

AVALIAÇÃO DA ROTA BIOSINTÉTICA DOS TERPENÓIDES ENCONTRADOS NO FUNGO ENDOFÍTICO (*NIGROSPORA SPHAERICA*) E SUA PLANTA HOSPEDEIRA (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)

Adriana Aparecida Lopes^{*1} (PQ), Edieidia de Souza Pina² (PG), Fernando Batista da Costa¹ (PQ), Ana Maria Soares Pereira² (PQ) e Mônica Tallarico Pupo (PQ)¹.

*adrianalps@yahoo.com.br

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP – 14040-903 – Ribeirão Preto, SP. ²Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP – 14100-000 – Ribeirão Preto, SP.

Palavras Chave: via mevalonoídica, via da triose-piruvato, isoprenóides.

Introdução

Os terpenóides possuem IPP como precursor biossintético, e duas rotas principais são responsáveis pela biossíntese desta classe de compostos: a via do mevalonato (MVA) e a via da triose-piruvato (MEP)¹. A investigação da biossíntese que leva à formação de IPP é feita através da incorporação de 1-*D*-glicose-¹³C. Estudos de biosprospecção iniciados com fungos endofíticos de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) levaram ao isolamento do fungo *Nigrospora sphaerica*². Este endofítico biossintetiza quantidades apreciáveis de diterpenóides, em especial a afidicolina, que apresenta elevada atividade citotóxica em células tumorais². Já a planta hospedeira (yacon) acumula uma série de lactonas sesquiterpênicas (LSTs) bioativas, marcadores quimiotaxonômicos da espécie³. Assim, estudos de biossíntese focados na incorporação 1-*D*-glicose-¹³C, principal precursor dos isoprenóides, tiveram como objetivo prever as principais vias envolvidas na formação das LSTs (planta) e do diterpeno (endofítico).

Resultados e Discussão

A avaliação da rota biossintética envolvida na formação dos terpenóides no vegetal (yacon) foi conseguida por meio da incorporação de 1-*D*-glicose-¹³C no meio de cultura das plântulas obtidas por micropropagação. Primeiramente foram utilizados protocolos de desinfecção do material vegetal, e em seguida 60 segmentos (segmentos nodais e gemas apicais) foram inoculados em meio Murashige e Skoog (MS)⁴ suplementados com 3 % de glicose. As primeiras plântulas foram obtidas com 20 dias de germinação e um extrato acetônico das mesmas foi preparado e injetado em CLAE-DAD para verificação da possível presença das LSTs utilizando-se de padrões autênticos. Tendo-se observado a presença das LSTs, repicou-se as plântulas em meio MS suplementados com 3 % de 1-*D*-glicose-¹³C. Após 60 dias de incubação as plântulas foram retiradas e um extrato acetônico foi preparado. O extrato (235 mg) foi submetido a fracionamento cromatográfico levando ao isolamento das duas principais lactonas sesquiterpênicas enriquecidas com ¹³C; enidrina (5 mg) e uvedalina (6 mg). A avaliação da via terpenoídica do endofítico (*Nigrospora sphaerica*) foi conseguida por meio da incorporação de 1-*D*-glicose-¹³C no meio de cultura. As fermentações foram realizadas em meio líquido (Czapek) modificado com 1% de 1-*D*-glicose-¹³C. Para o cultivo em Czapek, *N. sphaerica* foi inoculado em meio pré-fermentativo “seed” (48h, 120 rpm, 30 °C) e em seguida em meio fermentativo enriquecido com 1-*D*-glicose-¹³C (8 dias, 120 rpm, 30 °C). O extrato (393 mg) foi obtido e submetido a fracionamento cromatográfico levando ao isolamento do

diterpeno afidicolina (42 mg) enriquecido com ¹³C. Em etapa posterior, os metabólitos foram analisados por RMN de ¹³C e os espectros das substâncias enriquecidas e não enriquecidas foram comparados⁵. A rota operante encontrada no endofítico foi a do MVA, enquanto que no vegetal foi a via do MEP (rota alternativa), que possivelmente está compartimentalizada no plastídio (figura 1).

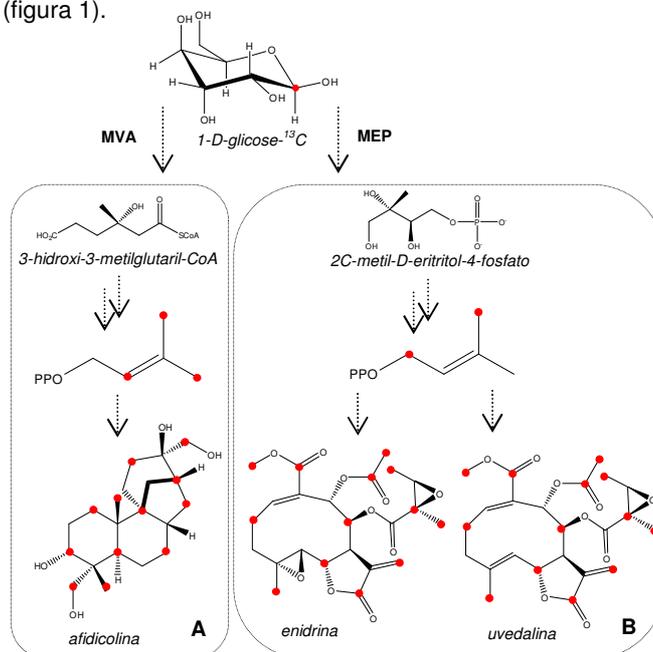


Figura 1. Metabólitos avaliados após incorporação *in vivo* de 1-*D*-glicose-¹³C no endofítico (*Nigrospora sphaerica*-A) e planta hospedeira (*Smallanthus sonchifolius*-B).

Conclusões

A avaliação das vias terpenoídicas envolvidas no endofítico e planta hospedeira culminou no envolvimento da MVA e MEP, respectivamente. Portanto, planta e endofítico biossintetizam terpenos através de vias diferentes. A marcação para as LSTs seguiram vias esperadas, como na biossíntese dos sesquiterpenos da camomila⁶. Os estudos de marcação isotópica são de grande importância, uma vez que permitem a determinação da via operante, além da possibilidade de predição no vegetal das principais organelas envolvidas na biossíntese dos metabólitos. Este é o primeiro estudo de comparação de vias biossintéticas entre substâncias encontradas no fungo endofítico e sua planta hospedeira.

Agradecimentos

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo auxílio à pesquisa e bolsas concedidas.

¹ Kirby, J. & Jay D. Keasling, J. D. *Annual Review of Plant Biology*, **2009**, 60, 335.

² Gallo, M. B. C.; Chagas, F. O.; Almeida, M. O. et al, *Journal of Basic Microbiology*, **2009**, 49, 142.

³ K. Schorr & F. B. da Costa, *Phytochemical Analysis*, **2005**, 16, 161.

⁴ T. Murashige & F. Skoog, *Physiol Plantarum*, 1962, **15**, 473.

⁵ Lopes, A. A.; Lopez, S. N.; Bergamo, D.; Kato, M. J.; Furlan, M. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2053.

⁶ Adam K. & Zapp, J, *Phytochemistry*, **1998**, 48, 6, 953.