



Prospecção metabólica de *Monascus ruber* 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: *Monascus ruber* é uma espécie fúngica conhecida por ser excelente produtora de metabólitos com várias aplicações industriais. A avaliação da diversidade metabólica em fungos tem sido de extrema importância para uma melhor compreensão a cerca deste microorganismo, justificando assim a necessidade dos estudos de prospecção metabólica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico do extrato de *M. ruber* e identificar metabólitos presentes no extrato utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Assim, após o fungo ser cultivado em extrato de malte ágar, por 10 dias a 28 °C, e extraído com metanol grau HPLC, uma alíquota do extrato foi analisada por CLAE-EM. A avaliação do extrato de *M. ruber* demonstrou que o micro-organismo é um potente produtor de metabólitos, sendo que dentre esta gama de substâncias, observadas no cromatograma de íons, a fosfocolina (íon m/z 184 $[M+H]^+$) foi identificada como um dos metabólitos presentes no fungo.

Palavras-chave: *Monascus ruber*, prospecção metabólica, CLAE-EM.

1. Introdução

Fungos filamentosos são fontes adequadas, para uso industrial, na produção de proteínas, ácidos orgânicos e pigmentos. No entanto, devido à baixa quantidade de estudos de metabólitos secundários provenientes de micro-organismos, pouco se tem aproveitado desta diversidade química de substâncias (HAJJAJ, 1998).

Estudos de metabólitos secundários podem ser divididos em dois seguimentos: estudo metabólico direcionado e não-direcionado (VILLAS-BÔAS, 2005). No estudo direcionado, investiga-se quali- e/ou quantitativamente uma classe de substâncias específicas ou uma determinada rota metabólica de interesse. Já para o estudo não-direcionado, o objetivo principal é caracterizar o maior número de substâncias possíveis de forma qualitativa (MATHEW, 2013).

A prospecção metabólica busca a caracterização de modo qualitativo de metabólitos sendo, desse modo, considerada um estudo não direcionado. No entanto, diversos fatores podem influenciar no perfil metabólico de um organismo como disponibilidade de fonte de energia à qual o fungo se alimenta, fatores genéticos, stress, umidade, pH, além de fatores físicos, como luz e calor (FRISVAD, 2008; SHWAB 2008). Assim estudos de prospecção podem encontrar respostas diferentes dependendo das condições às quais o micro-organismo foi submetido (LAMEIRAS, 2015). Por esta razão, é importante compreender que organismos vivos podem apresentar perfil química distinto em função do ambiente ao qual foi submetido durante o crescimento.

O gênero fúngico *Monascus*, por exemplo, é considerado um excelente produtor de metabólitos das mais variadas classes de substâncias, como antraquinonas, naftaquinonas, decalinas, além de policetídeos e derivados de colina (LIANG, 2018).

Assim o objetivo deste trabalho é avaliar o perfil químico de *Monascus ruber*, utilizando a cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas e identificar alguns metabólitos produzidos por *M. ruber*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da linhagem fúngica

O *M. ruber* CCT 3802 (IFO 6540) é um fungo de interesse biotecnológico, usado na produção de pigmento e citrinina. Para este estudo foi utilizada uma cepa de uma linhagem fúngica de *Monascus ruber* a qual foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello/Campinas-SP.

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 1525 μ (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 μ m) 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

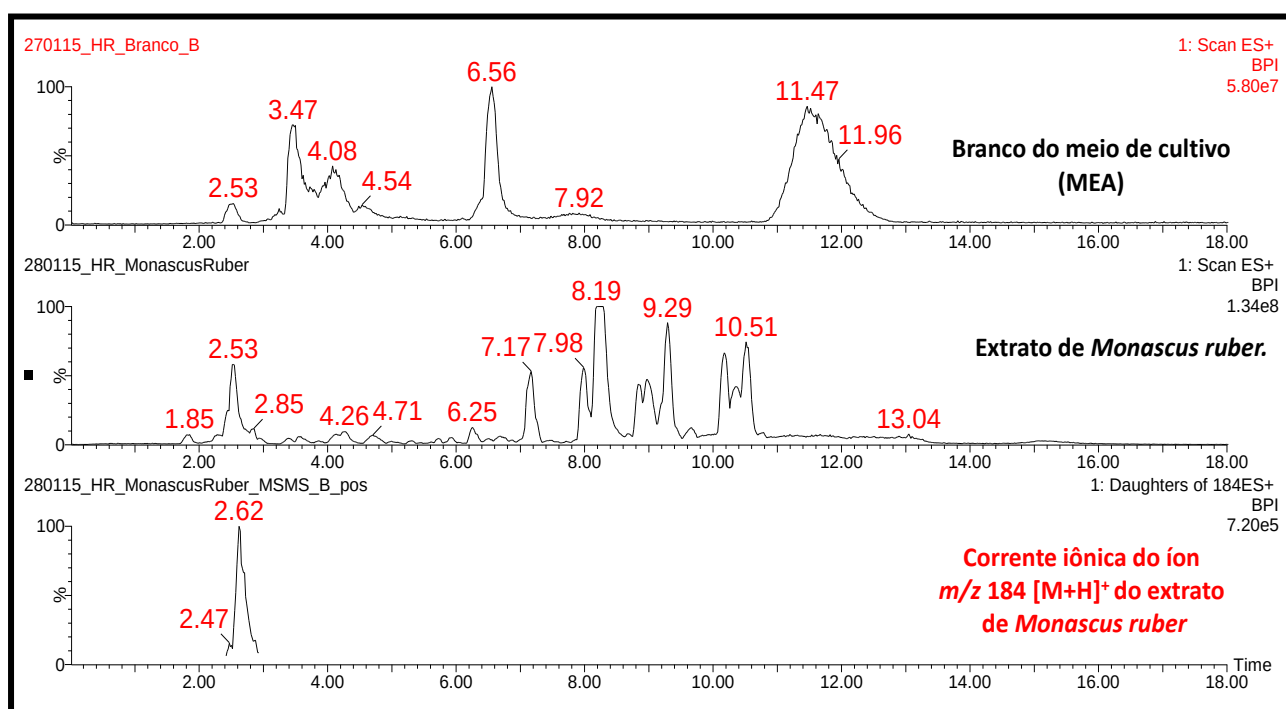
A avaliação do cromatograma de íons totais (Figura 1) do extrato alcoólico de *M. ruber* mostrou que o fungo é um excelente produtor de metabólitos das mais variadas classes químicas. A diversidade de compostos químicos apresentados no cromatograma é evidenciada pelos diversos sinais, nos mais variados tempos de retenção, sugerindo que os

compostos detectados apresentam polaridades diversas, respondendo de formas diferentes frente ao equilíbrio químico entre as substâncias do extrato e as fases móvel e estacionária (COLLINS, 2006).

Dentre os diversos sinais no cromatograma de íon totais, observou-se a presença de um sinal em 2,62 min, atribuído

majoritariamente ao íon m/z 184 $[M+H]^+$. A presença deste íon sugeriu inicialmente que poderia ser um derivado de colina relatado na literatura para outras espécies fúngicas (MARKHAM, 1993). Assim, o íon m/z 184 foi fragmentado, para confirmar sua identidade, obtendo-se o espectro de fragmentação EM/EM.

Figura 1 – Cromatograma de íons totais do branco do meio de cultura, do extrato fúngico de *Monascus ruber* e corrente iônica do íon de m/z 184 $[M+H]^+$ atribuída à fosfocolina.



Fonte: o autor.

No espectro de fragmentação EM/EM (Figura 2) foram observados os seguintes íons-fragmento: m/z 184,0 $[M+H]^+$, m/z 125,1 $[M+H]^+$, m/z 104,0 $[M+H]^+$, m/z 98,8 $[M+H]^+$, m/z 86,1 $[M+H]^+$, m/z 70,7 $[M+H]^+$, m/z 59,8 $[M+H]^+$, m/z 57,7 $[M+H]^+$. Foi possível observar que os fragmentos m/z 59,8 $[M+H]^+$ e m/z 104,0 $[M+H]^+$ eram respectivamente unidades referentes aos íons trimetilamônio e colina, deste modo contribuindo numa melhor caracterização do íon m/z 184. Assim, comparando o perfil de fragmentação do íon m/z 184,0 $[M+H]^+$ com bancos de dados específicos para espectrometria - LipidMAPS, ID: LMGP01070010 (FAHY, 2007) e dados da literatura, foi possível confirmar a identidade da substância como sendo a fosfocolina, um típico metabólito fúngico fosforilado. A presença de

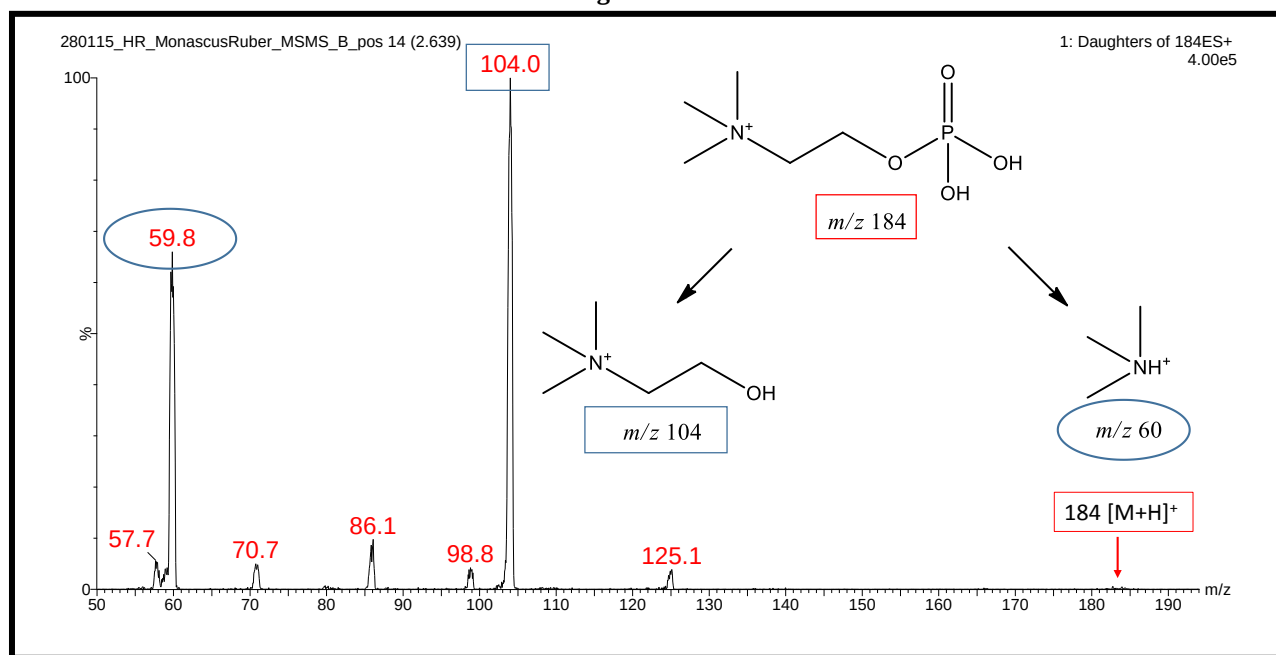
fosfocolina, em fungos filamentosos, evidencia uma importante função realizada por essa substância em fungos – a estruturação e composição celular. Dentre os diversos componentes da membrana fosfolipídica dos fungos filamentosos, a colina fosforilada (fosfocolina) é um dos principais constituintes desse sistema (MARKHAM, 1993). Além de estar relacionada ao crescimento dos fungos e morfologia das hifas, a colina participa do metabolismo do sulfato na forma de colina-o-sulfato. O metabolismo de sulfato nas células fúngicas é uma das principais formas de reserva de C, N e S, por esta razão é de suma importância a presença de fosfocolina, pois é um metabólito vital para o desenvolvimento do micro-organismo.

Além disso, a metodologia de extração

mostrou-se eficaz, pois a parede celular fúngica foi fragilizada na metodologia de extração. Este fato pôde ser evidenciado pela presença da fosfocolina no extrato, pois ela é um típico metabólito da parede celular de fungos. Assim, a presença deste metabólito sugere que

substâncias intra e extra-celulares foram extraídas ao longo da metodologia de extração, pois a parede celular foi fragilizada, evidenciando que o método é adequado para a avaliação do metabolismo totais de fungos filamentosos (CHEMAT, 2017).

Figura 2 – Espectro de fragmentação EM/EM (20eV) e principais fragmentos do íon m/z 184 $[M+H]^+$ do extrato fúngico de *Monascus ruber*.



Fonte: o autor.

4. Conclusão

A avaliação do perfil químico do extrato de *Monascus ruber* por meio da CLAE-EM mostrou que o fungo apresenta alto potencial para a produção de metabólitos, confirmando o que a literatura tem exposto para a espécie fúngica. Além disso, da avaliação dos extratos fúngicos observou-se a presença do íon m/z 184 $[M+H]^+$ que após ser fragmentado, foi confirmado como sendo a molécula de fosfocolina, um importante metabólito fúngico responsável por promover estruturação ao fungo e crescimento das hifas.

5. Agradecimentos

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

6. Referências

CHEMAT, Farid et al. Ultrasound assisted extraction of

food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 34, p. 540-560, 2017.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de cromatografia. In: *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, Campinas, 2006.

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, 2013.

FAHY, Eoin et al. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic acids research*, v. 35, n. suppl_2, p. W606-W612, 2007.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research*, v. 112, n. 2, p. 231, 2008.

HAJJAJ, H. et al. Sampling techniques and comparative

extraction procedures for quantitative determination of intra-and extracellular metabolites in filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, n. 1, p. 195, 1998.

LAMEIRAS, F.; HEIJNEN, J. J.; VAN GULIK, W. M. Development of tools for quantitative intracellular metabolomics of *Aspergillus niger* chemostat cultures. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1253, 2015.

LIANG, Bin et al. Investigation of citrinin and pigment biosynthesis mechanisms in *Monascus purpureus* by transcriptomic analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1374, 2018.

MARKHAM, P. et al. Choline: its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3-4, p. 287–300, 1993.

MATHEW, A. K.; PADMANABAN, V. C. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. SUPPL. 2, p. 45, 2013.

SHWAB, E. K; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 225, 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.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613, 2005.