

Análise por RMN de ¹H de metabólito secundário isolado do caldo fermentado de *Xylaria luteostromata* (Xylariaceae)

Isabella Mary Alves Reis¹; Alexsandro Branco²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isabella.alvesreis@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: branco@uefs.br

Palavras-chave: Xylariaceae, CLAE-DAD, RMN.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são consideradas importantes fontes de compostos bioativos e assim se destacam como precursores de novos fármacos. Sendo que, muitas ações terapêuticas destas plantas devem-se ao seu metabolismo secundário, cuja função está ligada principalmente à sobrevivência do vegetal (PETRINI, 1991).

A detecção de fungos endofíticos no interior de plantas sadias e a relação que estes microrganismos estabelecem com seus hospedeiros abrem novas perspectivas para o estudo das interações fungos-planta (VERMA, 2007). Desta forma, os endófitos têm atraído a atenção por serem considerados fontes promissoras de metabólitos secundários e consequentemente fontes geradoras de novos produtos bioativos.

Dentre os fungos endofíticos, a família Xylariaceae é considerada uma grande fonte de metabólitos secundários, apresentando diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Desta forma, a investigação química de fungos da família Xylariaceae é relevante e os aponta como fontes potenciais de produtos biotecnológicos, principalmente com propriedades farmacológicas.

As técnicas cromatográficas são utilizadas para separar os constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação ou obtenção da substância pura, sendo empregadas para a investigação química dos extratos brutos e caracterização dos metabólitos secundários de interesse (VOGEL, 1988).

Assim, pretende-se dar continuidade ao estudo de fungos endofíticos pertencentes à família Xylariaceae a partir da caracterização química dos extratos, em metanol e acetato de etila, de endófitos isolados de *Mikania laevigata* por Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e espectroscopia de massas (CLAE/MS/MS). Este estudo, somado aqueles anteriormente realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório de fitoquímica, poderá contribuir para o futuro isolamento de novos compostos bioativos e/ou para a formulação de um novo fitoterápico.

METODOLOGIA

O fungo endofítico *Xylaria luteostromata* foi previamente isolado da espécie *Mikania laevigata* (Asteraceae) (RIBEIRO, 2011), e armazenado segundo metodologia de Castellani (1967).

Quatro plugs desta espécie foram retirados das placas e incubados em erlenmeyer de 6L, contendo 4L de meio extrato de malte líquido 2%, por quatro semanas à 28°C, em estufa tipo D.B.O. sob o abrigo da luz. Esse experimento foi realizado em triplicata.

Após esse período, as amostras foram filtradas à vácuo em funil de Büchner, para obter, separadamente, os componentes do micélio e caldo fermentado. O caldo fermentado foi submetido à partição líquido-líquido, utilizando acetato de etila (AcOEt). Obteve-se o extrato bruto do caldo fermentado, que foi submetido à Cromatografia em Coluna (CC) e em seguida as frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada.

As amostras analisadas por CCD foram analisadas por CLAE-DAD. A fase móvel utilizada foi composta por solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 % e metanol na forma de gradiente. A temperatura da coluna foi mantida constante a 30 °C com um fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL, com detecção UV em 280 nm.

O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Líquido Merck-Hitachi LaChrom Elite, equipado com Detector de Arranjo Diodos (DAD). A coluna empregada foi LiCospher 100 RP18 (5 µm, com as dimensões 150 mm x 04 mm) Merck®.

Após investigação por CLAE-DAD a fração PCFXL 1 foi selecionada e submetida à análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, em aparelho Bruker® DRX-300, sendo a amostra solubilizada em metanol deuterado (MeOD), em tubos de 5 mm, e possuindo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *Xylaria luteostromata* em meio líquido apresentou crescimento satisfatório, após quatro semanas, de incubação em meio extrato de malte. Após a separação do micélio por filtração, passou-se a trabalhar apenas com o caldo fermentado. Esse procedimento visa obter apenas os metabólitos secundários secretados para o meio de cultura, o que do ponto de vista biotecnológico viabiliza uma produção em larga escala.

A cromatografia em coluna aberta preenchida com sílica gel do extrato bruto do caldo fermentado resultou em dez frações, devidamente identificadas como fração do Caldo Fermentado de *Xylaria luteostromata*, abreviadas como CFXL de 1 a 10.

Esse procedimento permitiu a purificação das substâncias presentes no extrato bruto obtido a partir do caldo fermentado de *Xylaria luteostromata*, ao separar os constituintes químicos do extrato por ordem de polaridade.

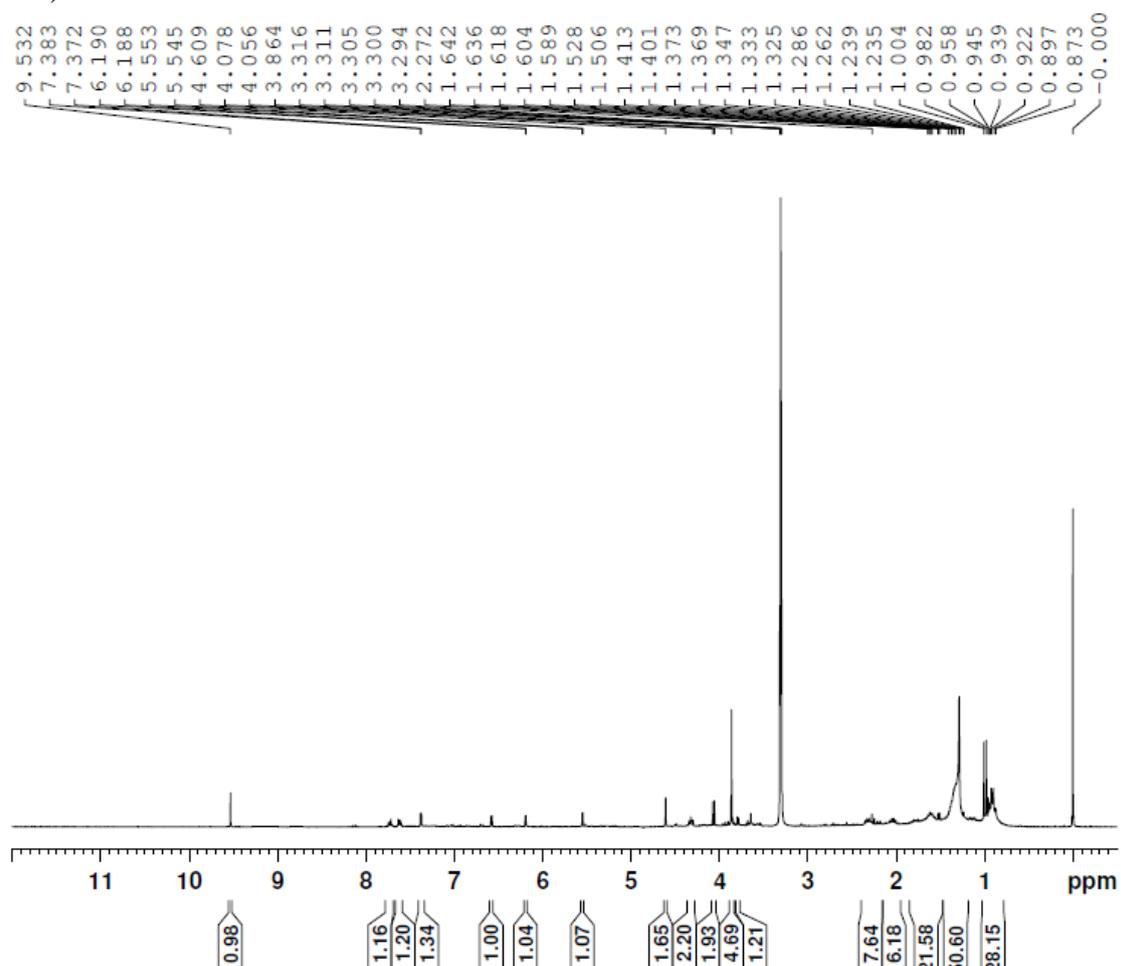
As frações que apresentaram o mesmo perfil, detectados em CCD, foram unidas, assim, reduziu-se o total de dez frações para três. Estas passaram a ser denominadas frações Purificadas do Caldo do Fermentado de *Xylaria luteostromata* 1, 2, 3 (PCFXL 1, 2 e 3).

A análise por CLAE-DAD das frações purificadas do extrato em acetato de etila do caldo fermentado de *Xylaria luteostromata*, possibilitou obter o perfil dos constituintes químicos presentes nas amostras.

A partir da análise de CLAE-DAD, a fração PCFXL 1 foi selecionada e analisada por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H. O espectro obtido encontra-se na Figura 1, sendo possível identificar os principais tipos de hidrogênios presentes na estrutura.

Em análise inicial são visualizados sinais na região de maior proteção, entre 0,8 e 1,4 ppm, correspondentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e/ ou metínicos, entre 4 e 5,5 ppm são visualizados sinais típicos de hidrogênios olefínicos. Em região de menor proteção, de 6 a 8 ppm, é notável a presença de sinais que sugerem hidrogênios aromáticos, por fim um sinal entre 9 e 10 ppm, pode indicar a presença de próton de hidroxila ligada a anel aromático.

Figura 1. Espectro de RMN ^1H da fração PCFXL 1, TMS como referência interna (300MHz, MeOD)



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu para o conhecimento científico a respeito da espécie *Xylaria luteostromata*, nunca antes analisada do ponto de vista químico, de forma que o endófito revelou ser uma fonte promissora de metabólitos secundários, assim como, as espécies do gênero *Xylaria* já estudados. O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) possibilitou a identificação de possíveis grupos químicos presentes no composto da fração analisada, tendo sido detectados hidrogênios metílicos, metilênicos, olefínicos e aromáticos.

REFERÊNCIAS

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS J.; HIRANO S. S. (Org). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer Verlag, 1991, p. 179-197.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, 1993, p. 214-216.

VERMA, V. C. et al. The Endophytic Mycoflora of Bark, Leaf, and Stem Tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, 2007, p. 119-125.

VOGEL, A. I. **Química Orgânica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S. A, 1988, v. 1, 172 p.

RIBEIRO, F.C.P. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae) e análise química dos extratos por CLAE-DAD**. 2011. 159 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2011.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.70, n.8, 1967, p. 181-184.