

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Disynaphia filifolia* (HASSL.) R.M.KING & H.ROB. (ASTERACEAE)

Nathália da Silva Malaco (PIBIC/CNPq/Uem), Rodolfo Bento Balbinot (PIBIC/CNPq/Uem), Andressa Domingos Polli (PG), Adriano Borges Meniqueti (PG), João Alencar Pamphile (Co-Orientador), Debora Cristina Baldoqui (Orientador), e-mail: dcbaldoqui@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

1.06.01.05-8 QUÍMICA DOS PRODUTOS NATURAIS.

Palavras-chave: Produtos naturais, *Stenocarpella* sp., Oblongolideo G.

Resumo:

Os fungos endofíticos constituem uma fonte ainda pouco explorada e promissora de novas substâncias bioativas. Das 42 linhagens de fungos endofíticos obtidos das folhas de *Disynaphia filifolia* foi selecionado para o estudo químico o fungo de gênero *Stenocarpella* sp, sendo que até o momento o estudo deste levou à caracterização de uma substância denominada como *Oblongolideo G*, a qual está sendo relatada pela primeira vez neste gênero.

Introdução

Microrganismos endofíticos são fungos ou bactérias que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar doenças, nem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO, 2000).

Os fungos do gênero *Stenocarpella* estão entre os principais fungos patogênicos que atacam a cultura do milho no Brasil, com destaque para as espécies *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, as quais atacam todas as partes áreas das plantas e são transmitidas via sementes. Ambas as espécies causam podridões de colmo e de espiga em milho, e *S. macrospora* causa, também, manchas foliares.

O único relato de espécies do gênero *Stenocarpella* como endófito é o isolamento de *S. maydis* de *Platypodium elegans*, uma árvore ornamental da família Fabaceae. Neste trabalho foi avaliada a atividade antiparasitária e anticancerígena de extratos obtidos de fungos endofíticos associados a dezenove espécies vegetais coletadas no Panamá, sendo que o extrato obtido a partir do fungo endofítico *S. maydis* apresentou potente atividade antimalária e moderadas atividades antileishmania e antitripanossômica (MARTÍNEZ-LUIS, 2011).

Materiais e métodos

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 2016 no Parque do Guartelá e identificado pela Profa Dr^a. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O cultivo estacionário dos fungos foi realizado em estufa de crescimento EletroLab com controle de temperatura a 28°C por 21 dias. Como meios de cultivo, foram utilizados os meios de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) Himedia M096, Batata-Dextrose (BD) Himedia M403, Batata-Dextrose Himedia M403 suplementado (BD+), Meio-Mínimo (MM), e o Meio Completo (MC) todos em pH 6,8. Para suplementar o meio BD, foi utilizado caso aminoácido 1,00 g.L⁻¹ e extrato de levedura 1,00 g.L⁻¹. Já o MM foi preparado nas seguintes concentrações: NaNO₃ 60,00 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 15,00 g.L⁻¹, KCL 5,00 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 5,00 g.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 0,01 g.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0,01 g.L⁻¹, CuSO₄.7H₂O 0,01 g.L⁻¹. No momento da utilização, o meio MM foi diluído 1:10 com água destilada e acrescido de D-glucose na proporção de 20 g.L⁻¹. Por fim, o MC foi preparado nas concentrações: MM concentrado 100 ml.L⁻¹, peptona 2,00 g.L⁻¹, caseína hidrolisada 1,50 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,00 g.L⁻¹, solução de vitaminas 1,00 ml.L⁻¹, glicose 10,00 g.L⁻¹.

Obtenção dos extratos

Após o cultivo os meios fermentados foram filtrados em funil com gaze e em seguida centrifugados a 2750 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para funil de separação e submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila P.A. (3 x 80 mL). A fração orgânica resultante da extração foi tratado com secante (sulfato de sódio anidro), e a mesma, respectiva de cada meio foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo R-3000 Buchi, a 37°C, obtendo-se os extratos brutos de metabólitos secundários.

Estudo químico dos extratos

Os extratos dos metabólitos secundários, referentes a todos os meios de cultivo, foram submetidos à análise de RMN de ¹H para observação do perfil químico de cada um. Após a obtenção do espectro, optou-se por fazer uma coluna cromatográfica filtrante (Φ= 1,0 cm x h= 23 cm) do extrato referente ao meio BD (27,9mg) utilizando como fase estacionária sílica flash (0,035 – 0,070 mm) e hexano, acetato de etila e metanol como eluentes em gradiente crescente de polaridade. Também foram realizadas análises de UHPLC-HRMS em um Cromatografo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC), utilizando fonte de ionização por eletrospray, no modo negativo. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando UHPLC, com coluna C18 e como fase móvel utilizou-se acetonitrila e água.

Resultados e Discussão

Das 42 linhagens de fungos endofíticos obtidos das folhas de *Disynaphia filifolia*, quatro foram selecionadas, sendo que a partir da análise taxonômica e filogenética foi possível determinar que se tratava de espécies dos gêneros *Epicoccum sp* ou *Phoma sp*, *Colletotricum sp*, *Colletotricum sp* e *Stenocarpella sp*. Uma pesquisa mostrou que o fungo do gênero *Stenocarpella sp* é menos estudado, e que o extrato obtido da espécie *Stenocarpella maydis* é descrito na literatura com potente atividade anti-inseto, sendo assim, este fungo foi selecionado para investigação química.

A subfração DF29 BD 1-4 proveniente do cultivo em meio de batata dextrose, por não possuir massa suficiente para a realização das análises de RMN, foi submetida à análise de UHPLC-HRMS e, por meio do cromatograma de íons totais observou-se o íon desprotonado 277,1423 m/z com o valor teórico de 277,1440 m/z e erro de 4,3 ppm, quando comparado com dados da literatura, foi possível caracterizar a substância **DF29-1** como Oblongolideo G (figura1).

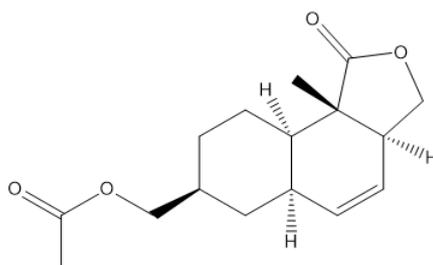


Figura 1: Estrutura do Oblongolideo G.

Este é o primeiro relato desta substância no gênero *Stenocarpella*. Entretanto, esta substância já foi previamente isolado no gênero *Phomopsis sp.* de *Melilotus dentata* (DAI et. al., 2005).

O metabolismo do fungo também foi avaliado em diferentes meios de cultivos: Meio Mínimo (MM), Meio Completo (MC) e Batata-Dextrose suplementado (BD+). Foi observado, através de análises espectrais de RMN de ¹H e de cromatografia em camada delgada, que as substâncias produzidas nos diferentes meios de cultura eram distintas. Dentre os meios utilizados, o extrato correspondente ao meio mínimo, apresentou características de um composto puro, portanto, este está sendo cultivado em maior quantidade com a finalidade de isolar e caracterizar tal composto.

Conclusões

O estudo do extrato de batata-dextrose (BD) do fungo endofítico *Stenocarpella sp.* levou até o momento a caracterização da substância Oblongolideo G, a qual está sendo descrita pela primeira vez neste gênero. Uma análise preliminar mostrou que os metabólitos produzidos por *Stenocarpella sp* são distintos nos diferentes meios de cultura utilizados.

Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação Araucária, a organização do evento e a UEM.

Referências

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. de. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 1, 15-16, 2000.

DAI, J.; KROHN, K.; GEHLE, D.; KOCK, I.; FLORKE, U.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. New oblongolides isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Melilotus dentata* from the shores of the Baltic Sea. **EurJOC**. 18, 4009-4016, 2005.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; CHERIGO, L.; HIGGINBOTHAM, S.; ARNOLD, E.; SPADAFORA, C.; IBAÑEZ, A.; GERWICK, W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **International Microbiology**, 14, 95-102, 2011.