

Caracterização do perfil metabólico de fungos deteriorantes de frutos de *Averrhoa carambola*

Gabriella Ferreira Siqueira (PIBIC), Juliana Cristina Castro (Coorientadora); Miguel Machinski Junior (Orientador). E-mail: ra112525@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR.

Palavras-chave: Fungo deteriorante; Micotoxinas; Carambola.

RESUMO

Dentre os já conhecidos riscos do consumo da carambola, como causar nefrotoxicidade e neurotoxicidade em pacientes com doença renal crônica, surge a necessidade da identificação de metabólitos secundários ocasionado por fungos micotoxigênicos. A toxicidade desses metabólitos vem afetando diariamente a vida humana e animal. O presente estudo teve por objetivo identificar fungos deteriorantes e micotoxigênicos dos frutos de *Averrhoa carambola*, e também avaliar o perfil micotoxigênico *in vitro* do fungo isolado por UHPLC-HMRS. Após o isolamento do fungo, de acordo com suas características micro e macroscópicas foi identificado como *Aspergillus* sp. Dentre os metabólitos secundários pesquisados obteve-se a fumagilina e o *epoxyfumitremorgin C*, que possibilitaram sugerir a identificação de *Aspergillus fumigatus*, resultado que será somente confirmado após identificação molecular.

INTRODUÇÃO

Associado aos riscos potenciais ao consumo de alimentos *in natura* e/ou processado, outro fator importante durante a pré e pós-colheita de frutos é a presença de fungos deteriorantes e toxigênicos. A deterioração de frutas por fungos acontece por meio de alguma lesão na superfície da fruta, por uma junção de interações como, espaço geográfico, clima, temperatura, patógenos na fruta, entre outros fatores. Há uma grande variedade de fungos micotoxigênicos contaminantes, entre eles, os gêneros *Aspergillus*, *Alternariam* e *Fusarium*. As micotoxinas por sua vez, são metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular produzidos por estes fungos filamentosos. As micotoxinas podem causar as doenças micotoxicoses em humanos e/ou animais que vierem a consumir esse fruto contaminado (Kumar et al., 2017).

Entretanto, existe uma carência bibliográfica sobre estudos em frutos de carambolas correlacionando e identificando fungos deteriorantes e/ou toxigênicos. Poucos estudos abordam a importância das alterações metabólicas dos frutos durante e após o amadurecimento, produção e especialmente, ao consumo dos frutos de *Averrhoa carambola*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência

de fungos deteriorantes e/ou toxigênicos, bem como avaliar o perfil toxigênico *in vitro* do fungo isolado por UHPLC-HMRS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento do fungo deteriorante

Frutos de *Averrhoa carambola* foram coletados no município de Telêmaco Borba - Paraná, selecionados, lavados e higienizados com hipoclorito de sódio 1% e água destilada. Os microrganismos foram isolados dos frutos por incubação durante 15 dias em temperatura ambiente até a podridão aparecer claramente na epiderme. O tecido da epiderme (1 x 1 cm²) com o microrganismo foi inoculado em BDA e incubados a 28°C por 7 a 15 dias. Após esse período, uma amostra de cerca de 10 mm do ágar contendo fungo foi transferida para uma nova placa de BDA. A purificação foi realizada com lavagem em Tween 80 a 1 %, para isolar as cepas de interesse.

Caracterização morfológica macroscópica e microscópica

A caracterização macroscópica foi realizada com o microrganismo cultivado em meio sólido de BDA e analisado quanto à aparência de colônias, forma do micélio, cor e tempo de crescimento. A caracterização microscópica foi realizada pela técnica de microcultivo.

O microcultivo, realizado de acordo com Ribeiro e Soares (2005), em ambiente estéril, através de uma placa de microcultivo esterilizada. As placas foram incubadas por 15 dias, até crescimento suficiente. O isolado foi avaliado em microscópio *Olympus* na objetiva de 10 e 40x, e foram parcialmente identificados por meio de caracterização morfológica e os resultados das avaliações macroscópicas e microscópicas foram analisados por meio de chaves de identificação.

Extração de metabólitos secundários "in vitro"

Após a incubação realizada no isolamento do fungo, três placas contendo o microrganismo cultivado em BDA foram cortadas em tamanho aproximado de 1x1 cm² com o auxílio de um bisturi estéril, mantidas por 3 horas a -80 °C. 60 mL de acetonitrila-água-ácido fórmico (84:16:1, v/v/v) foi adicionada a amostra. Homogeneizado em agitador *Shaker* por 60 minutos a 25 °C a 150 rpm e 60 minutos no sonicador. Filtrados, centrifugados por 20 minutos a 4.500 rpm, e o sobrenadante foi filtrado duas vezes em filtro PTFE 0,45 µm, e por fim, armazenados a uma temperatura de -20 °C até o momento da análise (Castro et al., 2018).

Método UHPL-HRMS

O sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência Nexera X2 equipado com 2 bombas LC-30AD e coluna Symmetry C18 (75 x 4,6 mm) foram utilizados para a determinação de metabólitos secundários *in vitro* dos extratos obtidos. Através do software *Data Analysis 4.3* foi visualizado o cromatograma de íons e os espectros de MS e MS/MS. Após isso os espectros foram comparados de acordo com a literatura

e banco de dados de espectrometria de massas de livre acesso, *Human Metabolone Database* (HMDB). A metodologia foi realizada de acordo com Castro et al. (2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica: macro e microscópicas

Na caracterização macroscópica (Figura 1a), a cepa isolada possui características de crescimento filamentososo, aveludado com coloração cinza-esverdeada no verso e amarelado no reverso com crescimento circular do centro para as extremidades. Foram incubadas durante 7 dias em estufa a 28°C sobre luz ultravioleta.

Pela caracterização microscópica (Figura 1b), foi possível evidenciar a presença de estruturas reprodutivas assexuadas de fungos septados e seus conídios assexuados, que de acordo com a caracterização morfológica (Hoog et al., 2000) por meio das chaves de identificação, a colônia possui características do gênero *Aspergillus*.

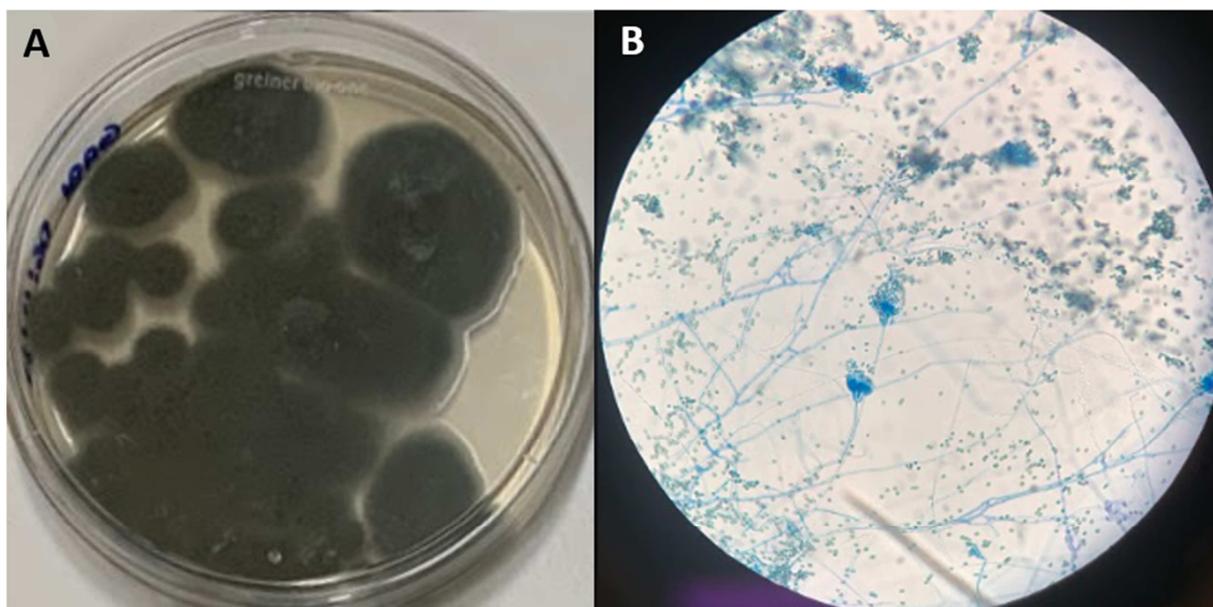


Figura 1. (a) Placa em ágar BDA com a cepa fúngica isolada e (b) Características microscópicas da cepa fúngica isolada na objetiva de 40x. Fonte: Autor.

Avaliação do perfil metabólico do fungo isolado

Ao total foram pesquisadas vinte e quatro micotoxinas características do gênero *Aspergillus* sendo elas: Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e Q₁); Alfa-Ácido ciclopiazônico; Asperxantona; Aurasperone (A, B, C e E); Citrinina; Dimetil-esterigmatocistina; Diidroxifumitremorgina C; Epoxyfumitremorgin C; Fumagilina; Fumigaclavina B; Fumitremorgin C; Giotoxina; Ocratoxinas (A e B); Patulina e Esterigmatocistina. Ao final da análise dos extratos, apenas duas micotoxinas foram detectadas e identificadas, a Fumagilina (C₂₆H₃₄O₇) ([M+H]⁺ 459,2377), e a Epoxyfumitremorgin C (C₂₂H₂₃N₃O₄) ([M+H]⁺ 394,1761) (HMDB0038643). Com tempo de retenção de 13,96

e 13,51 e com erro (ppm) de -6,0970 e -3,5517 para Fumagilina e Epoxyfumitremorgin C, respectivamente.

De acordo com as análises micro e macroscópicas, em conjunto com o perfil dos metabólitos secundários produzidos foi possível chegar a identificação do fungo *Aspergillus fumigatus*. No entanto, é necessário a confirmação por identificação molecular.

CONCLUSÕES

Partindo dos frutos da *Averrhoa carambola* analisados, o fungo identificado com relevância micotoxicológica foi o *Aspergillus fumigatus*, possibilitando a identificação de duas micotoxinas por meio do perfil toxigênico, a fumagilina e o epoxyfumitremorgin C. As atividades biológicas destas micotoxinas vêm sendo estudadas, além dos já conhecidos processos infecciosos que podem acometer o indivíduo, como suas propriedades farmacológicas e terapêuticas no tratamento do câncer de mama. Estudos *in vivo* e *in situ*, bem como a identificação molecular estão sendo realizadas, e serão divulgadas na forma de artigo científico futuramente.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/CNPq-Fundação Araucária-UEM e CNPQ (Processo nº 313035/2022-9) pelo apoio e financiamento.

Ao Laboratório de Toxicologia e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – Comcap (Ministério da Ciência e Tecnologia - Finep) da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

CASTRO, J.C.; AVINCOLA, A.S.; ENDO, E.H.; SILVA, M.V.; DIAS FILHO, B.P.; MACHINSKI JR, M. M.; ... & ABREU FILHO, B.A., Mycotoxigenic potential of *Alternaria alternata* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) using UHPLC-Qtof-MS. **Postharvest Biology and Technology**, v. 141, p. 71-76. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.012>. Acesso em 17 de agosto de 2023.

HOOG, G.S., CUARRO, G.J., FIGUERAS, M.J., **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed., American Society for microbiology, 1126 p. 2000.

KUMAR, D.; BARAD, S.; SIONOV, E.; KELLER, N.P; PRUSKY, D.B., Does the Host Contribute to Modulation of Mycotoxin Production by Fruit Pathogens? **Toxins** (Basel), v. 9, n. 9, p. 280. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9090280>. Acesso em 17 de agosto de 2023.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R., **Microbiologia Prática Roteiro e manual, bactérias e fungos**. 4^a ed., São Paulo, SP. 2005.