



Análise metabolômica *untargeted* do fungo filamentoso *Aureobasidium sp.* por 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: O perfil químico de um organismo é uma componente importantíssima na caracterização de um indivíduo ou espécie. Neste caso, a avaliação química por meio de técnica modernas e eficiente se faz necessária para que os dados obtidos possam ser o mais representativos possível. Os fungos filamentosos por exemplo, por serem excelentes produtores de metabólitos, necessitam de estudos metabolômicos para que a diversidade química atribuída e eles possa ser melhor compreendida. Assim, avaliações *untargeted* do metaboloma do fungo podem ser medidas eficientes e rápidas para se levantar algumas informações preliminares que auxiliem na caracterização do micro-organismo. Para a avaliação do metaboloma, ou do perfil químico de um micro-organismo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem sido a ferramenta mais utilizada por ser uma técnica reprodutível, sem um preparo de amostra complexo, além de ser uma técnica extremamente sensível. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil metabolômico do fungo *Aureobasidium sp.* com bases nos dados obtidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) utilizando uma abordagem *untargeted*. Com o uso da CLAE-EM foi possível observar que o fungo apresentou uma diversidade de metabólitos, evidenciada pela alta quantidade de sinais nos cromatogramas dos extratos fúngicos quando comparado com o branco, sendo que dentre estes sinais a LysoPC 18:2 foi um dos metabólitos identificados.

fungo filamentoso, *Aureobasidium sp.*.

1. Introdução

Fungos filamentosos são produtores de diversos metabólitos, das mais variadas classes e aplicações. Dentre esta diversidade metabólica estão presentes policetídeos, terpenos, alcaloides, peptídeos, ciclopeptídeos, lipídios, entre outros (KELLER, 2005). Compreender a produção e identificar metabólitos dentro de um organismo vivo ou grupo de indivíduos é parte fundamental do processo de caracterização química de uma espécie fúngica, uma vez que muitos metabólitos apresentam funções específicas, tendo sido utilizados em vários seguimentos como por exemplo indústria de fármacos, cosméticos, corantes alimentícios, biotecnologia e também biologia sistemática (ITO, 2014; NIELSEN, 2015).

O metaboloma de um organismo é caracterizado como o conjunto total de metabólitos presente naquele indivíduo, servindo como uma identidade química/bioquímica do organismo sob fase de estudo. Deste modo é possível diferenciar indivíduos de acordo com perfil químico que cada apresenta (MATHEW, 2013). Neste caso, é necessário técnicas analíticas que auxiliem na identificação do metaboloma ou que estabeleçam um perfil químico para o indivíduo (MIURA, 2012). A análise do metaboloma de um organismo vivo pode ser realizada de duas formas: avaliação metabolômica *targeted* e *untargeted* (NIELSEN, 2015). Neste caso, tem-se que a primeira abordagem avalia todo o metaboloma, porém ao longo da avaliação acaba por voltar a atenção para uma rota metabólica

ou uma substância específica. Na segunda abordagem porém, o que se observa é a valorização de todos os aspectos obtidos ao longo da análise que propiciem a construção de um perfil químico do indivíduo sem que seja necessário uma investigação acerca de uma classe ou substância específica. O estudo *untargeted*, tal como o *targeted*, pode e deve caracterizar substâncias ao longo da investigação, contudo não se restringe a mera identificação de substâncias unicamente (MATHEW, 2013; NIELSEN, 2015; WU, 2016).

Em ambas abordagens, especialmente na *untargeted* a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) tem sido uma das ferramentas mais utilizadas por sua disponibilidade generalizada, adequabilidade e reprodutibilidade para a análise química de amostras biológicas, sendo uma ferramenta importantíssima nas avaliações de metabolomas (WU, 2009).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil metabolômico do fungo *Aureobasidium sp.* com bases nos dados por CLAE-EM utilizando uma abordagem *untargeted*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da linhagem fúngica

Para este estudo foi utilizada uma cepa de uma linhagem fúngica de *Aureobasidium sp.* A cepa foi isolada da pele humana (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – Universidade de Campinas – SP, a nível de gênero) e utilizada na 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 Universidade de Campinas e foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli para estudos do grupo Labiomass-UEM.

2.2. Meio de crescimento do fungo

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 x 15 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 *Aureobasidium sp.* após 10 dias de crescimento foram cortadas em cubos com auxílio de lâmina de bisturi estéril, os quais foram congelados em N_{2(l)} por 1 h, sendo posteriormente submetidos a banho ultrassônico 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. Avaliação dos extratos por CLAE-EM

Para os experimentos de CLAE-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 L h⁻¹; fluxo do gás de dessolvatação 900 Lh⁻¹, para as análises de CLAE-EM.

Para as análises dos metabólitos foram utilizadas as seguintes condições: coluna Waters Symmetry® C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 μm) e gradiente linear de eluição por 18 min utilizando como solventes (A) água e (B) acetonitrila,

ambos acidificados a 1% com ácido fórmico 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.

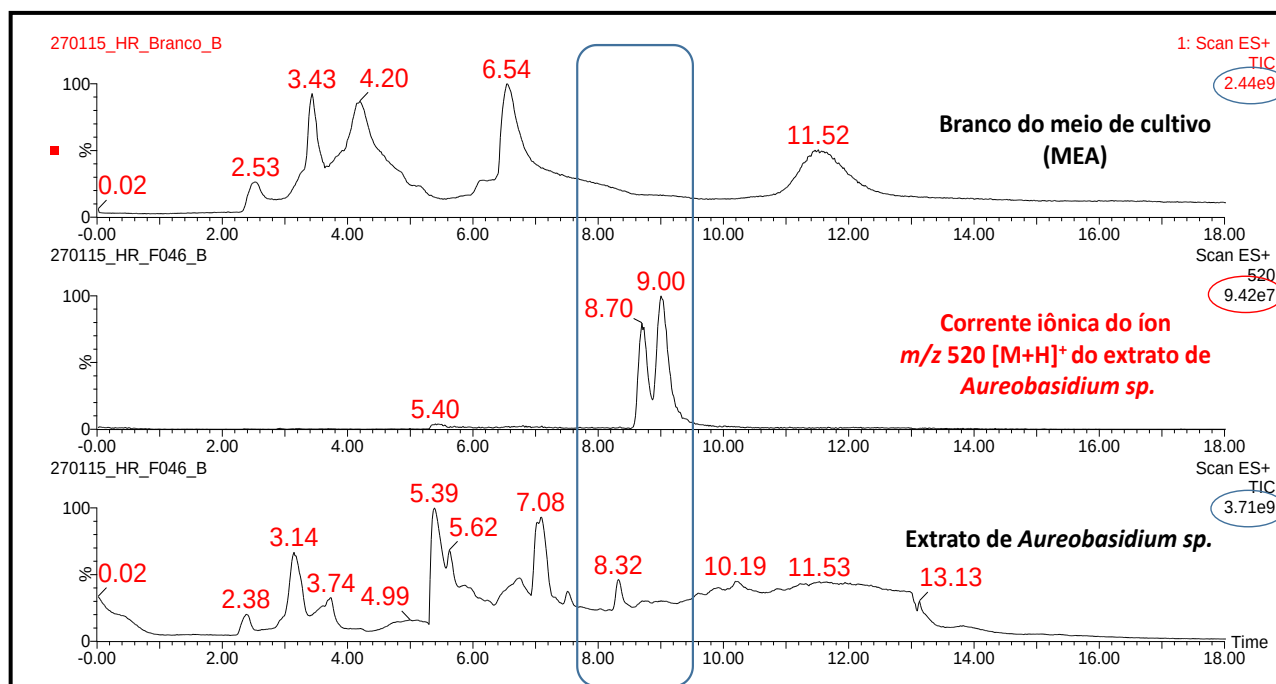
Nos experimentos de CLAE-EM/EM (análise sequencial), as mesmas condições acima foram utilizadas. Entretanto, para os experimentos de varredura de íons-produtos (daughter scan), foram realizadas utilizando dissociação induzida por colisão (CID, do inglês collision-induced dissociation) obtidas utilizando energia de colisão na faixa de 20 - 30 eV e pressão do gás de colisão de 2,93. 10⁻³ mBar, na câmara de colisão.

3. Resultados e Discussão

Os estudos *untargeted*, são estudos de avaliação do perfil metabólico de um indivíduo, valorizando todo o conjunto de metabólitos que fazem parte da composição deste organismo.

Neste caso ao utilizar-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi possível avaliar de modo amplo que o fungo *Aureobasidium sp.* é realmente um produtor de diversos metabólitos, com as mais variadas estruturas e classes químicas, isso se evidencia pela riqueza de sinais, do cromatograma dos extratos fúngicos, com diversos tempos de retenção (Figura 1). É possível, com a ajuda do branco do meio de cultura, observar vários sinais no cromatograma do extrato fúngico que não estão presentes no cromatograma do controle, sugerindo assim que a presença destes sinais é em resposta à produção metabólica do *Aureobasidium sp.* que ao longo de seu crescimento nutriu-se do meio de cultura e produziu substâncias que o auxiliaram ao longo de seu crescimento e manutenção da vida (LU, 2008).

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



Fonte: o autor.

Observou-se ainda, em ambos os cromatogramas de íons totais do fungo e do controle, sinais de mesmo tempo de retenção, sugerindo que componentes do meio de cultura

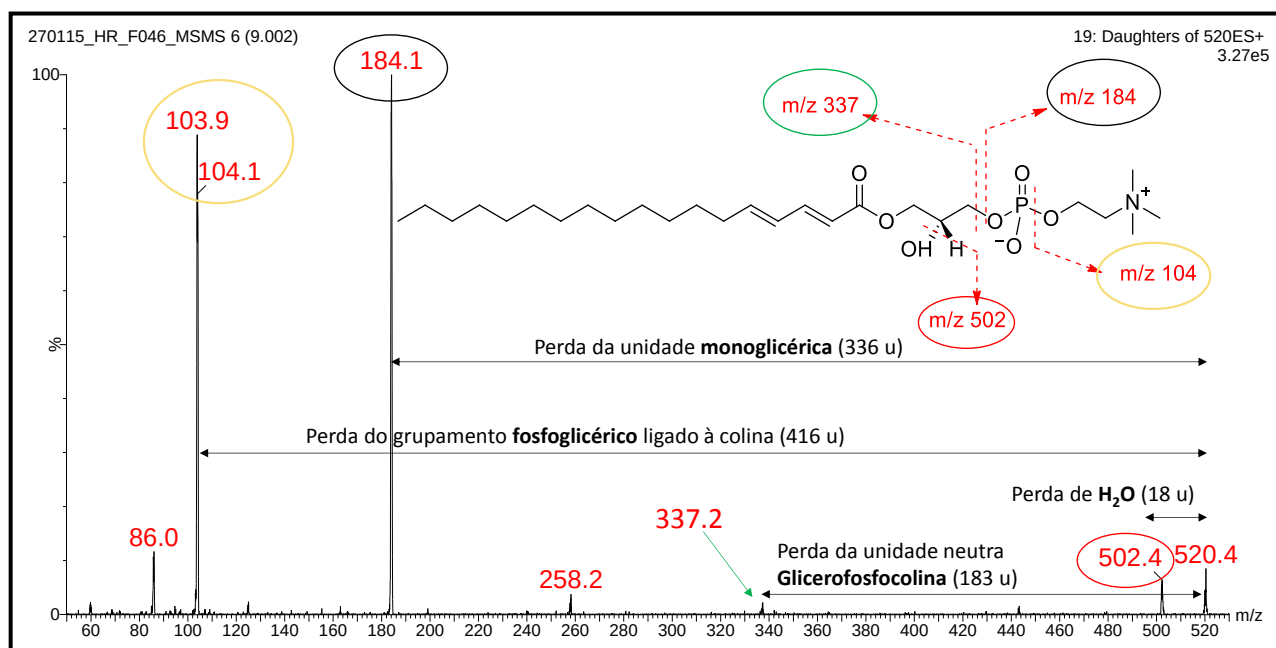
estavam presentes no extrato fúngico. Esta observação é coerente, pois no processo de extração metabólica o fungo não é separado de seu substrato, sendo que a extração metabólica é realizada com o material fúngico junto com o meio de cultivo. Por esta razão a cromatografia se faz tão importante e indispensável nas avaliações *untargeted* pois ajuda a discriminar por comparação dos tempos de retenção quais substâncias são de origem fúngica e quais são provenientes do meio de cultivo. A presença do controle é indispensável, pois nos estudos metabolômicos o controle auxilia na compreensão de como o micro-organismo interage com o meio de cultivo e expressa seus metabólitos durante o crescimento.

Na avaliação dos íons do extrato de *Aureobasidium sp.* foi possível observar um sinal no cromatograma de íons em 9.0 min referente ao pseudo-íon molecular m/z 520 $[M+H]^+$. Por ser um estudo *untargeted* de metabolômica não houve um direcionamento específico para selecionar quais picos seriam analisados, sendo que todos os sinais no cromatograma foram levados em consideração. Contudo, o íon 520 $[M+H]^+$ estava com uma intensidade relativamente alta no cromatograma,

na ordem de 10^7 , sugerindo que esta espécie química além de ionizar facilmente estava presente no extrato apresentando alta disponibilidade e tampouco efeito de supressão iônica, causado pela matriz, ao longo da análise.

Analizando o espectro de fragmentação do íon m/z 520 $[M+H]^+$ (Figura 2) do extrato de *Aureobasidium sp.* foi observado o íon fragmento de m/z 502 $[M-H_2O+H]^+$ corresponde a perda neutra de uma molécula de água (18u) na estrutura, além disso o íon de m/z 104 $[M-C_{21}H_{37}O_6P+H]^+$ atribuído à perda neutra da unidade fosfoglicérica (416 u) ligada à colina, um sinal em m/z 184 $[M-C_{21}H_{36}O_3+H]^+$ referente à perda neutra da unidade de monoglicérica (336u) e ainda observou-se o sinal m/z 337 $[M-C_5H_{14}O_4NP+H]^+$ referente a perda neutra da unidade glicerofosfocolina (183u). 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 do íon como sendo o derivado de colina conhecido como lisofosfatidilcolina 18:2 (LysoPC 18:2) (RIEKHOF, 2014).

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 *Aureobasidium sp.* O íon m/z 520 $[M+H]^+$ foi fragmentado (25 eV) e os fragmentos gerados, assim como as perdas neutras encontram-se apresentadas no espectro de EM/EM da LysoPC 18:2.



Fonte: o autor.

4. Conclusão

O perfil metabolômico é a identidade química de um indivíduo, sendo extremamente importante a tentativa de caracterizá-lo ou observar padrões metabólicos. Do estudo químico e avaliação do perfil cromatográfico, baseado em espectrometria de massas, para os extratos fúngicos de *Aureobasidium sp.* obtidos de cepas com 10 de crescimentos foi possível observar que várias classes de metabólitos foram produzidas pelo fungo. Além disso, a diversidade de sinais dos extratos fúngicos, foram comparadas com o controle do meio de cultura possibilitando que o metabólito LysoPC 18:2, com base em seu espectro de fragmentação, pudesse ser identificado ao longo deste estudo *untargeted*. Finalmente, com o uso da espectrometria de massa foi possível visualizar, de forma mais ampla, através dos cromatogramas de íons totais que o fungo *Aureobasidium sp.* além de excelente produtor de metabólitos produz substâncias detectáveis pela espectrometria de massas.

5. Agradecimentos

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

6. Referências

ITO, Tatsuya; MASUBUCHI, Miyako. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 5, p. 353, 2014.

KELLER, Nancy P.; TURNER, Geoffrey; BENNETT, Joan W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews**

Microbiology, v. 3, n. 12, p. 937, 2005.

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.

MATHEW, A. K.; PADMANABAN, V. C. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 2, p. 45-8, 2013.

MIURA, Daisuke; FUJIMURA, Yoshinori; WARIISHI, Hiroyuki. In situ metabolomic mass spectrometry imaging: recent advances and difficulties. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 16, p. 5052-5060, 2012.

NIELSEN, Kristian F.; LARSEN, Thomas O. The importance of mass spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 71, 2015.

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.

WU, Changsheng; CHOI, Young Hae; VAN WEZEL, Gilles P. Metabolic profiling as a tool for prioritizing antimicrobial compounds. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 299-312, 2016.

WU, Zeming et al. The application of chromatography-mass spectrometry: methods to metabonomics. **Chromatographia**, v. 69, n. 1, p. 23-32, 2009.