

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ISOLAMENTO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Aspergillus niger* DE *Hancornia speciosa* (mangabeira)

João Victor Andrade, Giulia Stavrakas Miranda, Alexandre Rodrigues Teodoro da Costa, Rafaela Souza da Silva, Mário Ferreira Conceição Santos.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitario, S/N - Guararema, Alegre - ES, 29500-000 – Alegre, ES, Brasil,
joao.andrade.75@edu.ufes.br, giustavarakas@gmail.com, alexandre.r.costa@edu.ufes.br,
rafaela.s.silva@edu.ufes.br, mariosantos408@gmail.com.

Resumo

O presente estudo investigou o gênero *Aspergillus*, que produz ácidos orgânicos, como o cítrico, oxálico e tartárico. Por meio de técnicas como a cromatografia e ressonância magnética, os ácidos foram isolados e identificados. A capacidade desse endófito em produzir esses ácidos abre novas perspectivas para estudos sobre a interação *A. niger* com a espécie hospedeira, mangabeira com possíveis aplicações tecnológicas na agricultura. A descoberta de um simbiote capaz de produzir ácidos orgânicos responsáveis pela solubilização de fosfatos abre uma nova possibilidade para o manejo dessa cultura.

Palavras-chave: Gênero *Aspergillus*. Ácidos orgânicos. Cromatografia. Aplicações tecnológicas. Agricultura.

Área do Conhecimento: Química.

Introdução

O gênero *Aspergillus*, pertencente à classe de fungos mitospóricos, é amplamente encontrado na natureza, presente em frutas, vegetais e qualquer outro substrato decomposto que é capaz de prover o alimento necessário para o seu crescimento (EL-HAWARY *et al.*, 2020). Tais fungos são metabolicamente muito versáteis e diversas espécies têm sido descritas como produtores de metabólitos de interesse (SARROCO *et al.*, 2022). Dentre eles, pode-se destacar a produção de ácidos orgânicos por *Aspergillus sp.* que são de interesse comercial, como, por exemplo, o ácido cítrico. Atualmente, a produção comercial de ácidos orgânicos é conduzida através de fermentação utilizando a espécie *Aspergillus niger* (CAIRNS *et al.*, 1991). A produção de substâncias de interesse comercial através de fontes renováveis tem ganhado visibilidade, e a utilização de fungos é uma ótima alternativa devido ao crescimento acelerado em curto período, e a possibilidade de alterar as condições de cultivo a fim de produzir metabólitos específicos (ARAUJO, 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus sp.* receberam destaque pela produção de ácidos orgânicos, entretanto, os ácidos de maior interesse nas pesquisas conduzidas são o ácido cítrico e o ácido oxálico (BAKRI *et al.*, 2019). Um número grande de mecanismos tem sido proposto em relação à regulação e síntese, enfatizando a produção desses ácidos, processo que é altamente influenciado pelas condições ambientais como o pH do meio de cultura e fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes (PAPAGIANNI *et al.*, 2005). Há também pesquisas sobre a habilidade dos ácidos orgânicos em solubilizar fosfato inorgânico (CUNNINGHAM e KUIACK, 1992). Assim este trabalho teve por objetivo o isolamento desses ácidos orgânicos através das técnicas cromatográficas e identificação por RMN de ¹H e ¹³C

Metodologia

As análises por HPLC foram realizadas em um equipamento Shimadzu, acoplado ao detector SPD-M2DA 330 PhotoDiodo-Array Ultra-Violet (PDA-UV), coluna analítica de fase reversa Shimpack (ODS, 5 µm, 150 x 4,6 mm) e semi-preparação de fase reversa Phenomenex (ODS, 10 µm, 250 X 10,0 mm). A detecção foi efetuada por UV com um comprimento de onda de 214 nm para a determinação dos

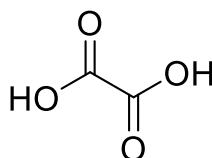
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ácidos orgânicos. As análises por RMN uni e bidimensionais foram realizadas num espectrômetro Varian INOVA-500 a 500 MHz para o núcleo de ^1H e 125 MHz para o núcleo de ^{13}C , o TMS foi utilizado como referência interna. As amostras foram dissolvidas em MeOH (metanol) e os espectros de massa foram obtidos num espectrômetro QTOF (Micromass) em modo de ionização positiva por electrospray (ESI). O fungo *Aspergillus niger* foi isolado das folhas de *Hancornia speciosa* (mangabeira). O fungo foi cultivado em meio líquido composto pelo suco da fruta da mangabeira por 28 dias. Após este período o micélio do fungo foi separado do caldo fermentado que foi extraído com acetato de etila fornecendo 500 mg de extrato bruto. O extrato bruto foi fracionado por coluna cromatográfica com 50g sílica gel utilizando acetato de etila / metanol nas seguintes proporções (100% acetato/ 0% metanol; 70% acetato de etila / 30 % metanol; 60% acetato de etila / 40% metanol e 50% acetato de etila/ 50% metanol). A fração 60% acetato de etila / 40% metanol se mostrou pura quando analisada por HPLC resultando no isolamento do composto **1**. A fração 50% acetato de etila/ 50% metanol foi purificado por HPLC utilizando 65% de metanol e 35% de água resultando no isolamento dos compostos **2** e **3**. Todas as amostras foram preparadas e dissolvidas com o MeOH grau HPLC que é um solvente ultra pura, foram dissolvidas 1 mg de amostra com 1 ml de solvente.

Resultados

A fração 60% acetato de etila / 40% metanol, obtida a partir do fracionamento do extrato acetato de etila do fungo *A. niger* cultivado em meio de suco de mangaba, foi analisada por RMN de ^1H e apresentou apenas um sinal em δ_{H} 6,33 (s) sugerindo que se tratava de ligação de hidrogênio a heteroátomo. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de um sinal em δ_{C} 161,1 indicando a presença de uma carbonila, sendo esta fração denominada composto **1** identificado como sendo o ácido oxálico (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura do ácido oxálico

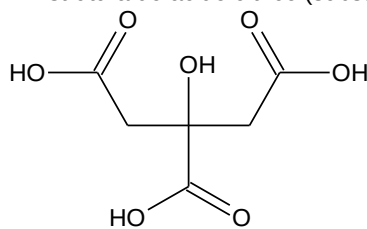


Fonte: Os Autores, 2020.

A fração 50% acetato de etila/ 50% metanol obtida por coluna cromatográfica foi purificado por HPLC o que resultou em duas frações. A fração 1, apresentou aspeto cristalino e foi submetida à análise de RMN de ^1H , verificando que possui uma substância majoritária em sua composição (Figura 2). O espectro de RMN de ^1H (figura 3) apresentou dois sinais em δ_{H} 2,77 (d, $J=15,5$ Hz) e 2,88 (d, J_{H} geminal $=15,5$ Hz). O espectro HMBC (Figura 4) apresentou correlações de sinais em δ_{H} 2,77 (d, $J=15,5$ Hz) com δ_{C} 176,0; 173,0; 73,0 e 44, sugerindo tratar-se do ácido cítrico, uma vez que este ácido é produzido por várias espécies de *A. niger*. O espectro de massas (Figura 5) obtido por electrospray modo positivo, mostrou os íons 193 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e 215 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e os fragmentos 175 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e 149 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$ característicos do ácido cítrico, estes dados são consistentes com os dados espectroscópicos presentes na literatura.

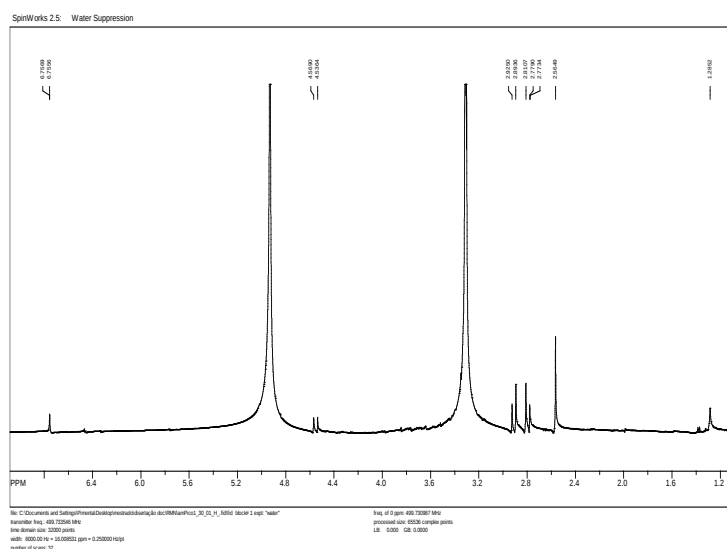
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 - Estrutura do ácido cítrico (substância 3)



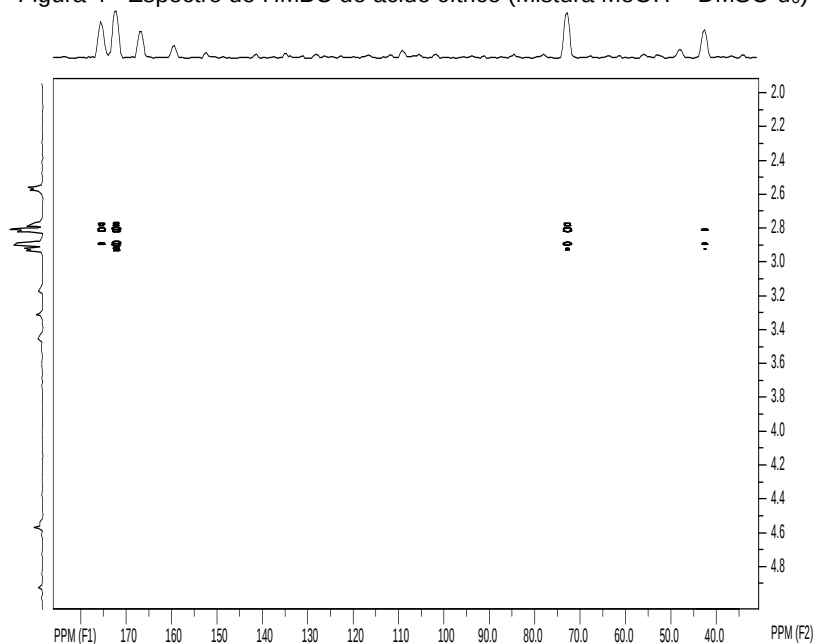
Fonte: Os autores, 2020.

Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do ácido cítrico (Mistura MeOH + $\text{DMSO}-d_6$)



Fonte: Os Autores, 2020.

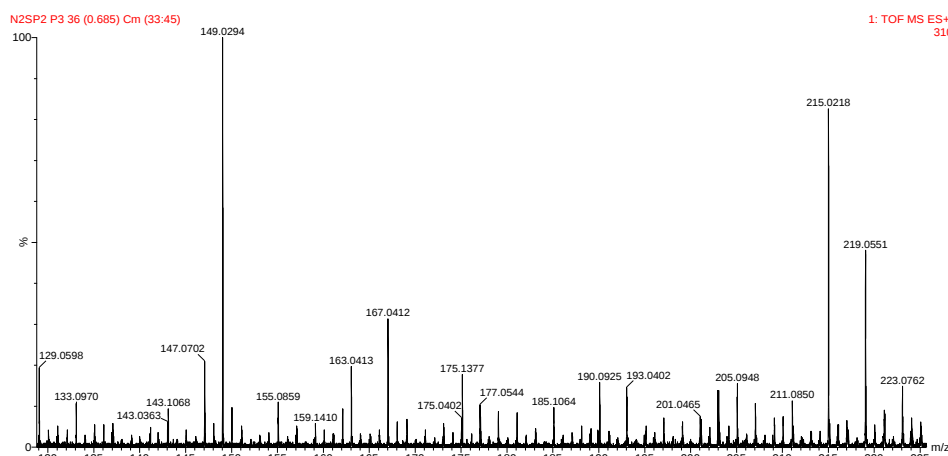
Figura 4 - Espectro de HMBC do ácido cítrico (Mistura MeOH + $\text{DMSO}-d_6$)



Fonte: Os Autores, 2020.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

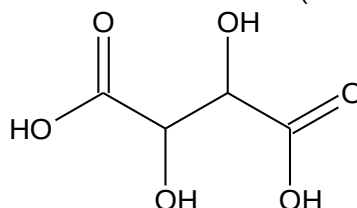
Figura 5- Espectro de Massas do ácido cítrico obtido por eletrospray no modo positivo



Fonte: Os Autores, 2020.

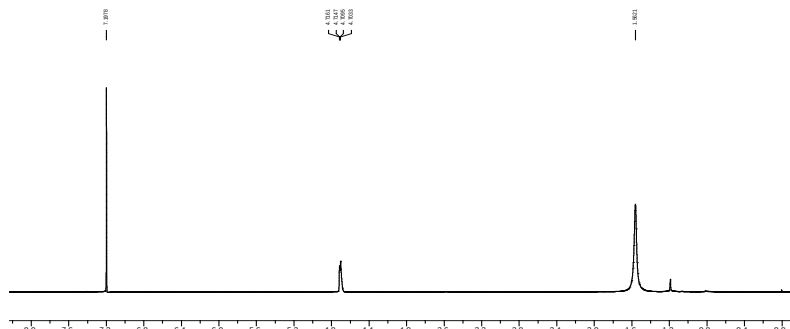
A fração 50% acetato de etila/ 50% metanol obtida por coluna cromatográfica foi purificado por HPLC o que resultou em duas frações. A fração 2 apresentou aspeto cristalino e foi submetida à análise de RMN de ^1H , verificando que possui uma substância majoritária em sua composição (Figura 6). O espectro de RMN de ^1H da substância (Figura 7) apresentou apenas um sinal δ_{H} 4,72 (s), como várias espécies de *A. niger* são produtoras de ácidos orgânicos, a comparação destes dados com valores de ácidos produzidos pelo gênero *Aspergillus* sugeriu que este ácido é o ácido tartárico.

Figura 6 - Estrutura da substância 4 (ácido tartárico)



Fonte: Os autores, 2020.

Figura 7- Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz, do ácido tartárico (CDCl_3)



Fonte: Os autores, 2020.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

O trabalho desenvolvido permitiu identificar que a cepa de *A. niger* isolada das folhas da mangabeira produz os ácidos orgânicos, oxálico, cítrico e tartárico. Através dessa extração foram obtidos 159 mg do Composto 1, já o composto 2 foi obtido aproximadamente 75 mg e composto 3 foi obtido cerca de 100 mg. Vários trabalhos (MENDES *et al.* 2003) têm relatado a importância destes ácidos na solubilização de fosfatos no solo, estando este fungo associado à mangabeira, uma planta característica de solos pobres. A descoberta de um simbiote capaz de produzir ácidos orgânicos responsáveis pela solubilização de fosfatos abre uma nova possibilidade para o manejo dessa cultura.

Conclusão

O trabalho realizado descobriu que o isolado de *Aspergillus niger* produz três ácidos orgânicos oxálico, cítrico e tartárico que podem ajudar na solubilização de fosfato no solo para a mangabeira durante a decomposição das folhas. A capacidade do endófito de produzir esses ácidos abre novas perspectivas para estudos da interação *A. niger/mangabeira*, com potencial para impactar o manejo de culturas comercialmente significativa.

Referências

- ARAUJO, N. C. de. **Estudo da variação do meio de cultura na produção de metabólitos secundários pelo fungo endofítico *Aspergillus niger***. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.
- BAKRI, M. M. Tri-calcium and zinc phosphates solubilization by *Aspergillus niger* and its relation to organic acids production. **BioNanoScience**, v. 9, n. 2, p. 238-244, 2019.
- CAIRNS, T. C., NAI, C., & MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal biology and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2018.
- CUNNINGHAM, J e; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, maio 1992.
- EI-HAWARY, S. S., MOAWAD, A. S., BAHR, H. S., ABDELMOHSEN, U. R., & MOHAMMED, R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. **RSC advances**, v. 10, n. 37, p. 22058-22079, 2020.
- PAPAGIANNI, M.; FRANK, W.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7178-7186, 2005.
- MENDES, G.O., SILVA, N.M.R.M., ANASTACIO, T.C., VASSILEV, N.B., RIBEIRO, J.I., SILVA, I.R., COSTA, M.D., 2003. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. **Microbial Biotechnology** 8, 930–939.
- SALIH, H.M., YAHYA, A.I., ABDUL-RAHEM, A.M. *et al.* Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. **Plant Soil**, v. 120, p. 181–185, 1989.
- SARROCCO, S., VICENTE, I., STAROPOLI, A., & VINALE, F. (2022). Genes Involved in the Secondary Metabolism of and the Biochemistry of These Compounds. **Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications**, p. 113-135, junho 2022.