

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE *FUSARIUM SUBGLUTINANS*

PARTIAL CHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDES OF *FUSARIUM SUBGLUTINANS* CELL WALL

Diego Wagner dos Santos¹
Ricardo Wagner²

Resumo

Os microorganismos fúngicos apresentam polissacarídeos que constituem uma importante porcentagem de sua biomassa, chegando até cerca de 80% deste tipo de biomolécula onde os principais polissacarídeos fúngicos são galactanas, mananas e glucanas. Estes polissacarídeos são componentes da parede celular fúngica responsável pela proteção do microorganismo, a qual sofre ação direta dos fungicidas que, apesar de terem eficiência comprovada no combate de doenças de plantações, promovem a contaminação do meio ambiente, fazendo-se necessário a utilização de pesticidas naturais e menos poluentes. O presente trabalho tem por objetivo realizar a caracterização química de polissacarídeos da parede celular de *Fusarium subglutinans*, causador da fusariose nas plantações de abacaxi. O fungo foi isolado da gomoze dos frutos de abacaxi e crescidos em meio líquido MY para a produção de biomassa. A biomassa obtida foi submetida a extração com tampão fosfato pH 6,5 para extração das glicoproteínas da parede celular. As glicoproteínas foram precipitadas com etanol (3 volumes), dialisadas em membrana de diálise de 12-12Kda e liofilizada. Com este material foi realizada a dosagem de açúcar total (30%) e a dosagem de proteínas pelo método de Hartree (66%). A composição monossacarídica desta glicoproteína mostrou a presença de rhamnose, manose e galactose na proporção (1:77:22). Por análise do espectro de ¹³C-RMN pode-se inferir que a cadeia principal deste polissacarídeo é composta de unidades de D-manose unidas por ligações α-(1*6) (d 100,5). Estudos mais aprofundados serão realizados para a determinação estrutural deste polissacarídeo.

Palavras-chave: *Fusarium subglutinans*, abacaxi, fungicida.

Biografia

1 Acadêmico do Curso de Farmácia das Faculdades Integradas do Brasil – CEP 82820-540, Curitiba, PR, Brasil. e-mail: diegoafl@gmail.com

2 Professor do Curso de Farmácia das Faculdades Integradas do Brasil.

Abstract

Fungi microorganisms show polysaccharides that are an important percentage of their biomass, up to 80% of this kind of biomolecule, where the main fungi polysaccharides are galactomannans, mannans and glucans. These polysaccharides are components of the fungi cell wall responsible for the microorganism protection, which suffers the direct action of fungicides which, besides having their efficiency in plantation diseases, promote the environment contamination, making the use of natural and less poluent pesticides important. The aim of this work is to perform the chemical characterization of polysaccharides in the cell wall of *Fusarium subglutinans*, which causes fusariosis in pineapple plantations. The fungus was isolated from the gomosis in pineapple fruits and grown in MY liquid broth for the production of the biomass. The obtained biomass was submitted to extraction with pH 6,5 phosphate buffer in order to extract the cell wall glycoproteins. The glycoproteins were precipitated with 3 volumes of ethanol, dialysed in a 12-14 KDa dialysis membrane and lyophilized. With this material were performed total sugar dosage (30%) and protein using the Hartree method (50%). The monosaccharide composition of this glycoprotein showed rhamnose, mannose and galactose (1:77:22). The analysis of the ^{13}C -RMN spectrum suggest that the main chain of this polysaccharides is composed by D-mannose units α -(1 \rightarrow 6) links (d 100,6). Further studies will be performed in order to have the structural determination of this polysaccharide

Key words: *Fusarium subglutinans*, pineapple, cell wall polysaccharide.

Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) é considerado uma das mais importantes frutas tropicais, cuja comercialização vem se expandindo nos principais mercados nacionais e internacionais, sendo o segundo fruto tropical mais comercializado, depois da banana. Dentre os produtores de abacaxi o Brasil é considerado o maior produtor mundial com 61.790 hectares e uma produção de mais de dois milhões de toneladas de frutos ⁽¹⁾.

Não obstante, existem doenças que causam perdas na produção de abacaxi tal como a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*, que é a doença mais severa do plantio brasileiro, com perdas estimadas entre 30 a 100% nos frutos e até 20% nas mudas. A fusariose não afeta apenas o fruto, mas também toda a planta que é utilizada como material de plantio ^(2, 3, 4).

O agente etiológico *F. subglutinans* tem especificidades para o abacaxizeiro e tanto pode ser disseminado pelo vento quanto pelo plantio de mudas infestadas com o fungo, incitando lesões nos tecidos afetados com exsudação de uma substância gomosa no pedúnculo ou no fruto. De acordo com Alves (2006) este fungo não produz esporos assexuais (clamidósporos) que se forma com a modificação de uma célula das hifas ou de conídios de um fungo e apresenta baixa capacidade competitiva, não sobrevivendo no solo por longos períodos. Mudanças infectadas e enterradas perdem a capacidade de servir como fonte de transmissão após quatro a seis semanas ^(4, 5, 6).

Tradicionalmente, a tecnologia de controle dessa doença fundamenta-se na aplicação preventiva de fungicidas, mas a eliminação de *F. subglutinans* seria otimizada se houvesse um método rápido para detecção da doença e proteção do plantio bem como a recuperação das mudas infectadas. ^(5, 7)

Apesar da eficiência dos fungicidas no controle de doenças de plantas, estes promovem a contaminação do meio ambiente, fazendo com haja uma necessidade de fungicidas que contenham substâncias naturais que protejam o ambiente e acabem com a propagação da fusariose em plantações contaminadas ⁽⁸⁾.

Uma tecnologia emergente no setor de fungicidas capaz de reduzir doenças pós-colheita é o uso de indutores de resistência bióticos e abióticos ⁽⁹⁾. As plantas possuem mecanismos eficientes de resistência que podem ser acionados ou ativados quando em contato com indutores ⁽¹⁰⁾. A utilização deste grupo de compostos é uma estratégia promissora e ecologicamente correta, já que a presença deste na planta estimula a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas na defesa natural das

plantas ⁽¹¹⁾.

Um conhecimento sobre a estrutura da parede celular destes organismos pode ajudar na descoberta de novas maneiras de se controlar o crescimento e colaborar para o desenvolvimento de novos antifúngicos menos poluentes, principalmente ao meio ambiente.

O presente trabalho visou a caracterização química da parede celular do fungo *Fusarium subglutinans* através da extração dos polissacarídeos da biomassa obtida e testes de análise de homogeneidade, composição monossacarídica, dosagem de proteínas, dosagem de açúcares totais e análise por ressonância magnética nuclear (RMN).

Metodologia

OBTENÇÃO DO FUNGO E BIOMASSA

O fungo *Fusarium subglutinans* foi isolado de gomos obtidas do fruto do abacaxi. O fungo isolado foi identificado por microscopia óptica observando-se as hifas e estruturas reprodutivas dos mesmos. Depois de isolado e identificado o fungo foi inoculado em meio líquido MY (maltose e levedura) para a produção de biomassa. O crescimento foi realizado durante 5 dias a temperatura ambiente, com agitação ocasional uma vez ao dia.

EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

Para a extração dos polissacarídeos a biomassa do fungo dialisada contra água corrente em membrana de diálise (*cut off* 12-14 Kda) e em seguida liofilizada. A extração foi feita com 600 mL de tampão fosfato 0,5M, pH 6,5 a 60°C durante 2 horas sob agitação mecânica ⁽¹²⁾. A solução foi centrifugada para a retirada de debris, concentrada em evaporador rotatório para 250ml de volume e os carboidratos precipitados com 3 volumes de etanol, de acordo com o Fluxograma 1. Os polissacarídeos precipitados foram separados por centrifugação e em seguida dialisados e liofilizados, tendo um rendimento de 1,3g (65%)

ANÁLISES DE HOMOGENEIDADE

Uma fração da amostra (3mg) contendo os polissacarídeos foi submetida à análise por HPSEC-MALLS para determinar sua homogeneidade. Esta fração foi solubilizada no solvente utilizado (nitrato de sódio + azida), filtrada logo em seguida em membrana de 0,22 μm .

DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNA

A dosagem total de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando um padrão de glucose e efetuando-se a leitura em espectrofotômetro em 490 nm ⁽¹³⁾. A dosagem de proteína total foi efetuada de acordo com o método descrito por Hartree (1972), onde o padrão apresentava concentração de 100 mg/mL e a leitura foi realizada em 650 nm ⁽¹⁴⁾.

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

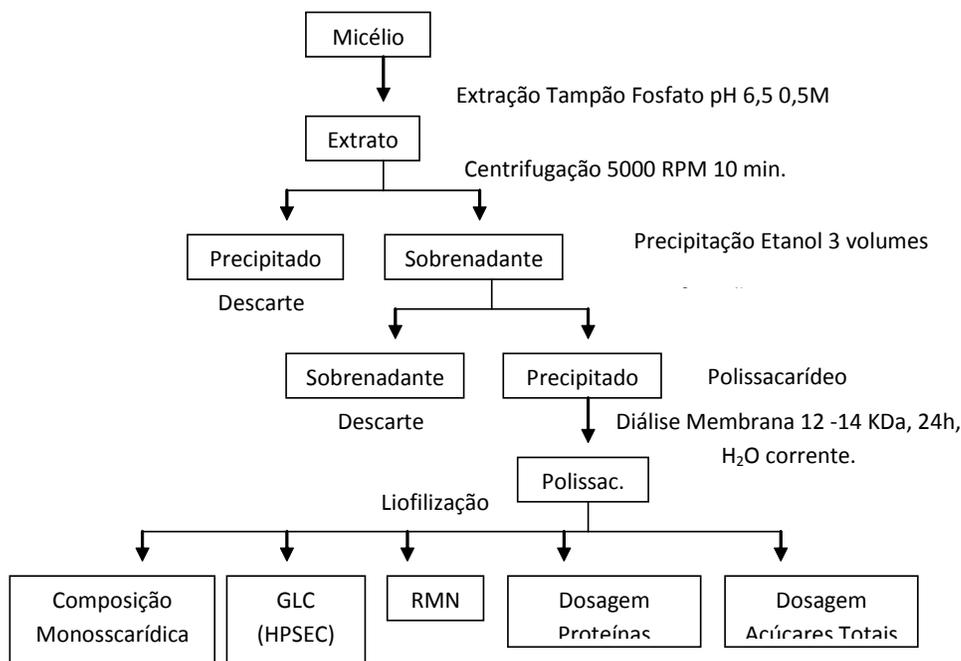
Para se determinar a composição monossacarídica realizou-se a hidrólise total do polissacarídeo. Uma fração de 1 mg foi hidrolisada com ácido trifluoroacético 1M (TFA), durante 8h à 100°C ⁽¹⁵⁾. Após a hidrólise removeu-se o TFA por evaporação até completa secura do material. Na sequência, dissolveu-se o material hidrolisado em 500 mL de água. Os monossacarídeos obtidos foram reduzidos pela adição de borohidreto de sódio (NaBH₄), permanecendo em temperatura ambiente por 4h, verificando se o pH estava entre 9,0 – 10,0. A solução foi neutralizada com solução aquosa de ácido acético 50%, tratada com resina catiônica e levada à secura em evaporador rotatório. Removeu-se o ácido bórico formado na forma de borato de trimetila pela lavagem do tubo e concomitante evaporação com metanol ^(16, 17).

Os derivados alditóis formados foram acetilados com 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina à 100°C durante 1 hora em tubo de reação com tampa de rosca ⁽¹⁵⁾. Interrompeu-se a reação pela adição de água ao meio reacional. Os alditóis acetatos formados foram extraídos com clorofórmio. A remoção do ácido acético formado e a piridina ocorreu durante a lavagem da fase clorofórmica com sulfato de cobre 5% repetidas vezes até não se notar mais a presença de ácido acético e piridina. A fase orgânica foi desidratada por filtração com sulfato de sódio anidro em seguida evaporada em temperatura ambiente para se proceder a análise por GC-MS.

ANÁLISE DE ^{13}C -RMN

A ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono 13 foi realizada dissolvendo-se os polissacarídeos em NaOH/óxido de deutério (D_2O). A análise foi efetuada a 50°C utilizando um equipamento Bruker 400MHz.

FLUXOGRAMA 1: Processamento da biomassa do fungo *Fusarium subglutinans*.

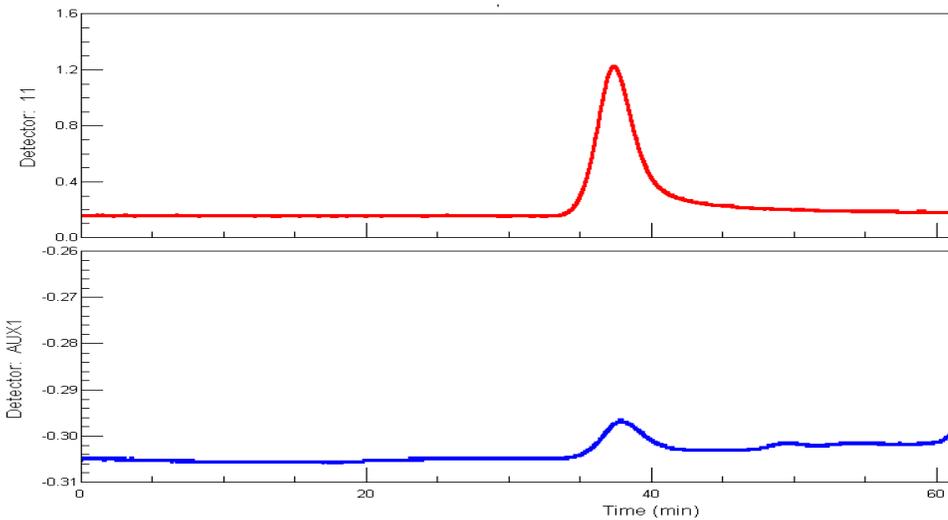


Resultados e Discussão

A extração dos polissacarídeos da parede celular da biomassa do fungo foi realizada com tampão fosfato 0,5M e pH 6,5 e centrifugação, seguida de tratamento do sobrenadante com etanol, fez com que houvesse a formação de um precipitado contendo os polissacarídeos, que após passar por diálise em água corrente por 48h foi posteriormente liofilizado.

Uma fração da amostra foi analisada por HPSEC para determinar a homogeneidade do material conforme figura 1. Podendo-se analisar que a amostra pode ser considerada homogênea.

Figura 1: Cromatograma de HPSEC da parede celular do fungo *Fusarium subglutinans*.



Em azul: detector de índice de refração.
Em vermelho: detector de espalhamento de luz

Embora existam vários estudos sobre a composição da parede celular de vários fungos, o maior número de informações disponíveis na literatura está relacionado com a estrutura de parede do ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae*, que é composta por β -D-glucanas, quitinas e manoproteínas^(18, 19, 20, 21).

Através do método de fenol-ácido sulfúrico fez o doseamento do teor de açúcares totais presente na amostra, que apresentou um total de 30,4% de açúcares. Utilizando-se do método de Hartree (1972) para a dosagem de proteínas a amostra apresentou teor de proteínas 66% na composição da parede celular do fungo *Fusarium subglutinans*.

Nos fungos, os polissacarídeos constituem um percentual representativo e importante da biomassa, onde a parede da hifa é formada por até 75% dessas moléculas, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como um suporte para a hifa, essas macromoléculas também podem constituir um revestimento extracelular ao redor do micélio⁽²²⁾.

Para se determinar a composição monossacarídica do polissacarídeo isolado do fungo uma fração da amostra foi hidrolisa com TFA 1M durante 8h a 100°C. Os alditóis acetatos formados foram então analisados por GC-MS, que revelou que dos 30,4% de açúcares totais da amostra 77% é manose, 22% de galactose e 1% de rhamnose.

Dentre os polissacarídeos encontrados na parede celular fúngica as glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa (α) ou beta (β). As β -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos. A conformação destas moléculas pode variar desde simples até tripla hélice, que é a forma mais comum, onde três cadeias de polímeros são agregadas por ligações de hidrogênio nos oxigênios do C-2⁽²³⁾.

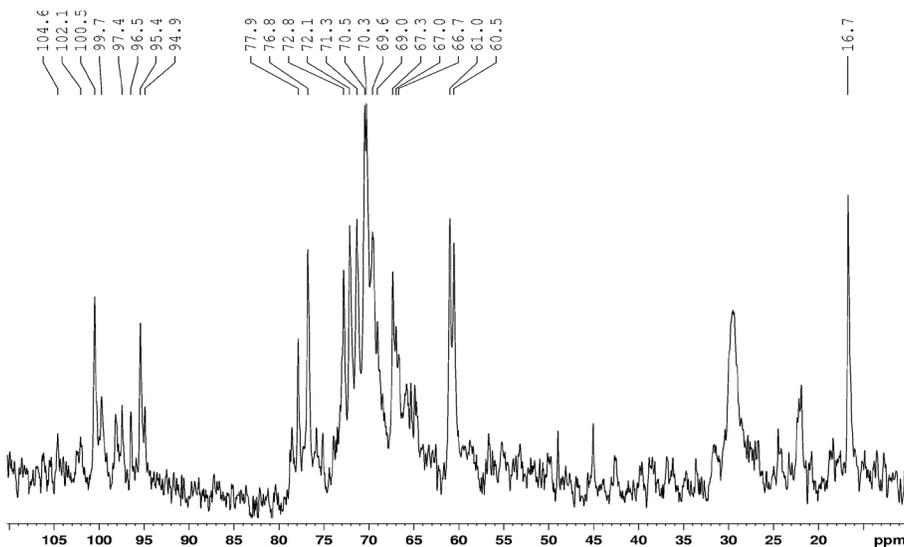
Moléculas de manose podem também ser encontradas em galactomananas, que são heteropolissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de manose ligada a unidades de galactose, presentes em espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. fumigatus* e *A. wentii*, e *Chaetosartorya chrysella*, fungos estudados em relação à patogenicidade humana (24). Dependendo do grau de ramificação, bem como do tamanho da cadeia lateral, as galactomananas apresentam propriedades físicas e químicas distintas, que permitem classificá-las como uma família de macromoléculas.

Ahrazem et al. (2002) caracterizaram um polissacarídeo extraído de paredes celulares das espécies de *Geotrichum spp.* (forma anamórfica), *Galactomyces* e *Dipodascus* (formas teleomórficas). Por análise de metilação e ¹³C-RMN propuseram que a estrutura do polissacarídeo era uma galactomanana com cadeia

principal constituída de unidades α -D-Manp (1 \rightarrow 6) e substituídas em 2 por [β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-1 \rightarrow]. Todas as espécies estudadas apresentaram o mesmo polissacarídeo e, portanto, concluíram tratar-se do mesmo gênero (25).

Para o polissacarídeo isolado de *Fusarium subglutinans* a análise do espectro de ^{13}C -RMN (figura 2) apresentou 2 picos principais na região de carbono anomérico em δ 100,5 correspondente ao C-1 de unidades de manose 6-O ligadas e δ 95,4 que foi atribuído ao C-1 das unidades de a-manose redutoras. O sinal em δ 16,7 correspondente ao CH3-6 das unidades de rhamnose. Outros sinais com baixa intensidade podem ser destacados como os carbonos anoméricos das unidades de β -D-galactose em δ 104,16 e das unidades de α -L-rhamnose em δ 102,1. Estes sinais estão de acordo com os dados encontrados por Gorin (1973) que utilizou os espectros de ^{13}C -RMN para caracterizar as diferentes espécies de *Saccharomyces* através dos diferentes padrões de substituição das mananas encontradas na parede celular. Já Barreto-Bergter et al. (2008) descreveram as rhamno-galactomananas encontradas na parede celular do patógeno *Scedosporium prolificans* correlacionando a estrutura da glicoproteína isolada com a glicoproteína isolada de *Pseudolescheria boydii* (fungo patógeno e oportunista em humanos).

Figura 2: Espectro de ^{13}C -RMN da glicoproteína isolada da parede celular do fungo *Fusarium subglutinans*.



Conclusão

A plantação de abacaxi é uma economia em expansão no Brasil, mas esta sofre de uma doença denominada fusariose causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*. A glicoproteína extraída da parede celular deste fungo é composta por mais de 50% proteínas e por 30% açúcares. A composição monossacarídica mostra a presença de manose como constituinte principal, com a presença galactose e rhamnose em menores proporções. Pela análise do espectro de ^{13}C -RMN sugere-se a presença de uma manana α -(1 $^{\circ}$ 6) ligada, com substituições de unidades de manose 2-O substituídas e unidades de galactose. A elucidação total do polissacarídeo isolado poderá ser de grande importância para o desenvolvimento de um fungicida menos tóxico e mais eficaz nos tratamento da fusariose nas plantações de abacaxi e recuperação de mudas e plantios afetados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CUNHA, G.A.P. Produção Integrada de Abacaxi no Norte e Nordeste do Brasil. 2007. Disponível em: www.cnpmf.embrapa.br/pic_bahia/producao_integrada_abacaxi.pdf. Acessado em: 17/05/2009 às 16:30.
2. VENTURA, J. A; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. Viçosa: UFV, p. 445-510, 2002.
3. OLIVEIRA, M. D. M. Controle Pré E Pós-Colheita De Doenças Em Abacaxizeiro, Dissertação de Mestrado em Agronomia na Universidade Federal do Paraíba. Areia-PB, 2008.
4. BIVANILDA A. SANTOS, B. A; ZAMBOLIM, L; VENTURA, J. A; VALE, F. X. R. Severidade De Isolados De *Fusarium subglutinans* F. Sp. Ananas Sensíveis e Resistentes ao Benomyl, em Abacaxizeiro, Fitopatologia brasileira. V. 27, p. 101-103, 2002.
5. STEENKAMP, E. T; WINGFIELD, B. D; COUTINHO, T. A; WINGFIELD, M. J; MARASAS, W. F. O. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini by Histone Gene Sequence Data. Applied And Environmental Microbiology. V. 65, n° 8, p. 3401–3406, 1999.
6. ALVES, G. A. R. Sobrevivência de *Fusarium subglutinans* f. sp. ananas em solos de diferentes procedências e incorporação de matéria orgânica, Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2006.
7. CARVALHO, R.A.; LACERDA, J. T. de. Controle alternativo da podridão negra do abacaxi. In: VI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO ABACAXI, 6., João Pessoa, Resumos. p.246. 2007.
8. PINTO, C. M. F; PEREIRA, J. M; PAULA JÚNIOR, T. J. Agricultura alternativa no contexto mundial, Informe Agropecuário. Belo Horizonte, V. 22, p. 80-83, 2001.
9. SCHAFFRATH, U; THIERON, M; SCHEINPFLUG, H; REISENER, H. J. Biochemical and cytological aspects of genetical and acquired resistance in the rice blast interaction. Cahiers Options Méditerranéennes. Paris, V. 15, p. 125-130, 1996.
10. ALMEIDA, L. C. C; COÊLHO, R. S. B. Efeito de indutores químicos no controle da antracnose do maracujá amarelo pós-colheita, Fitopatologia Brasileira. Brasília, V.

3, n° 31, p. 5017, 2006.

11. PEREIRA, E. W. L. Eficiência de Acibenzolar-S-methyl no controle da *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e efeito na qualidade de frutos de melão, Dissertação de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal do Semi-Árido. UFERSA, Mossoró-RN, p. 66-70, 2005.
12. BARRETO-BERGTER, E; SASSAKI, G. L; WAGNER, R; SOUZA, L. M; SOUZA, M. V. A. R; PINTO, M. R; DA SILVA, M. I. D; GORIN, P. A. J. The opportunistic fungal pathogen *Scedosporium prolificans*: Carbohydrate epitopes of its glycoproteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 42, p. 93-102, 2008.
13. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. V. 28, p.350-356, 1956.
14. HARTREE, E. F. Determination of Protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Analytical Biochemistry*. V. 48, p. 422-427, 1972.
15. WAGNER, R. Determinação da estrutura química do polissacarídeo das gomas de exsudato de *Vochysia tucanorum*, Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular na Universidade Federal do Paraná, UFPR, p. 89, 2007.
16. WOLFROM, M. L; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride, *Methods in Carbohydrate Chemistry*. V. 2, p. 65-68, 1963a.
17. WOLFROM, M. L; THOMPSON, A. Acetylation, *Methods in Carbohydrate Chemistry*. V. 2, p. 65-68, 1963b.
18. KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F.M. Review: The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1426, n° 2, p. 373-383, 1999.
19. LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*. V. 180, n° 15, p. 3735-3740, 1998.
20. NOBEL, H.; VAN DEN ENDE, H. V. D.; KLIS, F. M. Cell wall maintenance in fungi. *Trends in Microbiology*. V. 8, n° 8, p. 344-345, 2000.
21. NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFIN, W. L. Nonconventional protein secretion in

yeast. *Trends in Microbiology*. V. 14, n° 1, p. 15-21, 2006.

22. GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTINEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*. V. 281, n° 1, p. 143-154, 1996.

23. WILIAMS, D.L. Overview of (1→3)-β-D-Glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation*. V.6, n° 4, p. 247-250, 1997.

24. GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*. *Glycoconjugate Journal*. V. 20, n° 4, p. 239-246, 2004.

25. AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; GÓMEZ MIRNADA, B.; DOMENECH, J.; JIMÉNEZBARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. *Carbohydrate Research*. V. 303, n° 1, p. 67-72, 1997.

26. GORIN, P. A. J. Rationalization of Carbon-13 Magnetic Resonance Spectra of Yeast Mannans and Structurally Related Oligosaccharides. *Canadian Journal of*