

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

GLICOESFINGOLIPÍDIO DA PAREDE CELULAR DE *FUSARIUM OXYSPORUM*: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DE FLAVONÓIDES EM *PASSIFLORA ALATA*

¹Mariana Collodetti Bernardino; ¹Rosa Maria Tavares Haido; ³Renata de Oliveira Garcia; ²Eliana Barreto-Bergter.

1 - Instituto Biomédico, UNIRIO-RJ

2 - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ-RJ

3 - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ-RJ

Apoio: UNIRIO, UFRJ e UERJ.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*; glicoesfingolipídeo; TLC.

INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link e Gray em 1821 e compreende um grupo de fungos filamentosos, de reprodução assexuada (produção de conídios), com micélio vegetativo e hifas septadas. Sua principal característica é a produção de macroconídios, que são conídios em forma fusóide e multiseptados além de, também, produzirem microconídios e clamidoconídios (OHARA E TSUGE, 2004). *Fusarium oxysporum* é uma espécie fúngica que tem sido estudada devido a sua capacidade fitopatogênica, sendo economicamente importante (BURGESS, NELSON E SUMMERELL, 1989) e por estar emergindo também como um importante fungo oportunista causador de doenças em hospedeiros humanos imunocomprometidos (GORDON, OKAMOTO E MILGROOM, 1992). A parede celular é uma estrutura altamente relevante na célula fúngica, responsável pela forma e a integridade do fungo e pela interação do fungo com o ambiente (ADAMS, 2004). Schoffmeier e colaboradores (1999) estudaram a composição química da parede celular do *Fusarium oxysporum* e demonstraram que nas hifas, a parede era composta de N-acetilglucosamina (8-11%), açúcares neutros como glucose, manose, galactose (63-66%), proteína (7-8%) e ácidos urônicos (9-11%). Gliconjugados já foram descritos como moléculas envolvidas nos processos cruciais para colonização dos tecidos como a adesão e a diferenciação celular, sendo também considerados fatores de virulência em *A. fumigatus*, *Candida albicans* (LÓPEZ-RIBOT et al., 2004) e *Pseudallescheria boydii* (PINTO et al., 2004). Nos vegetais, pode se instalar e se desenvolver em seus tecidos, causando severas perdas em lavouras. Isto é possível devido à capacidade de penetração das hifas em raízes e tecidos de plantas e à produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal, tais como celulase e pectinases (CARLILE & WATKISON, 1996). As glicosilceramidas são glicoconjugados também encontrados na parede celular fúngica, compostos por uma unidade de açúcar, galactose ou glucose, ligada a uma ceramida, contendo uma base conservada 9-metil-4,8-esfingodienina N-ligada a um ácido graxo de cadeia longa, sendo designada genericamente de monohexosilceramida (CMH) (BARRETO-BERGTER, PINTO & RODRIGUES, 2004). Pinto e colaboradores (2002) caracterizou quimicamente uma glucosilceramida de *Pseudallescheria boydii*, expressa no micélio, mas não no conídio e demonstrou o seu envolvimento na diferenciação do fungo indicando, conseqüentemente, que o CMH poderia estar participando da infectividade da célula fúngica. As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses e conseguem modular respostas de defesa de forma a superar tais estresses e retornar ao metabolismo normal. Saber como os vegetais se protegem é essencial para obter, através da bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes, o que pode aumentar a produção e a qualidade das plantas. Por isso, diversos grupos de pesquisa buscam definir o papel de cada substância participante dos processos bioquímicos relacionados à defesa das plantas. O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), com produção aproximada de 491.619 toneladas (FNP, 2007). Entretanto, a expansão da área plantada fez-se acompanhada do surgimento e/ou agravamento de um grande número de doenças. Estes problemas fitossanitários têm reduzido o tempo de exploração econômica da cultura e, até mesmo, inviabilizado o seu cultivo em determinadas regiões (FISCHER et al., 2005). Das doenças importantes para o maracujazeiro no Brasil, destacam-se a fusariose (*Fusarium solani*) e aquelas provocadas por nematoides. A fusariose, também conhecida como 'morte prematura', causa sérios prejuízos em lavouras de maracujazeiro de várias regiões do País. Inicia-se com o amarelecimento e murcha de ramos, até o secamento de toda a planta, resultado da podridão do colo e do sistema radicular (FISCHER et al., 2005). O controle de fitopatógenos de solo é realizado, preferencialmente, pelo uso de cultivares resistentes. Este tipo de controle também é o método preferido pelos agricultores por ser mais barato e de fácil implementação. Todas as variedades cultivadas e silvestres de *P. edulis* (maracujá-roxo) e de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) apresentam algum nível de suscetibilidade ao *F. solani* (RONCATTO et al., 2004; FISCHER et al., 2005).

OBJETIVO

Extrair, purificar e caracterizar a estrutura de glicoesfingolipídeo da parede celular de *F. oxysporum* e avaliar o seu efeito na produção de flavonóides em *Passiflora alata*.

METODOLOGIA

O microrganismo utilizado nesse trabalho foi a cepa n° 4247 de *F. oxysporum*, da Coleção de Fungos da FIOCRUZ, cedida pela Dra. Maria Inez Sarquis, cuja manutenção foi feita em meio de cultura Sabouraud modificado (SAB-M) sólido inclinado. A massa de células foi obtida pelo crescimento do fungo a partir da inoculação de uma amostra *F. oxysporum* em Erlenmeyer contendo 2L do meio de manutenção líquido (SAB-M líquido) durante 7 dias à temperatura ambiente, sob agitação. O micélio foi recuperado por filtração em funil de Buchner, lavado com água destilada e estocado a -20°C. Para a extração e purificação dos glicoesfingolipídeos (CMH) a massa total de células obtida durante o período de crescimento foi tratada com clorofórmio/

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

metanol (2:1 e 1:2, v / v), submetida a partição de Folch (clorofórmio/ metanol/ KCl 0,75%; 8:4:3 v/v) e fracionado e purificado por meio de várias etapas cromatográficas em coluna de gel de sílica utilizando como solvente clorofórmio:acetona:metanol em diferentes proporções (DA SILVA et al., 2004). Por espectrometria de massa utilizando spray de elétrons (ESI-MS), essas moléculas foram identificadas como N-2'-hidroxioctadecanoil-1-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina e N-2'-hidroxioctadecenoil-1-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina. Para avaliar o efeito do CMH de *F. oxysporum* nas folhas de maracujá, foi feita a elicitação das folhas de *P. alata* com o CMH do fungo em estudo. O CMH foi ressuspensionado em diferentes concentrações (0 (controle), 50, 100, 200 e 400 µg/mL) em uma solução de 20mM de fosfato de potássio, pH 6,5, contendo 0,1% de Tween 20. Para realização dos experimentos foram utilizadas duas folhas de plantas de *P. alata* mantidas em casa de vegetação. Em cada folha foram feitos dez pequenos furos com agulha de seringa de 5 mL. Em cada fermento foram depositados 2 µL da solução de CMH. Após 2 dias as folhas foram removidas e processadas (KOGA, et. al., 1998). Os extratos das folhas de *P. alata* tratadas com CMH foram obtidos colocando as folhas tratadas para secar a 45° C. Após a secagem as folhas foram trituradas em moinho e posteriormente extraídas por decocção (±90°C) com etanol 40°GL (em água) por 10 minutos numa relação material vegetal:solvente 1:10 (m:v). Após resfriamento os extratos foram filtrados e o solvente eliminado sob pressão reduzida a 50°C em evaporador rotatório. Os extratos secos obtidos a partir das folhas de *P. alata*, foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC). As cromatografias foram desenvolvidas em placas com gel de sílica GF254 sendo que a fase móvel utilizada para a visualização de flavonóides foi acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26, v/v). Cada fase móvel migrou 10 cm a partir do ponto de aplicação. A identificação das substâncias contidas nos extratos foi feita, por TLC e como substâncias padrões, foram utilizadas: vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina e rutina.. Para a visualização de flavonóides (no visível), uma placa foi borrifada com solução de vanilina sulfurada e aquecida a 100°C, Uma segunda placa foi seca e revelada com o reagente difenilboriloxietilamina: polietilenoglicol (NP:PEG). A fluorescência foi observada em câmara de UV (365 nm) e posteriormente fotografadas. Para complementar o estudo, também analisamos o perfil químico dos extratos de *P. alata* por HPLC. As análises cromatográficas, dos extratos de folha de *P. alata* elicitadas com CMH de *F. oxysporum* foram realizadas em cromatógrafo Ultimate 3000, com um detector Diode Array e coluna ACCLAIM, C18 (Dionex Bonded Silica Products, 5 mm, 120 Å, com a dimensão de 4,6 X 250 mm). A fase móvel utilizada foi constituída de Acetonitrila (A) e Ácido acético 1% em água (B) em um sistema gradiente; 0-30 minutos, 5-20% de A em B e de 30-40 minutos isocrático 20% A em B. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção de 10 µL. A detecção foi realizada no ultravioleta (UV), a 340 nm, e os espectros de UV obtidos na faixa de 700 – 200 nm. Como substâncias de referência foram utilizadas isoorientina, isovitexina, orientina, vitexina e rutina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS

Os resultados observados por espectrometria de massa utilizando spray de elétrons (ESI-MS) indicaram, que as moléculas presentes no CMH de *F. oxysporum* foram identificadas como N-2'-hidroxioctadecanoil-1-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina e N-2'-hidroxioctadecenoil-1-β-D-glucopiranosil-9-metil-4,8-esfingadienina. Essas estruturas são semelhantes às encontradas em outros fungos, evidenciando assim a característica conservada desta molécula nos diferentes fungos estudados. Vários estudos demonstraram a importância dessa molécula na diferenciação, crescimento e viabilidade celular (BARRETO-BERGTER et al., 2004), processos básicos e essenciais para as células fúngicas que podem explicar o fato desses glicosíngolipídeos serem tão conservados entre as diferentes espécies. Por meio da análise qualitativa por TLC, constatou-se que os compostos químicos dos extratos de *P. alata* elicitados com o CMH em diferentes concentrações, quando reveladas com a solução de vanilina sulfurada/aquecimento (100°C), indicaram a presença de triterpenos e saponinas, assinalados pela reação de coloração (rúsea) típica frente ao agente cromogênico empregado. No entanto, a placa borrifada com solução de vanilina sulfurada, seguido por revelação com PEG 400 (5% w/v) e observada no UV (365nm), mostrou um perfil semelhante para todas as amostras. Duas substâncias chamaram atenção pela coloração típica de flavonóides (verde e o amarelo fluorescentes). Também foi possível visualizar uma banda azul fluorescente no topo da imagem que não aparece no controle, mas aparece em todas as amostras elicitadas com CMH. A análise dos extratos de *P. alata* por HPLC permitiu a visualização de cinco picos com tempos de retenção semelhantes nas amostras, sendo os picos 1 e 4 identificados como orientina e isovitexina, respectivamente, por meio dos parâmetros de comparação dos tempos de retenção, co-injeção com amostras autênticas e pelo perfil no UV. No entanto, essas substâncias foram encontradas em pouquíssima quantidade. Müller e colaboradores (2005) determinaram por HPLC a quantidade de isovitexina (0,018 g%) no extrato fluido de folhas de *P. alata*. Os autores detectaram apenas traços de vitexina e não foi detectada a presença de orientina, hiperosídeo, rutina, hesperidina e ácido clorogênico. Este resultado é bem semelhante ao que encontramos, já que os picos encontrados para orientina e isovitexina foram pequenos e as outras substâncias descritas para folhas de *P. alata* não foram detectadas. Observamos também que o pico 3 (RT = 28,7 min), foi predominante e pode ser o flavonóide vitexina-2"-O-ramnosídeo, baseados na comparação com o seu tempo de retenção descrito na literatura (MADOGLIO, 2011). Uma alteração na produção desta substância nos extratos das folhas tratadas com CMH nas concentrações de 200 e 400 µg/mL também foi observada. Estes resultados sugerem que o CMH causa alterações na produção de metabólitos secundários em *P. alata*.

CONCLUSÃO

Os CMHs identificados por ESI-MS foram N-2' hidroxioctadecanoil-9-metil-4,8-esfingadienina e N-2' hidroxioctadecenoil-9-metil-4,8-esfingadienina. O perfil químico dos extratos de folhas de *P. alata* elicitadas com CMH por TLC indicou a presença de triterpenos e saponinas, quando reveladas com a solução de vanilina sulfurada/aquecimento (100°C). Todas as amostras elicitadas apresentaram um perfil químico de flavonóides semelhantes quando reveladas com a solução apropriada para visualização no UV. A análise qualitativa por HPLC mostrou a presença de cinco substâncias em cada extrato. Em todos os extratos das folhas de *P. alata* elicitadas com CMH,

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

o pico 3 ($t_r=28,7\text{min}$) foi o majoritário e baseado na literatura nós sugerimos que seja a vitexina-2"-O-ramnosideo. Os picos 1 e 4 foram identificados como orientina e isovitexina, respectivamente. O tratamento com CMH parece induzir um aumento da substância majoritária, sugerindo uma resposta da planta a este elicitor.

REFERÊNCIAS

- ADAMS DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 2004; 150: 2029-2035.
- BARRETO-BERGTER, E., PINTO, M.R., RODRIGUES, M.L. Structure and biological functions of fungal cerebroside. *An Acad Bras Cienc.* 76 (1): 67-84. 2004.
- BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; SUMMERELL, B. A. Variability and stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from soils in Australia. *Mycology*, n.5, p.370-375, 1989.
- CARLILE, J. M.; WATKINSON, S. C. *The Fungi*. Ed. Academic, Londres, 3ªed., p. 307-371, 1996.
- FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; MARTINS, M. C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria hematococca*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 250-258, 2005.
- FNP-Consultoria e Agroinformativos. *Agrianual 2007: anuário estatístico da agricultura brasileira (Maracujá)*. São Paulo, 2007.
- KOGA J, YAMAUCHI T, SHIMURA M, OGAWA N, OSHIMA K, UMEMURA K, KILUCHI M & OGASAWARA N. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem* 273: 31985-31991. 1998.
- LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., MURGUI, A. & MARTÍNEZ, J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 41 (3), 187-196. 2004.
- MADOGLIO, F. A. *Investigação fitoquímica das partes aéreas de Passiflora alata* Curtis. Universidade Federal de Santa Catarina Dissertação de Mestrado, 2011.
- MULLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. L.C. UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 37, p. 399-403, 2005.
- OHARA, T.; TSUGE, T. FoSTUA, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, v.3. n.6, p.1412-1422, 2004.
- PINTO M.R, DE SÁ A.C, LIMONGI C.L, et al. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microbes Infect.* 6: 1259_1267. 2004.
- PONTON, J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol.* 25, 78-82. 2008.
- RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C. R. C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 3, p. 552-554, 2004.