

ANÁLISE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS ATIVOS EM FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A FOLHAS DE *Coffea arabica*

Ana Carla Rangel Rosa¹, Cecília Fernandes Patta Muller Marques², Leonardo Bindelli Verly², João Victor Andrade², Gabriel Finotti Alves Vieira², Mário Ferreira Conceição Santos²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, anacarlarangelrosa@yahoo.com

²Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde - Departamento de Química e Física, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, ceciliafernandespmm@gmail.com, leobindelli@gmail.com, joaovictorandrade927@gmail.com, finottigabriel1@gmail.com, mario.f.santos@ufes.br.

Resumo

Os fungos endofíticos habitam tecidos internos das plantas sem causar danos visíveis e desempenham papéis importantes nas interações planta-fungo, especialmente na produção de metabólitos com propriedades benéficas. Este trabalho teve como objetivo investigar a capacidade de fungos endofíticos associados a folhas de *Coffea arabica* de produzir compostos bioativos com potencial aplicação farmacêutica e biotecnológica. Após a coleta e esterilização das folhas de *C. arabica*, os fungos endofíticos foram isolados e purificados. Entre os fungos isolados, o gênero *Xylaria* sp. foi identificado, além de um fungo não identificado, denominado FV. Este fungo produziu um composto inédito, cuja estrutura foi determinada por cromatografia líquida e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A descoberta de novos compostos bioativos reforça o potencial dos fungos endofíticos como fontes de metabólitos inovadores para futuras aplicações científicas e tecnológicas.

Palavras-chave: Extração de Compostos; Espectroscopia RMN; Identificação Química.

Área do Conhecimento: CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - Química

Introdução

Os fungos podem ser classificados em várias categorias: coprófilos, que crescem em fezes; micoparasitas, que parasitam outros fungos; marinhos, que habitam ambientes aquáticos; epifíticos, que vivem na superfície de plantas ou objetos; e endofíticos, que residem dentro dos tecidos internos das plantas. Entre esses, os fungos endofíticos destacam-se devido à sua habilidade de se estabelecerem nos tecidos vegetais, geralmente sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Luo *et al.*, 2022). Esses fungos podem interagir com suas plantas hospedeiras de diversas maneiras, desde relações simbióticas, como o mutualismo e o comensalismo, até relações tróficas, como o parasitismo (Dos Santos Piancó *et al.*, 2022).

Nas interações mutualísticas, os fungos endofíticos desempenham papéis cruciais ao produzir ou estimular a produção de metabólitos secundários que beneficiam a planta. Esses compostos podem atuar de várias maneiras, como reduzir a herbivoria, proteger contra ataques de insetos e nematoides, e melhorar a resistência a estresses ambientais, tanto bióticos quanto abióticos (Pinheiro *et al.*, 2020).

Além dos benefícios diretos para as plantas, a presença contínua dos fungos endofíticos e suas interações com o ambiente e outros microrganismos promovem uma rica diversidade metabólica. Esta diversidade resulta na biossíntese de uma ampla gama de substâncias bioativas, muitas das quais têm potencial para aplicações práticas significativas (Pardo *et al.*, 2020). Os compostos produzidos por fungos endofíticos podem ter propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias, tornando-os de grande interesse para a medicina e a biotecnologia (Montel *et al.*, 2021).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi explorar a complexidade das interações entre fungos endofíticos associados a folhas de *Coffea arabica*, e investigar o potencial dos metabólitos secundários produzidos por esses fungos para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas.

Metodologia

As folhas de *C. arabica* foram coletadas no perímetro urbano do município de Alegre, Espírito Santo – Brasil, sob as coordenadas geográficas latitude de 20° 45' 31" S e longitude 41° 31' 32" W, e levadas para o Laboratório de Química 4 (LQ4) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre.

A superfície das folhas foi esterilizada por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% por 5 minutos, seguida de imersão em álcool etílico a 70% (Álcool Etílico 70% 1000mL - Dinâmica) por 1 minuto. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água estéril por 10 minutos, e a última água de lavagem foi colocada em uma placa para verificar a presença de contaminantes fúngicos. Em seguida, as folhas esterilizadas foram cortadas manualmente com tesoura em fragmentos assepticamente (4 pedaços), que foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido batata dextrose ágar (PDA) suplementado com antibiótico para inibição do crescimento bacteriano.

O desenvolvimento dos fungos foi monitorado diariamente e, quando as colônias atingiram aproximadamente 2-3 cm de diâmetro, foram repicadas sucessivamente para a obtenção de linhagens puras. A pureza dos isolados foi confirmada pela aparência homogênea das colônias em placas com meios apropriados. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). A fração 2.8.3, que apresentou um perfil químico puro, foi então submetida a análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (¹H e ¹³C).

Para a realização do ensaio de RMN, as amostras foram dissolvidas em diclorometano deuterado (CDCl₃) (Dichloromethane-D2 – Merk) na proporção de 10 mg de amostra para 0,5 mL de solvente. Foi testado o grupo de folhas maduras, para avaliar a diversidade de compostos produzidos pelos fungos endofíticos. Cada amostra foi submetida a três leituras espectroscópicas independentes para garantir a reprodutibilidade e a consistência dos resultados.

Os isolados fúngicos foram transferidos para placas de Petri contendo meio sólido de PDA (Potato Dextrose Agar), previamente esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Após 7 dias de incubação, o fungo foi transferido para 3 litros de meio de cultivo líquido batata dextrose (Potato Dextrose Broth - PDB), onde foi mantido em cultura estática à temperatura ambiente por 28 dias, resultando em um caldo fermentado.

Para a obtenção do extrato bruto (EB), o caldo foi separado do micélio por filtração, seguido de extração com acetato de etila (Acetato de Etila PA ACS 1000mL - C:99,5 D: 0,90). O extrato obtido foi então concentrado utilizando um evaporador rotatório.

Resultados

Foram isolados quatro fungos, dos quais, até o momento, um foi identificado como *Xylaria* sp (Figura 1).

O fungo *Xylaria* sp. é um membro da família *Xylariaceae*, caracterizado pela sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários (Luo *et al.*, 2022). Esses metabólitos possuem diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas (Becker; Stadler, 2021). O gênero *Xylaria* é amplamente distribuído em regiões tropicais e temperadas e pode ser encontrado em diferentes hospedeiros, como madeira em decomposição, frutas e folhas de plantas (Dos Santos Piancó *et al.*, 2022).

Figura 1 – Cultivo do fungo *Xylaria* sp., isolado de *C. arabica*.



Fonte: Os autores (2024).

O fungo vermelho (FV) (Figura 2) isolado das folhas de *C. arabica* mostrou um perfil único de produção de metabólitos secundários, destacando-se pela biossíntese de um composto inédito. Este fungo foi identificado pela sua coloração característica e por apresentar um potencial biotecnológico significativo.

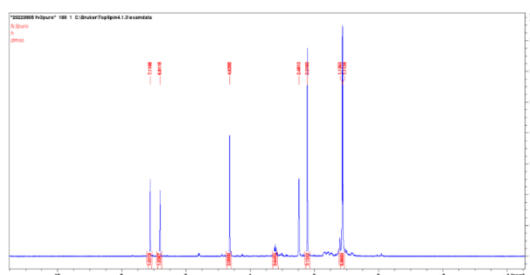
Figura 2 – Cultivo do fungo FV isolado de *C. arabica*.



Fonte: Os autores (2024).

As figuras apresentadas fornecem os espectros de RMN de ^1H dos compostos analisados. Todos os espectros foram obtidos usando diclorometano deuterado (CDCl_3) como solvente e um equipamento Bruker de 300 MHz. Cada espectro oferece informações detalhadas sobre os átomos de hidrogênio presentes nos compostos, permitindo a identificação de grupos funcionais e a determinação da estrutura molecular (D'Oca, 2021).

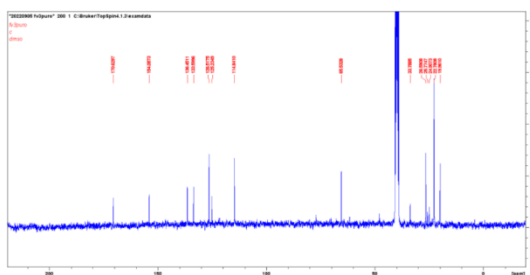
Figura 3 – Espectro de RMN de ^1H do composto 1 em CDCl_3 .



Fonte: Os autores (2024)

Os sinais observados em δ 7,11 e δ 6,81 indicaram a presença de um anel aromático tetrasubstituído. Outros sinais incluíam δ 1,12 (dupla), correspondente a dois grupos metila; δ 3,22 (septeto), indicando um grupo isopropil; δ 2,22, sugerindo um grupo metila ligado ao anel aromático; e δ 4,65, que representa um grupo metilênico (Figura 3).

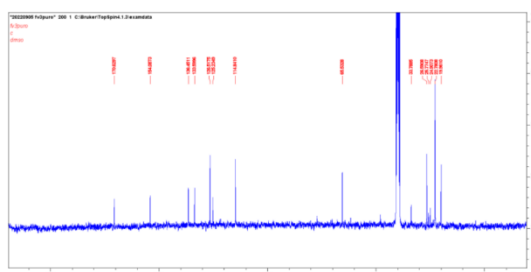
Figura 4 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 em CDCl_3 .



Fonte: Os autores (2024)

O espectro revelou um sinal de carbono carboxílico de éster em δ 170,06 e sinais de carbonos aromáticos em δ 154,08; 136,4; 133,5; 126,5; 125,2 e 114,8 (Figura 4).

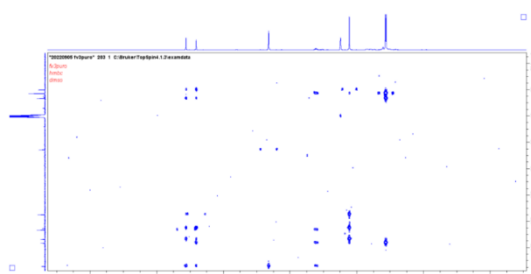
Figura 5 – Espectro bidimensional de RMN HMBC do composto 1.



Fonte: Os autores (2024)

Este espectro auxiliou na determinação da conectividade entre átomos de carbono e hidrogênio, fornecendo informações para a estrutura do composto (Figura 5) (Silva; Nunes, 2024).

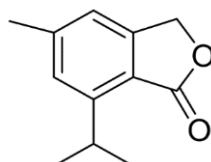
Figura 6 – Espectro bidimensional de RMN HSQC do composto 1.



Fonte: Os autores (2024)

O espectro HSQC permitiu a correlação direta entre átomos de hidrogênio e os carbonos aos quais estão ligados, ajudando na atribuição precisa dos sinais observados (Figura 6) (Fonseca *et al.*, 2022).

Figura 7 - Estrutura proposta para o composto 1, determinada com base nos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e nos espectros bidimensionais HMBC e HSQC.



Fonte: Os autores (2024)

O composto é inédito e não apresenta correlação com compostos conhecidos na literatura, conforme busca realizada no SCIFINDER (Figura 7).

Discussão

O gênero *Xylaria* sp. é conhecido por sua ampla distribuição e por produzir diversos metabólitos secundários com potencial biológico. Esses fungos podem ter propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas, o que é relevante para pesquisas na área de farmacologia e biotecnologia (Ricci *et al.*, 2022).

A presença de *Xylaria* sp. nas folhas de *C. arabica* confirma que esse fungo pode se desenvolver em diversos ambientes. O Fungo FV, com sua coloração vermelha, se destacou pela produção de um composto inédito. Esse pigmento sugere que o fungo pode produzir substâncias com potencial atividade biológica, como antioxidantes ou antimicrobianos, e merece mais investigação (De Andrade *et al.*, 2022).

A análise dos espectros de RMN revelou informações importantes sobre o composto 1. O espectro de RMN de ^1H (Figura 3) mostrou sinais característicos de um anel aromático tetrasubstituído, com deslocamentos em δ 7,11 e δ 6,81, semelhantes aos encontrados em estudos anteriores que analisaram compostos aromáticos com substituintes múltiplos (D'Oca, 2021). Os sinais adicionais, como δ 1,12 e δ 3,22, correspondem a grupos metila e isopropil, enquanto δ 2,22 e δ 4,65 indicam a presença de grupos metilênico e metila ligados ao anel aromático. Esses resultados são consistentes com a estrutura esperada para compostos aromáticos complexos, como descrito na literatura (Ma *et al.*, 2020).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4) revelou um sinal para um carbono carboxílico de éster em δ 170,06 e vários sinais para carbonos aromáticos. Esses dados são consistentes com outros estudos que identificaram compostos aromáticos com grupos éster e carbonos aromáticos em deslocamentos semelhantes (Farkas *et al.*, 2022). A confirmação dos grupos funcionais observados no espectro de ^1H reforça a precisão da nossa análise estrutural.

Os espectros bidimensionais HMBC e HSQC (Figuras 5 e 6) foram cruciais para a determinação da estrutura do composto 1. O HMBC forneceu informações sobre a conectividade entre átomos de carbono e hidrogênio, enquanto o HSQC ofereceu uma visão direta das correlações entre prótons e carbonos. Esses métodos são bem estabelecidos na literatura para a elucidação estrutural de compostos complexos (Yilmaz; Kebiroglu, 2022), e sua aplicação no presente trabalho ajudou a confirmar a estrutura do composto 1 com precisão.

A estrutura proposta para o composto 1 (Figura 7) foi estabelecida com base em uma combinação detalhada dos dados dos espectros de RMN e é inédita, sem correlação com compostos conhecidos na literatura.

Conclusão

A trabalho revelou um potencial significativo dos fungos endofíticos associados às folhas de *Coffea arabica* na produção de compostos bioativos. Identificou-se o gênero *Xylaria* sp. e um fungo não identificado, denominado FV, que produziu um composto inédito chamado 6-metil-7-metoxi-3,4-dihidrocumarina. A estrutura deste composto foi elucidada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

A descoberta da 6-metil-7-metoxi-3,4-dihidrocumarina expande o conhecimento sobre a biodiversidade química dos fungos endofíticos e abre novas possibilidades para o desenvolvimento de produtos com propriedades bioativas. Os próximos passos incluem a avaliação das atividades biológicas do composto isolado, o que poderá confirmar seu potencial para futuras aplicações. A continuidade desses estudos é essencial para explorar e utilizar efetivamente a biodiversidade metabólica dos fungos endofíticos em aplicações práticas.

Referências

BECKER, K., & STADLER, M. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, n. 1, p. 1-23, 2021.

DE ANDRADE, H. F., DA NÓBREGA VERAS, J. S., DE OLIVEIRA SOUZA, A. P., DE OLIVEIRA, P. L., & DE OLIVEIRA, M. B. M. Potencial biotecnológico dos fungos. In: **BIOTECNOLOGIA MICROBIANA-VOLUME 1**. Editora Científica Digital, 2023. p. 43-62.

D'OCA, C. D. R. M. **Ferramentas espectroscópicas na análise de compostos orgânicos: uma aproximação descomplicada**. Editora Intersaberes, 2021.

DOS SANTOS PIANCÓ, E., DOS SANTOS, J., CORRÊA, L. A. D., HATHERLY, R. L., & ZANANDREA, I. Fungos endofíticos na ilha de Upaon-açu, Maranhão, Brasil, e sua importância na conservação da flora. In: **Estudos dendrológicos e ecológicos na Amazônia: oportunidades e experiências**. Editora Científica Digital, 2022. p. 119-134.

FARKAS, G. J., BURTON, A. M., MCMILLAN, D. W., SNEIJ, A., & GATER JR, D. R. The diagnosis and management of cardiometabolic risk and cardiometabolic syndrome after spinal cord injury. **Journal of personalized medicine**, v. 12, n. 7, p. 1088, 2022.

FONSECA, S. A., CUNHA, A. L., LIMA, F. C. A., SILVA, M. C. E., SILVA, K. W. L., ARAÚJO, M. V., & SANTANA, A. E. G. Molecular docking studies and evaluation of the antiretroviral activity and cytotoxicity of the species *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e256261, 2022.

LUO, M., WANG, M., CHANG, S., HE, N., SHAN, G., & XIE, Y. Halogenase-targeted genome mining leads to the discovery of (\pm) pestalachlorides A1a, A2a, and their atropisomers. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1304, 2022.

MA, H., LI, T., WU, S., & ZHANG, X. Effect of the interaction of phenolic hydroxyl with the benzene rings on lignin pyrolysis. **Bioresource technology**, v. 309, p. 123351, 2020.

MONTEL, J. V. F., DE MORAES, G. K. A., DE SOUZA DANTAS, S. B., & CHAPLA, V. M. Caracterização química de extratos brutos obtidos de dois fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 42728-42737, 2021.

PARDO, S. N. F., FERNANDES, G. G., LIMA, V. M. S., REGO, V. M., DE SOUZA, W. P., & RIBEIRO, R. V. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. **Braz J Dev**, v. 8, n. 5, p. 33120-40, 2022.

PINHEIRO, J. B., POLONIO, J. C., ORLANDELLI, R. C., PAMPHILE, J. A., & GOLIAS, H. C. Atividade larvicida de fungos endofíticos: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 35761-35774, 2020.

RICCI, A. P., JÚNIOR, J. C. R. M., PRADEBON, V. P. O., MAIA, L. R., LOOSLI, A. W. M., ROEL, A. R., & DE ALMEIDA, T. T. Bioativos Derivados de Fungos Endofíticos Isolados da *Azadirachta indica* (Neem) e suas aplicações. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e13911932454-e13911932454, 2022.

SILVA, D. R., & NUNEZ, C. V. FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS ISOLADOS DOS EXTRATOS METANÓLICOS DAS FOLHAS E GALHOS DE *Macrolobium acaciifolium* (FABACEAE). **Química Nova**, v. 47, n. 7, p. e-20240040, 2024.

YILMAZ, MÜCAHİT; KEBIROGLU, HANIFI. Investigation of K-Serotonin Structure Using Nuclear Magnetic Resonance by Quantum Chemical Methods. **Journal of Physical Chemistry and Functional Materials**, v. 5, n. 2, p. 49-55, 2022.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Laboratório de Química Orgânica e Farmacognosia (LBQOFARM).