



# Estudo Químico do patógeno *Colletotrichum* causador da doença podridão floral em *citros*

Palavras-Chave: fitopatógenos; metabólitos; *citrus sinensis*

Autores/as:

Caio Augusto Franco da Silveira [UNICAMP]

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taicia Pacheco Fill (orientadora) [UNICAMP]

## INTRODUÇÃO:

O interesse deste projeto é realizar estudos sobre o metabolismo secundário dos fungos do gênero *Colletotrichum*, responsáveis pela doença conhecida como podridão floral dos citros (PFC), que ocasionam a queda prematura dos frutos. A espécie fitopatogênica *C. acutatum*, uma das principais do gênero, já foi responsável por cerca de 95% das perdas de produção de laranjas doces no sul do país. No estado de São Paulo, maior produtor de laranja, detendo 80% da produção nacional, a PFC é uma das principais doenças que afligem a citricultura (Silva-Junior et al., 2014). O patógeno *C. acutatum*, é comum nas regiões úmidas dos trópicos e subtropicais e seu desenvolvimento ainda é favorecido nas plantas cítricas que florescem mais de uma vez por ano. Deste modo, o Brasil é intensamente afetado pela doença, bem como os países da América Central e regiões mais ao sul dos Estados Unidos como a Flórida (Silva-Junior et al., 2014; Kupper, K. C. et al., 2003).

Atualmente o controle da maior parte das pragas fitopatogênicas é feita através da pulverização das plantações com agrotóxicos. Todavia, é de conhecimento que estes pesticidas estão associados a diversas doenças crônicas humanas, as disfunções hormonais e neurais e ao desenvolvimento de carcinomas (Sarwar, M., 2015). Portanto se faz necessário o estudo e desenvolvimento de novas técnicas capazes de suprir a necessidade de um defensivo agrícola, e que sejam biologicamente não danosas à saúde humana e a natureza. O estudo dos metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos, permite interpretar os mecanismos de infecção e associar aos clusters gênicos responsáveis por essa ação, assim pode-se desenvolver inibidores de expressão gênica com o intuito de impedir essa ação fitopatogênica do fungo de maneira branda e sem o uso dos agros defensivos. Uma outra vertente no estudo desses metabólitos é a identificação de produtos naturais de interesse industrial que podem ser utilizados como insumos para áreas farmacêuticas e cosmetológicas.

## METODOLOGIA:

O projeto possui como objetivos o isolamento do fungo fitopatogênico causador da postbloom fruit drop, mais conhecida no Brasil como podridão floral, bem como a otimização do meio de cultura *in vitro* que resulte numa maior produção de metabólitos secundários. Posteriormente foram realizadas avaliações do potencial biossintético destes microrganismos via análises em HPLC-MS para identificação de metabólitos de interesse. Uma vez obtido informações sobre o perfil metabolômico do fungo, realizou-se experimentos em larga escala para o isolamento de moléculas alvos, estas serão isoladas utilizando-se HPLC preparativo e suas estruturas serão elucidadas por métodos de ressonância magnética nuclear. Finalmente, serão realizados testes de fitotoxicidade frente ao hospedeiro *citrus* para determinação da bioatividade

dos compostos. Os dados obtidos neste estudo ainda poderão ser utilizados para projetos posteriores, onde será possível a realização de um rastreio genético com o objetivo de efetuar a deleção dos genes responsáveis pela produção das micotoxinas e consequente estudo metabólico do microrganismo mutante, assim como a sua respectiva virulência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 1. Cultivo do Microrganismo:

Na primeira etapa do projeto, foi realizado o cultivo do patógeno *Colletotrichum*, em diversos meios de cultura visando otimizar seu crescimento e também a produção de metabólitos secundários. O fungo foi inoculado em placas de Petri contendo aproximadamente 25 mL de BDA (batata-dextrose-ágar) e também placas contendo o meio Czapek, além disso foram testados meios líquidos como o Czapek e o meio contendo suco de laranja com ágar. Os inóculos foram então armazenados em ambiente estático e livre de claridade por 7 dias. Como apresentado na Figura 1, todos os meios apresentaram bom desenvolvimento do microrganismo. Assim, foi escolhido como meio para esse estudo o Czapek sólido, este possui uma composição conhecida e, portanto, é possível controlar as interferências da matriz durante as análises cromatográficas, isto reflete na geração de perfis metabólicos mais limpos e definidos para o estudo.

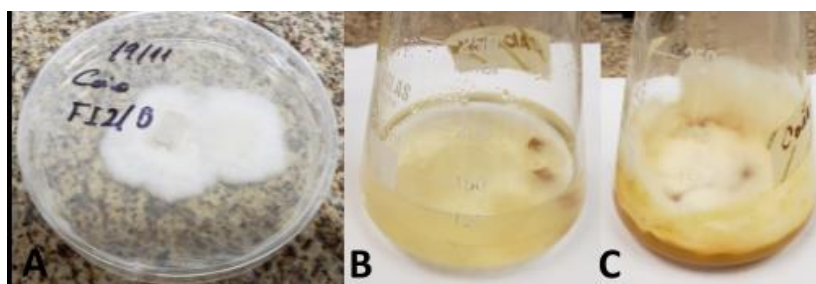


Figura 1- Cultivo do fungo do gênero *Colletotrichum* em Czapek sólido (A), Czapek líquido (B) e suco de laranja com ágar (C).

### 2. Ensaio de infecção *in vivo*:

Neste experimento foi preparada uma suspensão de esporos do microrganismo em estudo, para isso lavou-se uma placa de Petri contendo o fungo cultivado com água destilada, em seguida a água contendo esporos foi diluída e analisada em uma câmara de Neubauer para contagem de esporos e consequente determinação da concentração de esporos na solução. Após o preparo da suspensão de esporos foi iniciada a desinfecção das laranjas, os frutos são imersos em uma solução contendo hipoclorito de sódio por cerca de 10 min e depois imersos em um novo banho contendo água destilada. Finalmente, em ambiente estéril, é realizada uma incisão nas laranjas onde é injetado cerca de 10 µL da solução de esporos. O fruto inoculado foi então observado durante períodos de 3, 5, 7 e 9 dias para acompanhamento da infecção. Como a Figura 2 demonstra, não foi possível observar sinais de evolução do *Colletotrichum* quando comparamos a laranja infectada com uma outra do grupo de controle.

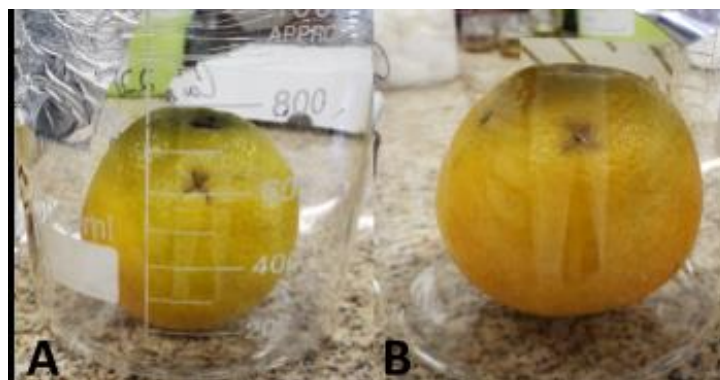


Figura 2- Teste de infecção do fungo *in vivo*. Nota-se que não há diferenças entre a laranja do grupo controle (A) e do fruto inoculado com solução de esporos (B).

### 3. Análise do perfil metabólico:

Após o cultivo do fungo foi realizado a extração dos metabólitos produzidos na placa via processo de extração líquido-líquido, onde o meio inoculado é lavado com uma mistura do tipo metanol, acetato de etila e diclorometano (1:2:3, v/v/v). Posteriormente, a fase orgânica do solvente utilizado é resgatada e seca em capela, o extrato seco foi então ressuspensionado em metanol grau HPLC, filtrado e envasado para análise. O equipamento utilizado para as análises foi um HPLC- MS/MS de alta resolução e o perfil obtido pode ser observado na Figura 3.

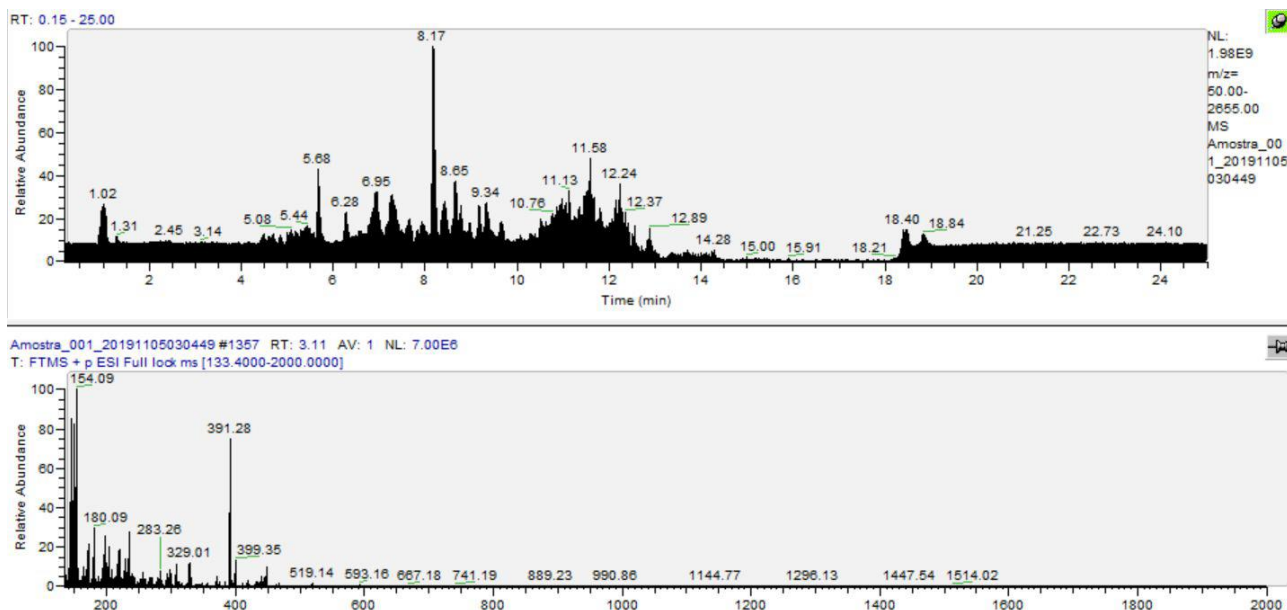


Figura 3 - Cromatograma obtido da extração de metabólitos do fungo *Colletotrichum*.

Uma análise do perfil cromatográfico obtido revelou a presença de pequenas cadeias peptídicas cíclicas como o ciclo-(Phe-Val-Val-Tyr) de  $m/z$  509,27 e também a presença de alguns dipeptídeos como o Piro-(Glu-Phe) de  $m/z$  277,12 e a Ciclo-(Pro-Leu) com  $m/z$  211,14. Essas pequenas cadeias de aminoácidos têm sido observadas em diversos sistemas onde o fungo fitopatogênico está infectando seu hospedeiro e são o atual alvo de estudo para a compreensão dos mecanismos de patogenicidade desses microrganismos. A correlação entre essas cadeias e os cluster genéticos ativos do fungo durante a infecção endofítica é uma das chaves para o controle do mesmo nas plantações.

Além disso, alguns desses peptídeos ainda não foram caracterizados quanto a sua toxicidade frente às plantas, e o isolamento dos mesmos parece possível frente às intensidades dos picos obtidos nos cromatogramas do extrato metabólico do *Colletotrichum*.

#### 4. Cultivo escalonado e extração de metabólitos:

Visando a obtenção de metabólitos em quantidade suficiente para isolamento e identificação, foi realizado um cultivo em larga escala no qual 150 placas foram cultivadas seguindo o procedimento de cultivo já citado anteriormente. Elas foram extraídas com uma mistura do tipo metanol, acetato de etila e diclorometano (1:2:3, v/v/v), e logo após a obtenção do extrato bruto, foi feita uma separação cromatográfica por cromatografia de coluna aberta usando metanol como fase móvel *Sephadex LH-20* como fase estacionária. Como resultado, obtiveram-se 35 frações.

#### 5. Análise DAD das frações obtidas no cultivo escalonado:

A partir das frações obtidas durante o cultivo escalonado, foi realizada uma análise via HPLC-DAD, onde o objetivo foi obter os perfis cromatográficos das frações no espectro do ultravioleta e posteriormente realizar a junção das frações com perfis semelhantes. Alguns dos espectros obtidos são apresentados na Figura 4.

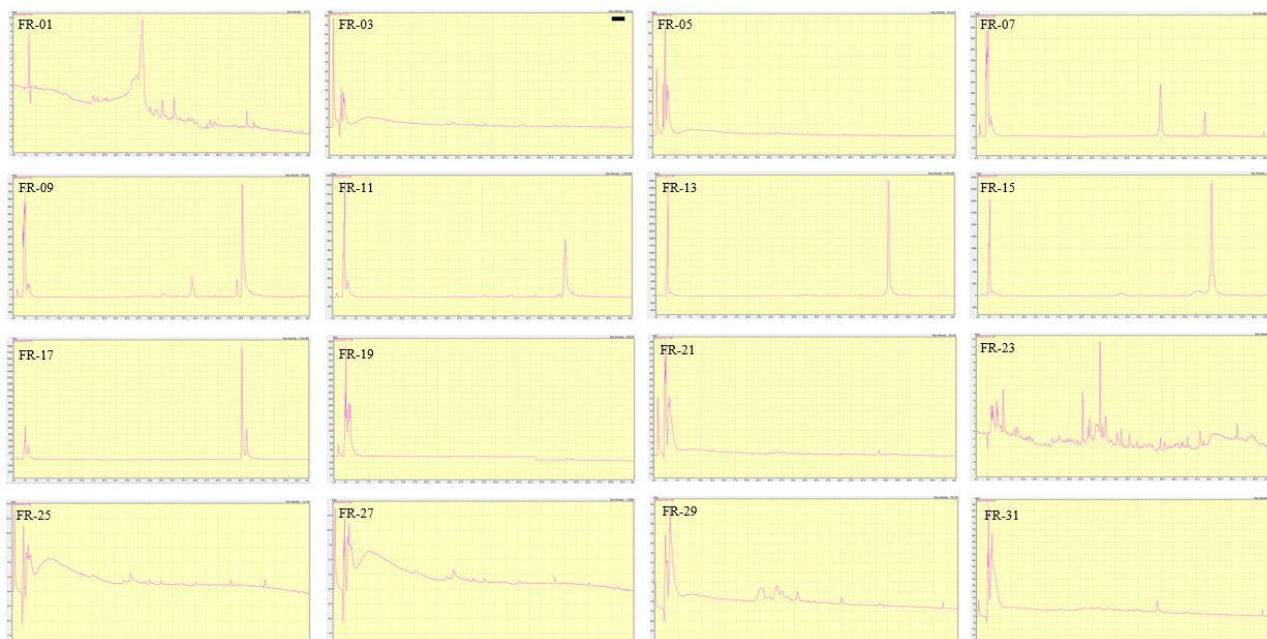


Figura 4 - Cromatogramas das frações obtidas via analisador DAD.

A junção das frações com perfis semelhantes faz-se necessária para a próxima etapa do estudo que é a utilização de um HPLC preparativo para isolamento e purificação dos metabólitos em quantidade significativa para testes de fitotoxicidade e análises estruturais das moléculas encontradas por ressonância magnética nuclear.

#### CONCLUSÕES:

Até o momento os resultados se mostraram bastante promissores para a identificação de metabólitos correlacionados aos mecanismos de patogenicidade do fungo, algumas das pequenas cadeias peptídicas encontradas fazem parte de ciclos enzimáticos relacionados ao processo de infecção entre o fungo e o hospedeiro, assim fica claro que o estudo aqui desenvolvido caminha na direção de entender quais clusters genéticos são responsáveis pela produção dos metabólitos e qual é a toxicidade destes frente ao citrus.

O projeto de pesquisa segue ainda em desenvolvimento e devido ao atual cenário de pandemia acabou sofrendo alguns percalços, assim o estudo tornou-se menos ambicioso e como objetivos finais pretende-se realizar o isolamento e teste de fitotoxicidade dos metabólitos de interesse bem como a elucidação dessas novas estruturas.

## **BIBLIOGRAFIA**

Kupper, K. C. et al. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatol. bras.*, vol.28, n.3, pp.251-257, 2003.

Sarwar, M. The dangers of pesticides associated with public health and preventing of the risks. *Int. J.Bioinfor. Biomed. Eng.*, v.1, n.2, p.130–136, 2015.

Silva-Junior, G. J. et al. Spatiotemporal characterization of citrus postbloom fruit drop in Brazil and its relationship to pathogen dispersal. *Plant Pathology*, v.63, p.519-529, 2014.