DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR VIA QUÍMICA ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Júlia Martino Caldato (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cláudio Celestino de Oliveira (Orientador), e-mail: ccoliveira@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento 10600000 – Química e 10604006 - Química Analítica

Palavras-chave: cromatografia em papel, análise de alimentos, fungos

Resumo:

É proposto o desenvolvimento de método analítico qualitativo para identificação do fungo *Aspergillus flavus* em amostras de alimentos através da separação e identificação de substâncias químicas produzidas pelo fungo que possam ser utilizadas como marcadores químicos. O fungo quando presente em cereais produz metabólitos tóxicos que podem deteriorar a qualidade dos alimentos e causar prejuízos econômicos e/ou comprometimento da saúde humana. Os métodos tradicionais de identificação do fungo são microbiológicos e, envolvem o cultivo do fungo em meios de cultura e posterior análise visual, microscópica e bioquímica. A maioria destes métodos apresenta baixa especificidade, elevado tempo de análise, mais de 15 dias, e requer pessoas altamente qualificadas. O desenvolvimento de métodos baseados em cromatografia em papel associados a procedimentos de extração podem correlacionar as manchas obtidas com os metabólitos do fungo e inferir sobre a sua presença em alimentos de forma rápida, barata e limpa; podendo ser uma alternativa aos métodos tradicionais com vantagens no custo, eficiência, tempo de análise, sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade. O estabelecimento destes métodos é relevante para a região de Maringá e Brasil; os produtos agroindustriais são fontes de divisas junto ao mercado nacional e internacional e, um rigoroso controle de qualidade destes produtos contribuem para inserção destes produtos no mercado internacional.

Introdução

Dentre os diversos seres classificados como microrganismos existem os fungos, que são considerados seres cosmopolitas, ou seja, vivem em qualquer parte do planeta, na água, solo, outros animais vivos ou mortos, etc. Em ambiente adequado, formam colônias algodonosas. Eles são constituídos basicamente de filamentos microscópicos e ramificados e de hifas. O conjunto de hifas é chamado de micélio que é o responsável pela absorção dos alimentos. Alguns tipos de fungos são bolor, levedura, mofo, penicillium e orelha-de-pau[1] e podem produzir substâncias ou serem utilizados em processos que são benéficos ao seres humanos e animais; porém alguns podem se desenvolver em alimentos

deteriorando-os e produzindo substâncias que podem ser tóxicas. A maioria se nutrem de elementos como C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe e Zn^2 e durante o seu desenvolvimento apresenta a atividade metabólica, que é o conjunto de reações químicas que ocorre no interior das células, sendo essa dividida entre metabolismo primário e secundário. No metabolismo primário, o fungo produz compostos essenciais a sua sobrevivência, e no secundário, produz os compostos que não são essenciais, mas que ajudam na sua sobrevivência, como no mecanismo de defensa contra predadores. Um famoso exemplo de um metabólito secundário é a penicilina, importante antibiótico que revolucionou o século XX, foi um composto extraído do fungo *Penicillium crysogenum*[3]. Normalmente, o cultivo do fungo fora de seu meio natural é feito em meios de cultura.

Na cromatografia em papel a separação está baseada no estabelecimento de equilíbrio líquido-líquido, ou seja, os componentes são separados pela diferença de solubilidade entre as fases. Nesse método usa–se o papel filtro (suporte) e a água presente na celulose do papel é a fase estacionária e utiliza-se um solvente como fase móvel, eluente, que se desloca no papel por capilaridade. Os compostos menos solúveis na fase estacionária se movimentarão mais rápido e os mais solúveis ficarão mais retidos e se movimentarão mais lentamente pelo papel[4]. Além do suporte e do eluente usa-se também o revelador que permite a visualização das substâncias após a separação, pois os compostos, normalmente, não apresentam coloração.

Assim, neste trabalho objetiva-se desenvolver método analítico baseado na cromatografia em papel para identificar o fungo *Aspergillus flavus* em amostras de alimentos através da correlação entre o fungo e a presença de substâncias por ele produzidas nas amostras (metabólitos secundários). O método é baseado, principalmente, no uso de técnicas de separação como a cromatografia em papel e extração em fase líquida e sólida que permitam purificar as amostras antes dos testes qualitativos.

Materiais e métodos

Preparação dos meios de cultura

Potato Dextrose Agar (PDA) – pesou-se 2,1000 g do meio ágar batata dextrose (HIMEDIA) e adicionou-se a um erlenmeyer contendo 50,00 mL de água destilada. Aquecimento em micro-ondas até completa solubilização, sem deixar atingir a fervura. O conteúdo foi, então, tampado com uma esponja e papel, identificado e levado para a autoclave. Czapek Dox Agar (CZP) – foram pesados 2,4505 g de CZP em 50,00 mL de água destilada e foram adotados os mesmos procedimentos quando da preparação PDA. Após a autoclavagem, ambos os meios de cultura foram transferidos para placas de petri esterilizadas para fazer os repiques utilizando uma cultura de uma cepa de referência certificada de *Aspergillus flavus* ATCC (American TypeCultureCollection) de número 9643, fornecida pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá.

Extração dos metabólitos

Com o ambiente descontaminado o fungo contido no PDA e no CZP foram distribuidos em tubos que foram submetidos a extração por diferentes solventes (metanol, etanol e SDS) gerando os extratos de 1 a 12.

Cromatografia em papel

Papéis de filtro foram recortados em forma retangular de 5x10 cm, altura da base de 1,0 cm marcada para aplicação de cada amostra (tubos 1 a 12) com auxílio de um capilar. O papel foi colocado um béquer saturado com metanol e deixou-se correr até atingir 1,0 cm antes da borda superior do papel. O papel foi retirado do béquer após a separação, foi marcada o ponto máximo atingido pela fase móvel e foi borrifado solução reveladora (solução de $KMnO_4$ a 0,1 mol/L) e marcados nos papéis as manchas que podem indicar a presença de metabólitos.

Resultados e Discussão

Experimentos preliminares mostraram que existe a possibilidade de separar compostos produzidos pelo fungo *Aspergillus flavus* utilizando cromatografia em papel. Obviamente, maiores investigações devem ser feitas para otimizar a fase móvel e reveladores para se obter melhores resoluções cromatográficas.
Análise dos dados indicam que ocorreu a separação de três compostos que podem ser metabólitos do fungo *Aspergillus flavus para os tubos 1, 2 e 3,* representados no método por três manchas marrons observadas no papel de filtro após revelação com solução de $KMnO_4$ a 0,1 mol/L por 1 minuto. Estas manchas marrons devem ter sido originadas pela oxidação dos metabólicos orgânicos pela solução de $KMnO_4$. Quando este papel de filtro foi deixado por 24 h no escuro, observou-se que todo o papel ficou marrom, provavelmente porque o oxidante foi capaz de oxidar inclusive o papel e outras substâncias químicas presentes no ar. Este fato é importante porque mostra que, no caso do $KMnO_4$, o tempo de revelação é uma variável importante e que deve ser controlado para evitar sinais falso/positivo. Resultados similares a este primeiro foram observados para os tubos 4, 5 e 6; para os tubos 7, 8 e 9 foram notadas 5 manchas e para os tubos 10, 11 e 12 foram observadas 2 manchas. Para todos foi verificada a completa oxidação do revelador após 24 h.
Experimentos feitos com as mesmas amostras utilizando um branco e variando-se o tempo de revelação (1, 2 e 10 min) mostraram que para o extrato do tubo 1 ocorreu 3 manchas para as revelações após 1 e 2 minutos, enquanto que após 10 minutos foram contadas 10 manchas (figura 1). Estes resultados indicam que o procedimento é reprodutivo, pois para 1 minuto os dados corroboram com os primeiros experimentos realizados. Outro fato importante é que para o tempo de revelação de 10 min, muitos compostos que não estavam sendo oxidados pelo revelador se oxidaram, indicando claramente que 1 e 2 minutos são insuficientes para a oxidação de todos os metabólicos.
Dados cromatográficos para os extratos dos tubos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11,12 mostraram resultados semelhantes aos obtidos anteriormente para revelações de 1 e 2 minutos porém para o as revelações após 10 minutos apresentaram 3, 6, 7, 7, 5, 5, 6, 7, 7, 9 e 6 manchas, respectivamente.

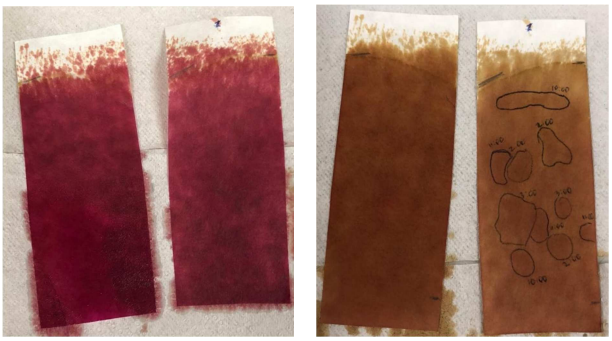

Figura 1. Fotografias da separação dos metabólitos em cromatografia em papel. Extrato do tubo 1, fase móvel de metanol e $KMnO_4$ como revelador; A, B, C e D correspondem ao branco e revelações após 1, 2 e 10 min; respectivamente.

Conclusões

Os resultados indicam que há possibilidade de desenvolver teste para verificar a presença do fungo através da impressão digital de metabólitos utilizando-se cromatografia em papel. Os dados, embora promissores, são bastante incipientes e novos experimentos serão necessários até objetivo seja alcançado. Nosso grupo de pesquisa identificou vários metabólitos secundários deste fungo por UPLC-MS/MS; então o desafio agora é correlacionar as manchas obtidas com a cromatografia em papel com os metabólitos secundários identificados por UPLC-MS/MS, para se obter um método de identificação do fungo que seja simples, rápido, barato e que possa ser realizado *in situ.*

Agradecimentos

Ao PIBIC/CNPq/Fundação Araucária/UEM pela bolsa de IC concedida a JMC.

Referências

[1]DE CARVALHO, I. **Microbiologia Básica**. Recife: EDUFRPE, 2010.
[2]MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. **Micologia: conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro, 2009.
[3]Peres, L.E.P. **Metabolismo Secundário de Plantas.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
[4]TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F; LYRA, F. H.; DA SILVAHUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual Química**, v. 9, p. 2351, 2017.