



Utilização da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas na avaliação de metabólitos do fungo filamentoso *Epicoccum sp.*

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 cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica robusta, sensível, reprodutiva e extremamente eficiente no processo de investigação metabólica de organismos vivos. Os fungos filamentosos, por exemplo, são excelentes produtores de diversos compostos químicos, contudo a avaliação dos extratos necessita de uma ferramenta analítica que possa suportar o alto grau de complexidade que os extratos fúngicos apresentam. Assim, este trabalho pretende com o uso da CLAE-EM avaliar a diversidade química (perfil cromatográfico) e identificar componentes presentes no extrato do fungo *Epicoccum sp.* Através da CLAE-EM, foi possível observar que o fungo mostrou-se como um excelente produtor de diversos metabólitos, de variadas classes, quando observado o cromatograma de íons totais da amostra. Além disso com o uso da espectrometria de massas foi possível identificar a presença da substância LysoPC 18:2, demonstrando que a CLAE-EM é extremamente eficiente no processo de avaliação de metabólitos fúngicos em matrizes complexas.

Palavras-chave: CLAE-EM, metabólitos fúngicos, fungo filamentoso, *Epicoccum sp.*

1. Introdução

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) tem sido atualmente uma das técnicas mais difundidas e utilizadas no processo de identificação de amostras complexas, pois não necessita de processos de preparação de amostra extremamente trabalhosos (BENTON, 2010).

Uma vantagem da utilização da técnica para a investigação de metabólitos fúngicos se dá pelo fato da técnica ser eficiente no processo de separação dos componentes químicos de uma mesma matriz, diminuindo o grau de complexidade da amostra e com isso facilitando com que as substâncias presentes na matriz, passíveis de análise por espectrometria de massas, possam ser detectadas sem sofrer supressão iônica (ŞENYUVA, 2008).

Uma importante característica atribuída à espectrometria de massas é a alta precisão quanto à detecção dos valores de m/z (razão massa/carga) referente aos analitos da amostra. Por este motivo, a CLAE-EM tem sido uma das ferramentas mais úteis e confiáveis no processo de identificação metabólica e avaliação de perfil químico de micro-organismos, devido à sua confiabilidade na detecção e resposta analítica à diversas matrizes (LU, 2008). Além do mais, com a utilização da técnica é possível identificar metabólitos unicamente pelo perfil de fragmentação, eliminando com o isso o uso de padrões analíticos em estudos qualitativos e/ou comparativos (LU, 2008; ERNST, 2014).

Os fungos filamentosos, por exemplo, são excelentes produtores de metabólitos das mais variadas classes, como terpenos, ciclopeptídeos, alcaloides, policetídeos, além de lipídios e proteínas (TAN, 2001). Porém, avaliar esta diversidade química requer análises específicas que consigam detectar e avaliar o perfil químico do micro-organismo, levando em consideração o alto grau de complexidade dos extratos fúngicos (CHAPLA, 2013).

A avaliação do perfil químico de um micro-organismo pode ser melhor realizada com

o uso de uma técnica robusta e reprodutiva com alta precisão analítica. Assim, a CLAE-EM é a ferramenta mais adequada, pois além da detecção dos metabólitos fúngicos é possível obter-se informações químico-estruturais dos analitos, contribuindo para um melhor entendimento do metabolismo dos fungos (BOUSLIMANI, 2014).

Assim, este trabalho pretende com o uso da CLAE-EM avaliar a diversidade química (perfil cromatográfico) e identificar componentes presentes no extrato do fungo *Epicoccum sp.*

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da linhagem fúngica

Para este estudo foi utilizada uma cepa de *Epicoccum sp.* isolada da pele humana (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – Universidade de Campinas – SP, a nível de gênero) durante a realização da Tese de Doutorado da Dra. Carla Porto da Silva (SILVA, 2012). 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 para estudos do grupo Labiomass-UEM.

2.2. Meio de crescimento do fungo filamentososo

O meio de cultura foi formulado seguindo recomendações da coleção de micro-organismos Norte americana (ATCC, American Type Culture Collection). Para o preparo do meio MEA (ágar extrato de malte) foi utilizado peptona (1 gL^{-1}), glicose (20 gL^{-1}) extrato de malte (20 gL^{-1}), e ágar (12 gL^{-1}) em água deionizada. Os meios de cultivo foram autoclavados por 15 minutos à 121°C e vertidos em placas de petri ($150 \times 15 \text{ mm}$). Os fungos foram cultivados neste meio de cultura por 10 dias em estufa DBO a 28°C .

2.3. Extração metabólica do fungo

As colônias de *Epicoccum sp.*, após crescidas em estufa, 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 (40 KHz) com 50 mL de MeOH grau HPLC por 60 min e agitados em frasco tipo Schott por 24 h na ausência de luz. O extrato após ser filtrado foi 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. CLAE-EM para avaliação dos extratos

Para os experimentos de CLAE-EM foi utilizado um cromatógrafo a líquido Waters 1525 μ (bomba binária) acoplado ao um espectrômetro de massas Quattro micro API Waters (Beverly-EUA). Para as análises dos metabólitos foram utilizadas as seguintes condições: coluna Waters Symmetry® C18 ($4,6 \times 75 \text{ mm} \times 3,6 \mu\text{m}$) e gradiente linear de eluição por 18 min utilizando como solventes (A) água e (B) acetonitrila, ambos acidificados com ácido fórmico a 1% como 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
18,00	0,5	98	2

Fonte: o autor.

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 (+) de aquisição de dados; voltagem do cone 25,0 V; voltagem do capilar 2,50 kV; temperatura de dessolvatação 450°C ; fluxo do gás no cone 26 L h^{-1} ; fluxo do gás de dessolvatação 900 L h^{-1} , temperatura da fonte 150°C , para as análises de CLAE-EM.

Nos experimentos de fragmentação as

mesmas condições acima foram utilizadas. Entretanto foram utilizadas para a obtenção dos fragmentos dissociação induzida por colisão (CID, do inglês collision-induced dissociation) obtidas utilizando energia de colisão na faixa de 15-30 eV e pressão do gás de colisão de $4,04 \cdot 10^{-3}$ mBar, na câmara de colisão.

3. Resultados e Discussão

Observando os cromatogramas de íons totais (Figura 1) nota-se uma riqueza de sinais presentes no extrato fúngico que não estão relacionados com componente do meio de cultivo. Deste modo, é possível afirmar que o fungo *Epicoccum sp.* é um excelente produtor de metabólitos, especialmente quando se destaca a faixa de tempo entre 1,5 – 10,0 minutos, região que apresenta a maior quantidade de sinais atribuído ao micro-organismo.

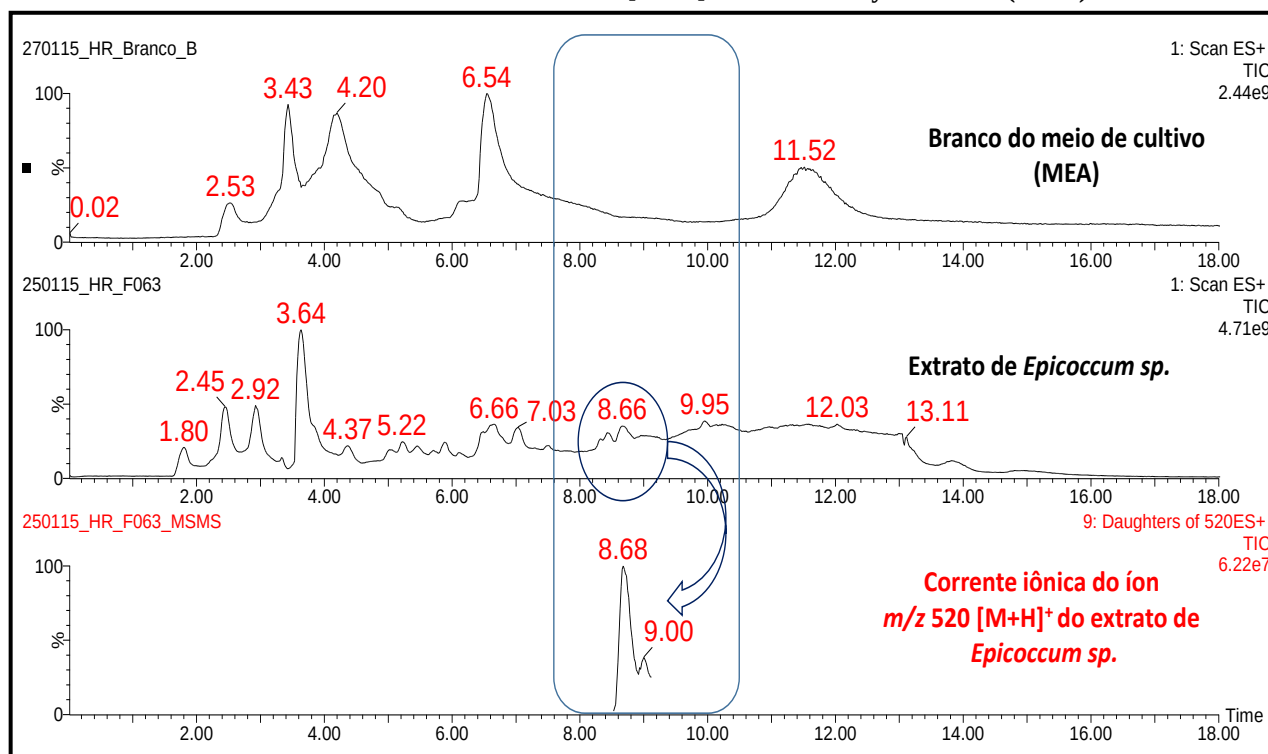
Como a extração metabólica deste estudo utiliza congelamento por 1h e ultrassom para potencializar o efeito extrator do solvente, era esperado que componentes da parede celular fúngica fossem extraídos também, além de

metabólitos intra e extracelular (HAJJAJ, 1998).

É importante destacar a etapa de extração metabólica como uma das mais significativas no processo de avaliação de um perfil metabólico de qualquer organismo, pois caso a amostragem não fosse eficiente a obtenção do perfil metabólico seria incompleta e ineficiente, não valorizando a diversidade química do organismo. Como é sabido, as extrações com ultrassom são extremamente eficientes no processo de extração de componentes químicos de micro-organismos por fragilizar as estruturas celulares, e neste caso dado à riqueza de sinais dos cromatogramas é possível afirmar que o processo de extração foi eficiente para a obtenção de metabólitos da cepa de *Epicoccum sp.* (CHEMAT, 2017).

Da avaliação geral do perfil metabólico de *Epicoccum sp.* observou-se a presença da corrente iônica do íon m/z 520 $[M+H]^+$ sugestível para o fosfolipídio lisofosfatidilcolina 18:2, proveniente da parede celular fúngica fragilizada ao longo do processo de extração (RIEKHOF, 2014).

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



Fonte: o autor.

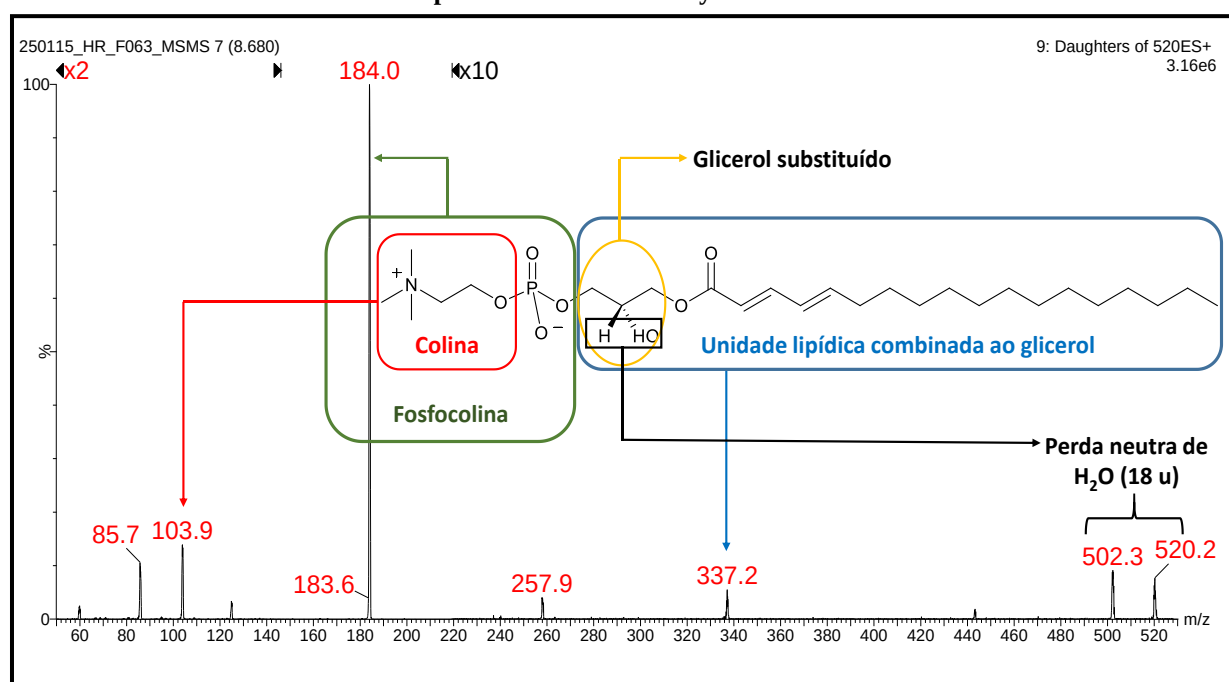
Analizando o espectro de fragmentação do íon m/z 520 $[M+H]^+$ (Figura 2) do extrato de *Epicoccum sp.* foi observado o íon fragmento de m/z 502 $[M-\text{água}+H]^+$ corresponde a perda neutra de uma molécula de água na estrutura, além disso o íon de m/z 104 $[M-\text{fosfolipídio}+H]^+$ referente a colina, um sinal em m/z 184 $[M-\text{glicerolipídica}+H]^+$ referente ao grupamento da fosfocolina e ainda observou-se o sinal m/z 337 $[M-\text{fosfocolina}+H]^+$ referente à unidade glicerolipídica.

Através da análise do perfil de fragmentação e comparação do espectro de fragmentação com bancos de dados específicos

para espectrometria de massas (LipidMAPS, ID: LMGP01070010), foi possível identificar o íon como sendo o lipídio de membrana conhecido como lisofosfatidilcolina 18:2 (LysoPC 18:2) (RIEKHOF, 2014).

Na figura 2 é possível observar que a estrutura da lisofosfatidilcolina 18:2 é composta por uma unidade lipídica, seguida de um grupamento glicerol, dando origem a um éster. Nesta mesma estrutura observa-se a presença de uma unidade de fosfato ligada ao grupamento éster e uma unidade de colina formando assim a LysoPC 18:2.

Figura 2 - Espectro de fragmentação EM/EM do íon m/z 520 $[M+H]^+$ atribuído à LysoPC 18:2 (9 min) do extrato fúngico de *Epicoccum sp.* O íon m/z 520 $[M+H]^+$ foi fragmentado (25 eV) e os fragmentos gerado apresentados no espectro de EM/EM da LysoPC 18:2.



Fonte: o autor.

4. Conclusão

Com o auxílio da espectrometria de massas foi possível avaliar o perfil químico do fungo *Epicoccum sp.* e demonstrar que este micro-organismo é um excelente produtor de metabólitos secundários. Além disso, com a técnica de CLAE-EM foi possível identificar um fosfolipídio no extrato fúngico proveniente da parede celular fúngica, a lisofosfatidilcolina 18:2, que foi confirmada pela comparação de espectro de fragmentação com bancos de dados

específico e a literatura.

5. Agradecimentos

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

6. Referências

BENTON, H. Paul; WANT, Elizabeth J.; EBBELS, Timothy MD. Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics data. *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2488-2489, 2010.

- BOUSLIMANI, Amina et al. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.
- CHAPLA, Vanessa M.; BIASETTO, Carolina R.; ARAUJO, Angela R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de química**, p. 421-437, 2013.
- 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.
- ERNST, Madeleine et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 784-806, 2014.
- 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. 195-200, 1998.
- LU, Wenyun; BENNETT, Bryson D.; RABINOWITZ, Joshua D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 236-242, 2008.
- RIEKHOF, W. R. et al. Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 6, p. 749-57, 2014
- SILVA, C. P. **Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias**. Tese (Doutorado em química) – Unicamp. Campinas, 2012.
- ŞENYUVA, Hamide Z.; GILBERT, John; ÖZTÜRKOĞLU, Şebnem. Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 97-106, 2008.
- TAN, Ren Xiang; ZOU, Wen Xin. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.