

METABÓLITOS DA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME DE *FUSARIUM OXYSPORUM*: UMA AVALIAÇÃO EM MODELOS *IN VITRO* E *EX VIVO*

Gabriela Guastala Englerth (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Monique de Souza, Deisiany Gomes Ferreira (Co-orientadora), Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (Orientador). E-mail: mnegri@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia/ Biologia e Fisiologia dos Microrganismos/ Micologia,

Palavras-chave: Virulência; biofilme; onicomicose.

RESUMO

O objetivo foi avaliar os componentes de matriz extracelular do biofilme de *Fusarium oxysporum* em modelos *in vitro*. Foi formado o biofilme de *F. oxysporum*, de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h, e depois extraída a matriz de cada tempo. Dessas matrizes, foi quantificado eRNA, eDNA e proteínas totais dessas matrizes, testado sua composição por FTIR-ATR e avaliado sua toxicidade em células HeLa. Foi observado um aumento de componentes da matriz em 72h. Também houve um comportamento mais citotóxico nas células HeLa nos períodos de 24h e 120h. No experimento com *FTIR-ATR*, especialmente em 120h, houve maior aumento da banda associada a proteínas e a redução da intensidade das bandas atribuídas a carboidratos e ácidos nucleicos na região de menor frequência. Assim, observamos que a matriz do biofilme de *F. oxysporum* se altera ao longo do tempo de maturação, podendo apresentar toxicidade sobre células humanas.

INTRODUÇÃO

Fusarium oxysporum é um fungo filamentoso que tem se destacado nas últimas décadas como um agente infeccioso oportunista, sendo o causador não dermatófito de onicomicose mais frequente no Brasil (GALLETTI et al., 2017). Sua capacidade de virulência se deve a diversos fatores, incluindo a habilidade de formar biofilmes. Esses biofilmes podem se desenvolver tanto em superfícies inanimadas, quanto em tecidos vivos, como nas unhas, onde causam a onicomicose, podendo levar, em indivíduos imunocomprometidos, a uma infecção sistêmica (GALLETTI et al., 2017; VEIGA et al., 2023).

A formação de biofilmes é um fator crucial para a capacidade de um microrganismo causar doenças, pois oferece proteção e estabilidade. Isso acontece porque os microrganismos se unem e criam uma estrutura protetora chamada de matriz polimérica extracelular (MEC) (VEIGA et al., 2022). Essa matriz contém aminoácidos, hormônios e outros componentes, que, quando liberados, ativam uma

série de reações em cadeia que estimulam a produção do que a comunidade precisa para sobreviver (MARCOMINI et al., 2023). A fim de entender mais sobre a virulência da matriz extracelular do *Fusarium oxysporum*, o estudo em questão visou analisar os efeitos em modelo *in vitro* e seus componentes ao longo do tempo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado

Para este estudo, foi utilizado a espécie do fungo *Fusarium oxysporum*, depositado nas CMRP - Rede Paranaense das Coleções Microbiológicas (CMRP2925). Este foi repicado em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) para o crescimento fúngico.

Formação do biofilme e obtenção da Matriz Extracelular

A formação e extração da Matriz Extracelular foi realizada conforme o protocolo descrito em Ferreira et al (2025), adaptado. Para isso, foi preparado um inóculo $3,0 \times 10^6$ conídios/mL e incubado por 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h. A cada 24h foi feita uma raspagem para obtenção do biofilme, e filtrado para a obtenção da matriz.

Caracterização da Matriz extracelular

Para caracterização dos componentes da matriz extracelular, foi utilizado o equipamento espectrofotômetro Nanodrop 2000TM (UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Foi realizada a leitura de eDNA, eRNA e proteínas totais dos tempos extraídos.

Avaliação da citotoxicidade em células HeLa

Para avaliar a citotoxicidade contra células de mamíferos, foi utilizada a cepa HeLa, segundo Kischkel et al. (2020). A análise de viabilidade celular foi avaliada por meio do vermelho neutro (INLAB®, Diadema, SP, BRASIL) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® Plus 384, Molecular Devices, San José, CA, EUA) a 540 nm (Ates et al., 2017). Os valores obtidos foram analisados no Microsoft Excel (2019) para calcular a inibição celular (%).

Avaliação dos componentes e da MEC por FTIR-ATR

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier via reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foi empregada para avaliar a matriz fúngica após 24, 48 e 120 h de crescimento. Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos na região espectral de $4000-400 \text{ cm}^{-1}$, com média de 128 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} . As leituras foram realizadas aplicando a suspensão de matriz fúngica diretamente sobre o cristal de ATR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A relata o crescimento do *F. oxysporum* nos sete períodos do experimento. Nas 24h horas é possível observar pouca coloração, diferente dos demais períodos,

onde é observado uma coloração rosa, típico comportamento do fungo estudado em crescimento.

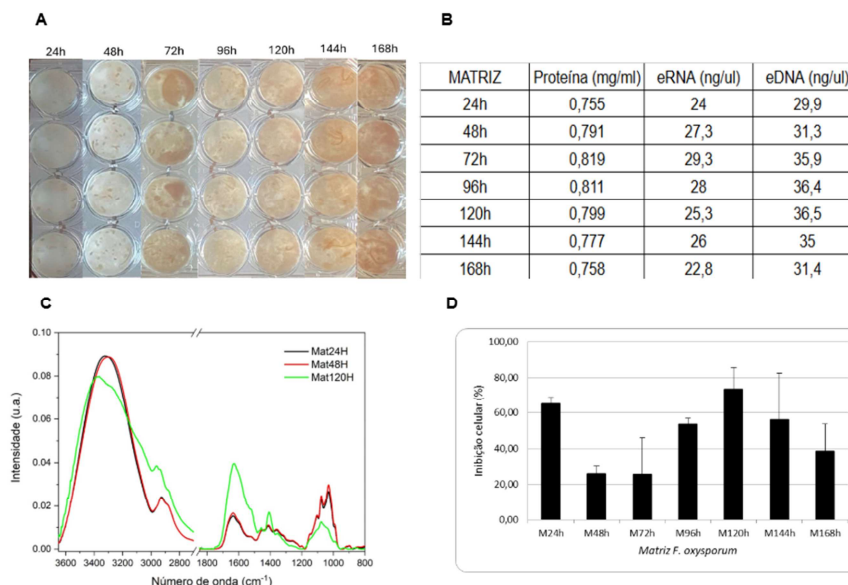


Figura 1 - Composição e efeitos da matriz extracelular de biofilme de *Fusarium oxysporum*. A) Formação do biofilme. B) Quantificação da matriz extracelular por Nanodrop. C) Análise da composição por FTIR-ATR. D) Citotoxicidade em células Hela.

Em relação a quantificação da matriz (Figura 1B), a maior produção de proteínas totais e RNA extracelular foi no período de 72h, com exceção do eDNA. Concordando com Ferreira *et al.*, no qual há um aumento nos períodos de 24h a 72h e uma decaída a partir de 96h (FERREIRA *et al.*, 2025).

Quando avaliado os espectros de FTIR-ATR (Figura 1C) das amostras das Matrizes de 24h, 48h e 120h. Observa-se que os espectros referentes às matrizes após 24 e 48 horas de crescimento fúngico exibem perfis semelhantes. Ambos apresentam uma banda (3600–3000 cm^{-1}), atribuída às vibrações de estiramento do grupo hidroxila (-OH); bandas associadas às vibrações de estiramento do grupo C–H (3000–2800 cm^{-1}); além de uma banda em 1636 cm^{-1} , correspondente a amida I de proteínas. Além disso, são observadas várias bandas na região entre 1200 e 950 cm^{-1} , atribuídas a carboidratos e ácidos nucleicos (VEIGA *et al.*, 2022), corroborando com os achados pela análise do Nanodrop. Por outro lado, o espectro da amostra Matriz de 120h apresenta alterações significativas quando comparado aos demais, destacando-se o aumento da intensidade da banda associada a proteínas e a redução da intensidade das bandas atribuídas a carboidratos e ácidos nucleicos.

Na figura 1D, é possível observar que a matriz apresentou maior toxicidade nos períodos de 24h e 120h. A apresentação de maior citotoxicidade em 24h está de acordo com estudos de Ferreira *et al.* e Veiga *et al.*, porém ao avaliarmos o tempo de 120h, a toxicidade também foi elevada, resultado diferente do encontrado na literatura até o presente momento. No entanto, associamos essa citotoxicidade elevada, à modulação que o biofilme possui, podendo ser diferente, dependendo das

condições analisadas, como análise in vitro, ex vivo, temperatura e entre outros fatores que podem gerar uma alteração na sua composição (VEIGA et al., 2022; FERREIRA et al., 2025).

CONCLUSÕES

É evidente que a matriz extracelular do biofilme de *Fusarium oxysporum*, é capaz de causar citotoxicidade em células humanas e esse fator se altera dependendo do tempo de desenvolvimento do biofilme. Isso leva a crer que, ao longo do tempo, a matriz altera sua composição para proteger e facilitar o desenvolvimento da comunidade microbiana, podendo até mesmo desestabilizar e danificar as células do hospedeiro. Portanto, ressaltamos que mais estudos devem ser feitos para o entendimento do papel e controle da matriz de biofilme, para prevenir maiores complicações de infecção por *F. oxysporum*.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária, Universidade Estadual de Maringá e grupo de pesquisa OneMyco.

REFERÊNCIAS

GALLETTI, J.; et al. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. **Future microbiology**, 12(14), 1311-1321, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0052>. Acesso em: 25 de Agosto de 2025.

MARCOMINI, E.K, Negri, M. (2023) Fungal quorum-sensing molecules and antiseptics: 518 A promising strategy for biofilm modulation?. **Drug discovery today** v. 28, p. 103624. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103624>. Acesso em 25 de Agosto de 2025.

VEIGA, F. F. et al. *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. **Future microbiology**, v. 13, p. 1745–1756, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0245>. Acesso em 22 ago 2025.

VEIGA, F.F. et al. Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails. **International journal of dermatology**, v. 61, 2ª edição, p. 191–198, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijd.15747>. Acesso em: 22 de Agosto de 2025.

FERREIRA, D. G., & Negri, M. (2025). In vivo and in vitro pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and its biofilm components. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-025-01632-x>. Acesso em 25 de Agosto de 2025.