



Estudo de fitotoxicidade de alcaloides produzidos pelo fungo *Penicillium digitatum* em sementes de *Citrus sinensis*

Palavras-Chave: [*Citrus sinensis*], [*Penicillium digitatum*], [Metabólitos secundários]

Autores:

Larissa Lara Barboza Oliveira da Silva [UNICAMP]

Stephanie Nemesio da Silva [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Taicia Pacheco Fill (orientadora) [UNICAMP]

1. Introdução

Uma das propriedades inerentes aos seres vivos é a existência de metabolismo. O metabolismo engloba o conjunto de reações químicas que ocorrem dentro das células.¹ Essas reações podem ser divididas entre metabolismo primário e metabolismo secundário.² Nas plantas, o metabolismo primário está relacionado a processos vitais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Já os metabólitos secundários, desempenham função relevante na proteção contra estresses bióticos e abióticos, incluindo defesa ao ataque de patógenos e herbívoros. Esses metabólitos são agrupados em três categorias principais: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides.¹ Para fungos, o metabolismo secundário é altamente diversificado, abrangendo uma ampla variedade de compostos, como policetídeos, derivados de chiquimato, derivados de isocumarina, ácidos fenólicos, quinonas, xantonas, lactonas, terpenoides, esteroides, peptídeos e alcaloides.³

Um exemplo notável é o fungo *Penicillium digitatum*, que é conhecido como o principal agente causal da doença bolor verde em frutas cítricas.⁴ Essa doença, juntamente com outras doenças pós-colheita, pode resultar em perdas significativas na produção de frutas cítricas, podendo chegar a até 50% da safra e contribuir com até 90% das perdas pós-colheita no Brasil.^{4,5} Estudos anteriores revelaram que o fungo *Penicillium digitatum* é capaz de promover o acúmulo de alguns alcaloides na superfície das frutas cítricas, na qual foram isolados e identificados como triptoquialaninas A e B (figura 1).⁵ Além disso, foi investigado o efeito do alcaloide triptoquialanina A (TA) na germinação de

sementes de laranja, ao avaliar sua fitotoxicidade.⁶ Segundo estudo, estes metabólitos secundários exibiram grande importância no estabelecimento da infecção no hospedeiro *citrus*.⁶

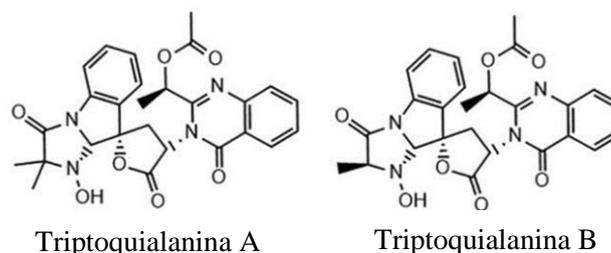


Figura 1. Estrutura química das moléculas triptoquialanina A e triptoquialanina B

No entanto, não existem estudos relacionados a investigação das alterações no metabolismo das plantas do gênero *Citrus* resultantes do tratamento com esses compostos. Um estudo nesse sentido seria fundamental para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade do fungo em relação ao seu hospedeiro, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doenças que afetam a agricultura e a segurança alimentar.

Neste sentido, o principal objetivo deste projeto foi investigar o efeito dos alcaloides triptoquialanina A e B no metabolismo de *Citrus sinensis*, em estágio inicial de desenvolvimento, a fim de aprofundar a compreensão dos mecanismos de patogenicidade do fungo *P. digitatum*.

2. Metodologia

2.1. Cultivo de *P. digitatum*, extração, pré-purificação e isolamento dos alcaloides

Inicialmente, foi realizado o cultivo do fungo *P. digitatum* em meio de cultura sólido contendo YES (*Yeast Extract Sucrose*). Para isso, uma placa de Petri contendo 30 mL do meio foi inoculada com 20 µL de uma solução de esporos na concentração de 10^6 esporos/mL. A placa foi vedada com plástico filme e colocada em uma câmara de crescimento a temperatura de 25 °C por 7 dias. Após o período de incubação, adicionou-se 5 mL de água Milli-Q estéril a placa infectada e os esporos foram extraídos com auxílio de alça de Drigalski. A solução resultante foi diluída até atingir uma concentração final de 10^6 esporos/mL. Em seguida, realizou-se a inoculação do fungo em laranjas pera (*Citrus sinensis*) previamente descontaminadas com hipoclorito de sódio a 2% (v/v). Após a secagem das laranjas em capela de fluxo, foi realizado um pequeno corte quadrado (1 cm x 1 cm) na casca de cada laranja, utilizando bisturi, e aplicou-se 20 µL da solução de esporos obtida. As laranjas inoculadas (N = 200) foram armazenadas em béqueres estéreis de 1000 mL e mantidas em câmara de crescimento a 25 °C por 11 dias. Após esse período, as partes infectadas da casca foram removidas das frutas e transferidas para um frasco Schott de 1000 mL. Os metabólitos foram extraídos sete vezes utilizando acetato de etila na proporção de 1:1 (m/v). O extrato orgânico resultante foi concentrado sob vácuo em um rotaevaporador. Posteriormente, realizou-se a pré-purificação do extrato por meio de cromatografia em coluna aberta utilizando 250 g de sílica gel. Os solventes orgânicos hexano (1 L) e acetato de etila (1 L) foram utilizados como eluentes. A fração eluída com acetato de etila foi coletada e o extrato concentrado em rotaevaporador.^{6,7}

A partir do extrato pré-purificado, prosseguiu-se com o processo de isolamento dos alcaloides de interesse. Para isso, o extrato foi dissolvido em metanol (MeOH), filtrado e submetido à purificação por cromatografia líquida (LC) preparativa. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Phenyl-Hexyl (250 x 10 mm, 5 µm) em

um sistema de LC composto por uma bomba Shimadzu LC-10, um detector de matriz de fotodiodos SPD-10A e um coletor de frações Shimadzu FRC-10A. O método de eluição utilizado envolveu o uso de uma fase móvel binária composta por uma solução aquosa acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v) como solvente A, e acetonitrila como solvente B. A vazão do sistema foi mantida em 4,7 mL/min e o volume de injeção foi de 200 µL.⁶

2.2. Ensaio de germinação com sementes de *Citrus sinensis* na presença dos alcaloides triptoquialanina A e B

Inicialmente, as sementes foram preparadas removendo-se as duas camadas protetoras externas. Em seguida, as sementes foram esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 1 minuto. Após o enxague com água Milli-Q, as sementes foram secas em temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. Posteriormente, placas de Petri de 6 cm de diâmetro foram revestidas com papel de germinação embebidos com 1 mL da solução de tratamento. Então, 4 sementes foram posicionadas em cada placa. Os tratamentos consistiram em soluções aquosas de triptoquialanina A (TA) e triptoquialanina B (TB) na concentração de 1.000 ppm, contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 3% (v/v) para solubilização. O herbicida glifosato foi utilizado como controle positivo (CP), enquanto a água Milli-Q foi usada como controle negativo (CN). Em ambos os controles foi adicionado DMSO 3% (v/v). Todas as soluções de tratamento foram filtradas através de filtros de membrana PTFE de 0,22 µm. Posteriormente, as placas de Petri foram seladas e incubadas em câmara de germinação a temperatura de 25 °C, com fotoperíodo 12/12 horas claro/escuro, pelo período de 10 dias.¹⁰

2.3. Teste 1: Otimização do ensaio de germinação de sementes de citros

Visando a otimização do experimento de germinação, foi realizado um teste para avaliar três fatores: método de descontaminação, volume de solução utilizada no tratamento e efeito do DMSO 3% (v/v) no processo de germinação (Tabela 1). O procedimento de preparo das sementes e das placas foram semelhantes aos

descritos no tópico 2.2, com algumas modificações. Para cada placa, foram utilizados dois papéis de germinação ao invés de um. Os ensaios foram conduzidos em triplicata (N=3) e as placas dispostas em câmara de germinação com fotoperíodos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, a temperatura de 25 °C, durante período de 11 dias. Neste experimento, massa e o comprimento de radícula das sementes foram utilizados como parâmetros de avaliação das diferentes condições de germinação.

Tabela 1: Otimização do teste da germinação de semente de *Citrus sinensis*.

Teste semente de <i>citrus</i>			
Ensaio	V (solução)	DMSO 3% (v/v)	Lavagem das sementes
1	3 mL	Sim	1 min, 2% hipoclorito
2	3 mL	Sim	1 min, 4% hipoclorito
3	3 mL	Não	1 min, 2% hipoclorito
4	3 mL	Não	1 min, 4% hipoclorito
5	5 mL	Sim	1 min, 2% hipoclorito
6	5 mL	Sim	1 min, 4% hipoclorito
7	5 mL	Não	1 min, 2% hipoclorito
8	5 mL	Não	1 min, 4% hipoclorito

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

2.4. Teste 2: Solubilização dos alcaloides em diferentes soluções e avaliação na germinação de sementes de citros

Para avaliar a solubilização dos alcaloides em diferentes soluções, foram conduzidos testes com as cinco seguintes soluções: acetato de sódio 3M (pH 5,2), Tween 80 (0,65 g/L), Triton X-100 (0,65 g/L), tampão fosfato-salino (pH 7,4) e acetato de sódio 1M (pH 5,2). Inicialmente, adicionou-se 0,5 mg do alcaloide juntamente com 0,5 mL das soluções em microtubo de 1,5 mL. O conteúdo foi agitado em Vortex por 10 segundos e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos.

Em seguida, foi realizado um ensaio de germinação de sementes de laranja para avaliar a toxicidade das soluções que apresentaram efeito positivo na solubilização dos alcaloides. Os tratamentos incluíram a solução de acetato de sódio 3M e solução tampão fosfato-salino (PBS). O herbicida glifosato foi utilizado como controle positivo (CP) e água Milli-Q como controle negativo (CN). As placas de Petri de 6 poços, onde foram colocados dois papéis de germinação, foram embebidos com 1 mL da solução de tratamento em cada poço. Em seguida, duas sementes foram posicionadas em cada um dos

poços. As placas foram vedadas e incubadas em uma câmara de germinação com fotoperíodos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, a uma temperatura de 25°C, por um período de 10 dias.

3. Resultados e Discussão

3.1. Resultados e discussão dos testes realizados

Visando investigar o impacto dos alcaloides TA e TB produzidos pelo fungo fitopatogênico *Penicillium digitatum* no metabolismo das sementes de *Citrus sinensis*, buscou-se, inicialmente, a obtenção dos alcaloides a partir do extrato fúngico. Para isso, *P. digitatum* foi cultivado em larga escala e o extrato bruto (79,47 g) submetido a pré-purificação com coluna de sílica e purificação em sistema de cromatografia preparativa.

Após obtenção dos alcaloides, as sementes de citros foram expostas ao tratamento com as soluções contendo os alcaloides triptoquialanina A e B. A figura 2A exibe o aspecto das sementes após 10 dias de germinação. O experimento realizado não exibiu diferenças significativas na germinação das sementes entre os ensaios avaliados, mesmo o controle negativo (NC) em que esperava-se a germinação da semente. Além disso, enfrentou-se problemas de contaminação em um número considerável de placas (em 58% do total de placas), o que indicou a necessidade de aprimorar a metodologia aplicada. Nesse sentido, foi indispensável otimizar o teste da germinação de sementes de citros.

Por conseguinte, foi realizado teste de otimização do ensaio de germinação explorando as seguintes condições experimentais: variação do método de descontaminação, volume de solução utilizado e efeito do DMSO no processo de germinação. Os resultados obtidos estão exibidos na figura 2B. De acordo com o gráfico 1, que avalia a massa e o comprimento da radícula. Notou-se que o ensaio 4 apresentou as melhores condições de germinação, com base na média de comprimento radicular (7,43 mm) e massa radicular (0,0341 g). Além disso, observou-se que as placas que levaram DMSO afetaram negativamente no processo de germinação. Diante disso, buscou-se encontrar alternativas

ao uso do DMSO no processo de solubilização dos alcaloides. No teste de solubilização dos alcaloides, avaliou-se as diferentes soluções: acetato de sódio 3M, o tampão fosfato-salino, Tween 80 e Triton X-100. Dentre elas, apenas acetato de sódio 3M e o PBS foram capazes de solubilizar os alcaloides. De acordo com o teste de germinação exibido na figura 2C, foi observado que ambas as soluções inibiram o crescimento das sementes de *Citrus sinensis*, tornando-as inviáveis como alternativas ao DMSO. Com base nesses resultados, deve-se optar pelo ensaio que exibiu melhores resultados entre os que fazem uso do DMSO. Neste caso, o ensaio de número 5 que apresentou comprimento médio de radícula de 3,08 mm e massa média da radícula de 0,0121 g.

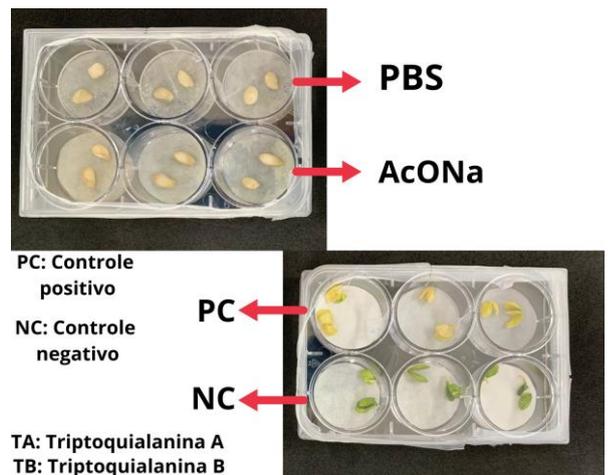
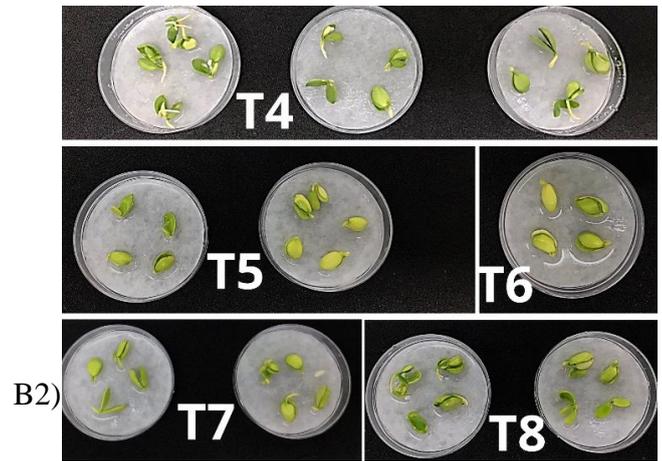


Figura 2. A) Ensaio de germinação de semente de *Citrus sinensis* na presença dos alcaloides após 11 dias na câmara de germinação (onde PC é o controle positivo, NC é o controle negativo, TA faz referência a triptoquialanina A e TB a triptoquialanina B). B) Otimização do teste da germinação de semente de *Citrus sinensis* (onde T1, T2, T3... refere-se aos ensaios da Tabela 1). C) Ensaio de germinação de sementes de citros na presença das soluções que solubilizaram os alcaloides (onde PBS é a solução tampão fosfato-salino, AcONa é a solução de acetato de sódio, PC é o controle positivo e NC, o controle negativo).

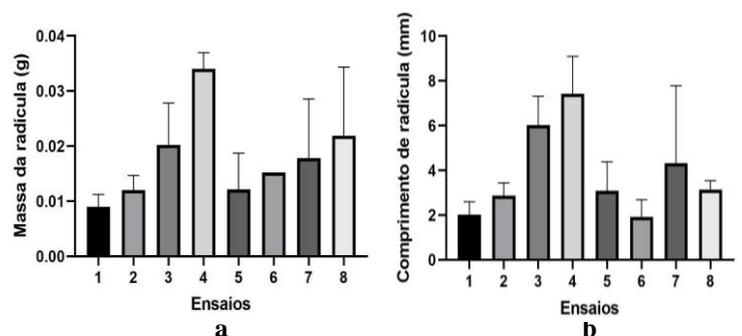
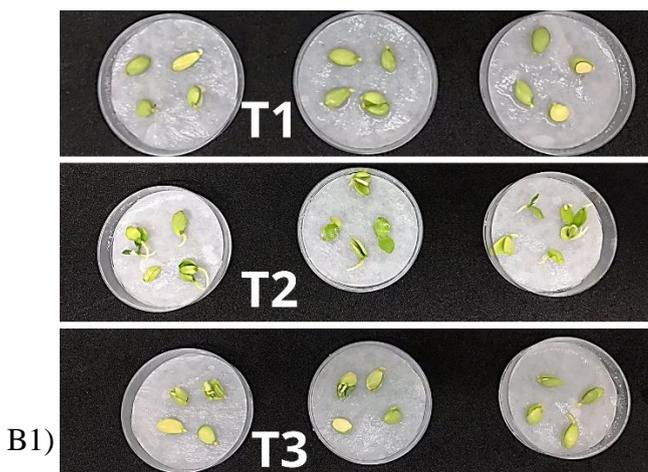
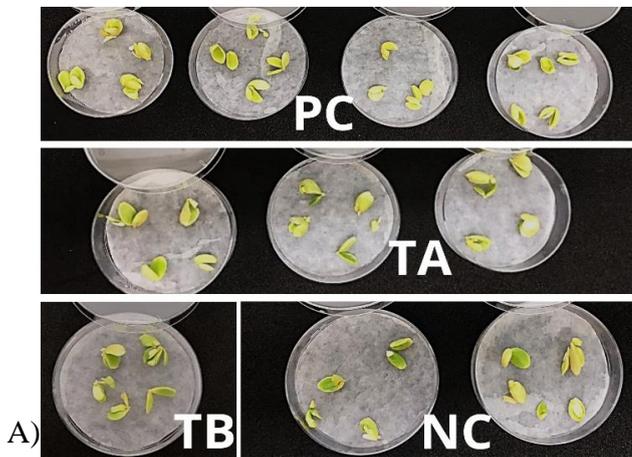


Gráfico 1: Gráfico de colunas a) Ensaio x Massa da radícula e b) Ensaio x Comprimento de radícula. Fonte: GraphPad (2023).

4. Conclusão

Neste estudo, foram realizadas etapas de cultivo em larga escala do fungo *P. digitatum*, isolamento dos alcaloides triptoquialanina A e B e ensaio de germinação em sementes de citros na presença destes compostos. No entanto, devido a problemas experimentais, uma etapa de otimização do ensaio de germinação se mostrou necessária. Os resultados do teste de otimização indicaram que o ensaio 4 foi o melhor dentre os avaliados. No entanto, surgiu a necessidade de avaliar alternativas ao uso de DMSO na solubilização dos alcaloides, uma vez que o DMSO inibe, parcialmente, a germinação das sementes (fitotoxicidade). Com o intuito de obter alternativas ao uso deste solvente, foram realizados testes de solubilidade com diferentes soluções com pH entre 5-7,5. As soluções que apresentaram bons resultados foram avaliadas quanto a toxicidade na germinação das sementes. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, indicando completa inibição de germinação das sementes de citros. Com base nesses resultados, planeja-se repetir o ensaio de germinação utilizando as melhores condições obtidas no experimento de otimização. Com isso, será possível retomar o cronograma do projeto e avançar para a etapa final, que consiste na análise metabolômica das sementes tratadas com os alcaloides de interesse.

5. Referências

¹D. Y. Santos. Botânica aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente. São Paulo, 2015.

²Lima Neto, g.a.1; Kaffashi, s.1; Luiz, w.t.1; Ferreira, w.r.1; Dias da Silva, y.s.a.1; Pazin, g.v.1; violante, i.m.p.1, Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso, Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

³J.H. Costa, J.M. Bazioli, J.G. Ponte, T.P. Fill, *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? Fungal Biol. 123 (8) (2019) 584–593.

⁴Bus, V.G., Bongers, A.J., Risse, L.A. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. Plant

Disease, St. Paul, v. 75, p. 1098-1100, 1991.

⁵J.H. Costa, J.M. Bazioli, E.V. Araújo, P.H. Vendramini, M.C.F. Porto, M.N. Eberlin, J.A. Souza-Neto, T.P. Fill, Monitoring indole alkaloid production by *Penicillium digitatum* during infection process in citrus by Mass Spectrometry Imaging and molecular networking, Fungal Biol. 123 (8) (2019) 594–600, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.002>

⁶Dunn, W. B.; Ellis, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

⁷Lei, Z.; Huhman, D. V.; Summer, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. JBC Papers in Press, Published on June 1, 2011 as Manuscript R111.238691.

⁸Songsermsakul, P., & Razzazi-Fazeli, E. (2008). A Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Detection of Mycotoxins. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 31:1641-1686.

⁹Costa JH, Bazioli JM, Barbosa LD, dos Santos Júnior PLT, Reis FCG, Klimeck T, Crnkovic CM, Berlinck RGS, Sussulini A, Rodrigues ML, Fill TP. 2021. Phytotoxic tryptoquialanines produced in vivo by *Penicillium digitatum* are exported in extracellular vesicles. mBio 12: e03393-20.

¹⁰Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Divers 2010;41:1-16.