

Estudo da comunicação química entre fungos utilizando Espectrometria de Massas

Carolina Parcero Hernandes (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Diany Lucy Silveira dos Reis (PG), Fabricio Henrique de Souza(IC), Carla Porto (PQ), Eduardo Jorge Pilau (Orientador), e-mail: ejpilau@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra- Química/ Química / Química Analítica

Palavras-chave: co-cultura, fungos, espectrometria de massas

Resumo: A superfície externa da pele adulta é colonizada por uma diversidade de micro-organismos (MOs) tais como fungos, que produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos e são frequentemente encontrados na natureza em comunidades. A co-cultura microbiana é uma estratégia poderosa que tem se destacado na busca por novos metabólitos bioativos. Técnicas instrumentais, como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) podem ser amplamente úteis na busca por metabólitos bioativos, uma vez que os fragmentos gerados são características definitivas de uma molécula. Desta forma a utilização da UHPLC-MS/MS possibilitou a detecção e identificação de compostos tais como lisofosfolípeos, fitoesfingosina e NAD provenientes dos experimentos de mono e co-cultura.

Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo sua superfície externa colonizada por vários MOs (PRICE, 1938), no qual, os fungos, produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos que são valiosos para a agricultura, pesquisa biológica e descoberta de medicamentos, apresentando enorme potencial para a biossíntese de compostos com alta diversidade química (NEWMAN et al). No entanto, muitos destes caminhos biossintéticos são inativos em mono-cultura produzidas em laboratório, assim, estratégias para ativá-los são necessários a fim de explorar a diversidade química completa de tais MOs. Na natureza, os MOs são encontrados em forma de comunidades microbianas mistas, a prática de co-cultivo microbiano é uma poderosa estratégia que tem se destacado na busca por novos metabólitos bioativos, pois simula um ambiente natural causando o estresse biótico induzido através da interação artificial por cultura de dois ou mais MOs num espaço confinado (DE ROY et al). Análises por UHPLC-MS/MS podem ser amplamente explorados na busca por metabólitos bioativos, uma vez que, os fragmentos gerados são características definitivas de uma molécula, o que permite uma identificação inequívoca dos metabólitos.

Materiais e métodos

Neste trabalho foram utilizadas cepas de leveduras do gênero *Candida albicans* e *Malassezia furfur* e do fungo filamentoso *Phoma* sp. As cepas isoladas das leveduras foram cultivadas em meio ISP2 e foram suspensas num tubo contendo solução salina e padronizada de acordo com a escala de Mc Farland. Nos ensaios de co-cultivo, o fungo *Phoma* sp. foi cultivado em mono e co-cultura junto com *Candida albicans* ou *Malassezia furfur*, em 3 meios de cultura diferentes, sendo eles: Extrato de Malte Agar (MEA), Agar Sabouraud (SAB) e Extrato de Malte e Levedura (ISP2). Os fungos foram incubados a 28°C por 7 e 15 dias, posteriormente foram submetidos à extração em microescala. Tanto os fungos cultivados isoladamente (monoculturas) quanto as co-culturas foram submetidas a processos de extração na qual três fragmentos de 5 mm foram cortados da região de interação e transferido para um tubo de 2 mL com 1 mL de MeOH. Esta mistura foi sonicada durante 15 minutos, agitada por 10 minutos, centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante coletado para análise por UHPLC-MS/MS.

Resultados e Discussão

Na primeira etapa do trabalho foram realizados ensaios de mono e co-cultivo, dos fungos selecionados. Essas análises consistiram no monitoramento constante de alterações fenotípicas das colônias, como mudança de cor, formato, formação de halo em interações competitivas. Na Figura 1 foi possível observar que houve mudança morfológica significativa do *Phoma* sp. frente aos diferentes meios de cultura estudados.



Figura 1- Interações entre fungo filamentoso *Phoma* sp em frente a levedura *Candida albicans* em 3 meios de cultura diferentes sendo primeiro MEA o segundo SAB e o terceiro ISP2.

Na etapa seguinte do trabalho foi realizado a identificação dos compostos produzidos na co-cultura através da análise dos espectros de fragmentação obtidos da extração com MeOH, com a comparação dos espectros com espectros de bancos de dados e da literatura. Foi possível a identificação de metabólitos como a lisofosfolípídeo de massa $[M+H]^+$ m/z 454.2917 com erro de -2.4 ppm (Figura 2).

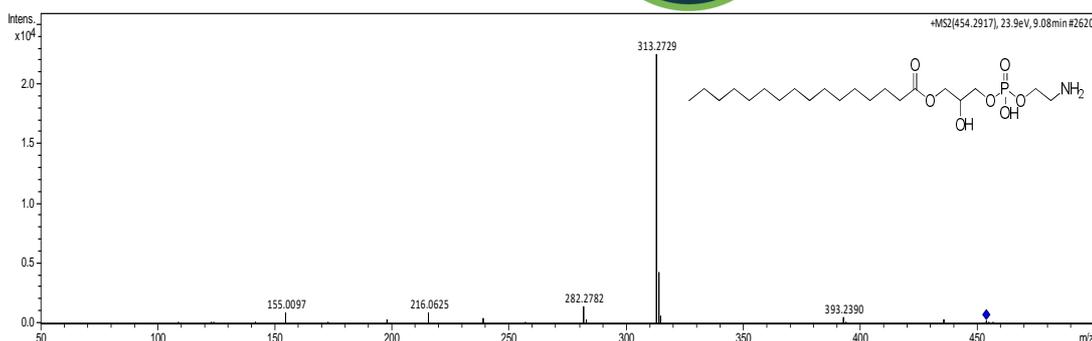


Figura 2- Espectro de MS/MS do metabólito lisofosfolípido obtido em mono e co-cultura da *Malassezia furfur* com fungo *Phoma* sp.

O lisofosfolípido trata-se de um monoglicerofosfolípido em que uma porção fosforilcolina ocupa um local de substituição de glicerol. As lisofosfatidilcolinas podem ter diferentes combinações de ácidos graxos de diferentes comprimentos e saturação, fixados na posição C-1 (sn-1). Ácidos graxos associados encontrados na literatura foram ácidos palmítico e ácido tetradecanóico, os lisofosfolípideos têm um papel na sinalização lipídica, agindo nos receptores de lisofosfolípideos.

Outro composto identificado foi a nirantina (Figura 3) com $[M+H]^+$ m/z 415.2115 com erro de 3 ppm, da família das ligninas. Esse composto tem efeito inibidor de edema, migração celular e/ou a produção de IL-1 e se destaca como potencial efeito citostático e citocida e por ser responsável por ações anti-inflamatórias.

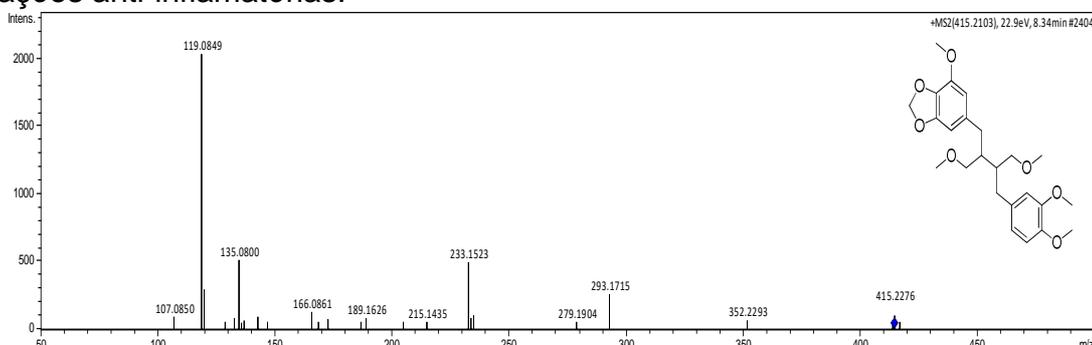


Figura 3- Espectro de MS/MS do metabólito nirantina obtido em mono e co-cultura da *Malassezia furfur* com fungo *Phoma* sp.

Compostos como a fitoesfingosina **1** e NAD **2** (Figura 4) também foram identificados. A fitoesfingosina é um fosfolípido pertencentes a classe dos lipídios, que por sua vez é um dos principais componentes de todas as membranas biológicas. O NAD é uma molécula que tem a capacidade de receber hidrogênio, atuando no metabolismo como um acceptor de hidrogênios, que serão transferidos a outras substâncias em reações que liberam energia.

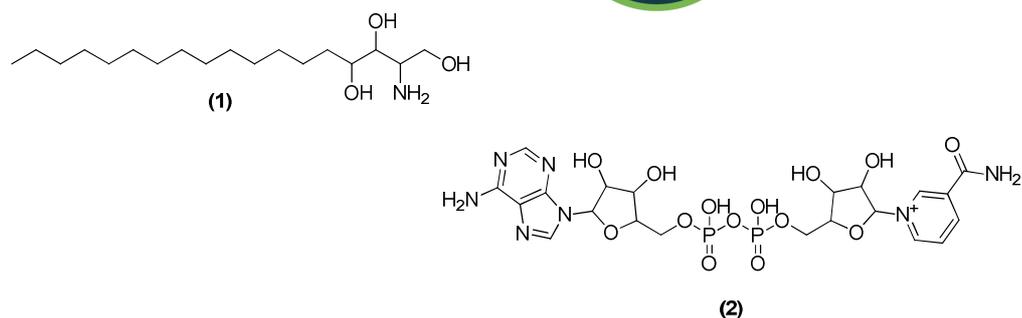


Figura 4- Metabólito fitoesfingosina (1) obtido na co-cultura da *Candida albicans* com o fungo *Phoma* sp.e NAD (2) obtido em co-cultura da *Malassezia furfur* com fungo *Phoma* sp.

Conclusões

Com os experimentos de mono e co-cultura e análises de UHPLC-MS/MS foi possível encontrar e identificar metabólitos previamente relatados sendo provenientes de fungos. Tais como lipídeos de membrana e estruturas de troca energética como NAD. Foi identificado também o composto nirantina ainda não relatado em associação com fungos. O estudo aprofundado de metabólitos de MOs possui extrema relevância, pois facilita o entendimento das rotas metabólicas, aumentando o conhecimento sobre as espécies fúngicas, bem como os papéis que desempenham em sistemas biológicos como na pele e em determinadas doenças.

Agradecimentos

UEM/DQI, UEM/DFA, PIBIC/CNPq e a organização do evento.

Referências

DE ROY, Karen et al. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1472-1481, 2014.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

PRICE, Philip B. The bacteriology of normal skin; a new quantitative test applied to a study of the bacterial flora and the disinfectant action of mechanical cleansing. **The journal of infectious diseases**, v. 63, n. 3, p. 301-318, 1938.