

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS SIMPLES PARA IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Gabriella Pereira Furio (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Danielle Cristina da Silva Oliveira (Coorientadora), Cláudio Celestino de Oliveira (Orientador), e-mail: ccoliveira@uem.br

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

**Área e subárea - Química e Química Analítica**

**Palavras-chave:** metabólitos secundários, fungos, cromatografia.

### Resumo:

É proposto o desenvolvimento de métodos cromatográficos baseados na cromatografia em papel para identificar a presença de fungos patogênicos em amostras de alimentos. Esta estratégia visa diminuir o tempo de identificação de fungos em amostras de alimentos, pois os métodos microbiológicos, tradicionalmente utilizados para este fim, normalmente, necessitam de 14 dias de inoculação das amostras em meio de cultura para posterior análise microbiológica. Neste trabalho, a estratégia utilizada para reduzir o tempo de análise para horas é separar, identificar e correlacionar as substâncias químicas produzidas pelo fungo (metabólitos secundários) com a presença dele nas amostras. Como sistema modelo foi estudado o fungo *Fusarium oxysporum*, que quando presente em amostras de cereais pode produzir substâncias tóxicas que inviabilizam o comércio e o consumo do alimento, causando prejuízos econômicos e/ou comprometimento da saúde humana. Técnicas analíticas simples como a cromatografia em papel e extração em fase líquida e sólida foram selecionadas para extrair e identificar os metabólitos secundários do fungo em amostras de alimentos de forma rápida, barata e limpa; podendo tais métodos se constituir em alternativas aos métodos tradicionais com vantagens em relação ao custo, tempo de análise, sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e menor uso de reagentes tóxicos. O estabelecimento destes métodos é relevante para a região de Maringá e para o Brasil; onde os produtos agroindustriais são fontes de divisas junto aos mercados nacional e internacional e, o controle de qualidade destes produtos contribuem para aumentar as vendas.

### Introdução

O desenvolvimento de métodos analíticos que possam melhorar a qualidade de vida das pessoas, com enfoque na saúde, alimentação, conservação e preservação do meio ambiente e na geração e distribuição de renda tem tido um destaque internacional. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos que possam ser aplicados na análise de alimentos tem sido uma tendência, como observado em artigos científicos publicados nos principais periódicos internacionais dedicados a Química Analítica [1,2].

A produção agroindustrial ocupa lugar de destaque no Brasil gerando divisas e disponibilidade de alimentos; neste cenário, é de suma importância que esta produção seja acompanhada de um rigoroso controle de qualidade que, garanta a segurança alimentar da população e evite que os produtos brasileiros possam ser alvo de bloqueios alfandegários durante o processo de exportação. O Brasil tem enfrentado problemas na exportação de alimentos devido às falhas no controle de qualidade; desta forma, o estabelecimento de métodos analíticos que sejam rápidos e sigam os preceitos da Química Limpa é altamente relevante para ajudar a garantir que toda esta produção agroindustrial possa ter a qualidade necessária.

Fungos podem contaminar diferentes tipos de amostras através do contato dos esporos presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita, armazenamento, secagem e transporte de alimentos. Assim, a utilização de práticas agrícolas incorretas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos provocadas por insetos e o armazenamento inadequado em locais úmidos e sem ventilação são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos em produtos agroindustriais [3]. A presença de fungos em alimentos pode levar a uma série de alterações dentre as quais se destacam: redução do poder germinativo, descoloração, odores desagradáveis, alterações químicas e nutricionais, queda da qualidade do produto e produção de micotoxinas. Ainda, metabólitos secundários tóxicos podem causar danos aos animais, à saúde humana, recusa do produto no mercado e perdas econômicas gigantescas; inclusive com o descarte total dos lotes contaminados, pois gastos para remover as substâncias tóxicas são inviáveis e podem gerar efeitos perigosos sobre a saúde [4]. Desta maneira, a identificação de fungos presentes em alimentos é essencial para o controle da contaminação gerada por estes microrganismos, bem como da possível produção de micotoxinas para assegurar a qualidade e segurança dos alimentos, reduzindo as perdas econômicas e os riscos à saúde humana e animal [5]. Estes fatos deixam clara a necessidade de se desenvolver métodos para o controle da qualidade de alimentos, sobretudo os de controle microbiológico.

## 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. Aqueceu-se a mistura em forno de 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.

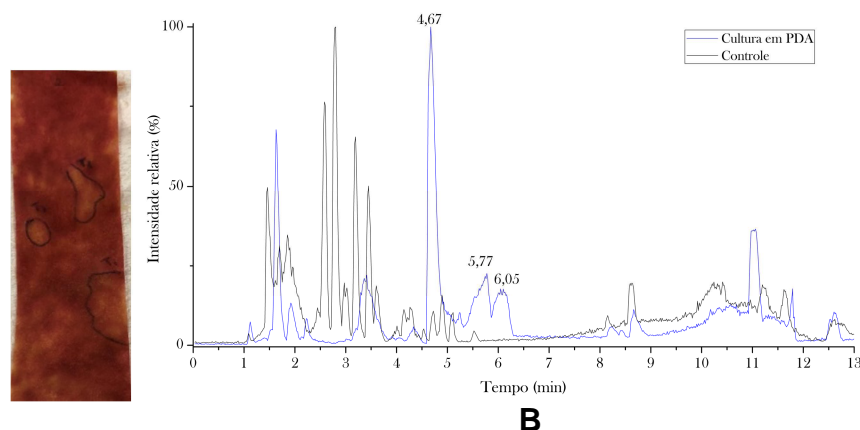
Czapek Dox Agar (CZP) – foram pesados 2,4505 g de CZP em 50,00 mL de água destilada e foram adotados os mesmos procedimentos quando da preparação PDA. Após a autoclavagem, ambos os meios de cultura foram transferidos para placas de petri esterilizadas para fazer os repiques utilizando uma cultura de uma cepa de referência certificada de *Fusarium Oxysporum* ATCC (American Type Culture Collection) de número 9643, fornecida pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá.

Extração dos metabólitos - Com o ambiente descontaminado, os fungos contidos no meios PDA e CZP foram distribuídos em tubos que foram submetidos a extração com etanol gerando dois extratos provenientes dos dois diferentes meios de cultura.

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 extrato 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<sub>4</sub> a 0,1 mol/L) e marcados nos papéis as manchas que podem indicar a presença de metabólitos.

## Resultados e Discussão

Os experimentos mostraram que existe a possibilidade de separar os compostos produzidos pelo fungo *Fusarium Oxysporum* utilizando cromatografia em papel. Obviamente que mais experimentos devem ser feitos para otimização dos parâmetros fase móvel, natureza do revelador e o tempo de revelação para se obter melhores resoluções cromatográficas. Análise dos dados indicam que ocorreu a separação de três compostos que podem ser metabólitos do fungo *Fusarium Oxysporum* indicados por três manchas marrons observadas no papel de filtro após revelação com solução de KMnO<sub>4</sub> a 0,1 mol/L por 2 minutos (Fig. 1A). Estas manchas marrons devem ter sido originadas da oxidação dos metabólitos orgânicos pela solução de KMnO<sub>4</sub>. Estes 3 compostos devem corresponder aos ácidos fusarinólico; 9,10-deidrodusárico e fusárico, respetivamente; pois análises por HPLC-MS de extratos semelhantes (recuperados em acetonitrila) mostraram que três compostos foram eluidos da coluna cromatográfica C18 com tempos de retenção de 4,67 min e m/z de 196 (ácido fusarinólico); 5,77 min e m/z 178 (ácido deidrofusárico) e 6,05 min e m/z 180 (ácido fusárico) (Fig. 1B). Como no experimento de cromatografia em papel as condições cromatográficas são invertidas, ou seja, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, o composto que mais se deslocou no papel é o ácido fusárico, o composto com retenção intermediária corresponde ao ácido deidrofusárico e o que menos se locomoveu é o ácido fusarinólico.



**Figura 1.** A- Cromatogramas de cromatografia em papel e HPLC-MS da separação dos metabólitos do fungo *Fusarium Oxysporum*. A - Extrato do tubo 1, fase móvel etanol e KMnO<sub>4</sub> como revelador. B-

Cromatograma HPLC-MS (BPI) modo positivo para o extrato de acetonitrila (Fase orgânica). Compostos com tempo de retenção de 4,67; 5,77 e 6,05 correspondem aos ácidos fusarinólico, deidrofusárico e fusárico, respectivamente. Gradiente de eluição entre os solventes (A) 0,1% de ácido fórmico em água (B) acetonitrila com 0,1% ácido fórmico começando 98% da fase A e 2% da fase B e chegando em 9,0 min com 5% de A e 95% de B que, foi mantido até 11. Entre 11 e 13 min o sistema voltou a composição inicial da fase móvel.

## Conclusões

Os resultados obtidos até o presente momento dão fortes indícios que o fungo *Fusarium Oxysporium* poderá em breve ser identificado utilizando cromatografia em papel, no entanto, mais alguns experimentos precisam ser realizados. A pandemia tem atrapalhado sobremaneira a conclusão da pesquisa.

## Agradecimentos

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

## Referências

- [1] N.C. Saldan, R.T.R. Almeida, A. Avíncola, C. Porto, M.B. Galuch, T.F.S. Magon, E.J. Pilau, T.I.E. Svidzinski, C.C. Oliveira, **Food Chemistry**, 241 (2018) 113.
- [2] V. Pérez-Fernández, L.M. Rocca, P. Tomai, S. F., **Analytica Chimica Acta**, 983 (2017) 9.
- [3] B. Alberts, O. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. **Fundamentos da Biologia Celular**, 2º edition, Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [4] H.S. Hussein, J.M. Brasel, **Toxicology**, 167 (2001) 101.
- [5] R. Morris. **Microorganisms and disease**. Handbook of Water and Wastewater Microbiology, 2003.