

Desreplicação em *Phomopsis stipata*, um fungo endofítico de *Styrax camporum*, por RMN e EM.

Andressa Somensi^{1*} (PG), Miller Pulito Rufino²(PQ), Vanderlan da S. Bolzani¹ (PQ), Alberto Jose Cavalheiro¹(PQ), Angela Regina Araujo¹(PQ).

*andressasomensi@iq.unesp.br

¹ NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais. Instituto de Química – UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Francisco Degni, 55, CEP 14800-900. Araraquara – SP.

² CEMPEQC - Centro de Monitoramento E Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis Petróleo e Derivados. Instituto de Química – UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Francisco Degni, 55, CEP 14800-900”. Araraquara – SP.

Palavras Chave: *Phomopsis stipata*, desreplicação, dicetopiperazinas.

Introdução

Em geral, micro-organismos produzem extratos brutos muito complexos com dezenas ou centenas de metabolitos secundários¹ o que faz necessária uma detecção eficiente e caracterização rápida dessas substâncias. Nesse contexto, técnicas hifenadas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM e CLAE-EM-RMN são utilizadas na chamada desreplicação de misturas complexas para estabelecer quais já foram previamente identificadas, e assim evitar o resisolamento além de acelerar a detecção e identificação estrutural de possíveis novas drogas. Neste trabalho, analisamos o extrato bruto AcOEt produzido pelo endófito *P. stipata*, aplicando metodologias de desreplicação utilizando técnicas analíticas robustas como a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN). O resultado da utilização dessas técnicas permitiu a identificação de dicetopiperazinas em matrizes brutas.

Resultados e Discussão

O fungo *P. stipata* foi isolado como endófito de folhas saudáveis de *Styrax camporum* de acordo com a metodologia descrita².

Após obtenção da linhagem pura e identificação, esta foi cultivada em 6,4 L de meio de cultura líquido (MBD) estéril por 28 dias a 25 °C. Após este período, o caldo foi separado do micélio por filtração e extraído com AcOEt (3x50% do volume), resultando em 633,4 mg de extrato bruto. Este foi submetido ao fracionamento em CC de fase reversa (C-18) (gradiente MeOH:H₂O (v/v)), fornecendo nove frações (*PsMDBFr1-Fr9*).

A análise por RMN de ¹H e ¹³C (11.7 T, dissolvido em DMSO) das frações *PsMDB Fr03* e *04* de *P. stipata* nos sugeriu a presença de dicetopiperazinas.

De tal modo a confirmar esta suposição utilizou-se o software MestReNova ver. 6.0.2-5475, que possui ferramentas que permitem a simulação de espectros virtuais de RMN de ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁶O, com uma margem de acerto acima de 95%.

Este estudo nos permitiu a detecção *in situ* de quatro dicetopiperazinas, sendo ciclo (Pro-Val) (**1**), ciclo (Pro-Phe) (**2**), ciclo (Pro-Ile) (**3**), e ciclo (Pro-Tyr) (**4**). Adicionalmente, o experimento de espectrometria de massas (FIA – ESI – IT – MSⁿ,

modo positivo, com adição de ácido 1%) para identificar os íons produtos das dicetopiperazinas foi realizado. O padrão de fragmentação de todos os sinais foi estudado e comparado com literatura³, confirmando a presença das substâncias **1-4**.

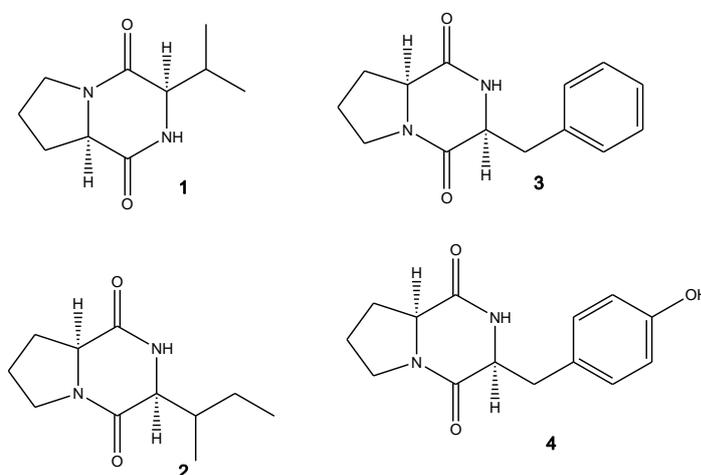


Figura 1. Metabolitos produzidos por *Phomopsis stipata*.

Conclusões

A metodologia utilizada permitiu a rápida detecção de quatro dicetopiperazinas em *P. stipata*, evidenciando ser esta uma ferramenta poderosa e eficaz na identificação de substâncias em matrizes complexas.

Estes resultados reforçam a potencialidade destes micro-organismos como fontes de produtos naturais bioativos uma vez que as substâncias identificadas apresentam várias atividades biológicas³.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida, ao BIOTA/FAPESP e SISBIOTA/FAPESP/CNPq pelo suporte financeiro.

¹ WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Journal of Chromatography, **2003**, 437-455.

² SILVA, G.H. **2005**. 306p. Tese de doutorado em Química- Instituto de Química –UNESP.

³ STARK, T.; HOFMANN, T. J. Agric. Food Chem., **2005**, 7222-7231.