

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *NODULISPORIUM* ISOLADOS DE *MIKANIA LAEVIGATA* (ASTERACEAE)

Louise Queiroz Brito de Souza¹; Alexsandro Branco².

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lou.uefs.farm@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: branco@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Fungos endofíticos, *Nodulisporium*, *Mikania laevigata*.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de fungos em folhas assintomáticas é comumente relatada, demonstrando que, em relação simbiótica com os vegetais, tem por habitat os tecidos internos e subcuticulares das plantas, em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (ANDREWS *et al.* 1991). Tais microrganismos podem estar presentes em todos os tecidos de uma planta (PETRINI *et al.* 1992) e receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos.

A capacidade funcional de produção de metabólitos é uma característica peculiar desses fungos tornando-os fontes geradoras de novos produtos bioativos (SOUZA, 2004). Sabe-se que os endofíticos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de interesse biotecnológico (PIMENTEL; FIGURA; AUER, 2010).

Pela variedade existente de fungos endofíticos destaca-se a família *Xylariaceae* como uma grande produtora de metabólitos secundários (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Dentre os gêneros de relevância nesta família destacam-se *Xylaria*, *Nodulisporium*, *Daldinia* e *Hypoxylon*. Os fungos do gênero *Nodulisporium* são reconhecidos como importantes fontes de metabólitos secundários bioativos. Tetralois, diidroisocumarinas e cromonas estão entre os compostos naturais extraídos deste gênero (KAMISUKI *et al.* 2007).

Devido às novas perspectivas de investigação científica, a respeito dos metabólitos gerados das interações fungos-plantas, este trabalho objetiva a investigação fitoquímica de um isolado fúngico do gênero *Nodulisporium*, em busca da extração de compostos farmacologicamente ativos, sempre no intuito de encontrar novas alternativas terapêuticas.

METODOLOGIA

A amostra do fungo endofítico isolada foi colocada em meio de cultura BDA, suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) e Rosa de Bengala (25 µg/mL) e incubada em estufa tipo B.O.D, a 28°C, por quatro semanas. Após este tempo de incubação, o micélio foi separado do meio de cultura através de filtração. À massa micelial do fungo endofítico cultivado foi adicionado 100 mL de metanol, o extrato metanólico foi obtido após maceração por refluxo por duas horas. Para o fracionamento do extrato metanólico utilizou-se cromatografia em coluna aberta, tendo como fase estacionária sílica gel 60 F254, e como fase móvel, os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: n-hexano, acetato de etila, álcool etílico, álcool metílico e água destilada.

As frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) tendo como fase estacionária placas de sílica gel e como fase móvel, uma mistura de solventes contendo água destilada, clorofórmio e álcool metílico nas seguintes proporções: 5: 35: 60, respectivamente. Realizou-se também a análise das frações por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência equipado com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) utilizando o cromatógrafo líquido Merck-Hitachi Elite LaChrom, equipado com Detector de Arranjo de Diodos (DAD). A coluna utilizada foi LiCospher 100 RP18 (5 µm, com as dimensões 150 mm X 04 mm) Merck. Os componentes das amostras foram separados utilizando a seguinte fase móvel: H₂PO₄/H₂O 0,1% (A) e MeOH (B). Sendo que durante os 20 minutos iniciais, as

condições foram: A (75-0%) e B (25-100%), permanecendo assim por quatro minutos e em seguida, retornou as condições iniciais (75% A e 25% B) durante 10 minutos. O volume injetado das amostras foi de 20 μL com um fluxo de $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sendo a temperatura da coluna mantida em 30°C . As frações de interesse foram submetidas à Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) a fim de obter a caracterização química dos compostos das frações do extrato metanólico.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Os resultados relativos quanto ao desenvolvimento do endófito do gênero *Nodulisporium*, após quatro semanas de incubação, foram os seguintes: no erlenmeyer 1, não houve crescimento da massa micelial do endófito; erlenmeyer 2, o fungo apresentou o desenvolvimento de uma pequena massa micelial e no erlenmeyer 3, houve um maior crescimento do fungo. Os micélios foram devidamente pesados apresentando uma massa micelial total de 6,116 g.

Ao extrato metanólico obtido da massa micelial do endófito, preparou-se uma alíquota do mesmo para posterior análise por CLAE-DAD resultando no perfil cromatográfico da amostra evidenciado abaixo.

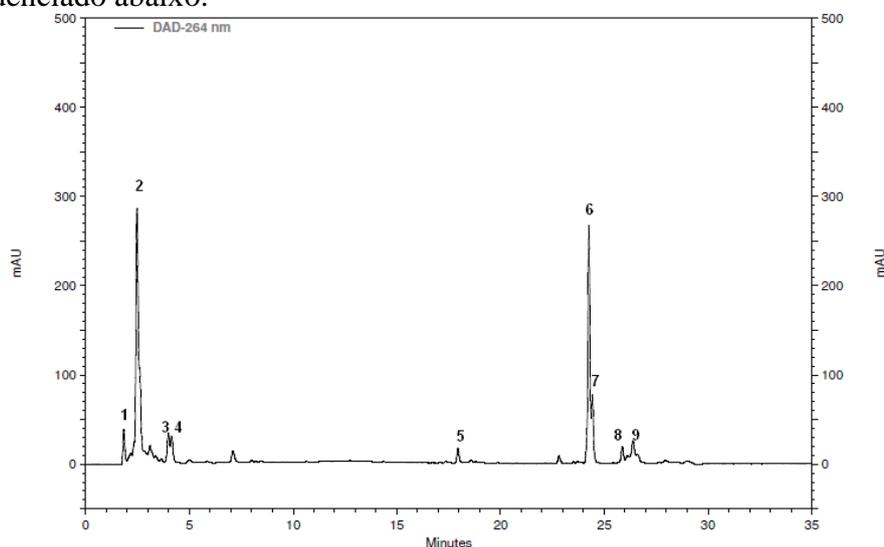


Figura 1: Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico *Nodulisporium*.

Posteriormente, os metabólitos do extrato metanólico foram separados por cromatografia em coluna aberta obtendo-se a separação de 10 frações. Em seguida, as mesmas foram analisadas por CLAE-DAD e CCD. As análises das 10 frações pelas técnicas cromatográficas foram obtidos os seguintes resultados: a fração 1 (derivada da fração do solvente n-hexano), não foram detectadas substâncias pelas técnicas cromatográficas. As frações 2, 3 e 4 (derivadas da fração n-hexano – acetato de etila) possuem perfis químicos semelhantes, sendo que as frações 2 e 3, por possuírem o mesmo perfil químico, foram unidas representando uma única fração. As frações 5, 6, 7 e 8 apresentaram a formação de cristais brancos, indicando a presença de açúcares originários do metabolismo primário do fungo. As frações 5 e 6 (derivadas da fração acetato de etila – álcool metílico) apresentaram perfis químicos semelhantes. As frações 7, 8, 9 e 10 (derivadas da fração acetato de etila – álcool metílico – água destilada) possuem similaridade química.

As frações 2 e 6 do extrato metanólico do fungo endofítico do gênero *Nodulisporium* foram enviadas para análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) para caracterização química. A interpretação dos espectros de RMN ^1H das frações do extrato metanólico do endófito forneceu a seguinte análise: foram observados sinais de duas regiões características para açúcares, uma região de hidrogênio ligado a carbono anomérico (4-5 ppm)

e a outra, composta por hidrogênios metilênicos ligados a oxigênio (3-4 ppm). Esta observação sugere a presença de carboidratos nas frações. Entretanto, outras análises espectroscópicas serão necessárias a fim de confirmar a presença de polissacarídeos. Os respectivos espectros das frações estão demonstrados abaixo.

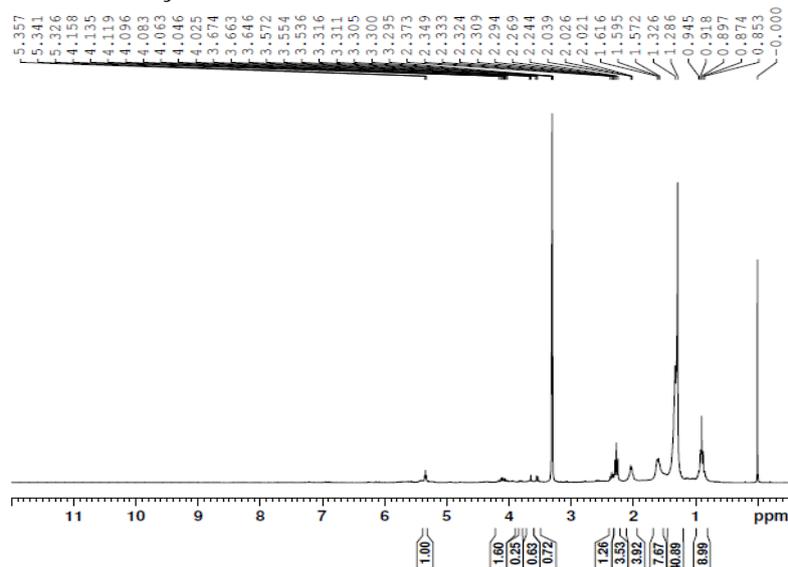


Figura 2: Espectro de RMN ^1H da Fração 2 do extrato metanólico do fungo endofítico do gênero *Nodulisporium*.

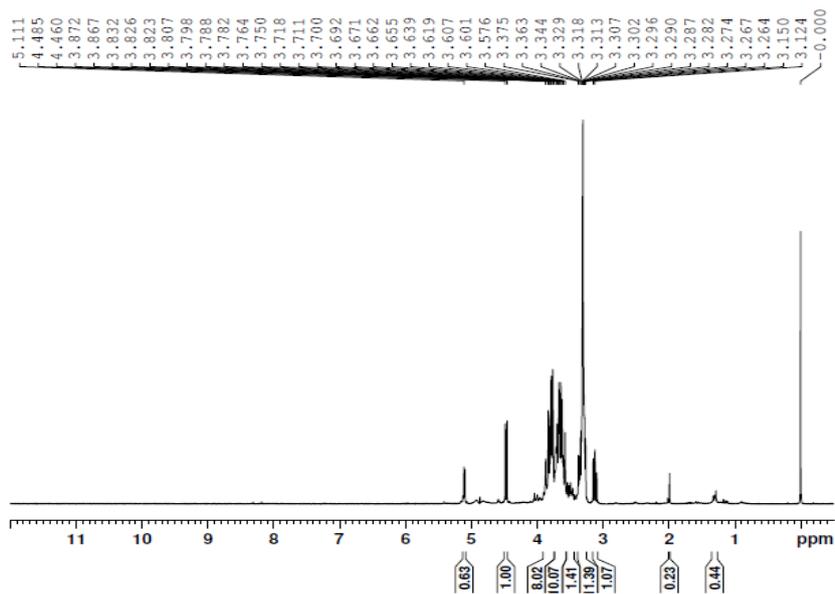


Figura 3: Espectro de RMN ^1H da Fração 6 do extrato metanólico do fungo endofítico do gênero *Nodulisporium*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse contexto, através das análises cromatográficas e espectroscópicas obtidas, não foram encontrados metabólitos secundários no extrato metanólico do fungo endofítico do gênero *Nodulisporium*.

Através do conhecimento obtido com o desenvolvimento desta pesquisa, foi observado que o cultivo de fungos endofíticos requer a criação de novas estratégias que possam de alguma forma promover o “estresse” do endófito para que este produza metabólitos secundários e que estas substâncias, possam representar a elucidação de novos compostos bioativos de interesse científico. Estes microrganismos necessitam de um meio apropriado para crescerem e produzirem seus metabólitos. Portanto, qualquer alteração neste meio, como mudança de pH, temperatura, contaminação por microrganismos, entre outros fatores,

favorecem para o pouco desenvolvimento do endófito, além de interferir na produção de metabólitos secundários de interesse científico.

REFERÊNCIAS

KAMISUKI, S. et al. Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase λ from a fungus, *Nodulisporium* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 3109-3114, 2007.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, v. 1, p. 185-186, 1992.

PIMENTEL, Ida Chapaval; FIGURA, Gisele; AUER, Celso Garcia. Endophytic fungi associated to *Pinus taeda* needles. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052010000100016&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 jan. 2013.

SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazônica*, v.43, n. 2, p.185-195, 2004.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, v. 260, p. 214-216, 1993.