

## ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PROUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA PELE HUMANA.

Carolina F. Parceró (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Evandro Silva, João R. B. de Souza, Carla Porto, José E. Gonçalves, Regina Aparecida Correia Gonçalves, Eduardo Jorge Pilau (Orientador), e-mail: carolinaparcerohernandes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Química/ Maringá, PR.

### Ciências Exatas e da Terra / Química

**Palavras-chave:** microextração em fase sólida, metabólitos voláteis, fungos da pele

### Resumo:

Os metabólitos voláteis representam uma parcela significativa no estudo da metabolômica de fungos, desempenhando funções importantes no desenvolvimento, defesa, proteção contra estresse, comunicação e patogenicidade do mesmo. Assim, muitos trabalhos na literatura, relatam a ação destes metabólitos como marcadores biológicos ou mesmo como compostos antagônicos a outras espécies de fungos. Deste modo, neste estudo utilizamos a técnica de microextração em fase sólida para extração, separação e caracterização de metabólitos voláteis de um fungo filamentoso da pele via Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas. Possibilitando a identificação de uma ampla variedade de compostos orgânicos, tais como, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, monoterpenos e sesquiterpenos.

### Introdução

O estudo de metabólitos, também conhecido por metabolômica, tem por objetivo uma análise quantitativa e abrangente de matrizes de amostras biológicas, concentrando-se principalmente no estudo de perfis dos metabólitos presentes (SMART et al, 2010). Estas espécies podem possuir diferentes propriedades físico-químicas e ocorrer em diferentes concentrações na matriz, fazendo-se necessário o uso de técnicas analíticas sofisticadas, como a espectrometria de massas e ainda ferramentas de análise de dados, bibliotecas de metabólitos e bancos de dados (DETTMER et al, 2007). Dentre essa gama de substâncias, os metabólitos voláteis representam uma parcela significativa no estudo da metabolômica de fungos, desempenhando funções importantes no desenvolvimento, defesa, proteção contra estresse, comunicação e patogenicidade. Desta forma, a separação e identificação dos metabólitos é importante para definí-los com

biomarcadores, proporcionando a utilização dos mesmos como dados de impressão digital de diferentes fungos.

O uso da técnica de microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Microextraction) para extração de metabólitos voláteis de fungos tem sido utilizada em diversos trabalhos (NAZNIN et al, 2013), devido a sua capacidade de extrair eficientemente metabólitos voláteis presentes em baixa concentração e também por limitar os interferentes, mesmo em meio à matrizes complexas e dinâmicas.

## **Materiais e métodos**

### *Cultivo e extração da cultura de fungos*

O fungo selecionado para análise foi o fungo *Massarina* sp., para o crescimento foi utilizado o meio de cultura ágar extrato de malte (MEA, do inglês malt extract agar), com temperatura de incubação de 28°C, o crescimento dos fungos ocorreu em vials de 20 mL lacrados e contendo 4 mL de meio de cultura, possibilitando uma análise dos voláteis em *headspace*, as amostras foram retiradas para análise após sete dias de incubação, onde foram submetidas à extração de seus metabólitos voláteis utilizando a técnica de SPME à 25°C e com tempo de extração de 2 horas. A fibra utilizada foi uma Divinilbenzeno/Carboxen/PolidimetilSiloxano DVB/CARB/PDMS.

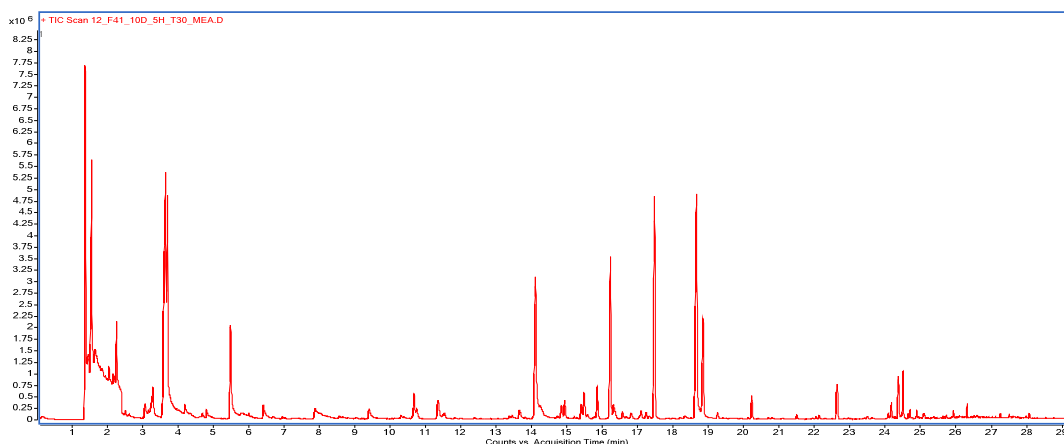
### *Análise por Cromatografia a Gás acoplado a Espectrometria de Massas*

As amostras de metabólitos voláteis extraídos pela fibra de SPME foram analisadas em um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas da marca Agilent Technologies, modelo 5977A, operando com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% de difenil, 95% dimetilpolisiloxano) e utilizando hélio como gás de arraste. A elucidação dos espectros foi realizada com a ajuda das bibliotecas Wiley 7.0 e Adams contidas no software do equipamento, e com bibliotecas disponíveis na literatura.

## **Resultados e Discussão**

Com o método de SPME, foi possível perceber uma grande diversidade metabólica para o gênero de fungo testado. Na Figura 1, temos o cromatograma da extração de metabólitos voláteis para o gênero *Massarina* sp. em meio de cultura MEA, no qual a fibra foi exposta por duas horas à uma temperatura de 30°C. Com a elucidação dos espectros de massas obtidos foi possível identificar metabólitos das classes de compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, monoterpenos e sesquiterpenos, conforme Tabela 1, o que nos permitiu uma projeção positiva para a utilização deste método na extração dos metabólitos voláteis de outros fungos provenientes da pele humana. Os compostos foram identificados utilizando a biblioteca contida no software do

equipamento e por meio da comparação dos espectros obtidos com dados da literatura.



**Figura 1** – Cromatograma da Extração de Metabólitos voláteis com fibra exposta por duas horas do gênero *Massarina* em MEA.

A presença de alcoóis metabolizados pelo fungo *Massarina* sp. está associada ao mecanismo de defesa do fungo empregando suas atividades antimicrobianas, como no caso do 2-metil-1-butanol e 3-metil-butanol que foram capazes de inibir completamente o crescimento de fungos patógenos segundo trabalhos já publicados (FIEDLER et al, 2001). Os mono- e sesquiterpenos identificados já foram relatados na literatura como metabólitos liberados por outras classes de fungos (MORATH et al, 2012). Vale salientar a importância destes compostos na indústria química e farmacêutica bem como na participação de rotas biossintéticas, como precursores de compostos de extrema importância como vitaminas e esteróides (Tabela 1).

**Tabela 1** Metabólitos voláteis do fungo *Massarina* sp. identificados por EM

Tempo de Retenção	Composto	Fórmula Molecular
2.273	2-metil-1-propanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O
2.529	3-metil-butanol	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O
2.627	2-metil-butanol	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O
2.752	Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
3.669	2-metil-1-butanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O
6.963	Etanoato de isopentila	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
18.648	Teresantalol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
22.637	β-Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
24.89	β-sesquifelandreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
26.469	α-Bisabolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
28.093	geranil-α-terpineno	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>

## Conclusões

Com os resultados obtidos é possível concluir que a técnica de SPME empregada neste estudo é uma ferramenta poderosa para a identificação de metabolitos voláteis de fungos da pele. Grande parte dos metabólitos encontrados já foram relatados como voláteis provenientes de fungos, contudo não há nenhum trabalho para o *Massarina* sp., sendo identificados alguns compostos ainda não relatados. O estudo aprofundado de metabólitos de fungos possui extrema relevância, pois facilita o entendimento das rotas metabólicas desses micro-organismos, aumentando o conhecimento sobre as espécies fúngicas, bem como os papéis que desempenham em sistemas biológicos como a pele e em doenças.

## Agradecimentos

UEM/DQI, UEM/DFA, UNICESUMAR, PIBIC/CNPq.

## Referências

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry**, v. 26, n. 2, p. 51-78, 2007.

FIEDLER, K.; SCHTZ, E.; GEH, S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produce by moulds on various materials. **Journal of Hygiene Environmental Health**, v. 204, p. 111-121, 2001

SMART, K. F.; AGGIO, R. M.; HOUTTE, J. R. V.; Villas-Bôas, S. G. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709-1729, 2010.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.

NAZNIN, H. A.; KIMURA, M.; MIYAZAWA, M.; HYAKUMACHI, M. Analysis of Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungus *Phoma* sp. GS8-3 for Growth Promotion Effects on Tobacco. **Microbes and Environments**, v.28, n. 1, p. 42-43, 2013.