

INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DE KOMBUCHA USANDO ABORDAGENS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E BIOINFORMÁTICA

Luiz Gabriel Moreira Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo Jorge Pilau
(Orientador), e-mail: ra126834@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas e da Terra/Maringá,
PR.

Química / Química Analítica

Palavras-chave: Green Tea, Microbiota, Molecular Network

RESUMO

A Kombucha é produzida a partir da fermentação do chá de *Camellia sinensis* juntamente com culturas de bactérias e leveduras, comumente consumido por seus supostos benefícios à saúde, e com o crescente interesse no consumo de alimentos fermentados e probióticos proporcionado pelos estudos da microbiota intestinal, vêm uma necessidade dos estudos e análises dos metabólitos presentes em tais alimentos. Entretanto, existe uma falta de informações sobre as classes de metabólitos que compõem esses produtos. Sendo assim, nossa proposta consiste em utilizar a abordagem de metabolômica não direcionada baseada em espectrometria de massas para investigar essa composição durante o processo de fermentação do produto. Para isso, um desenho experimental foi realizado para avaliação da influência de 7 dias de fermentação da kombucha. Um grupo controle de chá não fermentado foi utilizado. As amostras foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a um espectrômetro de massas utilizando ionização por eletrospray. Os dados foram putativamente identificados e separados por classes diferentes usando a plataforma online e gratuita *Global Natural Products Social Molecular Networking*.

INTRODUÇÃO

A fermentação está presente na nossa dieta, desde iogurtes e queijos à bebidas alcoólicas. Nos últimos anos, pesquisas mostram que o processo de fermentação é importante para o desenvolvimento de vários produtos e benefícios para a saúde (Arora et al., 2013). Assim, os produtos fermentados, como a kombucha e o kefir, estão em alta demanda e cada vez mais presentes nos cardápios dos restaurantes e nas prateleiras de mercados especializados com alternativa de produtos novos e saudáveis. De modo geral, a produção da kombucha consiste na preparação do chá verde ou preto adoçado da *Camellia sinensis*, fermentado por uma cultura simbiótica de bactérias (acéticas e ácido-láticas) e leveduras (*scooby*) incorporadas em uma matriz de celulose (Coton et al., 2017). Durante a fermentação, os compostos do chá

sofrem uma transformação por este complexo microbiano e algumas substâncias descritas na literatura sendo elas os ácidos orgânicos, carboidratos, vitaminas, proteínas, minerais (Jayabalan et al., 2007). Vários estudos investigaram as propriedades da kombucha (Chakravorty et al., 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

Produtos químicos e reagentes:

Água com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila foram obtidos da Merck. A água ultrapura será produzida usando um sistema EMD Millipore Direct-QTM 3. Filtros de seringa obtidos da Merck Millipore. O chá de *Camellia sinensis* e as kombuchas foram coletados de um biorreator da Companhia dos Fermentados.

Estudo do perfil metabólico:

O estudo consiste em comparar chá fresco (chá verde de folhas de *Camellia sinensis*; GT) e kombucha (chá verde de *Camellia sinensis* fermentado com scoby por 7 dias; GTK). Para preparar a kombucha, 8 g de folhas de chá verde de *Camellia sinensis* foram infundidos a 80 °C por 10 minutos. Em seguida, o chá verde foi resfriado à temperatura ambiente, adicionado sacarose suficiente até obter um grau inicial de 5 brix de sacarose e scoby processo de fermentação. O grau Brix foi medido por um Sacarímetro Densimeter.

Preparo de amostras e análise metabólica não direcionada:

Uma alíquota de 2 mL de chá e kombucha foi sonicada por 10 segundos em banho ultrassônico e centrifugada a 12.000 rpm por 15 min. Após isso, a amostra foi filtrada utilizando um filtro de seringa de PTFE de 0,22 µm antes da análise em UHPLC-MS/MS. As análises foram realizadas a partir de um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa Impact II. Uma coluna Acquity UPLC® CSH C18 será utilizada seguindo o gradiente de eluição de água e ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) como fase móvel usada no modo negativo e positivo de ionização. A separação cromatográfica é realizada por 31 min usando o gradiente.

Rede Molecular (MN):

Os dados adquiridos de fragmentação (MS/MS) serão convertidos para a extensão mzXML e transferidos para o servidor da plataforma virtual GNPS, biblioteca online de dados e informações de espectrometria de massas onde usuários podem complementar com dados adquiridos nas análises para criar os mapas químicos, conforme documentação da plataforma. Os dados MN foram exportados para o software Cytoscape 3.7.1 para melhor visualização do perfil metabólico das amostras. Os espectros de fragmentação do produto foram comparados com seus semelhantes encontrados nas bibliotecas comunitárias do GNPS. A identificação putativa dos compostos foi feita através da comparação entre os dados de MS/MS provenientes das amostras com os dados de MS/MS presentes na biblioteca, verificação manual do perfil de fragmentação das amostras e também o cálculo de

erro de massa. Essas anotações são consideradas anotações putativas com base na similaridade de biblioteca espectral ou classe de compostos putativamente caracterizada com base na similaridade espectral com compostos conhecidos de uma classe química.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização positivo e negativo e foram pré-tratados para serem inseridos no GNPS, onde foram gerados os mapas químicos para identificação putativa dos compostos presentes na kombucha. Por meio da técnica UHPLC-ESI-MS/MS, foram obtidos os espectros de fragmentação das amostras de GT e amostras de GTK. Em seguida, os dados de MS/MS foram tratados e depositados na plataforma GNPS, onde foram gerados os MN de GT e GTK (Figura 2), foi obtido também o cromatograma de sobreposição das amostras de GT e GTK (Figura 1), que mostrou que existe diferença entre os grupos em relação a intensidade e tempo de retenção, porém somente a inspeção visual não é suficiente para diferenciar as alterações feitas após a fermentação. No MN, espectros de MS/MS são agrupados em classes químicas pela semelhança entre os espectros de fragmentação adquiridos e espectros de MS/MS presentes em sua própria biblioteca, e são representados nos formatos de *nodes*. O MN é gerado a partir da comparação entre espectros de MS/MS das amostras e espectros de MS/MS presentes na biblioteca do GNPS, então os dados de MN foram exportados para o *software* Cytoscape 3.7.1 para melhor visualização e entendimento das informações fornecidas pelo mapa químico. O MN das amostras obtidas mostrou que foram obtidas 73 entidades químicas, onde 28 estão associados exclusivamente ao grupo GTK, 16 exclusivas ao grupo de amostras GT e 29 entidades presentes em ambas as amostras. É visível uma maioria de metabólitos na classe dos flavonoides, principalmente catequinas, flavan-3-ols incolores e solúveis em água, que contribuem com o sabor amargo e adstringência do GT. A epigallocatequina galato apresenta a maior abundância dentre as catequinas encontradas na GTK, e, bem como outras moléculas da classe dos flavonóides, têm capacidades antioxidantes baseadas em captura de radicais livres e quelação de metais, bem como propriedades biológicas como quimioprevenção do câncer e proteção contra danos de raios UV à pele (NAGLE et al, 2006). E uma minoria classificados como fenilpropanóides, derivados da fenilalanina, policetídeos, derivados de unidades acetil e malonil, imidazopiridinas, como cafeína e teobromina, que atuam no sistema nervoso central, bem como aminoácidos, nucleosídeos, ácidos orgânicos, lipídios, carboidratos e conjugados, álcoois, polióis, e lactonas.

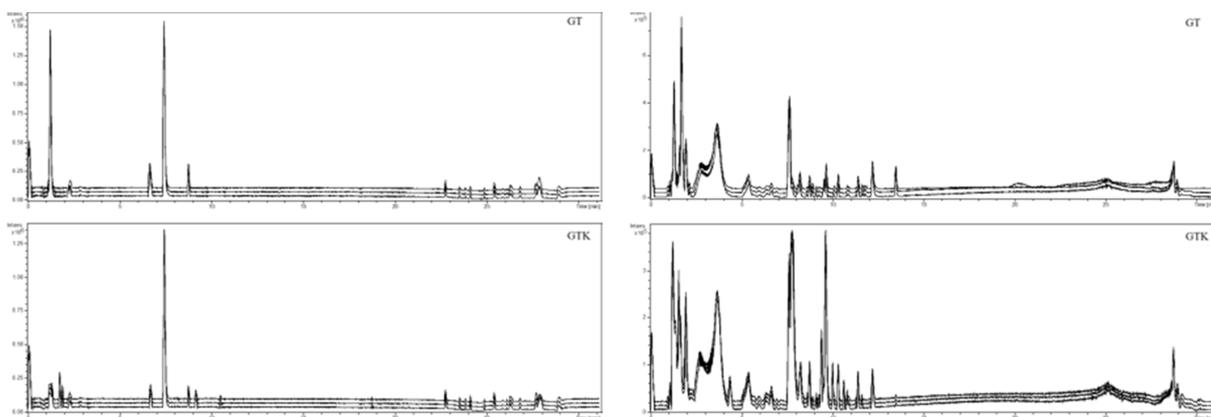


Figura 1 - Sobreposição de cromatogramas de pico de base (BPC) de chá fresco de *Camellia sinensis* (GT) e kombucha (GTK) após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS à esquerda e Sobreposição de BPC de chá GT e GTK após análise por UHPLC-ESI(-)-MS/MS à direita.

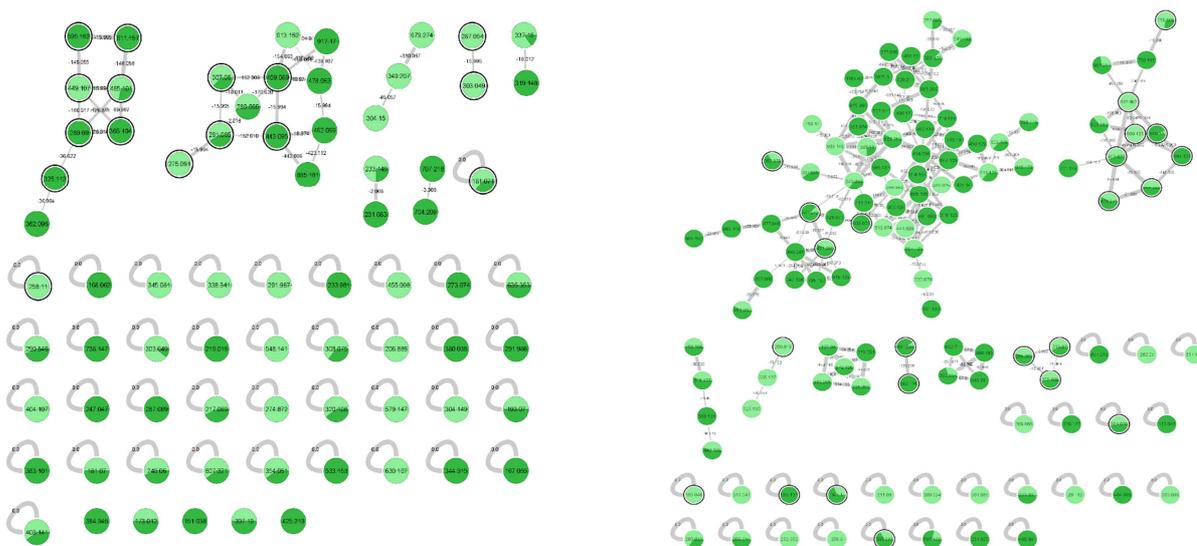


Figura 2 - À esquerda, rede molecular do espectro MS/MS obtida na análise de amostras do controle e da Kombucha no modo de ionização positivo. À direita, rede molecular do espectro MS/MS obtida na análise de amostras do controle e da Kombucha no modo de ionização negativo.

CONCLUSÕES

A combinação de espectrometria de massas e o molecular networking teve sucesso em fazer o perfil metabolômico da Kombucha e a identificação da presença dos flavonóides é uma informação poderosa na adição de valor ao produto, entretanto, ainda há uma falta na pesquisa das vias metabólicas completas e melhor identificação de todos os metabólitos para garantir a segurança do alimento. A fermentação mostra-se uma ferramenta excelente na transformação de bioativos, embora ainda seja muito dependente das condições em que é feita, portanto é de

grande importância criar técnicas para proporcionar estabilidade durante a fermentação.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à UEM, ao CNPq, à Fundação Araucária, e ao meu orientador.

REFERÊNCIAS

ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 591–596, abr. 2013.

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, 18 abr. 2017.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, jan. 2007.

CHAKRAVORTY, S. et al. 10 - Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128152706000104?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 set. 2023.

NAGLE, D. G.; FERREIRA, D.; ZHOU, Y.-D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1849–1855, 1 set. 2006.