



## ESTUDO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Mariana S. Saraiva<sup>1</sup>; Bruno de A. Gomes<sup>2</sup>; Odair dos S. Monteiro<sup>3</sup>; Ana L. de Lima<sup>4</sup>; Raissa E. C. Cruz<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – Campus São Luís – Monte Castelo; E-mail: [sousamariana@acad.ifma.edu.br](mailto:sousamariana@acad.ifma.edu.br)

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – Campus São Luís – Monte Castelo; E-mail: [bruno.gomes@ifma.edu.br](mailto:bruno.gomes@ifma.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Maranhão – São Luís; E-mail: [Odair.sm@ufma.br](mailto:Odair.sm@ufma.br)

<sup>4</sup>IQ - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro; E-mail: [analima@iq.ufrrj.br](mailto:analima@iq.ufrrj.br)

<sup>5</sup>IQ - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro; E-mail: [raissaecard@pos.iq.ufrrj.br](mailto:raissaecard@pos.iq.ufrrj.br)

**Palavras-Chave:** cromatografia, fungos, voláteis.

### Introdução

A associação entre plantas e microrganismos constitui um pilar da ecologia e da biotecnologia por desempenhar papel essencial na manutenção de ecossistemas e na adaptação das plantas a diferentes condições ambientais. Essas interações podem assumir caráter mutualístico, comensal ou até mesmo parasitário, sendo mediadas por complexos processos bioquímicos. Dentre elas, destacam-se as estabelecidas no interior dos tecidos vegetais, envolvendo microrganismos denominados endofíticos, que colonizam a planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Azevedo et al., 2000). Tais relações podem resultar em benefícios mútuos, como o aumento da resistência da planta a estresses bióticos e abióticos e, em contrapartida, a obtenção de abrigo e nutrientes para os fungos, caracterizando uma relação simbiótica vantajosa para ambos (Rodriguez et al., 2009).

A importância dessas associações torna-se evidente quando se considera a produção de metabólitos secundários, tendo em vista que tanto as plantas quanto os microrganismos endofíticos são capazes de sintetizar compostos bioativos com funções ecológicas específicas. Notavelmente, estudos demonstram que fungos endofíticos podem produzir metabólitos secundários idênticos ou análogos àqueles sintetizados por suas plantas hospedeiras, incluindo substâncias com potencial farmacológico (Strobel; Daisy, 2003).

A partir desse contexto, a espécie *Duguetia furfuracea*, pertencente à família Annonaceae, é um arbusto distribuído em regiões de cerrado do Brasil que apresenta potenciais significativos em estudos de metabólitos secundários (Pinho et al., 2014). Sendo conhecida como “araticum-seco”, essa espécie é muito utilizada na medicina popular, a exemplo do uso do pó das sementes no tratamento de pediculose, bem como infusões de folhas no tratamento de distúrbios renais e como agente antiparasitário (Silva et al., 2007). Quimicamente, a *D. furfuracea* apresenta uma composição complexa, caracterizada pela presença de alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos e outros compostos fenólicos, os quais estão associados a diferentes atividades biológicas, como ação antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, anti-



inflamatória e antitumoral, além de atividade citotóxica e efeitos sobre o estresse oxidativo (Pinho et al., 2014). Entretanto, ainda não se encontram registros na literatura acerca de estudos baseados em metabólitos secundários obtidos a partir de microrganismos associados a essa espécie, assim como suas composições ou potenciais farmacológicos, sejam eles semelhantes ou distintos aos identificados na planta hospedeira.

Assim, tendo em vista a relevância da investigação de fungos endofíticos nessa espécie, o presente trabalho tem como objetivo realizar o isolamento e o cultivo de microrganismos presentes em folhas de *D. furfuracea* para extrair e analisar os compostos orgânicos voláteis (COV's) produzidos por eles. A dopagem dos meios de cultivo usados também é abordada, uma vez que se constitui como uma estratégia experimental interessante para modulação da produção de metabólitos por esses microrganismos. Esse processo ocorre a partir da adição de substâncias específicas — tais como precursores biossintéticos, sais minerais ou indutores químicos — com a finalidade de influenciar rotas metabólicas específicas. No caso desse estudo, o procedimento de dopagem selecionado concentra-se na adição de um sal ( $\text{MnCl}_2$ ), com o intuito de avaliar as mudanças causadas nas rotas metabólicas produzidas na presença do composto e as diferenças observadas em relação ao meio não dopado.

A análise dos COV's coletados baseia-se na cromatografia gasosa, que realiza a separação de compostos em função de sua volatilidade e interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Quando acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a técnica permite a separação eficiente dos constituintes da mistura complexa obtida da extração e a identificação estrutural dos compostos por meio da análise de seus espectros de fragmentação (Skoog et al., 2014). Essa combinação torna o procedimento altamente sensível e aplicável na análise de metabólitos secundários, como terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos e outros compostos orgânicos voláteis. Portanto, ressalta-se a importância do estudo dos compostos produzidos pelos microrganismos associados à espécie *D. furfuracea*, tendo em vista as contribuições ao conhecimento científico na área da Química dos Produtos Naturais, além de propostas de obtenção de compostos orgânicos voláteis biologicamente ativos por meio do cultivo do microrganismo isolado em substituição à extração direta da espécie vegetal, representando uma alternativa para a aplicação dos princípios sustentáveis afim de minimizar os impactos ambientais. A identificação de um microrganismo capaz de produzir compostos de interesse torna possível estabelecer protocolos de cultivo e extração em condições controladas, permitindo maior reprodutibilidade sobre o processo produtivo, sem danos ao material vegetal.

## Material e Métodos

As folhas da espécie *D. furfuracea* foram coletadas em janeiro de 2026, na região de Tajipuru II em São José de Ribamar, MA (2°38'59.7"S 44°10'26.4"W). Para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas foram submetidas à lavagem com água corrente e sabão líquido, seguida de desinfestação superficial conforme metodologia adaptada de Pereira et al. (1993) e

Araújo (2001). Após a desinfestação, fragmentos foliares foram retirados e inoculados em placas de Petri contendo meio BDA, sendo posteriormente incubados para o crescimento dos microrganismos. As colônias fúngicas obtidas foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, utilizando técnicas assépticas com o objetivo da obtenção de culturas sem contaminação.

Para a produção dos metabólitos voláteis, foi selecionado um dos fungos isolados, nomeado como MAR3.1, escolhido por apresentar melhor reprodução, bem como uma macro morfologia mais definida. Como observado na Figura 1, a colônia apresentou desenvolvimento concentrado a partir do ponto de inoculação. A região central exibiu coloração acinzentada, mais intensa que a periferia, enquanto a superfície expôs um aspecto aveludado e as margens relativamente regulares, indicando um crescimento uniforme sobre o meio de cultura.

Figura 1. Fungo MAR3.1.



Fonte: Autores (2026).

Logo, o microrganismo foi cultivado em meio sólido de arroz parboilizado e acondicionado em balões de fundo redondo de 1,0 L. A inoculação foi realizada por meio de suspensão de esporos, seguida de incubação por 20 dias, em temperatura ambiente e sem agitação. Dessa forma, o fungo MAR3.1 foi cultivado em duas etapas distintas, sendo a primeira referente ao crescimento em arroz, não havendo dopagem do meio, e a segunda ao crescimento no meio dopado com a presença do sal  $MnCl_2$ . Os ensaios não foram realizados em duplicata em virtude do caráter inicialmente qualitativo do trabalho, que visou verificar a variação da composição das amostras a partir de condições distintas.

Após isso, as extrações dos COV's produzidos foram realizadas por meio de hidrodestilação, utilizando éter etílico para a coleta dos óleos resultantes, que foram analisados por CG-EM. A análise das amostras coletadas foi feita em um sistema de Cromatografia Gasosa

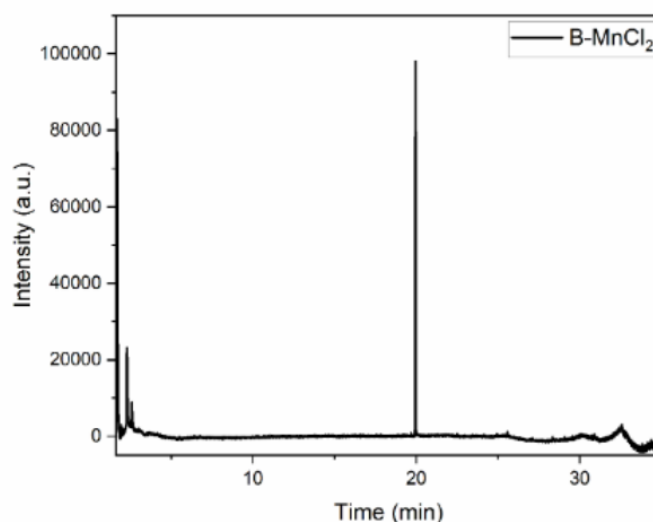


acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM), composto por um Agilent 8860 GC System e detector Agilent 5977C GC/MSD, equipado com injetor automático (modelo Agilent 19091S-433UI). A separação utilizada foi uma coluna capilar HP-5ms Ultra Inert (30 m x 250  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m) e o hélio foi usado como gás de arraste sob fluxo na coluna de 2mL/min, pressão de 18,544 psi, velocidade média de 52,038cm/s e tempo morto de 0,96083min. O volume de injeção foi de 0,2 $\mu$ L no modo split (5:1), com injetor mantido a 200 °C. A programação de temperatura do forno iniciou em 50 °C (isoterma de 5 min), seguida de uma rampa de 7°/min até 290 °C (mantida por 5 min), totalizando uma corrida de 44 min. No espectrômetro de massas, foi configurado um *solvent delay* de 1,5 min.

### Resultados e Discussão

As análises por CG-EM evidenciaram diferentes componentes nas amostras estudadas em condições distintas. Dessa maneira, ao se tratar inicialmente da amostra B-MnCl<sub>2</sub>, que corresponde ao branco do ensaio dopado contendo apenas o meio sólido de arroz e o sal MnCl<sub>2</sub>, o cromatograma obtido a partir da análise demonstrou a presença de um único pico encontrado em 19,947 min, conforme mostrado na Figura 2, sendo o pico inicial correspondente ao solvente utilizado, éter etílico.

Figura 2. Cromatograma referente à análise da amostra B-MnCl<sub>2</sub>.



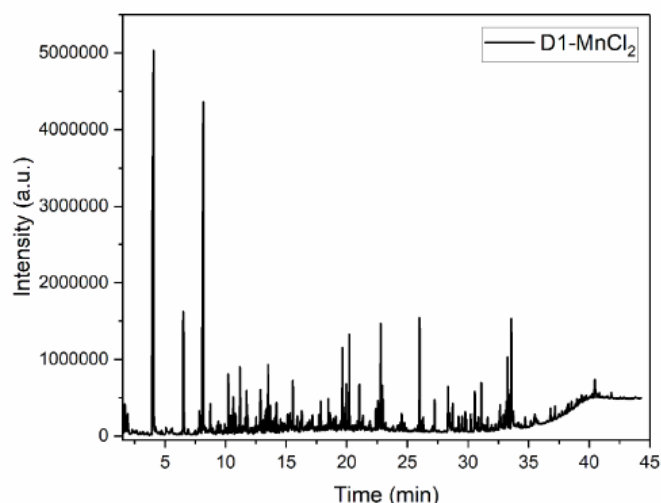
Fonte: Autores (2026).

A partir disso, o programa de espectro de massas realizou uma busca na biblioteca do aparelho e, confrontando com os dados da literatura, foi possível sugerir que o pico com tempo de retenção próximo a 20 min trata-se do Curcumenol, com uma baixa probabilidade de 6,9%. No entanto, para a confirmação da identidade do composto, se faz necessário outros meios de caracterização que permitam melhores correspondências com probabilidades mais elevadas.

Além disso, em relação às análises das amostras não dopadas com o sal  $\text{MnCl}_2$ , as quais foram identificadas como B- Não dopado (branco do ensaio- meio sólido de arroz) e D1- Não dopado (meio sólido de arroz e o fungo MAR3.1), os cromatogramas obtidos foram idênticos ao representado na Figura 2, referente à amostra B- $\text{MnCl}_2$ . Dessa forma, a ausência de picos adicionais além daquele registrado próximo a 20 min nas análises demonstrou o mesmo perfil cromatográfico para tais amostras. Isso possibilitou sugerir que não houve produção expressiva de COV's pelo fungo cultivado nas condições oferecidas, uma vez que o cromatograma atribuído aos brancos do ensaio, contendo somente o meio sólido de arroz, também foi atribuído à amostra contendo meio sólido de arroz e o fungo inoculado. Sendo assim, o composto preponderante apresentado nos cromatogramas foi produzido pelo próprio meio de cultivo utilizado no experimento, o arroz parboilizado.

Todavia, no que diz respeito à amostra extraída do ensaio com dopagem contendo o meio sólido de arroz e o fungo cultivado (D1-  $\text{MnCl}_2$ ), as análises viabilizaram a identificação de composições completamente distintas e muito mais complexas em relação às amostras discutidas anteriormente, como evidenciado na Figura 3.

Figura 3. Cromatograma referente à análise da amostra D1- $\text{MnCl}_2$ .



Fonte: Autores (2026).

Assim como realizado no cromatograma apresentado na Figura 2, o programa de espectro de massas, através da análise dos espectros dos compostos em confronto com a biblioteca do aparelho e na literatura em plataforma de busca como o NIST, foi capaz de indicar que a amostra de COV's extraída em meio dopado expôs grande complexidade em termos de composição em decorrência da presença de inúmeras substâncias distintas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos indicados pela análise de CG-EM para a amostra D1- $\text{MnCl}_2$



| Composto                  | Tempo de retenção (min) |
|---------------------------|-------------------------|
| Furfural                  | 3,976                   |
| 1-(2-furanil)etanona      | 6,501                   |
| Benzaldeído               | 7,872                   |
| 5-metilfurfural           | 8,114                   |
| p-Cresol                  | 11,193                  |
| Tetradecano               | 17,847                  |
| Curcumenol                | 19,963                  |
| Decosanoato de etila      | 27,263                  |
| Hexadecanonitrila         | 28,741                  |
| Palmitoleato de glicidila | 33,180                  |

Fonte: Autores (2026).

Logo, a diferença significativa denunciada pelos cromatogramas apresentados permitiu acreditar que a presença do sal de dopagem  $\text{MnCl}_2$  na concentração de trabalho (125ppm) em meio sólido de arroz provocou alterações nas rotas metabólicas oriundas do fungo inoculado e possibilitou a obtenção de variados compostos orgânicos, tendo em vista que não foram denotadas produções relevantes de voláteis pelo microrganismo apenas no meio de cultivo. Dessa forma, a influência da composição do meio de cultivo sobre o metabolismo do fungo endofítico estudado se torna evidente, uma vez que as condições nutricionais e químicas do ambiente exercem papel determinante na expressão de vias metabólicas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários (Strobel; Daisy, 2003). A dopagem dos meios de cultivo com sais metálicos representa uma abordagem de modulação muito eficiente, pois se fundamenta na capacidade dos metais de influenciarem processos bioquímicos essenciais ao metabolismo celular. Diversos íons metálicos, como ferro ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), participam diretamente da estrutura ou da ativação de inúmeras enzimas envolvidas na respiração celular, no metabolismo oxidativo e na síntese de metabólitos secundários (Nelson; Cox, 2021). Assim, como constatado pelo presente trabalho, pequenas alterações na concentração desses elementos podem provocar modificações significativas na atividade metabólica dos fungos, resultando em mudanças na produção de compostos bioativos como resposta ao estresse causado pelo ambiente.

Além disso, a partir dos resultados observados, torna-se interessante comparar os compostos orgânicos voláteis obtidos a partir do fungo endofítico cultivado e aqueles descritos pela literatura para o óleo essencial extraído diretamente da planta *D. furfuracea*, sendo reveladas diferenças significativas em sua composição química. Estudos focalizados na caracterização do óleo essencial da espécie apresentam diversos resultados para a sua composição, destacando principalmente constituintes provenientes dos monoterpenos e sesquiterpenos, como  $\beta$ -felandreno, sabineno, terpinen-4-ol, biciclogermacreno, espatulenol, germacreno-D e *trans*-cariofileno (Valter et al., 2008). No entanto, tais compostos não foram identificados na análise cromatográfica realizada com os metabólitos produzidos pelo fungo cultivado. Essa divergência sugere que o microrganismo pode ter apresentado um metabolismo



secundário distinto daquele atribuído à planta hospedeira, reforçando que fungos endofíticos podem sintetizar metabólitos específicos (Schulz; Boyle, 2005). Não obstante, a ausência de compostos em comum entre os estudos levanta a hipótese de que alguns metabólitos descritos para *D. furfuracea* possam estar relacionados também à atividade de outros fungos endofíticos associados à espécie ou serem produzidos exclusivamente pelos tecidos vegetais.

## Conclusões

O fungo MAR3.1, isolado da espécie botânica *Duguetia furfuracea*, foi capaz de apresentar uma complexidade de metabólitos voláteis muito distinta a depender das condições de incubação ao qual foi submetido. Em meio sólido de arroz sem dopagem, o fungo não expôs variedade de COV's produzidos de forma distinta aos produzidos pelo meio; enquanto em meio sólido de arroz dopado com o cátion metálico  $Mn^{2+}$ , o microrganismo gerou diversos compostos em intensidades e tempos de retenção diferentes, analisados pelo CG-EM. Logo, a dopagem de meios de cultivo com  $MnCl_2$  se configura como uma estratégia promissora para a manipulação do metabolismo de fungos endofíticos, permitindo modular tanto o crescimento quanto a produção de compostos orgânicos voláteis.

A partir desse cenário, torna-se notória a importância associada aos estudos envolvendo a dopagem de meios de cultivo e a análise de COV's produzidos por microrganismos endofíticos, tendo em vista a contribuição para ampliar o conhecimento acerca da regulação metabólica dos fungos e dos mecanismos que controlam a expressão de vias biossintéticas silenciosas. Essa abordagem representa uma alternativa sustentável para a obtenção de compostos de interesse biotecnológico, reduzindo a necessidade de exploração direta da planta hospedeira e favorecendo o aproveitamento racional da biodiversidade microbiana.

## Referências

- ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ARAÚJO, W.L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 229-236, 2001.
- AROLLO, C. A. et al. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.



BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.

CAROLLO, C. A. et al. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1047–1058, 2007.

DA SILVA, D. B. et al. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 8, p. 1560–1565, 2007.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Amsterdam, v. 69, p. 291–299, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: princípios de bioquímica. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2021.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. São Paulo: Makron Books, 1997.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia*, 85: 362–364, 1993.

PINHO, F. V. S. A. et al. Phytochemical constituents and toxicity of *Duguetia furfuracea* hydroalcoholic extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

RODRIGUES, V. R. G.; CARVALHO, D. A. Plantas medicinais no campo. Lavras: UFLA, 2001.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, London, v. 182, n. 2, p. 314–330, 2009.

SANTOS, D.; SALATINO, A. Flavonoids of *Duguetia furfuracea*. 2000.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. *The endophytic continuum*. *Mycological Research*, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.

SKOOG, D. A. et al. *Fundamentos de química analítica*. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.



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

VALTER, J. L. et al. *Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de Duguetia furfuracea (Annonaceae)*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 373–378, 2008.