



Avaliação qualitativa do perfil metabólico do fungo filamentoso *Phoma sp.* utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Alexandre da Silva Avincola¹ – alexandre.avincola@ifpr.edu.br

Carla Porto² – cporto.silva@gmail.com

Eduardo Jorge Pilau² – epilau@gmail.com

1 – Instituto Federal do Paraná – IFPR Paranavaí

2- Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá, PR

Resumo: A diversidade metabólica de *Phoma sp.*, tem sido pouco explorado, com isso estudos relacionados à análise e identificação de metabólitos contribuem para uma melhor caracterização deste micro-organismo. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar se o fungo *Phoma sp.* seria um potencial produtor de metabólitos como a literatura previamente generaliza para todos os fungos e ainda identificar algum metabólito presente dentre esta diversidade de substâncias. Para avaliar esta diversidade química do gênero *Phoma sp.* a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) foi utilizada, por ser uma técnica altamente confiável, reprodutiva, sem alto rigor no preparo de amostra, não necessitando de amostras concentradas. Da avaliação dos cromatogramas do extrato fúngico obtido com MeOH como solvente extrator para culturas crescidas por 10 dias a 28 °C, foi observado que o fungo é um possível produtor de diversas classes de substâncias, dentre elas o fosfolipídio Lisofosfatidilcolina 18:2 identificado neste trabalho, também conhecido como LysoPC 18:2 de m/z 520 $[M+H]^+$. A confirmação da identidade do íon m/z 520 $[M+H]^+$ se deu através dos espectros de fragmentação desta substância, análise da rota de fragmentação e comparação com bancos de dados específicos para espectrometria de massas.

Palavras-chave: *Phoma sp.*, perfil metabólico, metabólitos, CLAE-EM.

1. Introdução

O estudo de metabólitos de fungos tem despertado interesse acadêmico, contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas nas áreas de medicina, biologia sistemática, indústria alimentícia, entre outras (CRAGG, 2013). Os fungos são considerados excelentes produtores de metabólitos bioativos das mais diversas classes de produtos naturais, onde pode-se destacar alcaloides, terpenoides, peptídeos, ácidos graxos, policetídeos, entre outros (TAN, 2001). Muitas classes de substâncias têm sido relatadas para as espécies fúngicas, porém poucas informações a respeito da identidade das substâncias frente a um gênero fúngico e/ou espécie é apresentado na literatura (FRISVAD, 2008). Com isso, a análise do perfil químico e identificação metabólica de uma espécie ou gênero torna-se fundamental no processo de caracterização química deste indivíduo e melhor compreensão acerca destes micro-organismos (SHWAB, 2008).

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar se o fungo *Phoma sp.* seria um potencial produtor de metabólitos como a literatura previamente generaliza para todos os fungos e ainda identificar algum metabólito presente dentre esta diversidade de substâncias.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da linhagem fúngica

Para este estudo foi utilizada uma cepa de uma linhagem fúngica de *Phoma sp.* A linhagem selecionada faz parte da coleção do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica,

do Instituto de Química da Unicamp e foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. A cepa da linhagem *Phoma* foi isolada da pele humana, e identificada (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – Unicamp) a nível de gênero, e utilizada como parte integrante da Tese de Doutorado da Dra. Carla Porto da Silva (SILVA, 2012).

2.2. Meio de cultivo

O meio de cultura foi formulado seguindo recomendações da coleção de micro-organismos Norte americana (ATCC, American Type Culture Collection). Para o preparo do Ágar extrato de malte (MEA) foi utilizado extrato de malte (20 gL⁻¹), peptona (1 gL⁻¹), glicose (20 gL⁻¹) e ágar (12 gL⁻¹) em água deionizada. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121°C e vertidos para placas de petri (150 x 15 mm).

2.3. Extração dos metabólitos fúngicos

As colônias de fungos (crescimento em estufa DBO a 28°C por 10 dias) foram cortadas em cubos com auxílio de lâmina de bisturi estéril, os quais foram congelados em nitrogênio líquido por 1 h, sendo posteriormente submetidos a banho ultrassônico com 40 mL de MeOH grau HPLC por 30 min e agitados em frasco tipo Schott por 24 h sem presença de luz. O extrato foi filtrado, pré-concentrado sob fluxo de nitrogênio gasoso e uma alíquota retirada para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).

2.4. Avaliação dos extratos por CLAE-EM/EM

Para os experimentos de CLAE-EM/EM foi utilizado um cromatógrafo a líquido Waters 1525μ (bomba binária) acoplado ao um espectrômetro de massas Quattro micro API Waters (Beverly-EUA).

O espectrômetro de massas com fonte de ionização do tipo eletrospray e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) foi operado no modo varredura (scan) de m/z 100 a

1000, sendo que as condições de análise foram ionização no modo positivo (+); voltagem do capilar 2,50 kV; voltagem do cone 25,0 V; temperatura da fonte 150°C; temperatura de dessolvatação 450°C; fluxo do gás no cone 25 Lh⁻¹; fluxo do gás de dessolvatação 900 Lh⁻¹, para as análises de CLAE-EM.

Para as análises dos metabólitos foram utilizados: coluna Waters Symmetry® C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 μm) e gradiente linear de eluição utilizando como solvente (A) água e (B) acetonitrila ambos a 0,1% com ácido fórmico mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na separação dos constituintes dos extratos.

Tempo (min)	Vasão (ml/min)	%A	%B
0,00	0,5	98	2
5,00	0,5	50	50
5,01	0,5	50	50
10,00	0,5	30	70
11,00	0,5	2	98
13,00	0,5	2	98
15,00	0,5	98	2

Fonte: O autor.

Nos experimentos de CLAE-EM/EM, as mesmas condições acima foram utilizadas. Entretanto, para os experimentos de varredura de íons-produtos (daughter scan), foram realizadas utilizando dissociação induzida por colisão (CID, do inglês collision-induced dissociation) obtidas utilizando energia de colisão na faixa de 5 - 50 eV e pressão do gás de colisão de 3,06. 10⁻³ mBar, na câmara de colisão.

3. Resultados e Discussão

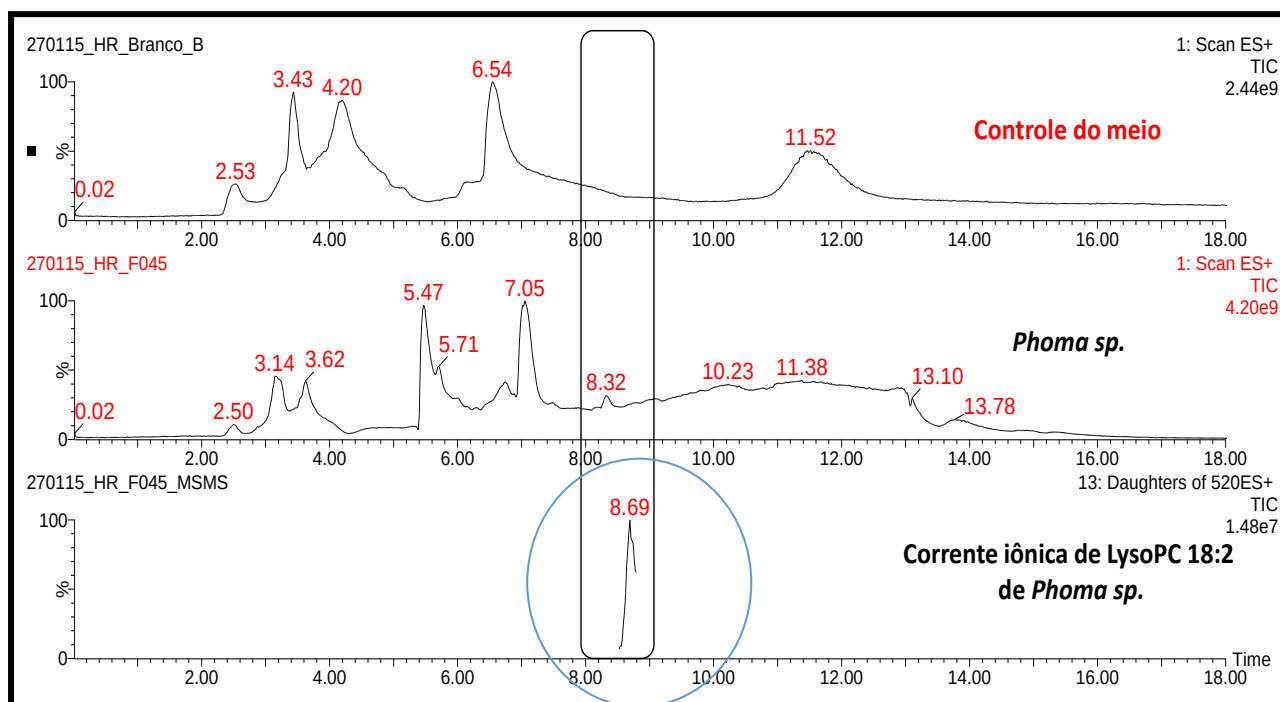
Comparando os cromatogramas de íons totais do controle do meio de cultura versus o extrato de *Phoma* sp. foi possível observar a presença de diferentes picos em diversos tempos de retenção, atrelados à produção metabólica por parte do fungo. As diferenças cromatográficas sugerem que os sinais comuns entre os cromatogramas estão atrelados a componentes do meio de cultura, uma vez que os sinais específicos estão correlacionados com substâncias possivelmente produzidas pelo fungo, como observado na figura 1.

Dentre as principais características dos fungos, pode-se destacar a produção de lipídeos, ácidos micólicos e policetídeos. De acordo com os sinais observados nos cromatogramas da figura 1 é possível observar o alto grau de complexidade química que este micro-organismo apresenta. Esta complexidade se deve ao fato que vários sinais do cromatograma do extrato fúngico de *Phoma* não são observados no controle do branco, sugerindo que o gênero fungico apresenta substâncias de variadas classes químicas quando analisamos os diversos sinais com os mais variados tempos de retenção ao longo de toda a análise

cromatográfica.

Da avaliação do extrato fúngico de *Phoma sp.* foi possível observar um sinal no cromatograma de íons da faixa de 8.0 – 9.0 min não observado no controle. A presença deste sinal estava principalmente atrelada ao pseudo-íon molecular m/z 520 $[M+H]^+$. A LysoPC 18:2 é um fosfolipídio que em modo positivo apresenta valor de razão massa/carga de m/z 520 $[M+H]^+$, contudo a presença de um íon de m/z 520 $[M+H]^+$ não sugere informações suficientes para a identificação de um metabólito quando utilizamos um equipamento como o QqQ que não apresenta alta exatidão de massa.

Figura 1 – Cromatograma de íons totais do branco do meio de cultura, do extrato fúngico de *Phoma sp.* e corrente iônica do íon de m/z 520 $[M+H]^+$ (região circulada) atribuída à LysoPC 18:2 (8 – 9 min).



Fonte: o autor.

Para a confirmação da identidade deste íon que possivelmente é sugestível para a LysoPC 18:2 foi realizada a fragmentação desta substância (30eV de energia de colisão) obtendo-se assim o espectro de fragmentação deste íon (Figura 2). Analisando o espectro de fragmentação do íon 520 $[M+H]^+$ do extrato de *Phoma sp.* foi observado o íon fragmento de m/z 502 $[M-H_2O+H]^+$ corresponde a perda neutra de uma molécula de água na estrutura, além disso o íon de m/z 104 $[M-C_{21}H_{37}O_6P+H]^+$

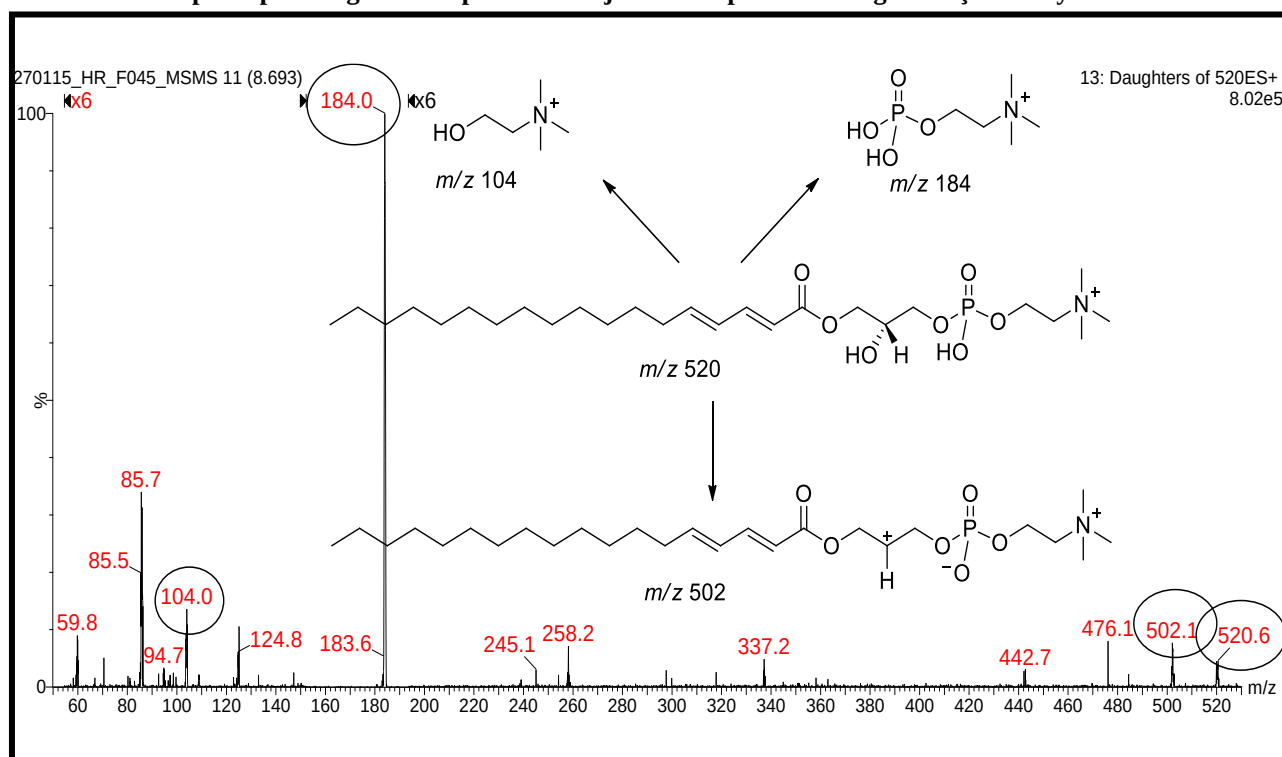
atribuído à porção nitrogenada referente a colina na estrutura, sendo este um fragmento característico dos derivados de colina substituída e o sinal m/z 184 $[M-C_{21}H_{36}O_3+H]^+$ referente à unidade de fosfocolina. Através da comparação do espectro de fragmentação com bancos de dados específicos para espectrometria de massas (LipidMAPS, ID: LMGP01070010), e análise do perfil de fragmentação, foi possível confirmar a identidade da substância como sendo o fosfolipídio lisofosfatidilcolina 18:2

(RIEKHOF, 2014).

A presença de lisofosfatidilcolina, demonstra a importância dos fosfolipídios nas células fúngicas, pois além da estruturação e composição da parede celular fúngica, eles são reguladores do crescimento e desenvolvimento das hifas e fonte de fósforo inorgânico, na forma de fosfato ou derivados (WICKRAMASEKARA, 2013). Uma característica importante das lisofosfatidilcolinas é que tais substâncias são facilmente detectáveis por espectrometria de massas por apresentarem em sua estrutura um nitrogênio quaternário com uma carga positiva,

por esta razão tais lípideos não apresentam dificuldades em serem analisados em modo positivo de ionização em fontes de ionização do tipo ESI (do inglês *electrospray ionization*), sugerindo que a identificação da LysoPC 18:2 pode ser obtida sem a necessidade de acidificação da amostra e/ou fase móvel. A detecção de LysoPC 18:2 demonstra a eficiência da técnica CLAE-EM para a caracterização de metabólitos fúngicos e auxilia numa melhor compreensão das características químicas dos fungos filamentosos, especialmente para o gênero *Phoma*, que até o presente momento tem sido pouco estudado.

Figura 2 – Espectro de fragmentação EM/EM do íon m/z 520 $[M+H]^+$ atribuído à presença de LysoPC 18:2 (8 – 9 min) do extrato fúngico de *Phoma* sp. O íon observado foi fragmentado (30eV) e a estrutura química dos principais fragmentos apresentadas junto ao espectro de fragmentação da LysoPC 18:2.



Fonte: o autor.

4. Conclusão

A avaliação do perfil químico do extrato de *Phoma* sp. através da técnica de CLAE-EM mostrou que o gênero fúngico é um alto produtor de diversas classes de metabólitos, sendo que foi observado dentre esta diversidade química a presença do fosfolipídio LysoPC (18:2). Além disso, foi possível afirmar que a utilização da técnica CLAE-E é uma ferramenta

eficiente para avaliar a presença de LysoPC (18:2) em extrato fúngico, pois além de ser uma técnica eficiente para a detecção de espécies químicas carregadas, ela ainda fornece informações estruturais mais significativas sobre o metabólito, informações estas confirmadas pelos espectros de fragmentação da substância. Com a avaliação do extrato fúngico, baseado no perfil dos cromatogramas e dos

espectros de massas, foi possível apontar algumas características químicas atreladas ao gênero *Phoma* sp. que vieram a contribuir

5. Agradecimentos

À professora Anita (Unicamp), ao grupo Labiomass-UEM e a CAPES-CNPQ.

6. Referências

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

FRISVAD, Jens C.; ANDERSEN, Birgitte; THRANE, Ulf. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 231-240, 2008.

HSU, Fong-Fu; TURK, John. Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 4, p. 352-363, 2003.

RIEKHOF, W. R. et al. Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglycerol-N,N,N-

diretamente para caracterização metabólica deste micro-organismo.

trimethylhomoserine. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 6, p. 749–57, 2014.

SHWAB, E. Keats; KELLER, Nancy P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 225-230, 2008.

SILVA, C. P. **Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias**. Tese (Doutorado em química) – Unicamp. Campinas, 2012.

TAN, Ren Xiang; ZOU, Wen Xin. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

WICKRAMASEKARA, S. et al. Electrospray Quadrupole Travelling Wave Ion Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Plasma Metabolome Changes Caused by Xanthohumol in Obese Zucker (fa/fa) Rats. **Metabolites**, v. 3, n. 3, p. 701–717, 2013.