



Avaliação da influência do meio de cultura na produção de metabólitos secundários de *Fusarium sp.* por 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 meio de cultivo ao qual um micro-organismo é crescido pode influenciar a expressão metabólica modificando o perfil químico fúngico. Neste artigo pretende-se demonstrar qual a relação do meio de cultivo (ISP2, MEA e Sauboraud) no perfil químico de uma cepa de *Fusarium sp.* utilizando a espectrometria de massas para avaliar o perfil dos extratos fúngicos. Desta avaliação observou-se que o perfil químico é levemente influenciado pelo meio, contudo existem metabólitos que independentemente do meio ao qual o fungo esteja, serão expressado porém com suas quantidades variando. No caso do *Fusarium sp.* quatro substâncias: ácido fusarinólico, ácido fusárico, ácido d-9,10-desidrofusárico e fusarina C, puderam ser identificadas através da espectrometria de massas e mantiveram-se presentes nas cepas de *Fusarium sp.* em todos os meios de crescimento mesmo quando outros metabólitos variaram.

Palavras-chave: *Fusarium sp.*; fungo, perfil químico, CLAE-EM; Espectrometria de Massas.

1. Introdução

Metabólitos secundários são substâncias químicas, produzidas em baixas quantidades por uma espécie, seja ela animal, vegetal, fúngica, entre outros e que desempenham atividades específicas no sistema biológico do qual foi produzido. Em fungos, um perfil de metabólitos secundários consiste em todos os diferentes compostos que um fungo pode produzir em um determinado substrato e inclui toxinas, antibióticos e outros compostos intra e extra

celular (FRISVAD, 2008). Como os fungos são excelentes produtores de metabólitos bioativos, é necessário o desenvolvimento e aplicação de estudos de prospecção metabólica para compreender mais efetivamente a diversidade química destes micro-organismos.

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 (meio de cultivo), fatores genéticos, stress, umidade, pH, além de fatores físicos, como luz e calor. Assim estudos de prospecção podem encontrar respostas diferentes dependendo das condições às quais o micro-organismo foi submetido, porém pouco se sabe até o presente momento como estas variações são respondidas pelo fungo, em especial o meio de cultivo. (FRISVAD, 2008; SHWAB, 2008; LAMEIRAS, 2015).

Por esta razão é importante avaliar o perfil químico de um fungo, neste caso *Fusarium sp.*, na tentativa de estabelecer algumas características químicas que o fungo possa apresentar ao longo do crescimento em diversos substratos, bem como qual a relação direta em metabólitos fúngicos expressos em meios de cultura diferentes sob as mesmas condições de crescimento e extração metabólica.

Uma das ferramentas mais úteis, sensíveis e confiáveis atualmente utilizada em estudos de prospecção metabólica é a espectrometria de massas (BHARDWAJ, 2014). Esta técnica consegue identificar substâncias em

amostras complexas por analisar e determinar a razão massa/carga (m/z) de cada dos compostos ionizados presentes em uma amostra, com isso sendo possível identifica-los. Deste modo, por ser uma técnica segura, rápida, reprodutiva e precisa na identificação de analitos, é possível estabelecer perfis químicos/metabólicos para amostras complexas (BOUSLIMANI, 2014).

Assim, pretende-se demonstrar qual a relação do meio de cultivo (ISP2, MEA e Sabouraud) no perfil químico de uma cepa de *Fusarium sp.* utilizando a espectrometria de massas para avaliar o perfil dos extratos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da linhagem fúngica

Para este estudo foi utilizada uma cepa de uma linhagem fúngica de *Fusarium sp.* A cepa foi isolada e identificada à nível de gênero (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. Meios de crescimento de *Fusarium sp.*

O meio de cultura foi formulado seguindo recomendações da coleção de micro-organismos Norte americana (ATCC, American Type Culture Collection). Três meios de cultivo foram testados: Extrato de malte ágar (MEA), Sabouraud dextrose ágar (SAB) e Extrato de levedura/malte ágar (ISP2). Para o preparo do meio MEA foi utilizado peptona (1 gL^{-1}), glicose (20 gL^{-1}) extrato de malte (20 gL^{-1}), e ágar (12 gL^{-1}) em água deionizada. Para o preparo do ISP2 foi utilizado extrato de levedura (4 gL^{-1}), extrato de malte (10 gL^{-1}), dextrose (4 gL^{-1}) e ágar (13 gL^{-1}). O meio SAB foi utilizado da marca Kasvi, seguindo o procedimento do rótulo para preparar. Os meios de cultivo foram autoclavados por 15 minutos à

121°C e vertidos em placas de petri ($150 \times 15 \text{ mm}$). Após isso os fungos foram crescidos nos três meios de cultivo por 10 dias à 28°C .

2.3. Extração metabólica do fungo

As colônias de *Fusarium 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 com 50 mL de MeOH grau HPLC por 60 min e agitados em frasco tipo Schott por 24 h na ausência de luz. Os extratos (SAB, MEA e ISP2) após serem filtrados foram pré-concentrados 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) metanol, 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	0,4	98	2
5,00	0,4	50	50
5,01	0,4	50	50
10,00	0,4	30	70
11,00	0,4	2	98
13,00	0,4	2	98
15,00	0,4	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 (+); 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 Lh⁻¹, temperatura da fonte 150°C, para as análises de CLAE-EM.

2.4. Escolha dos marcadores de *Fusarium sp.*

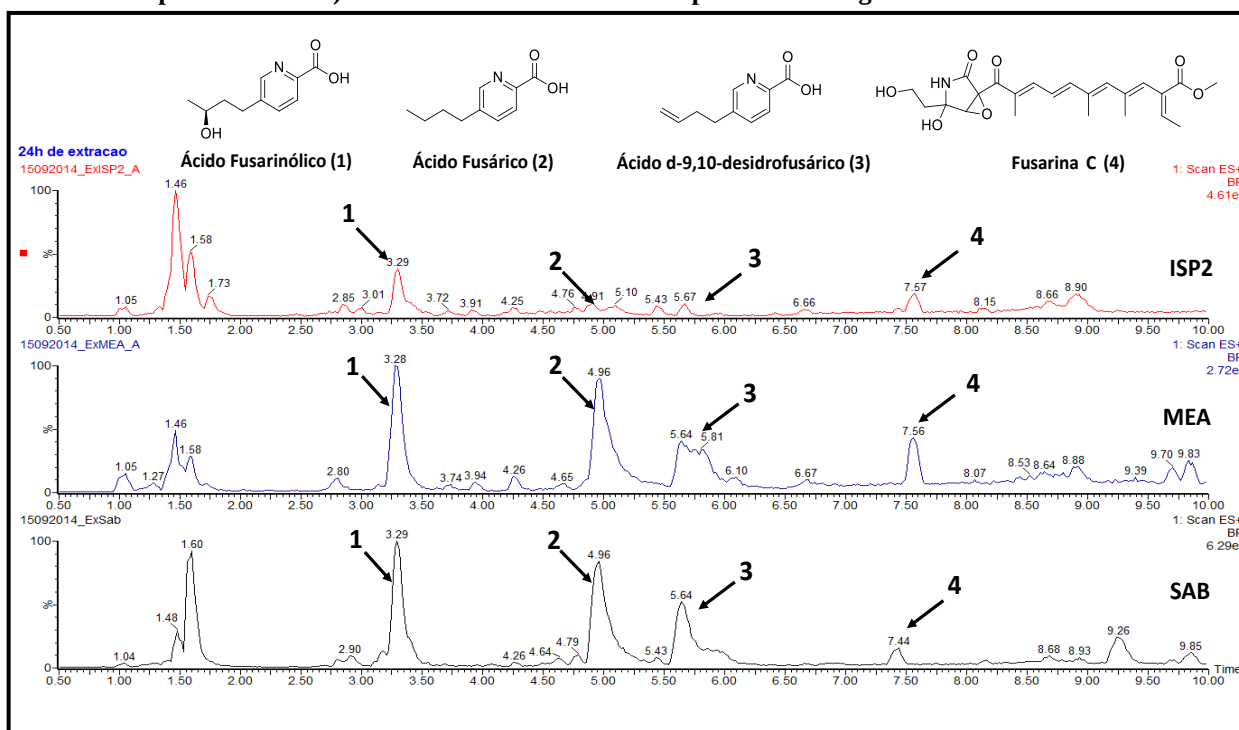
De acordo com a literatura o gênero *Fusarium* apresenta alguns marcadores quimiotaxonômicos. A seleção destes marcadores auxilia na identificação/confirmação do gênero ao qual o fungo pertença. Neste caso, os marcadores ionizados em modo positivo ([M+H]⁺) foram: *m/z* 178 (ácido d-9,10-desidrofusárico), *m/z* 180 (ácido fusárico), *m/z* 196 (ácido fusarinólico) e *m/z* 432 (fusarina C).

3. Resultados e Discussão

A produção de metabólitos do fungo

Fusarium sp. como pode-se observar nos cromatogramas de íons totais (figura 1) para os três meios em que o fungo foi cultivado é relativamente alta. Vários sinais de alta e baixa intensidade são observados, devido à diversidade química que os fungos apresentam (KELLER, 2005; NIELSEN, 2015). Contudo, é possível observar a presença de vários sinais semelhantes entre os cromatogramas, sugerindo que existem semelhanças no perfil químico dos três extratos fúngicos. Neste caso, o fungo *Fusarium sp.* cresceu em substratos diferentes, o que poderia causar uma modificação no perfil metabólico do fungo, uma vez que cada meio apresenta características química diferentes. No entanto, alguns metabólitos expressados pelo fungo são produzidos independentemente do meio ao qual o micro-organismo se desenvolveu.

Figura 1 - Cromatograma de íons dos três extratos fúngicos de *Fusarium sp.* cultivado em ISP2, MEA e SAB. Os sinais cromatográficos marcados com números (pico 1 = *m/z* 196, pico 2 = *m/z* 180, o pico 3 = *m/z* 178 e o pico 4 = *m/z* 432) mostram as similaridades dos perfis cromatográficos dos três extratos.



Fonte: o autor.

Estes metabólitos expressos ao longo da vida do fungo, e que não variam com o meio de cultivo, são úteis no estabelecimento da identidade do micro-organismo (FRISVAD,

2008). Neste caso, é possível afirmar que amostras de extratos fúngicos que apresentarem o mesmo perfil químico baseado nos cromatogramas apresentados neste estudo, serão

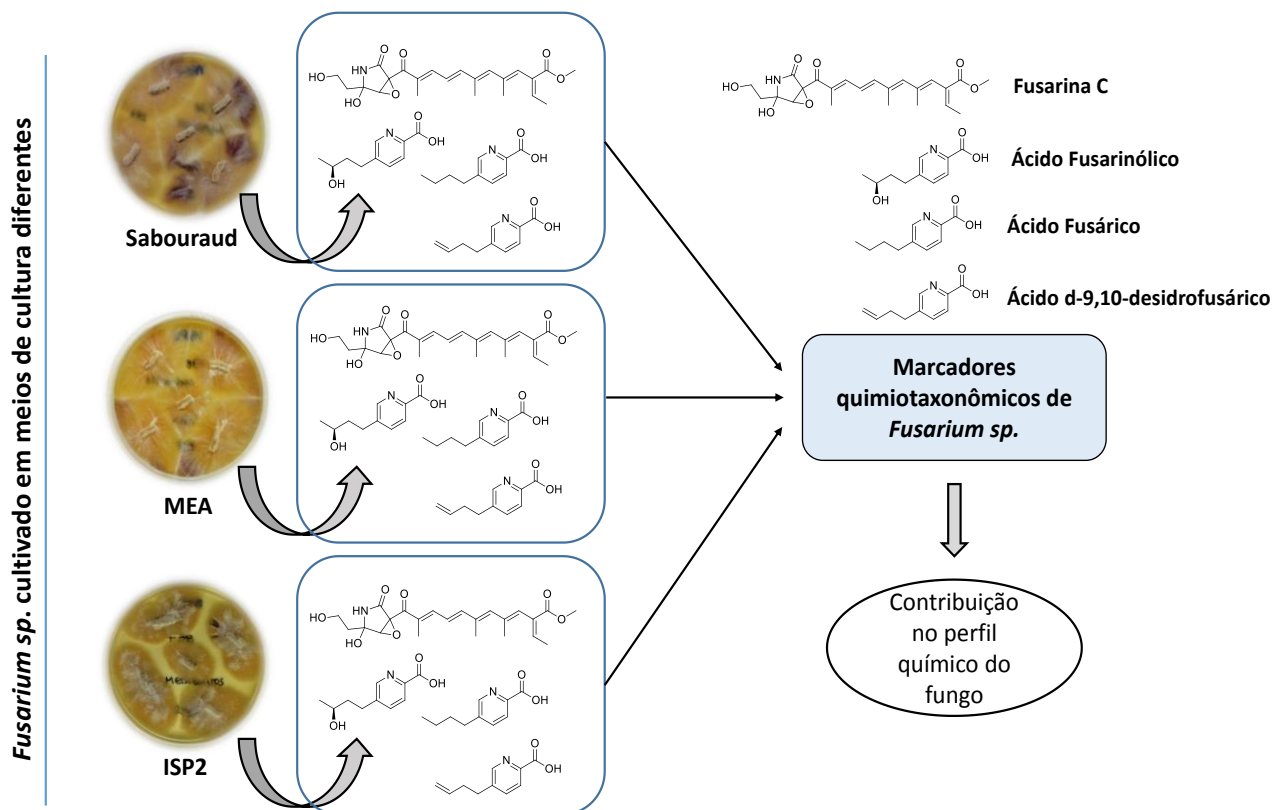
possivelmente atribuídas a um fungo do gênero *Fusarium*. As características destes perfis químicos, que se repetem para um fungo independentemente do meio cultivado, podem ser melhor compreendidas quando identificamos cada pico do cromatograma. Os picos similares em todos os espectros obtidos em ISP2, MEA e SAB foram analisados e comparados, levando em conta intensidade e tempo de retenção. É importante ressaltar que o primeiro sinal mais intenso foi atribuído a uma substância que não foi possível identifica-la, contudo mesmo sem sua identidade química, sabe-se que sua produção está presente em exemplares de *Fusarium*, e que este sinal cromatográfico auxilia no estabelecimento de um padrão cromatográfico para o gênero *Fusarium*. Assim, para os picos de 1-4, observados na figura 1, seus valores de razão massa/carga (m/z) foram determinados como: pico 1 sendo o íon m/z 196, pico 2 sendo m/z 180, o pico 3 como o m/z 178 e por fim o pico 4 sendo m/z 432. Com os valores

de m/z de cada pico cromatográficos e comparação com a literatura, foi possível identificar os sinais como sendo respectivamente: ácido fusarinólico, ácido fusárico, ácido d-9,10-desidrofusárico e fusarina C (AMALFITANO, 2002).

Estas quatro substâncias observadas em todos os três extratos de *Fusarium sp.* são importantes metabólitos que auxiliam no estabelecimento de um perfil químico para o gênero fúngico, pois tais metabólitos são exclusivamente produzidos apenas por fungos do gênero *Fusarium sp.* (AMALFITANO, 2002).

Esta especificidade é extremamente importante pois amostras que apresentem os íons referentes aos metabólitos: ácido fusarinólico, ácido fusárico, ácido d-9,10-desidrofusárico e fusarina, poderão ser identificadas como amostras provenientes de um fungo também do gênero *Fusarium* (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática dos metabólitos produzidos por *Fusarium sp.* em ISP2, MEA e SAB e a contribuição taxonômica destes marcadores químicos para o gênero fúngico.



Fonte: o autor.

Além do mais, uma vez que os sinais apresentados nos cromatogramas estão associados à metabólitos restritos ao gênero fúngico, pode-se utilizar a cromatografia para demonstrar que os marcadores quimiotaxonômicos de um micro-organismo são produzidos sem sofrer influências diretas do meio de cultivo ao qual o indivíduo foi submetido (ZAIN, 2010). As únicas influências observadas nos cromatogramas, estão relacionadas à quantidade de substância que foi produzida em cada meio, sendo que quanto menos intenso o sinal, menor será a quantidade de substância presente na amostra.

Na figura 2, é possível observar que o perfil visual dos crescimentos fúngicos mudam com o meio de cultura, porém quimicamente falando não existe mudanças significativas quanto à expressão metabólica dos 4 principais marcadores químicos de *Fusarium sp.*. Contudo, esta mudança fisiológica está atrelada à outras substâncias que o meio de cultura influenciou na produção, contudo estão em quantidade muito menores que os marcadores químicos.

4. Conclusão

O perfil químico de um micro-organismo é uma das formas mais eficientes de se avaliar como o indivíduo responde à fatores externos durante seu período de crescimento. Da avaliação do perfil químico de *Fusarium sp.* crescido em ISP2, MEA e Sabouraud, poucas mudanças no perfil cromatográfico foram observadas para os sinais mais intenso. Além disso pode-se identificar de acordo com os valores de m/z 4 metabólitos conhecidos por serem marcadores químicos de *Fusarium sp.*, sendo eles: ácido fusarinólico, ácido fusárico, ácido d-9,10-desidrofusárico e fusarina C. Com o auxílio dos cromatogramas de íons totais, para os três extratos de *Fusarium sp.*, observou-se mudanças muito sutis no perfil químico do fungo, demonstrando que independentemente do meio ao qual o fungo é cultivado, os marcadores químicos serão sempre produzidos mesmo que em baixas quantidades.

5. Agradecimentos

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

6. Referências

- AMALFITANO, Carmine et al. HPLC analysis of fusaric acid, 9, 10-dehydrofusaric acid and their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 13, n. 5, p. 277-282, 2002.
- BHARDWAJ, Chhavi; HANLEY, Luke. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 756-767, 2014.
- 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.
- 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.
- 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.
- LAMEIRAS, Francisca; HEIJNEN, Joseph J.; VAN GULIK, Walter M. Development of tools for quantitative intracellular metabolomics of *Aspergillus niger* chemostat cultures. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1253-1264, 2015.
- 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.
- 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.
- ZAIN, M. E. et al. Biochemical markers in Taxonomy of the genus *Fusarium*. **Res J Agric Biol Sci**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2010.