

Marcação isotópica como estratégia de verificação de compartilhamento de substâncias entre plantas parasitas e hospedeiras

Heloisa Sarti Dantas

Orientador: Dr. Daniel P. Demarque

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

helosd@usp.br

Objetivos

O principal objetivo do projeto é entender se há translocação de substâncias de uma planta parasita para sua hospedeira.

Métodos e Procedimentos

O modelo de estudo utilizado foi a parasita *Struthanthus rhynchopsyllus* Eichler (Loranthaceae), parasitando uma goiabeira *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). O experimento consiste em injetar uma solução na parasita por meio de uma bolsa de soro de 250 ml. Para manter a pressão de injeção constante de 150 mmHg utilizou-se o equipamento med-linket pressure infuser. A solução injetada continha cerca de 100 mg de cada uma das 10 substâncias naturais adicionadas (ácido benzóico, ácido gálico, ácido nicotínico, antraquinona, cafeína, emetina, cumarina, hesperidina, quercetina e rutina), além da glicose marcada com ¹³C em 100 mL de água.

Antes de injetar a solução foram coletadas amostras de caule e folha da hospedeira e da parasita. Feito isso, foi iniciado o processo de injeção em que se cortou o caule da parasita e conectou-se a cânula da bolsa de soro. O local de injeção foi vedado com parafilme. Foram feitas coletas das folhas e caules depois de 48, 72, 96 e 168 horas.

Todas as amostras foram secas na estufa a 45°C por 24 horas e moídas no moinho analítico. Utilizou-se 50 mg de cada amostra que foram extraídas com 1 ml de uma solução

de metanol e água a 70% e 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram preparadas em vials para análise no HPLC utilizando uma coluna Gemini C18 (250 x 4,6mm) sendo o solvente A água ultrapura (millipore, simplicity) e o solvente B metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico, com um fluxo total de 1ml/min e um volume de injeção de 10 µL. Foi utilizado um modo gradiente que iniciou com 10% de B e aumentou gradualmente até 100% em 50 minutos, dos minutos 50 a 54 o solvente B foi mantido a 100% e depois diminui gradualmente até 10% em 1 minuto. Nos últimos 5 minutos foi feita a lavagem da coluna.

Depois algumas amostras foram submetidas à análise por CLAE-EM/EM, em que se utilizou o cromatógrafo Shimadzu acoplada a espectrofotometria de Massas ESI-qTOF (Bruker, MicroTOFII); coluna C18 (dimensões 15 cm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula, Gemini), fluxo de 1ml/min, forno à 40°C e volume de injeção de 20 µL. A bomba A era água ultrapura (Millipore, MA, USA) e a bomba B era metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico. O método começou com 10% de B e elevou para 100% até o minuto 30. Foi utilizado método positivo de ionização, 3500 V no capilar, 9 L/min dry gas e 300°C de dry temperature.

Resultados

Ao analisar os cromatogramas dos padrões, foi observado que a antraquinona e hesperidina não apresentaram nenhum pico significativo.

Para os demais padrões foi possível estabelecer um tempo de retenção, porém ao se observar o cromatograma da solução que foi injetada, somente foi possível identificar 5 padrões, dentre eles; cafeína, ácido benzoico, ácido gálico, ácido nicotínico e cumarina.

Ao comparar os cromatogramas do caule da parasita antes e depois de injetar (figura 1) foi possível observar a presença de 4 picos a mais depois da injeção, que correspondem ao tempo de retenção do ácido nicotínico, cafeína, cumarina e ácido benzoico. Além disso, também se observou um aumento da intensidade de um pico que corresponde ao tempo de retenção do ácido gálico.

No modo positivo de ionização, identificou-se a presença de 3 padrões no caule da parasita depois de injetar (ácido nicotínico, cafeína e rutina). Já na folha da parasita se encontrou 4 padrões: cumarina, cafeína, rutina e quercetina, sendo que os 3 últimos estavam presentes antes de injetar, porém com uma área de pico menor. Nas amostras da hospedeira, somente foi possível observar a presença da quercetina, sendo que depois de injetar o pico tem uma área maior do que antes da injeção.

No modo negativo de ionização, foi identificado a presença da rutina no caule e na folha da parasita depois de injetada. Nas amostras da hospedeira, somente se observou diferenças na folha após a injeção dos padrões, em que foi possível observar um aumento na área do pico que corresponde à quercetina.

Em relação a abundância isotópica fora do normal, devido a injeção de glicose marcada com ^{13}C , em ambos os modos de ionização, não foi possível observar diferenças.

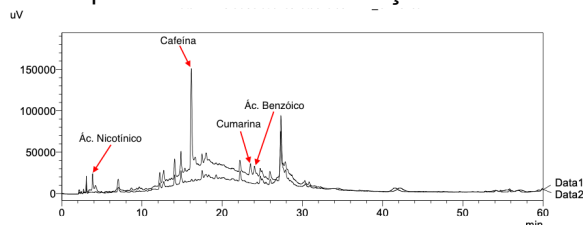


Figura 1: Comparação entre os cromatogramas do caule da parasita antes e depois de injetar os padrões.

Outros estudos demonstram que há uma conexão livre entre os floemas, por meio do plasmodesma presente no haustório. Porém no presente experimento o sentido de injeção foi contrário do que o feito nos demais estudos.¹ Além disso as hospedeiras haviam acabado de serem parasitadas, ou seja, o haustório estava recém formado, o que garante o seu funcionamento, visto que os plasmodesmas parecem se degradar com o tempo.²

Conclusões

As substâncias que foram encontradas na hospedeira tem os menores LogP dentre todos os padrões, sendo a rutina o menor (-5,11) e a quercetina o terceiro menor (0,35). Podendo isso ser um possível critério de seleção das moléculas que são compartilhadas entre hospedeira e parasita.

Referências

1. Birschwilks M, Haupt S, Hofius D, Neumann S. Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *J Exp Bot.* 2006;57(4):911-921.
2. Vaughn, K. Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma* 220, 189–200 (2003).