

Caracterização química de extratos brutos obtidos de dois fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium*

Chemical characterization of crude extracts obtained from two endophytic fungi isolated from *Cochlospermum regium*

DOI:10.34117/bjdv7n4-639

Recebimento dos originais: 04/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

João Vitor Fonseca Montel

Graduando em Química Ambiental na Universidade Federal do Tocantins - UFT
Instituição: Universidade Federal do Tocantins - UFT
Endereço: Rua Badejós, S/N, Zona Rural, Caixa postal 66, Gurupi - TO, 77402-970, Brasil
E-mail: joaovitorfonseca11@gmail.com

Gleys Kellen Aquino de Moraes

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Tocantins - UFT
Instituição: Universidade Federal do Tocantins - UFT
Endereço: Rua Badejós, S/N, Zona Rural, Caixa postal 66, Gurupi - TO, 77402-970, Brasil
E-mail: gleys_kellen@mail.uft.edu.br

Sara Bruna de Souza Dantas

Mestre em Química pela Universidade Federal do Tocantins - UFT
Instituição: Universidade Federal do Tocantins - UFT
Endereço: Rua Badejós, S/N, Zona Rural, Caixa postal 66, Gurupi - TO, 77402-970, Brasil
E-mail: saradantasp@hotmail.com

Vanessa Mara Chapla

Doutora em Química pela Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituição: Universidade Federal do Tocantins - UFT
Rua Badejós, S/N, Zona Rural, Caixa postal 66, Gurupi - TO, 77402-970, Brasil
E-mail: vmchapla@uft.edu.br

RESUMO

Diante da necessidade de descobrir novos compostos ativos, os fungos endofíticos, organismos associados a plantas, surgem como uma alternativa viável para amplificar a descoberta de novos compostos. Com o intuito de estudar o potencial químico e biotecnológico de fungos endofíticos do Cerrado, dois fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Cochlospermum regium*, foram selecionados para estudo. Os compostos produzidos pelos fungos foram identificados por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (CG/EM). Foram identificados 36 compostos, os majoritários foram o 3-metil-2-butenal (1) e o iodo-dodecano (2) para o fungo Cr-4, com porcentagem

de área de 27,4% e 10,36%, respectivamente. E para o fungo Cr-39 o composto majoritário foi o ácido 1,2-benzenodicarboxílico bis 2-metil propil éster (**3**) com 50,45%. Esses dados demonstram a ampla diversidade de compostos produzidos pelos fungos endofíticos associados à planta *C. regium*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Metabólitos secundários; *Cochlospermum regium*; Cerrado.

ABSTRACT

Faced with the need to discover new active compounds, endophytic fungi, organisms associated with plants, appear as a viable alternative to amplify the discovery of new compounds. In order to study the chemical and biotechnological potential of endophytic fungi from the Cerrado, two endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Cochlospermum regium* were selected for study. The compounds produced by the fungi were identified by gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC/MS). 36 compounds were identified, the major ones were 3-methyl-2-butenal (1) and iodine-dodecane (2) for the fungus Cr-4, with an area percentage of 27.4% and 10.36%, respectively. And for the fungus Cr-39 the major compound was 1,2-benzenedicarboxylic acid bis 2-methyl propyl ester (3) with 50.45%. These data demonstrate the wide diversity of compounds produced by the endophytic fungi associated with the *C. regium* plant.

Keywords: Endophytic fungi; Secondary metabolites; *Cochlospermum regium*; Cerrado.

1 INTRODUÇÃO

Endófitos e fungos endofíticos são termos frequentemente utilizados para descrever a microbiota interna de plantas (Rajamanikyam *et al.*, 2017). Uma definição amplamente aceita é que fungos endofíticos vivem no interior dos tecidos vegetais, sem induzir nenhuma expressão aparente de doença (Gupta *et al.*, 2020). Estes são considerados importantes componentes da biodiversidade, estima-se que mais de um milhão de endófitos existam na natureza, sendo a maioria relatada como Ascomycetos (Rajamanikyam *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos produzidos pelos endófitos têm como função principal ajudar as plantas hospedeiras a resistir ao estresse biótico e abiótico externo, o que em troca beneficia a sobrevivência do hospedeiro. O estudo da distribuição, biodiversidade e características bioquímicas dos endófitos tem grande importância nas ciências das plantas para compreender e melhorar a capacidade das mesmas (Rajamanikyam *et al.*, 2017, Gupta *et al.*, 2020).

Além disso, um interesse em fungos endofíticos é que muitos deles produzem importantes compostos de importância farmacêutica e comercial. Esta lista inclui agentes

anticâncer, antibióticos, compostos imunossupressores, misturas de antibióticos voláteis, antioxidantes, entre outros (Strobel, 2018).

Uma fonte de fungos endofíticos são as plantas medicinais em países de alta biodiversidade como o Brasil. *Cochlospermum regium* Pilger pertence à família Bixaceae, popularmente conhecida como algodãozinho do cerrado ou algodãozinho do campo, nativa do Brasil encontrada principalmente no bioma cerrado. É uma planta medicinal, utilizada contra diversos tipos de inflamações e como regulador menstrual. Esta planta está inserida na lista de risco de extinção, isto torna imprescindível o estudo dos fungos endofíticos que a colonizam (Camillo *et al.*, 2018; Solon, 2009).

Neste sentido, o grupo de pesquisa vem estudando os fungos endofíticos associados à espécie vegetal *C. regium* (Arruda *et al.*, 2021). Para dar continuidade a este trabalho este artigo demonstra a produção de metabólitos secundários de dois fungos endofíticos isolados da planta medicinal *C. regium*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram coletados folhas e caules jovens e saudáveis da *Cochlospermum regium* encontradas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus Gurupi, em outubro de 2016, estes foram levados para o laboratório para assepsia.

O isolamento dos fungos endofíticos das folhas/caules ocorreu da seguinte maneira: a superfície do material vegetal foi lavada com água e sabão, e posteriormente levada ao fluxo laminar, o material então foi esterilizado por imersão em NaClO 1% (3 min.) e em etanol 70% (1 min.), seguida de duas lavagens de água estéril (5 min.). A água do segundo lavagem foi inoculada em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar) e antibiótico para verificar se a assepsia do material foi eficiente.

O isolamento pelo método por secção foi realizado seccionando pedaços de folhas asepticamente utilizando bisturi e inseridos em três placas de Petri contendo meio de cultura BDA e antibiótico (50 mg/L), para evitar o crescimento bacteriano. O mesmo processo foi realizado para o caule. O outro método de isolamento empregado foi o método de maceração, adicionou pedaços de folhas esterilizadas junto com tampão PBS ao almofariz e macerou o material, este foi inserido em três placas de Petri contendo meio BDA + antibiótico (50 mg/mL). Realizou o mesmo procedimento para o caule.

O crescimento dos fungos foi monitorado, e a partir de sucessivas repicagens obteve-se as cepas puras. O fungo codificado como Cr-4 foi isolado do caule, enquanto o fungo Cr-39 foi isolado da folha macerada, estes foram preservados em eppendorfs contendo água estéril (método Castelani) na micoteca do Laboratório de Reatividade de Compostos Orgânicos da UFT, Gurupi (Moraes, 2018). Até o presente momento não foi possível a classificação e/ou identificação dos fungos endofíticos relatados neste trabalho.

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE CR-4 E CR-39

Os fungos endofíticos Cr-4 e Cr-39 foram cultivados em meio BDA por 7 dias em temperatura controlada (25 °C). Após, os fungos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 500 mL de meio líquido MDB (Meio de Batata e Dextrose). Os fungos foram incubados e mantidos sob temperatura controlada de 25°C por 20 dias. Ao final do período de fermentação, a suspensão micelar foi filtrada separando o micélio do filtrado. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila por 3x. Seguidamente fez-se a evaporação do solvente utilizando um rotaevaporador, obtendo-se os extratos brutos Cr-4 (17,1 mg) e Cr-39 (5,7 mg).

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), dos extratos brutos obtidos, foi realizada utilizando como fase estacionária placas de sílica gel prontas (F254-Filter-Bio). Estas foram eluídas em cuba cromatográfica contendo hexano: acetato de etila (3:7 v/v). As placas cromatográficas foram reveladas em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), e posteriormente em vapores de iodo.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CG/EM

A caracterização química dos compostos produzidos pelos endófitos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). As análises foram efetuadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrofotômetro de massas modelo GCMS-QP2020 da marca Shimadzu.

A temperatura do forno da coluna foi de 50°C e a de injeção de 280°C, com o modo de injeção tipo splitless. Pressão a 107,4 kPa com fluxo total de 13,9 mL / min e fluxo da coluna de 1,82 mL / min com o tempo de equilíbrio de 1 min. Tempo inicial da

corrida em 2,6 min e finalização da corrida em 97 min. Para gás de arraste foi utilizado o hélio. Os espectros de massa foram obtidos no intervalo de 40-650 uma, operando a 70 eV, e a fonte foi mantida à temperatura de 280°C.

Os dados obtidos do espectro de massa foram comparados com os espectros de massas do NIST do banco de dados GC-EM utilizando índice de Kovalts como referência.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise das cromatoplacas foi possível inferir que os metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos presentes na *C. regium* são diversificados, tanto em quantidade, quanto em suas características físico-químicas. Pois nas placas foi possível verificar manchas em toda a extensão, constituindo uma variedade de polaridades.

Nos extratos brutos dos fungos Cr-4 e Cr-39 foram identificados 36 compostos apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os compostos majoritários presentes no extrato bruto Cr-4 foram o 3-metil-2-butenal (**1**, Figura 1) com porcentagem de área de 27,4%; e o iodo-dodecano (**2**) com 10,36% de área. Além da identificação de outras classes de compostos como aminas, éteres, ácidos e cetonas, em menor quantidade, evidenciando uma produção metabólica diversa pelo endófito.

3-metil-2-butenal (**1**) é conhecido como senecialdeído ou 3,3-dimetilacroleína. Pertence à classe dos compostos orgânicos conhecidos como enais, derivado da acroleína, um metabólito carbonila insaturado. É formado no interior das células durante uma peroxidação lipídica ou após um estresse oxidativo. As acroleínas produzidas endogenamente são uma fonte constante de danos ao DNA (Seiner *et al.*, 2007).

O iodo-dodecano (**2**) constitui a classe dos haletos de alquila. Já foi identificado como produto majoritário apolar no querosene no reprocessamento de combustível nuclear (Kindel *et al.*, 1994).

Tabela 1: Compostos identificados por CG/EM no extrato bruto de Cr-4.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Porcentagem de área %
Formamida	2,665	0,71
Clorometoxietano	2,950	1,33
Etilenoimina	3,265	1,67
3-metil-2-butenal	4,284	27,38
Ácido propanóico, 2-metil-, 3-metilbutílico éster	4,689	6,11
Bromocicloheptano	4,745	9,61
(E)-3-Buten-2-ona, 4-(1H-pirrol-2-il) -	10,173	2,00
Ácido ftálico, 6-etil-3-octil butil éster	17,370	1,40
2,2-dimetilhexan-3-ona	17,621	2,07
Ácido sulfuroso, 2-etilhexil hexil éster	18,661	6,07
Anti-2-Acetoxiacetaldoxima	18,906	2,44
Ácido oxálico, propil butil éster	19,521	1,76
Acetil valeril	19,657	9,44
Anidrido propanóico	20,101	1,74
1-iodo-dodecano	20,651	10,36
Ácido sulfuroso, 2-etilhexil hexil éster	21,795	8,85
Ácido sulfuroso, isobutil pentil éster	23,159	3,99
Ácido ftálico, 6-etil-3-octil butil éster	25,951	2,68
Óxido nitroso	26,108	0,40

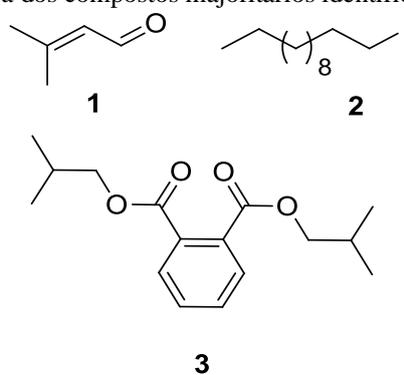
Para o extrato bruto Cr-39 o composto majoritário foi o ácido 1,2-benzenodicarboxílico bis 2-metil propil éster (**3**) com 50,45% de área (Tabela 2, Figura 1). Também foi identificado o 1-iodo-dodecano (**2**) com 10,07% de área. Demonstrando que os dois fungos endofíticos produzem compostos similares, dessa forma podem estar protegendo o seu hospedeiro. Do extrato do fungo Cr-39 foram ainda identificados compostos das classes de aldeídos, éster, cetona e anidrido.

Tabela-2: Compostos identificados por CG/EM no extrato bruto de Cr-39.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Porcentagem %
3-metil-2-butenal	4,284	5,52
2,3,4-trimetil-pentano	4,689	1,47
Bromocicloheptano	4,744	1,97
Guanidina	8,494	0,69
1-(2-furanil)-3-buten-1,2-diol	15,605	0,67
1-iodo-dodecano	16,530	10,07
3-metoxi-3-metil-2-butanona	16,838	0,89
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (2-metilpropil) éster	17,372	50,45
Valerato de metila	17,899	1,17
Ácido oxálico, butil propil éster	18,224	0,95
2,4,4-trimetil-hexano	18,292	0,68
Ácido ftálico, 4-cianofenil nonil éster	18,376	8,98
Nitrito de t-butila	18,599	0,68
Ácido ftálico, 4-cianofenil nonil éster	19,474	7,96
Não identificado	19,979	1,96
2,4-dimetil-3-hexanona	20,652	1,01
Não identificado	21,552	1,32
Di-n-octil ftalato	25,958	3,57

O composto **3** é constituído por um anel benzênico *orto*-dissubstituído por ésteres. Compostos aromáticos apresentam características antioxidantes (Andrade, 2018; Sousa, 2007), vários fungos endofíticos já foram relatados contendo atividade antioxidantes (Alves *et al.*, 2020) devido a sua produção de compostos aromáticos (Arruda *et al.*, 2021, Chapla *et al.*, 2013). Esta propriedade pode estar associada a proteção do hospedeiro de fatores abióticos, como o composto **3** que tem propriedade de filtrar raios ultravioletas (UV-B, 280-320nm) e já foi detectado em plantas nas regiões superficiais da estrutura vegetal (Azevedo, 1998; Gobbo-Neto, 2007; Ferreira, 2008).

Figura 1: Estrutura química dos compostos majoritários identificados nos extratos fúngicos.



A produção dos metabólitos secundários é o resultado da interação entre os fungos endofíticos, seu hospedeiro e o ambiente ao qual está contido. Dessa forma as condições ambientais e de laboratório podem modificar a produção de compostos pelos endófitos.

Esses dados demonstram a ampla diversidade de compostos produzidos pelos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *C. regium*. Evidenciando assim a importância da análise destes compostos, e suas possíveis aplicações para a indústria, agricultura ou medicina.

4 CONCLUSÃO

Com a identificação de 36 compostos produzidos pelos endófitos podemos destacar que este trabalho contribui para a caracterização química da biodiversidade fúngica do Cerrado. Além de promover os fungos endofíticos como produtores de compostos bioativos que possam estar ajudando o desenvolvimento de seu hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta pesquisa contou com benefícios do Programa Institucional de Produtividade em Pesquisa da UFT (PROPESQ/UFT).

REFERÊNCIAS

- ALVES, D.R.; SILVA, W.M.B.; SANTOS, D.L.; FREIRE, F.C.O.; VASCONCELOS, F.R.; MORAES, S.M. Atividades antioxidante, anticolinesterasica e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 9, p.73684-73691, 2020.
- ANDRADE, C.H.; KUMMERLE, A.E.; GUIDO, R.V.C. Perspectivas da Química Medicinal para o Século XXI: Desafios e Oportunidades. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 476–483, abr. 2018.
- ARRUDA, G.L; MORAIS, G.K.A.; CHAGAS JR., A.F.; ARAUJO, A.R.; CHAPLA, V.M. Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. **Natural Products Research**, 2021.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO I.S. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna. EMBRAPA, CNPMA, 1998. p. 117-137.
- CAMILLO, J.; MARTINS, R.C.; NETO, G.G.; GULIAS, A.P.S.M.; FILGUEIRAS, A.D.; COSTA, L.C.; SILVA, D.B. ***Cochlospermum regium*: algodão do campo**. In: Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Centro-oeste. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF: MMA, 2018, 1160 p.
- CHAPLA, V.M.; BIASSETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual Química**. v.5, n. 3, p. 17, 2013.
- FERREIRA, M.M.M. Flavonas e Flavonóis: Novas Descobertas Sobre sua Estrutura Química e Função Biológica. **Revista Agro@ambiente** v. 2, n. 2, p. 4, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GUPTA, S.; CHATURVEDI, P.; KULKARNI, M.G.; STADEN, J.V. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v. 39, p. 107462, 2020.
- KINDEL, O.; HERRMANN, F.J.; SCHMIDT, L.; PATZELT, P. Identification of iodoorganic compounds in kerosene from nuclear fuel reprocessing. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 182, n. 2, p. 385-391, 1994.
- MORAES, G. K. A. Isolamento e avaliação biológica de fungos endofíticos associados à *Cochlospermum regium*. Gurupi, TO. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal do Tocantins - UFT, 2018.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S.M. Endophytic Fungi as Novel Resources of Natural Therapeutics. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 60, e17160542, 2017.

SEINER, D.R.; LABUTTI, J.N.; GATES, K.S. Kinetics and mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B inactivation by acrolein. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 9, p. 1315-1320, 2007.

SOLON, Soraya. Análise Fotoquímica e Farmacognósticas das raízes da *Cochlospermum regium* (Mart. Et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae. Brasília, DF. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Brasília – UNB, 2009.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Total Phenolic and Antioxidant Activity of Five Medicinal Plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **Journal of Fungi**, v.4, p. 57, 2018.