

Avaliação do potencial biológico e perfil químico através de RMN de ^1H do extrato e das frações do fungo endofítico *Phomopsis* sp.

¹Lissa Apolonia MARIANO, ²Camila Martins de OLIVEIRA

²Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET, UFAM, CEP 69100-000,
Itacoatiara-AM

e-mail: lissa_lam@hotmail.com; camilacm@ufam.edu.br

Avaliação do potencial biológico e perfil químico através de RMN de ^1H do extrato e das frações do fungo endofítico *Phomopsis* sp.

RESUMO

Extratos brutos a partir de fungos endofíticos são muito utilizados atualmente na busca por metabólitos secundários bioativos. Tais organismos são produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos e apresentam propriedades biológicas com ação antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória, entre outras. O endófito *Phomopsis* sp. foi inicialmente relatado na literatura como um fungo patógeno bastante encontrado na soja, porém, atualmente estudos relatam que este fungo endofítico é responsável por diversas respostas biologicamente ativas. Neste estudo foi proposto cultivar em larga escala o endófito *Phomopsis* sp. Ao final do processo de cultivo, a massa foi de 1,084g. Extratos fúngicos necessitam de um largo cultivo de caldo de cultura para obter um rendimento suficiente para realização dos estudos químicos e biológicos.

Palavra-chave: endófito; cultivo; rendimento.

ABSTRACT

Crude extracts from endophytic fungi are very currently used in the search for bioactive secondary metabolites. Such organisms are producing biologically active secondary metabolites and exhibit biological properties with antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, among others. The endophyte *Phomopsis* sp. was first reported in the literature as a very fungus pathogen found in soy, however, studies report that this current endophytic fungus is responsible for various biologically active responses. This study was proposed to cultivate large scale the endophyte *Phomopsis* sp. At the end of the cultivation process, the mass was 1,084g. Fungal extracts requiring a large culture broth culture to obtain sufficient performance for conducting chemical and biological studies.

Keyword: endophyte; cultivation; yield.

1- INTRODUÇÃO

A descoberta de novas substâncias podem ser a partir de várias fontes naturais ou sintetizados em laboratório. Podem ser descobertas por acidente ou ser o resultado de incansáveis investigações (Ansel et al., 2007).

Ao longo do anos, os extratos de microrganismos vem sendo uma fonte de compostos farmacologicamente ativos cada vez mais explorados. Dentre esses compostos encontra-se o taxol, substância isolada do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que apresenta propriedades biológicas para o tratamento de câncer mamário e uterino (Ouedraogo et al., 2011).

Novos microrganismos têm o potencial em produzir compostos desconhecidos com bioatividade podendo ser adaptados para propósitos medicinais (Kharwar et al., 2011). Os fungos do gênero *Phomopsis* tem ganho maior atenção em muitos casos envolvendo a procura de novos compostos, levando a descoberta de vários metabólitos secundários bioativos (Huang, et al. 2015). Esses fungos estão presentes em algumas plantas medicinais e ainda são pouco estudados para a busca de novos fármacos. Nos relatos de Zhang, et al. (2015) produzem substâncias bioativas *in vitro* como o (+) - pinoresinol (Pin), pinoresinol diglucoside (PDG) e o pinoresinol monoglucoside (PMG) que combatem a hipertensão, inibem a melanogênese, combatem o crescimento fúngico e são precursores de substâncias que têm um efeito significativo para a prevenção de cânceres de mama, próstata, colo do útero e cervical. Outras atividades também relatadas das substâncias do *Phomopsis sp.* são, a sua capacidade em aumentar a produção de vegetais como a graviola e a pinha (Silva, 2006), apresentam resultado positivo frente a bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Corrado, 2004) e, também apresentam substâncias inibidoras de colônias das bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichi coli* e *Candida albicans* (Chareprasert, 2006).

Diante do exposto, o estudo tem como objetivo a obtenção do extrato bruto do fungo endofítico *Phomopsis sp* em larga escala, a fim de se obter um maior rendimento, para posteriormente ser fracionado.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ativação das cepas fúngicas

O fungo endófito *Phomopsis* sp preservado em Castellani e codificado como PS-02, foi repicado em placas de petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e levados à BOD com temperatura controlada a 30 °C até que o endófito apresentasse crescimento adequado.

2.2. Obtenção do extrato seco fúngico

Visando obter 1,0g de extrato fúngico seco, preparou-se 5L de Caldo Batata Dextrose divididos em 25 erlenmeyers com 200mL cada. Inoculou-se ao caldo 5 pedaços (aproximadamente 1cm²) de meio de cultura contendo o fungo e levou-se à BOD com temperatura controlada por 20 dias. Decorrido os 20 dias, adicionou-se 200mL de acetato de etila em cada Erlenmeyer. No dia seguinte, o caldo foi filtrado a vácuo e concentrado até a eliminação do solvente. O extrato obtido foi colocado em vidro tipo penicilina e pesado.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente cultivou-se 3L de extrato bruto fúngico conforme descrito no tópico 2.2. Entretanto, o material obtido foi descartado antes de se realizar a extração, pois o cultivo foi contaminado por um fungo patógeno. Os equipamentos passaram por limpeza e, afim de finalizar a contaminação, o laboratório foi fechado por 30 dias devido a limpeza ao formaldeído.

Conforme dados do extrato fúngico no estudo de Letícia Corrêa Santiago, 1000mL de caldo de cultivo deste endófito teve um rendimento de 218mg, então através de uma relação utilizando esses dados, em 5L de caldo de cultivo, a massa obtida seria de aproximadamente 1,0g (quantidade suficiente para realização dos objetivos propostos no presente estudo). Para alcançar a massa esperada, foi preparado mais 3,2L de extrato bruto seguindo a mesma metodologia. Ao final, o resultado obtido foi de 1,084g. Apesar da obtenção de extrato com massa necessária para conseguir o fracionamento e as análises de RMN, não foi possível, realiza-los pois estou gestante de dois meses.

4- CONCLUSÃO

Para se obter uma massa de aproximadamente 1,0g foi necessário realizar um pouco mais de 8L de caldo de cultivo do endófito. Conclui-se então que o rendimento do extrato foi menor que o esperado, necessitando dessa forma, preparar uma quantidade maior de caldo em um período mais longo de tempo para se obter a quantidade esperada.

5- AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pela bolsa concedida.
Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia do Amazonas pela infraestrutura concedida.

6- BIBLIOGRAFIA

Ansel, H. C., Popovich, N. G., Allen, L. V. JR. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 45p.

Chareprasert, S.; Piapukiew, J.; Thienhirun, S.; Whalley, A. J. S.; Sihanonth, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 22, n. 5, p. 481-486, 2006.

Corrado, M.; Rodrigues, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. Journal Basic Microbiol, v.44, p.157-160, 2004.

Huang, R., et al. Secondary Metabolites of an Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 51, No. 2, 2015.

Kharwar, R.N.; Mishra, A.; Gond, S.K.; Stierle, A.; Stierle, D. Anticancer Compound Derived From Fungal Endophytes: Their Importance And Future Challenges. The Royal Society of Chemistry, Nat. Prod. Rep, 2011.

Ouedraogo, M; Ruiz, M; Vardelle, E; Carreyre, H; Coustard, J. M; Potreau, D; Sawadogo, L.L; Cognard, C; Becq, F; Vandebrouck, C; Bescond, J. From the vasodilator and hypotensive effects of an extract fraction from *Agelanthus dodoneifolius* (DC) Danser (Loranthaceae) to the active compound dodoneine. Journal of Ethnopharmacology. (2011) 133: 345–352.

Silva, R. L. De O.; Luz, J. S.; Silveira, E. B.; Cavalcante, T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). Acta Botanica Brasilica, v.20, n. 3, p. 649-655, 2006.

Zhang, Y., et al. Production of pinoresinol diglucoside, pinoresinol monoglucoside, and pinoresinol by *Phomopsis* sp. XP-8 using mung bean and its major components. Appl Microbiol Biotechnol, 99:4629–4643, 2015.