

EXPLORAÇÃO METABOLÔMICA DO NATÔ USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MOLECULAR NETWORKING

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

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

Química Analítica / Separação

Palavras-chave: Natô; UHPLC-MS/MS; Metabolômica.

RESUMO

Natô é um alimento japonês feito da fermentação da soja pelo *Bacillus subtilis natto*. Tem textura pegajosa e sabor forte, sendo geralmente produzido em casa. Rico em proteínas, vitaminas e probióticos, é considerado um superalimento. Estudar sua fermentação é importante para entender suas substâncias e benefícios à saúde. A ferramenta de Molecular Networking, baseada em espectrometria de massas, ajuda a identificar metabólitos com padrões de fragmentação semelhantes. No estudo do natô, foi realizada uma análise metabolômica usando UHPLC-MS/MS, que identificou 893 substâncias químicas e 52 correspondências na biblioteca da plataforma GNPS.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) da família Fabaceae, das Leguminosas, é um grão super nutritivo (Friedman; Brandon, 2001). Um dos derivados da soja mais consumidos no leste asiático, especialmente no Japão é o natô, um produto da fermentação dos grãos da soja pela bactéria *Bacillus subtilis natto* e é consumido pelos nativos como acompanhamento para arroz no café da manhã (Afzaal et. al., 2022), e apesar de seu odor pungente, textura pegajosa e sabor forte, características não muito atrativas num alimento, é considerado um superalimento devido à sua riqueza nutricional e benefícios à saúde (Chen et. al., 2022). A metabolômica está dentre uma das muitas técnicas empregadas para o estudo de organismos e suas alterações biológicas, sendo o estudo de metabólitos de moléculas pequenas em sistemas biológicos e suas mudanças em resposta a fatores genéticos ou ambientais geralmente realizado com um espectrômetro de massas. A espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta analítica muito usada na

metabolômica, permitindo a quantificação e identificação dos metabólitos em amostra (Canuto et al., 2018)

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Tanto o natô quanto a soja em grão foram obtidos de uma produtora independente na feira do produtor localizada na Cidade de Maringá-PR. A análise metabolômica foi realizada em 5 partes, sendo elas: a) Análise do grão de soja in natura; b) Análise do grão de soja cozido; c) Análise do natô com um dia de fermentação; d) Análise do natô com três dias de fermentação e; e) Análise do natô com cinco dias de fermentação. Foram realizadas essas análises como forma de conseguir um comparativo entre a soja antes e depois da fermentação em natô.

Preparo dos extratos de soja

A preparação das amostras de grão de soja in natura, cozida e fermentada foi realizada em triplicata, onde 100,0 mg da amostra foram secos, macerados e extraídos em três replicatas de 500 µL utilizando uma solução de clorofórmio: metanol (9:1; v:v). Após a extração, as amostras foram filtradas utilizando um filtro de membrana hidrofílica PTFE (Filtrilo; 0,22 µm; 13 mm) para a separação da fase sólida. Os solventes utilizados foram evaporados utilizando gás nitrogênio, e posteriormente, ressuspensos em 200 µL de metanol grau LC-MS e filtrados novamente utilizando o filtro de mesmas características para a soja não fermentada, a fermentada, foi centrifugada em minicentrífuga por 5 minutos.

Análise dos extratos obtidos da soja, soja cozida e natô por UHPLC-MS/MS

Para as análises, 2,00 µL de cada extrato foi analisado por LC-MS com geometria Q-TOF (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna cromatográfica Acquity UPLC® CSH™ C18 (Waters, 1,7 µm, 2,1 × 100 mm) com uma vazão da fase móvel de 0,250 mL/min. O gradiente de eluição foi realizado com um sistema de solvente binário, sendo A (H₂O com 0,1 % de ácido fórmico; v:v) e B (metanol com 0,1 % de ácido fórmico; v:v) para o modo positivo e, com o intuito de investigar de modo mais efetivo e abrasivo os compostos presentes no natô, foi realizado também a ionização no modo negativo, no qual foi utilizado H₂O com 0,1% de ácido fórmico; v:v para a fase A e metanol sem adição de ácido

fórmico na fase B. Os dados foram coletados na faixa de razão massa/carga (m/z) de 100 a 1200 com uma taxa de aquisição de dois espectros por segundo.

Parâmetros utilizados para obtenção da rede molecular

Os espectros de MS/MS brutos foram convertidos para o formato mzXML utilizando a ferramenta MSConvert e inseridos na nuvem utilizando o software WinSCP. Após a conversão, os dados foram inseridos na plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) para geração da rede molecular usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS/MS dentro de ± 17 Da do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 4 principais íons de fragmento na janela ± 50 Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 0,02 Da e uma tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,02 Da.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a conclusão das análises por meio de UHPLC-MS/MS, os dados resultantes foram transferidos para a nuvem, utilizando a ferramenta GNPS. Essa etapa visou gerar o MN, um processo crucial para a visualização e interpretação dos resultados. A fim de facilitar a representação visual dessas complexas redes de interações moleculares, recorreu-se à plataforma reconhecida na comunidade de bioinformática, o Cytoscape®. A plataforma oferece uma interface intuitiva para a visualização de clusters moleculares, contribuindo assim para a compreensão dos padrões e relações emergentes nos dados analisados. O Molecular Networking gerado pelas análises de UHPLC-MS/MS utilizando o modo positivo de ionização gerou ao todo 893 nodes, sendo apenas 52 deles moléculas que deram hit na literatura. O MN relacionou os dados obtidos nas análises de soja in natura, soja cozida, e as amostras de natô com um, três e cinco dias de fermentação, sendo todos diferenciados no Cytoscape®. Percebe-se que, dentro de um mesmo cluster, existe uma variedade de metabólitos formados em diferentes tempos de fermentação da soja, além dos formados pela soja em sua forma in natura e após o seu cozimento. No MN, 123 clusters de compostos interligados foram formados.

Esses são agrupamentos de substâncias que compartilham de uma estrutura química semelhante, baseado em seus espectros de fragmentação.

CONCLUSÕES

O estudo da metabolômica não direcionado é uma ferramenta importante para o entendimento global das substâncias presentes em uma série de amostras. Na análise do natô em diferentes tempos de fermentação, foi possível observar, pelo MN, uma variação de compostos formados de um extrato ao outro. Essa metodologia permitiu a observação de alguns compostos do natô, como a presença de surfactina e acetil fenilalanina nas amostras, produtos da conversão fermentativa da soja em natô pela ação de bactérias da cepa *Bacillus subtilis*. Além disso, o natô é considerado um superalimento por possuir uma grande quantidade de vitaminas, substâncias com efeitos anti-osteoporose e antitumorais, que também foram encontradas nas amostras.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao CNPq e à Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

Afzaal, M. et al., "Nutritional Health Perspective of Natto: A Critical Review", *Biochemistry Research International*, vol. 2022, Out, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2022/5863887>>.

Barros, F. F. C., Quadros, C. P. de., Maróstica Júnior, M. R., & Pastore, G. M.. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409–414, mar. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>>.

Canuto, G. et al., METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. *Química Nova*. São Paulo. Vol. 41, No. 1, p. 75-91. Jan, 2018. Disponível em: <[doi:10.21577/0100-4042.20170134](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134)>. Acesso em 21 de abril de 2023.

Chen, X. et al. Quantitative analyses for several nutrients and volatile components during fermentation of soybean by *Bacillus subtilis* natto. *Food Chemistry*, v. 374, p. 131725, abr. 2022.

Friedman, M.; Brandon, D. L. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 1069–1086, mar. 2001.