

Estudo químico e aleloquímico da linhagem fungica I1SYS1A1

Dayane Rodrigues de Brito¹

Marilene Nunes Oliveira²

Simone Yasue Simote Silva³

Sebastião da Cruz Silva⁴

Resumo: Os fungos compreendem um grupo heterogêneo de micro-organismos heterotróficos que vivem em associação com outros organismos. Considerando-se o aumento crescente da importância dada aos estudos desenvolvidos nesta área, bem como a necessidade do conhecimento da diversidade desses fungos, este trabalho teve como objetivo o estudo químico e aleloquímico da linhagem I₁S_YS₁A₁, isolada a partir de uma amostra de solo coletada em área de exploração mineralógica rica em cobre, localizada em Canaã dos Carajás/PA. A obtenção da biomassa fúngica deu-se a partir do cultivo em arroz. Os extratos etanólicos obtidos foram submetidos a cromatografia clássica à procura por novas substâncias que possam apresentar propriedades biológicas úteis. A partir do extrato etanólico foram realizados bioensaios de alelopatia. A avaliação do potencial fitotóxico foi realizada utilizando sementes das espécies *Senna obtusifolia* (mata-pasto) e *Mimosa pudica* (malícia), visando à inibição da germinação de sementes. O extrato apresentou resultado satisfatório no teste alelopático frente às sementes de malícia. Na separação cromatográfica foram obtidas duas substâncias, uma delas sendo o ergosterol.

Palavras-chave: Biodiversidade. Estudo Químico. Alelopatia.

-
- 1 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica de Química e Física. Contato: day.brito1@hotmail.com. Bolsista de Produtividade em Pesquisa da Capes.
 - 2 Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – Unifesspa. Campus de Marabá, Instituto de Ciências Exatas. Contato: mnol@unifesspa.edu.br
 - 3 Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – Unifesspa. Campus de Marabá, Instituto de Ciências Exatas. Contato: simote@unifesspa.edu.br
 - 4 Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – Unifesspa. Campus de Marabá, Instituto de Ciências Exatas. Contato: simotesilva@unifesspa.edu.br

1 Introdução

O Brasil possui uma riqueza imensurável de fauna e flora, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical do planeta, por isso não pode abdicar de sua aptidão para os produtos naturais. A química de Produtos Naturais no Brasil é a uma das áreas mais antigas dentro da química e que talvez congregue o maior número de pesquisadores (PINTO et al., 2002).

O reino fungi é o reino onde engloba não só os fungos como também os micélios e cogumelos, sendo este, o ramo da Biologia denominada de micologia ou micetologia (LACAZ et al., 2002). Dentre os micro-organismos que compõem a biomassa do solo, os fungos merecem destaque por se tratar do principal grupo decompositor da matéria orgânica, degradando a celulose e a lignina, além de outros polímeros amplamente encontrados em áreas florestais. Eles são essenciais para a ciclagem e transporte de nutrientes para as plantas, além de exercer papel importante na supressão de doenças (THORN, 1996; DORAN; HILL et al., 2000). Uma das suas propriedades mais importantes está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas.

Após a descoberta da penicilina (isolada do fungo *Penicilium notatum*), a investigação de fungos para fins farmacêuticos deu um avanço, descobriu-se uma das fontes mais prolíficas de produtos naturais. Pesquisas mostram o enorme potencial dos fungos em produzir diversas classes de substâncias que podem ser utilizadas na medicina e agricultura (CHAPLA et al., 2012). Esse fato pode ser evidenciado pela utilização de diversos medicamentos utilizados nos centros de saúde serem derivados de metabólitos de fungos (STROBEL e DAISY, 2003; FERRARA, 2006).

Isso mostra que os produtos naturais isolados de micro-organismos, de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes, não só como medicamentos (exemplo antibióticos), mas também como agroquímicos no combate de plantas daninhas (PINTO et al., 2002).

Plantas daninhas são plantas que afetam a produção de culturas pela interferência sobre a produtividade primária, ocasionando danos na colheita e prejudicando a qualidade do produto (RIZZARDI et al., 2003).

O controle de plantas daninhas em áreas de pastagens cultivadas tem sido há muito tempo realizado pelo uso do fogo e da roçadeira e, mais recentemente, empregando herbicidas sintéticos. Embora o uso herbicida sintético seja considerado um método de controle eficaz para um número considerável de espécies de plantas daninhas, ele vem sendo questionado quanto ao seu impacto ambiental e à saúde (SOUZA FILHO, 2006). Por isso, a alelopatia representa uma alternativa ao controle dessas plantas daninhas.

O termo alelopatia é definido como qualquer efeito causado por uma planta, ou microrganismo, sobre outras plantas, por meio de compostos químicos lançados no meio ambiente. Esses compostos são conhecidos como aleloquímicos ou agentes aleloquímicos (PUTNAM e DUKE, 1978; RICE, 1984).

Tendo em vista a importância dos fungos e sua potencialidade, o presente trabalho avaliou o potencial alelopático e buscou o isolamento e caracterização de substâncias químicas.

2 Metodologia

2.1 Seleção do fungo e isolamento da linhagem

Foram coletadas amostras de solo mineralizado da Mina do Sossego em Canaã dos Carajás a partir de três pontos. Para cada ponto foram retiradas quatro amostras, sendo uma amostra por profundidade. A amostra I1SYS1A1 (primeiro isolado do solo coletado no ponto 1, profundidade 1 em meio de cultura SABOURAUD), com profundidade 0-20 cm.

O tratamento da amostra de solo para o isolamento da espécie se deu a partir da preparação de uma suspensão mãe e a partir desta realizou-se duas diluições com concentrações de 10^{-2} e 10^{-3} . A suspensão mãe foi preparada utilizando 25 g da amostra de solo em 225 mL de água deionizada esterilizada contendo clorafenicol e tetraciclina, ambos na concentração de 100 mg.L^{-1} . A partir das concentrações, foram tomados $100 \mu\text{L}$ de cada uma delas e dispensados em placas de Petri contendo meio de cultura (BDA (Batata dextrose e ágar), MALTE, SABOURAUD e CZAPEK). Todas as dispersões foram feitas em duplicatas denominadas de X e Y.

A linhagem I1SYS1A1 foi isolada a partir do meio de cultura SABOURAUD da placa de Petri denominada Y e preservada de acordo com a metodologia descrita por Castellani, 1939.

O fungo foi selecionado para estudo devido apresentar um rápido crescimento e coloração diferenciada.

2.2 Reativação da linhagem

A linhagem I1SYS1A1 (Figura 1) isolada do solo foi inoculada em duas placas de Petri contendo o meio BDA, utilizando a técnica de semeadura em superfície e incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 7 dias. Após esse período, o fungo foi cultivado em meio sólido (arroz).

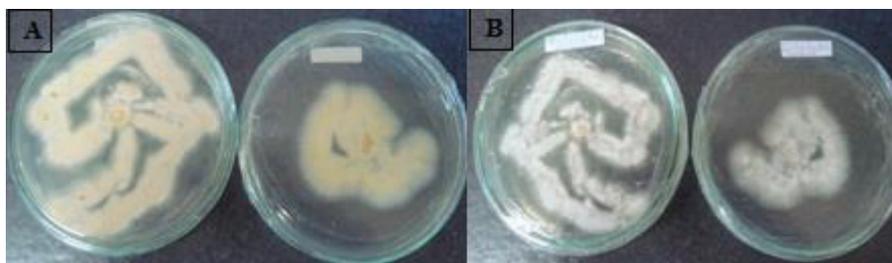


Figura 1 Linhagem IISYS1A1.

2.3 Cultivo da linhagem em meio sólido (arroz)

Para o cultivo em meio sólido (arroz Tio João) foram utilizados 10 Erlenmeyers de 1000 mL. Em cada frasco foram adicionados 200,0 g de arroz e 40,0 mL de água destilada. Estes foram devidamente vedados com “bonecas” de gaze e cone de papel para que fosse diminuído o risco de contaminação. Em seguida, esse material foi autoclavado por cerca de 50 min. a 120 °C. Após a etapa de esterilização e resfriamento até a temperatura ambiente foram introduzidos cerca de 3 a 4 fragmentos do fungo em cada frasco. O cultivo foi realizado em um período de 24 dias em modo estático, à temperatura ambiente (em torno de 25 °C) e ao abrigo da luz. Após o período de cultivo e conseqüentemente obtenção da biomassa fúngica foram obtidos os extratos. Todo o procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar com o auxílio do bico de Bunsen para que fosse evitado qualquer risco de contaminação. A Figura 02 exibe as amostras 24 dias após o cultivo.



Figura 2 Cultivo em meio sólido (arroz Tio João).

2.4 Obtenção dos extratos

Após os 24 dias foi adicionado EtOH aos Erlenmeyers contendo a massa fúngica com dois objetivos: elimina o fungo garantindo a segurança durante a

manipulação e o segundo é obtenção de um extrato orgânico. Após 48 h todo o material foi filtrado com o auxílio de papéis de filtro; posteriormente o filtrado foi concentrado utilizando o aparelho rota-evaporador. Depois da primeira adição de EtOH, adicionou-se mais uma vez EtOH nos frascos por um período de três dias, em seguida, realizou-se a extração, e mais uma concentração no rota-evaporador, obtendo-se os extratos. As extrações foram devidamente identificadas e guardadas em frascos. Dos extratos obtidos, foram feitas coluna cromatográfica (CC) e avaliação do potencial alelopático.

2.5 Avaliação do pontencial alelopático do extrato ETOH

Parte do extrato obtido a partir da biomassa produzida em meio sólido foi testado na concentração 1% (m/v) visando à inibição das sementes das espécies invasoras de pastagens, *Senna obtusifolia* (mata-pasto) e *Mimosa pudica* (malícia). Cultivo exibido na figura 3.



Figura 3 Avaliação do potencial alelopático da biomassa de I1SYS1A1.

O ensaio foi realizado na EMBRAPA em Belém. Foram utilizadas 6 placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro com dois papéis de filtros no fundo de cada placa. Em cada placa foram adicionados 3 mL da solução metanólica, esperou-se a evaporação do solvente, adicionou-se solução antifúngica. Distribuiu-se em triplicata nas placas, 20 sementes de *Mimosa pudica* (malícia) e 20 sementes de *Senna obtusifolia* (mata-pasto). A solução antifúngica foi adicionada sempre que necessária durante os cinco dias de teste. As placas foram colocadas em câmara de germinação à temperatura de 25 °C com acompanhamento de 24 horas durante um período de 5 dias para verificação do aparecimento da radícula (germinação fisiológica). A cada dia foram contadas e eliminadas as sementes germinadas. A germinação foi comparada com as testemunhas (controle), utilizando apenas água com o mesmo número de sementes e descartando-as conforme fosse germinando.

O percentual de germinação (%G) foi calculado a partir da Equação 01, onde é feita a divisão da quantidade de sementes germinadas (SG) pela quantidade total de sementes na placa (ST), que foi vinte, e multiplicada por cem.

$$\%G = \frac{S_G}{S_T} \times 100$$

A partir dos valores de percentual de germinação obtidos, foram calculados os percentuais de inibição (%In) das sementes de malícia e de mata-pasto. Obtiveram-se as médias do percentual de germinação para cada tipo de semente (%Gsem) e de sua respectiva testemunha (%Gtest), sendo estes valores utilizados na Equação 02.

$$\%In = \left(\frac{\%G_{sem}}{\%G_{test}} - 1 \right) \times 100$$

2.6 Fracionamento dos extratos

Ao final da etapa de concentração, necessária a obtenção de um extrato seco, foi observado na superfície do extrato cristais na forma de agulha. Os referidos cristais foram retirados, lavados e analisados. Os estudos espectroscópicos dos cristais obtidos revelaram tratar-se uma substância (S1).

Dando continuidade à investigação química, o estudo cromatográfico clássico do extrato etanólico (34,59 g) foi realizado utilizando sílica gel (70 – 230 mesh) como fase estacionária e misturas de solventes em gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Inicialmente, foi preparada e desenvolvida uma coluna filtrante (hXØ = 22 cm x 8 cm) para obtenção de fases previamente determinadas conforme mostra a figura abaixo.

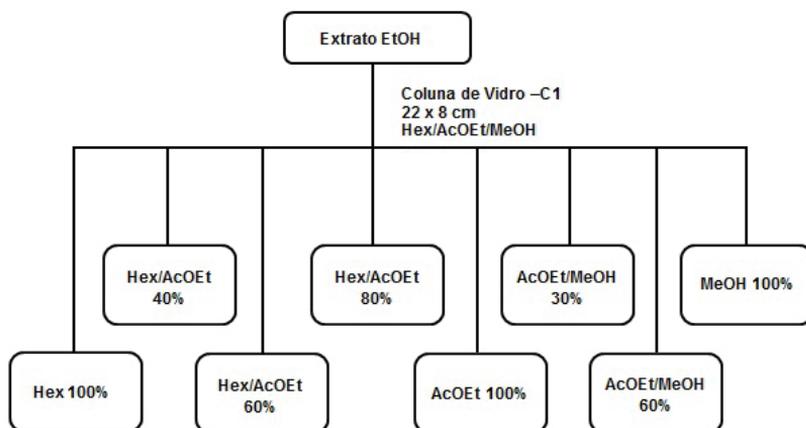


Figura 4 Fracionamento cromatográfico do extrato EtOH da biomassa de IISYSIA1.

2.7 Fracionamento de HEX/ACOET 40% (C2)

A fração Hex/AcOEt 40% foi submetida ao fracionamento cromatográfico clássico, $bX\varnothing = 12 \times 8$ cm, utilizando-se sílica gel (70 - 230 mesh) como fase estacionária e gradiente de eluição (figura 5), obtendo-se no total treze frações e uma substância (S2).

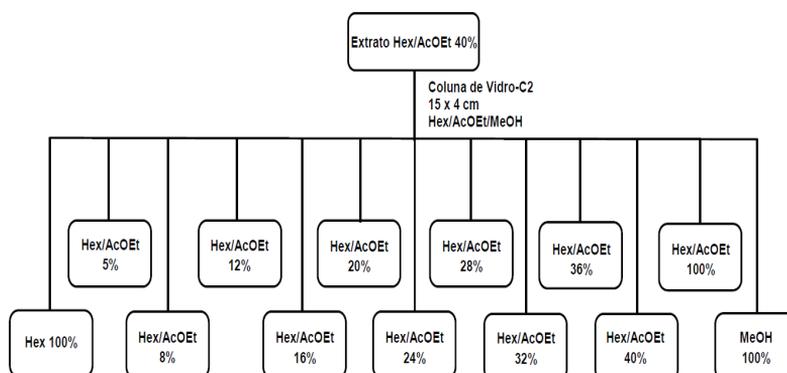


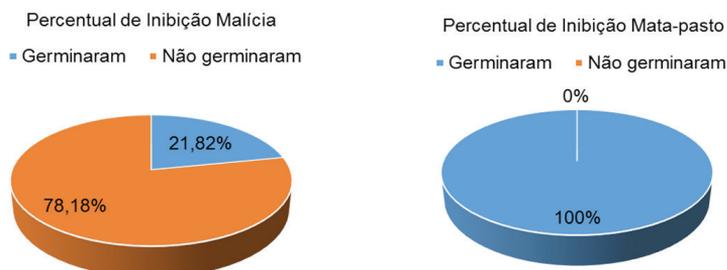
Figura 5 Fracionamento cromatográfico da amostra Hex/AcOEt 40%.

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação do potencial alelopático do extrato

A partir do bioensaio realizado observou-se que a espécie Malícia mostrou-se mais sensível ao efeito do extrato etanólico comparada a espécie mata-pasto, apresentando percentual de inibição da germinação de sementes igual 78,18%. Não foi observado nenhum efeito alelopático do extrato visando à inibição da germinação das sementes de mata-pasto (Gráfico 1).

Gráfico 1 Gráfico do percentual de inibição das espécies estudadas.



3.2 Identificação estrutural da substância isolada

O estudo cromatográfico do extrato etanólico obtido a partir da biomassa fúngica levou ao isolamento de duas substâncias. A substância **S1** (Figura 6) cristalina de coloração amarelada apresentou-se em forma de agulhas na superfície do extrato bruto, que após lavagem com hexano foi submetida a análise por RMN ^1H e ^{13}C (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13).

Os espectros de RMN de S1 (Figuras de 8 a 11) foram obtidos na Universidade Federal do Pará (UFPA) e os dados obtidos em comparação com dados da literatura (Tabela 1 e 2) levou a conclusão de que a substância **S1** tratava-se do ergosterol, um esteroide comumente produzido por fungos.

A substância **S2** encontra-se em fase de identificação estrutural.

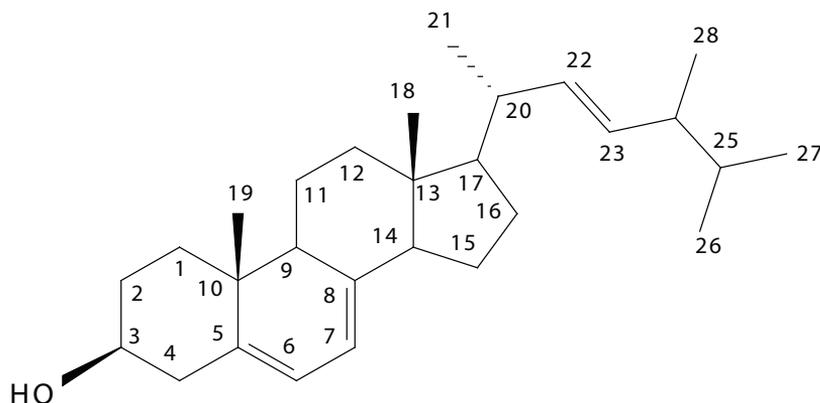


Figura 6 Ergosterol (S1).

Fonte: Souza, 2013.

Tabela 1 Dados de RMN ^1H de S1 (CDCl $_3$, 300 MHz).

POSIÇÃO	d (OLIVEIRA, 2008)	d S1
3	3,63 (<i>m</i> , 1 H)	3, 63 (<i>m</i> , 1 H)
6	5,61 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,4 e 2,4 Hz, 1H)	5, 57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,7 e 2,7 Hz, 1H)
7	5,37 (<i>m</i>)	5,38 (<i>m</i>)
18	0,62 (<i>s</i> , 3H)	0,63 (<i>s</i> , 3H)
19	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,95 (<i>s</i> , 3H)
21	1,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)	1,04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)

Continua

Tabela 1 Dados de RMN¹H de S1(CDCl₃, 300 MHz). (Continuação)

POSIÇÃO	d (OLIVEIRA, 2008)	d S1
22	5,19 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15 e 5,6 Hz, 1H)	5,20 (<i>m</i>)
23	5,23 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15 e 5,6 Hz, 1H)	5,20 (<i>m</i>)
26	0,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)	0,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)
27	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz, 3H)
28	0,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz, 3H)	0,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)

Fonte: Autor.

Tabela 2 Dados de RMN ¹³C de S1.

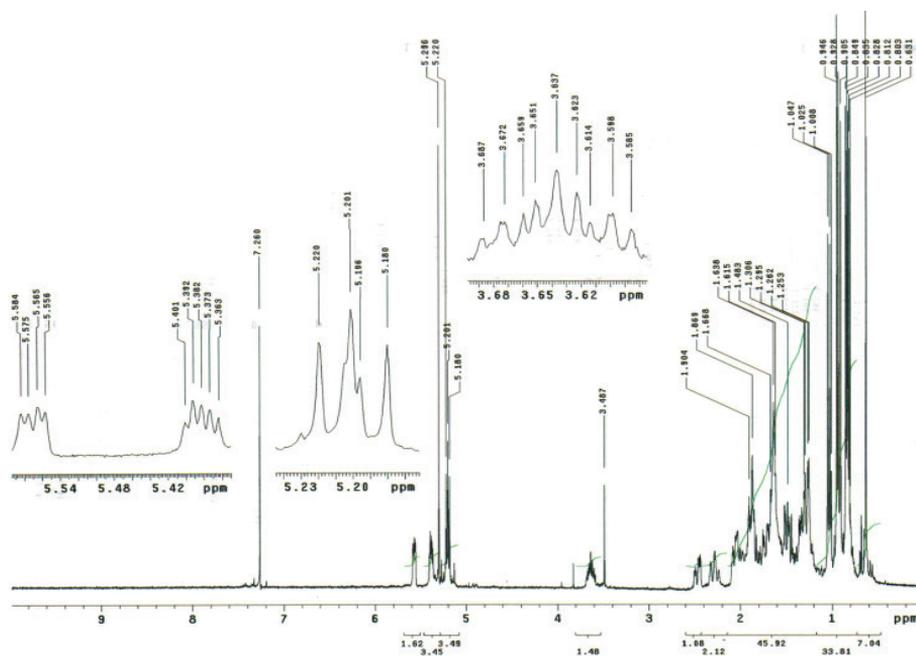
CARBONOS	d (OLIVEIRA, 2008)	d (CDCl ₃)
C-1	38,3	38,4
C-2	31,9	32
C-3	70,4	70,5
C-4	40,7	40,8
C-5	139,7	139,8
C-6	119,6	119,6
C-7	116,3	116,3
C-8	141,4	141,4
C-9	46,2	46,3
C-10	37,0	37,0
C-11	21,1	21,1
C-12	39,0	39,1
C-13	42,8	42,8
C-14	54,5	54,6
C-15	23,0	23,0
C-16	28,3	28,3
C-17	55,7	55,7

Continua

Tabela 2 Dados de RMN ^{13}C de S1. (Continuação)

CARBONOS	d (OLIVEIRA, 2008)	d (CDCl_3)
C-18	12,0	12,0
C-19	16,3	16,3
C-20	40,4	40,4
C-21	21,1	21,1
C-22	135,5	135,6
C-23	131,9	132
C-24	42,8	42,8
C-25	33,1	33,1
C-26	19,9	19,9
C-27	19,6	19,6
C-28	17,6	17,6

Fonte: Autor

**Figura 7** Espectro de RNH ^1H (CDCl_3 , 300 MHz).

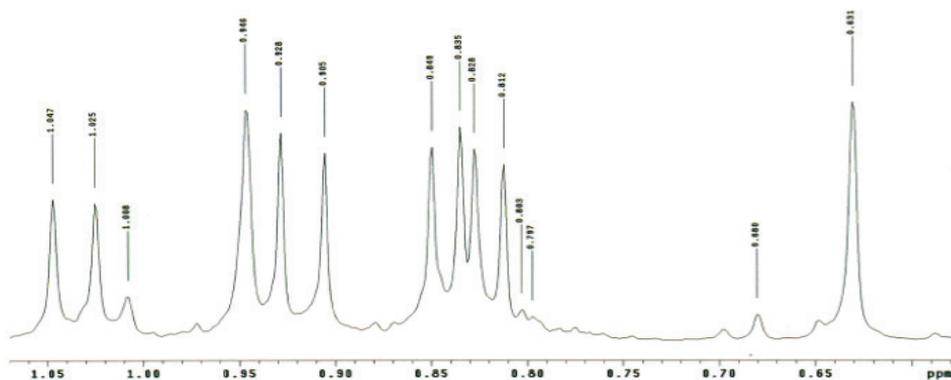


Figura 8 Expansão do espectro de RNH ^1H (CDCl_3 , 300 MHz).

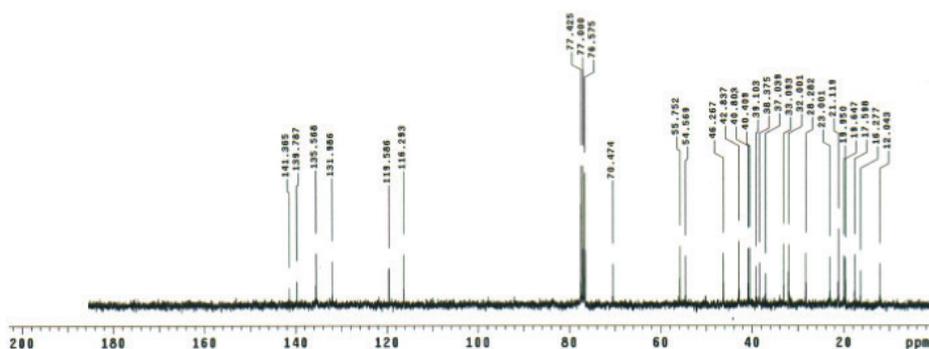


Figura 9 Espectro de RNH ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz).

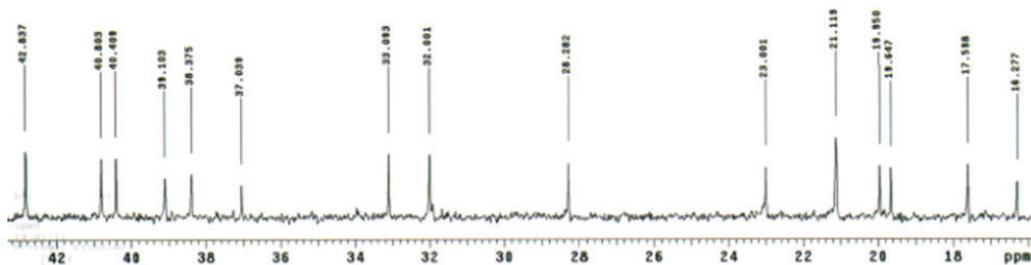


Figura 10 Expansão do espectro de RNH ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz).

4 Considerações finais

A partir das amostras de solo mineralizado foi isolado a linhagem I₁S_YS₁A₁, o cultivo em grande escala levou a obtenção de 83,3107 g. O extrato obtido foi

submetido ao teste alelopático e estudos de cromatográfica. Nos testes alelopáticos realizados visando à inibição da germinação das sementes das espécies *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (mata-pasto) foi observado um percentual de inibição igual 78 % frente à espécie malícia. Não foi observado efeito alelopático frente à espécie mata – pasto. Na investigação química a partir dos extratos foram obtidas duas substâncias: S1 e S2, sendo a S1 identificada como o esteróide ergosterol.

Referências

- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais**, 2012.
- DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. **Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality**. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 1, p. 3-11, 2000.
- HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. **Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities**. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 15, p. 25-36, 2000.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. ed. 9. São Paulo: Sarvier. 2002.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas**. Química Nova, vol. 25. Supl. 1, 45-61, 2002.
- PUTNAM, A. R., DUKE, W. D. **Allelopathy in agroecosystems**. Ann. Rev. Phytopathol., v.16, p. 431-451, 1978.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. 2.ed. New York: Academic Press, 1984. p. 422.
- RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D. & BALBINOT JR., A.A. **Previsão da perda de rendimento de grãos de soja causada pela infestação de plantas daninhas utilizando variáveis foliares relativas**. Planta Daninha. p. 21:45-54, 2003.

SOUZA FILHO, A.P.S. **Alelopatia e as plantas.** p.3, 2006.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, New York, v.67, n. 4, p. 491-502, 2003.

THORN, R.G.; REDDY, C.A.; HARRIS, D.; PAUL, E. A. **Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 62, p. 4288-4292, 1996.

