

Triagem fitoquímica de extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão

Phytochemical screening of extract obtained from the fungus *Penicillium purpurogenum* from polluted marine environment of Maranhão

Examen fitoquímico del extracto obtenido del hongo *Penicillium purpurogenum* del ambiente marino contaminado de Maranhão

Recebido: 28/06/2020 | Revisado: 01/07/2020 | Aceito: 03/07/2020 | Publicado: 16/07/2020

Amanda Mara Teles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5068-4696>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: damarateles@hotmail.com

Gustavo Oliveira Everton

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0457-914X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: gustavooliveiraeverton@gmail.com

Adenilde Nascimento Mouchrek

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3270-1437>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: adenild@bol.com.br

Carla Junqueira Moragas Tellis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9834-2874>

Fundação Oswaldo Cruz, Brasil

E-mail: carlamoragas@yahoo.com.br

Geusa Felipa de Barros Bezerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1016-8563>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: geusabezerra@gmail.com

Fernando Almeida de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0047-6159>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: fernandoalsouza@gmail.com

Ana Paula Silva de Azevedo-Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6404-0103>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: apsazevedo@yahoo.com.br

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2783-362X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: m.desterro.soares@gmail.com

Resumo

Este artigo objetiva o isolamento, identificação e triagem fitoquímica de um extrato preparado do fungo *Penicillium purpurogenum*, obtido de um ambiente marinho poluído de São Luís-MA. A pesquisa foi realizada na Laguna da Jansen localizada no município de São Luís, Maranhão, Brasil. Foram realizadas 4 coletas do sedimento no período de maio a setembro de 2017, no período matutino. As amostras foram obtidas de uma profundidade de até 73,5 cm com auxílio de uma draga metálica. A identificação do fungo seguiu metodologias de isolamento e identificação com triagem fitoquímica dos extratos preparados por metodologia de Matos. A identificação confirmou a presença de *Penicillium purpurogenum*. A triagem fitoquímica dos extratos exibiu a presença de substâncias como: fenóis, alcaloides, triterpenos, flavononas, flavonóis, catequinas, flavonóides e esteróides, sendo de interesse no estudo de atividades biológicas a serem realizadas com os extratos obtidos do fungo em estudo. Por fim, os resultados obtidos neste estudo asseguram uma classe de constituintes químicos, identificados pela triagem fitoquímica, que encorajam estudos de atividades biológicas com os extratos obtidos assegurando um potencial de aplicabilidade do bioproduto.

Palavras-chave: *Penicillium*; Fitoquímica; Extrato.

Abstract

This article aims to isolate, identify and screen phytochemistry a prepared extract of the fungus *Penicillium purpurogenum*, obtained from a polluted marine environment of São Luís-MA. The research was conducted at Laguna da Jansen located in the municipality of São Luís, Maranhão, Brazil. Four sediment collections were performed from May to September 2017, in the morning period. The samples were obtained from a depth of up to 73.5 cm with the aid of a metal dredger. The identification of the fungus followed methodologies of isolation and identification with phytochemical screening of extracts prepared by Matos

methodology. Identification confirmed the presence of *Penicillium purpurogenum*. Phytochemical screening of extracts exhibited the presence of substance phenols, alkaloids, triterpenes, flavanones, flavanols, catechins, flavonoids and steroids, being of interest in the study of biological activities to be performed with the extracts obtained from the fungus under study. Finally, the results obtained in this study ensure a class of chemical constituents, identified by phytochemical screening, which encourage studies of biological activities with the extracts obtained ensuring a potential for applicability of the bioproduct.

Keywords: *Penicillium*; Fitochemistry; Extract.

Resumen

Este artículo tiene como objetivo aislar, identificar y examinar la fitoquímica un extracto preparado del hongo *Penicillium purpurogenum*, obtenido de un ambiente marino contaminado de San Luis-MA. La investigación se llevó a cabo en Laguna da Jansen ubicada en el municipio de San Luís, Maranhão, Brasil. De mayo a septiembre de 2017 se realizaron cuatro colecciones de sedimentos en el período matutino. Las muestras se obtuvieron a partir de una profundidad de hasta 73,5 cm con la ayuda de una draga de metal. La identificación del hongo siguió metodologías de aislamiento e identificación con cribado fitoquímico de extractos preparados por la metodología Matos. La identificación confirmó la presencia de *Penicillium purpurogenum*. El cribado fitoquímico de extractos exhibió la presencia de sustancias como fenoles, alcaloides, triterpenos, flavonoides, flavonols, catequinas, flavonoides y esteroides, siendo de interés en el estudio de las actividades biológicas a realizar con los extractos obtenidos de los hongos en estudio. Por último, los resultados obtenidos en este estudio aseguran una clase de componentes químicos, identificados por cribado fitoquímico, que fomentan estudios de actividades biológicas con los extractos obtenidos asegurando un potencial de aplicación del bioproducto.

Palabras clave: *Penicillium*; Fitochemistry; Extracto.

1. Introdução

Fungos, plantas e bactérias são os principais reinos da vida com metabolismo secundário bem desenvolvido. Diversos metabólitos secundários já foram descritos como em estudos que descrevem novos metabólitos fúngicos, sendo observada também uma aceleração significativa nas duas últimas décadas em relação às bactérias que tradicionalmente têm sido a fonte mais rica de produtos naturais microbianos (Nett et al., 2009; Bérdy, 2012).

A ampla diversidade de espécies de fungos pode sofrer uma diversidade de mutações apontando assim para um potencial quase ilimitado de variações metabólicas. O sucesso ecológico dos fungos filamentosos na colonização de praticamente todos os habitats do planeta deve-se à sua capacidade de implantar séries de metabólitos secundários em conjunto com suas formas de vida penetrantes e absorventes, sendo capazes de sobreviver até mesmo em ambientes poluídos (Bills&Gloer, 2017).

A produção de metabólitos secundários por fungos é realizada em diversos habitats e a maioria das espécies produz vários tipos de metabólitos secundários, sua expressão ocorre devido ao ciclo de vida e pelo ambiente em que este inserido. A extração de metabólitos de fungos necessita ser mais explorada, pois compostos potencialmente úteis podem ser perdidos, deixando de serem descobertos, devido a não utilização de algumas espécies (Bräse et al., 2013). Um dos habitats que precisam ser mais explorados é o ambiente marinho poluído podendo gerar microrganismos mais resistentes capazes de produzir metabólitos ainda não descritos na literatura e com possíveis atividades biológicas.

O ambiente marinho poluído como lagos costeiro, que é o espaço geográfico de interação com ar, mar e terra, incluindo seus recursos renováveis ou não, abrangendo uma faixa marítima e outra terrestre. O ambiente poluído acaba refletindo os fatores físicos e químicos, sendo considerados abertos e dinâmicos, verificamos que entre os ambientes terrestres e marinhos, estão sujeitas às influências dos dois sistemas, o que as tornam altamente dinâmicas (Ferreira et al., 2013).

Esse ambiente poluído pode modificar os microrganismos presentes fazendo com que sejam produtores de metabólitos que possuem diversas propriedades biológicas em que fungos presentes nesse ambiente podem gerar substâncias já descritos na literatura (Pavan et al., 2015) ou novos compostos capazes ou não de ter atividade biológica.

Desta forma, este estudo teve por objetivo o isolamento, identificação e triagem fitoquímica de um extrato preparado do fungo *Penicillium purpurogenum*, fungo filamentoso tem a capacidade de sintetizar uma variedade de substâncias com potencial biotecnológico e bioativas (Dhake&Patil, 2005; Shalom et al.; Fritz et al.; Shalom et al., 2008), obtido de um ambiente marinho poluído de São Luís-MA.

2. Metodologia

2.1. Área do estudo

A pesquisa foi realizada na Laguna da Jansen localizada no município de São Luís, Maranhão, Brasil e cujas coordenadas geográficas são: 2°29'56"S 44°17'59"W. Encontra-se na região noroeste, há 4,0 km de distância do Centro Histórico – Patrimônio Histórico da Humanidade. Próximo a ela estão localizadas as praias de maior fluxo de banhistas, a Ponta D'Areia, Ponta do Farol, Marcela e Calhau

2.2. Coleta do sedimento

Foram realizadas 4 coletas de maio a setembro de 2017 todas realizadas no período matutino. Cada ponto de coleta foi devidamente georreferenciado com o auxílio de um GPS sendo suas coordenadas: Norte (Coordenada geográfica: 2°30'13"S 44°17'53"O), Sul (Coordenada geográfica: 2°29'35"S 44°17'52"O), Leste (Coordenada geográfica: 2°29'37"S 44°18'10" O) e Oeste (Coordenada geográfica: 2° 29'35"S 44°17'52"O). Todos os procedimentos em campo seguiram Instituto Nacional de Biodiversidad; Museo Nacional de Costa Rica (2009) e Santos (2009).

As amostras foram obtidas de uma profundidade de até 73,5 cm, foram coletadas usando uma draga metálica e transferidas para recipientes de plástico. Em seguida, foram colocadas em bolsa plástica zipada e transportadas até o Laboratório de Micologia do NIBA/DEPAT/CCBS/UFMA, onde foram processadas.

2.3. Isolamento de fungos no sedimento de ambiente marinho poluído

Para todas as análises microbiológicas foram utilizadas as técnicas descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods APHA (2005). As amostras chegaram no laboratório e foram coletadas em tubos Falcon estéreis de 50 mL e preservadas em uma caixa de gelo e processadas em 4 horas. Resumidamente, 1,0 g da amostra foram suspensos em 4,5 mL de água destilada estéril, homogeneizada por vórtice por 1 min, 1,0 mL desta suspensão foram transferidos para 9,0 mL de água destilada estéril realizando diluições seriadas até 10⁻⁵. As diluições ficaram em repouso por 30 minutos e alíquotas de 100 µL foram espalhadas no meio ágar batata acrescido de 3% de sal,

suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de polimicina B para inibir bactérias Gram negativas. As placas foram incubadas estufa a 28°C por sete dias. As colônias com características do fungo *P. purpurogenum* foram transferidas para uma nova placa de Petri do meio ágar batata acrescido de 3% de sal para purificação.

2.4. Identificação do fungo purificado

Após os sete dias de incubação a 28°C foram observadas as características macroscópicas como: textura e coloração do anverso e reverso de cada colônia. Para as características microscópicas utilizou-se a técnica de microcultivo segundo Ridell (1950) modificado, seguindo os protocolos já existentes do Laboratório de Micologia (NIBA/DEPAT/CCBS/UFMA) (Bezerra et al., 2014a. Bezerra et al., 2014b; Bezerra et al., 2014c) para assegurar a visualização das estruturas de frutificação de cada fungo. Com este achado microscópico somado às observações macroscópicas e, também, auxílio de atlas, literatura especializada, chaves taxonômicas, chegou-se à taxonomia do fungo. No qual foi depositado na Coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão.

2.5. Preparação dos extratos do fungo

A linhagem do fungo foi primeiramente inoculada em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) com 3% e incubado a 28°C por 7 dias até completo crescimento. Após este período, círculos superficiais de ágar contendo o micélio foram transferidos das colônias, com o auxílio de uma seringa plástica, para um balão de fundo redondo contendo 250 mL do meio de cultura original líquido do fungo (caldo Sabourad 3% de sal), onde foram deixados para fermentação por 28 dias a 28°C com agitação a 150 rpm em mesa agitadora. O caldo fermentado (3 L) foi filtrado e separado a o caldo da biomassa micelial.

O caldo obtido neste procedimento foi adicionado a Etanol PA na proporção 1:3 e permaneceu sob agitação constante a 115 rpm por um período de 24 horas, sendo filtrado e concentrado em evaporador rotatório a 45°C. Com o objetivo de obter um extrato de média/alta polaridade dos metabólitos produzidos pelo fungo, o extrato concentrado obtido foi adicionado de acetato de etila e particionado, após 24 horas, em funil de separação de líquidos, resultando na obtenção de uma fase orgânica (AcOEt) e uma fase aquosa. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica, após concentração em evaporador rotatório, foi liofilizada, originando o extrato de AcOEt (FR1).

A biomassa micelial do fungo, após total remoção do meio de cultura original líquido por filtração a vácuo, foi acondicionado em frasco reagente âmbar contendo 250 mL etanol 70% e mantido sob agitação constante a 115 rpm por 24 horas. O extrato obtido foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até remoção total do etanol. À parte aquosa remanescente, foi adicionado acetato de etila na proporção 1:3, que após separação em funil de separação e eliminação do solvente em evaporador rotatório e liofilização, levou a obtenção do extrato de AcOEt (FR2).

2.6. Triagem fitoquímica do extrato

Os extratos FR1 (extracelular) e FR2 (intracelular) foram submetidos a testes químicos baseados na metodologia apresentada por Matos (2009), para detecção de fenóis e taninos (reação com cloreto férrico); antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas (variação de pH utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio); flavonóis, flavanonas, flavonóis e xantonas (reação com magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado). Os resultados obtidos em cada teste (tubo de ensaio) foram avaliados qualitativamente através de reações coradas e formação de precipitado

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação do fungo

O método tradicional e comumente utilizado para identificar espécie de *Penicillium* ainda é a visualização das características morfológicas da colônia (textura, cor, diâmetro da colônia), em um específico meio, e as estruturas reprodutivas (tipos e tamanhos do conídio e conidióforo). A identificação do fungo em estudo onde foram realizadas e analisadas, tendo em conta diversos parâmetros como os macroscópicos e a microscopia. Como foi comprovada identificação do fungo.

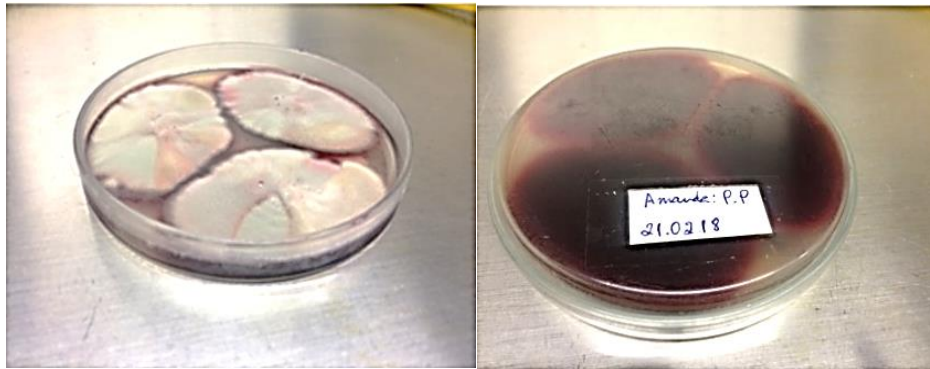
A definição de espécies e para a realização de um estudo epidemiológico, é importante dispor de um método confiável. Os testes padrão bioquímicos, microscopia, características de colônias têm sido convencionalmente utilizados para identificar espécies de fungos, mas estes métodos são dispendiosos, morosos, e requer habilidades especiais (Shin et al. 2003).

Segundo Fischer&Dott (2002) micologistas com experiência limitada acabam por questionar o uso da morfologia durante uma identificação, eles relatam que se os métodos

padrões como: inoculação, repicagem, incubação e preparação de lâminas são aplicadas corretamente os resultados serão consistentes e a maioria dos isolados pode ser identificada.

Verificou-se que através de testes macroscópicos as colônias obtidas no meio Ágar Batata foram observadas não somente a cor, mas também a textura do micélio (Figura 1).

Figura 1. *P. purpurogenum* isolado de sedimento da Laguna da Jansen de São Luís, MA.



Fonte: Autores.

Foi observado na Figura 1, a difusão de colorantes de cor avermelhada, indicando a produção de corantes pelo micro-organismo, verificamos também o diâmetro da colônia (28 mm), observamos que a coloração obtida na superfície da colônia é esverdeada e no seu verso uma coloração vermelha demonstrando uma produção de corante visível características do *P. purpurogenum*.

Identificação de fungos utilizando caracteres macro e micro morfológico é bastante complicada e requer grande experiência mesmo entre os profissionais da área pois os fungos variam muito a sua morfologia e dependem das condições ambientais e do substrato. Adotando as melhores técnicas de padronização para realização a identificação adequada ainda assim podemos ter uma resposta falsa, pois os fungos dentro de um mesmo gênero têm pequenas diferenças morfológicas que só podem ser reconhecidas por experiente micologistas (Fischer&Dott, 2002).

Com análise do microcultivo cultivado em lâmina e da coloração das estruturas na Figura 1, foram observadas as seguintes estruturas: conidióforo ou estipe, métula, esterigmas dispostos na forma de pincel e conídios em cadeia. Resultados encontrados no macro e microcultivo enfatizam a autenticação da linhagem de *P. purpurogenum*, após sua identificação foi realizado a preparação do extrato extra e intracelular de acetato de etila.

3.2. Triagem fitoquímica

O extrato extracelular apresentou maior poder de extração de metabólitos secundários, onde se destacam fenóis, alcalóides, triterpenos flavononas, flavonóis, xantonas, além de flavanonóides, catequinas e estereoides como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de metabólitos secundários identificados extratos FR1 e FR2 do fungo *P. purpurogenum* de ambiente marinho poluído.

Extratos	Metabólitos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
FR1	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
FR2	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

Nota: 1:fenóis;2:taninos;3:alcaloides;4:triterpenos;5:cumarinas;6:antocianinas;7:antocianidinas;8:flavononas;9:flavonois;10:xantonas;11:chalconas;12:auronas;13:leucoantocianidinas;14:catequinas;15:flavonóides;16: esteroides;+:presença;-:ausência;FR1: extrato extracelular de *P. purpurogenum*;FR2: extrato extracelular de *P. purpurogenum*; Fonte: Autores.

Através das análises químicas dos extratos foi possível identificar a presença de diversas classes de metabólitos secundários que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória.

Embora os mesmos componentes encontrados no extrato FR1 foram observados no extrato FR2 também pela metodologia de Matos (2009) pode se observar que a presença dos metabólitos secundários se demonstrou mais intensa no extrato FR1. Existem diversos fatores que podem interferir no teor de metabólitos secundários dos fungos, dos quais os compostos fenólicos fazem parte. Dentre eles estão a temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição ambiental e ataque de patógenos.

4. Considerações Finais

Por fim, os resultados obtidos neste estudo asseguram uma classe de constituintes químicos, identificados pela triagem fitoquímica, que encorajam estudos de atividades biológicas com os extratos obtidos assegurando um potencial de aplicabilidade do bioproduto.

Referências

- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385-395.
- Bezerra, G. F. D. B., Almeida, F. C., Neto da Silva, M. A. C., Nascimento, A. C. B., Meireles Guerra, R. N., Viana, G. M. D. C., & Brandão Nascimento, M. D. D. S. (2014a). Respiratory allergy to airborne fungi in São Luís–MA: clinical aspects and levels of IgE in a structured asthma program. *Journal of Asthma*, 51(10), 1028-1034.
- Bezerra, G. F. D. B., Gomes, S. M., Silva, M. A. C. N. D., Santos, R. M. D., Muniz Filho, W. E., Viana, G. M. D. C., & Nascimento, M. D. D. S. B. (2014b). Diversity and dynamics of airborne fungi in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(1), 69-73.
- Bezerra, G. F. B., da Silva, M. A. C. N., dos Santos, R. M., Haidar, D. M. C., Muniz Filho, W. E., Rosa, I. G., & Nascimento, M. D. D. S. B. (2014c). Avaliação da resposta IgE para o entendimento do papel de fungos do ar na alergia respiratória em crianças. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, 2(3), 119-124.
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *The Fungal Kingdom*, 1087-1119.
- Brae, S., Endnas, A., Keck, J., & Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabo] ites. *Chem Rev*, 109, 3903-3990.
- Dhake, A. B., & Patil, M. B. (2005). Production of β -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(2), 170-176.
- Federation, W. E., & American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.

Ferreira F. S. (2013). Uso de índices de qualidade da água como subsídios na sustentabilidade da Laguna da Jansen.

Fischer, G., & Dott, W. (2002). Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory—compilation of basic techniques for the identification of fungi. *International journal of hygiene and environmental health*, 205(6), 433-442.

Matos, F. D. A. (1997). *Introdução à fitoquímica experimental*. edições UFC.

Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.

Pavan, M. E., Pavan, E. E., López, N. I., Levin, L., & Pettinari, M. J. (2015). Living in an extremely polluted environment: clues from the genome of melanin-producing *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34melT. *Applied and environmental microbiology*, 81(15), 5235-5248.

Riddell, R. W. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42(2), 265-270.

Shalom, G., Pratten, J., Wilson, M., & Nair, S. P. (2008). Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the α -1, 3-glucanase from the filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. *Protein expression and purification*, 60(2), 170-175.

Shin, J. H., Sung, J. H., Park, S. J., Kim, J. A., Lee, J. H., Lee, D. Y., & Yang, J. M. (2003). Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(6), 857-865.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Amanda Mara Teles – 12,5%

Gustavo Oliveira Everton– 12,5%

Adenilde Nascimento Mouchrek– 12,5%

Carla Junqueira Moragas Tellis– 12,5%

Geusa Felipa de Barros Bezerra– 12,5%

Fernando Almeida Souza– 12,5%

Ana Paula Silva de Azevedo-Santos– 12,5%

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento – 12,5%