

Metabolômica de *Schizophyllum commune* cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas

Miria de Almeida Souza¹, Marina Borges Guimarães², Jorge Candido Rodrigues Neto³, Simone Mendonça⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵, Patrícia Verardi Abdelnur⁶

Resumo

A grande demanda de fonte energética despertou o uso de biodiesel derivados de óleos vegetais, tendo destaque para a cultura do algodão. A torta/farelo do caroço de algodão (TCA), oriundo da etapa de extração do óleo, é rica em proteína, lipídeos e carboidratos. No entanto, a TCA possui compostos, como o gossipol e a lignina, os quais necessitam de tratamento adequado para degradá-los. A degradação destes compostos utilizando macrofungos tem se destacado, viabilizando assim a sua utilização na nutrição de animais. Portanto, é necessário prospectar os compostos químicos degradados e/ou produzidos após a fermentação com macrofungos. Esse trabalho teve como objetivo a caracterização de metabólitos presentes em TCA após a fermentação estado sólido de *Schizophyllum commune*, utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra alta eficiência, acoplado a espectrometria de massas tandem (UHPLC-ESI-MS/MS). Os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e comparados ao banco de dados. O PCA das amostras demonstrou alterações significativas no perfil de compostos químicos da torta de caroço de algodão (in natura) após a fermentação fúngica. Foi possível identificar os compostos químicos N-butil-L-homoserina lactona, di-hidroanticapsina e inosina, os quais não foram relatados na literatura. Foram prospectados compostos das classes dos lipídeos, aminoácidos, oligossacarídeos, nucleosídeos e nucleotídeos, agregando valor a torta de caroço de algodão. Assim, a metabolômica, que ainda é pouco explorada no fungo *S. commune* foi aplicada para detectar diversas classes de metabólitos através da técnica avançada UHPLC-MS/MS. A ferramenta de metabolômica *untargeted* aplicada neste trabalho poderá ser aplicado a outras espécies de fungos. Tais informações contribuem para trabalhos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica e indústria de nutrição animal.

Palavras-chave: basidiomicetos, fermentação em estado sólido, metabólitos bioativos, UHPLC-ESI-MS/MS, insumo animal.

¹ Mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, miria17a.souza@gmail.com

² Farmacêutica, mestranda em Ciências da Saúde, marinaborgesguimaraes@gmail.com

³ Químico, mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, jorgecni@hotmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁶ Doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

Introdução

A alta demanda global de energia e o esgotamento dos resíduos fósseis têm despertado a busca por alternativas que sejam sustentáveis, renováveis e atendam a necessidade energética. Os resíduos agroindustriais são potenciais matéria-prima renováveis que estão ganhando força no setor energético. As biomassas oriundas da etapa de extração possuem características químicas que podem ser aplicadas a outros setores, tais como produtos para nutrição animal (Gangwar; Shankar, 2020).

Neste cenário, encontra-se a cultura agrícola do *Gossypium hirsutum* L., popularmente conhecido como algodão. Essa cultura possui grande importância comercial, onde tem como principal produto a pluma, aplicada na indústria têxtil. As sementes possuem grande quantidade de óleo, e após processadas geram dois novos produtos, óleo e torta/farelo (Lee, 1984).

O óleo tem aplicações para produção de biodiesel, lubrificantes ou alimentos. A torta/farelo tem sua principal aplicação a nutrição de ruminantes, em função dos teores de proteínas e carboidratos. A torta de caroço/semente de algodão (TCA) é rica em proteína, lipídeos e carboidratos, podendo ser aplicada na nutrição animal (Carvalho, 1996). O uso da TCA na nutrição animal possui algumas limitações devido a presença do gossipol, o qual é uma substância antinutricional e tóxica, interferindo na digestibilidade e absorção dos nutrientes. Este afeta o crescimento e ganho de peso e pode levar o animal à infertilidade (Zhang et al., 2007). A recalcitrância da parede celular, principalmente em função da lignina, também limita o uso na nutrição animal. Com isso, faz-se necessários tratamentos que reduzam a toxicidade dos principais compostos presentes nos resíduos agroindustriais, viabilizando o uso deles para nutrição animal (Barbosa, 2016).

Alternativamente, os métodos de pré-tratamentos biológicos, envolvendo os fungos de podridão branca (do inglês, *White – rot fungi*), se destacam por degradarem os materiais lignocelulósicos e os compostos tóxicos (gossipol) presentes neste resíduo (Zhu et al., 2016). Estes fungos são cultivados em sistema de fermentação em estado sólido (FES), catalisando e metabolizando não apenas os compostos recalcitrantes, mas também compostos fenólicos que podem ser bioativos, enriquecendo a biomassa para formulações de dietas nutricionais do animal, podendo ainda melhorar a saúde animal (Zhu et al., 2016).

Contudo, fazem-se necessários estudos mais detalhados de todos os metabólitos produzidos após a fermentação da TCA pelos macrofungos. Permitindo assim conhecer e caracterizar quais metabólitos estão presentes e prospectar os compostos químicos com atividades bioativas que podem trazer benefícios para a saúde animal. Para isso, o uso de ferramentas como a metabolômica por espectrometria de massas torna-se uma excelente opção para este tipo de abordagem.

Portanto, este trabalho tem como objetivo prospectar os metabólitos secundários presentes em torta de caroço de algodão fermentada por *Schizophyllum commune* utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas tandem (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*).

Material e Métodos

Material Biológico

O macrofungo *Schizophyllum commune* (BRM 060008) foi escolhido por se destacar em trabalhos anteriores realizados na Embrapa Agroenergia (Brasília, DF) (Gomes et al., 2015; Machado, 2016; Cunha, 2017). Este faz parte da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Biorrefinaria da Embrapa Agroenergia (CMMABio), Brasília, Distrito Federal.

O macrofungo foi cultivado em sistema de fermentação em estado sólido (FES) em torta de caroço de algodão (TCA). Foram preparados frascos contendo apenas a TCA, sem inóculo, considerados como controles. Os frascos foram incubados em estufa incubadora de bancada a 28 °C por 15 dias. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas biológicas.

O TCA-fermentado foi seco em estufa, a 40 °C durante 48 horas, e triturados em moinho manual. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento dos processos de extração de metabolitos e análises químicas.

Extração dos metabolitos de TCA-fermentado

As amostras de TCA-fermentado foram extraídas com etanol 50%. Pesou-se 10 mg da TCA-fermentado e com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 1000 µL de etanol 50%. As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex (Vortex Lab Dancer Ika - Ika Best Selle) e levadas para o banho ultrassônico por 10 min a 30 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em uma microcentrifuga de bancada (MiniSpin®, Eppendorf AG, Alemanha) por 3 min e 1200 rpm.

Após o processo de extração, as amostras foram analisadas em sistema constituído por UHPLC (Modelo Prominence LC30AD, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Maxis 4G (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com fonte por electrospray (ESI) e analisador de massas de alta resolução tipo quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*).

Para separação dos analitos, empregou-se a cromatografia líquida em fase reversa, através do emprego da coluna Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm x 1,8 µm, Waters) a 35 °C. O solvente A foi ácido fórmico (AF) 0,1% em água (v/v) e o solvente B ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v). As corridas cromatográficas foram de 18 min, sendo os 4 min finais para reconstituição da fase móvel para a próxima análise.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (ESI(+)-MS) e negativo (ESI(-)-MS), configurado numa voltagem do capilar de 3800 V, pressão do nebulizador 4,0 Bar, gás de secagem a 9,0 L/min a 200 °C, temperatura do cone 200 °C; temperatura da coluna 40 °C; taxa de aquisição de espectros 3 Hz e faixa de massas monitorada m/z 80-1200 Da. O equipamento foi calibrado com cluster de formiato de sódio (1 mM), inserido diretamente no início de cada corrida.

Os dados foram adquiridos por meio dos softwares *Otof Control* (Bruker), acoplado ao *HyStar* (Shimadzu). E a fórmula molecular dos íons foi atribuída com o auxílio da ferramenta *SmartFormula* do software *DataAnalysis* versão 4.2 (Bruker Daltonics). Os metabolitos foram identificados a partir da comparação entre a fórmula molecular e a massa exata, o qual foi atribuído através da ferramenta *Compound Crawler* (*DataAnalysis*

versão 4.2, Bruker Daltonics). Este *software* possui interface com bancos de dados em metabolômica públicos *Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas* (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e/ou *Entidades Químicas de Interesse Biológico* (ChEBI, do inglês *Chemical Entities of Biological Interest*).

Os dados de m/z , tempo de retenção (rt) e intensidade foram processados e tabelados através do *software XCMS Online*, versão 3.7 (xcmsonline.scripps.edu). Uma matriz de variáveis (*bucket table*) foi elaborada, constando as intensidades dos sinais em uma janela de 0,5-10 min, na faixa de m/z 80 a 1200. E depois essa tabela foi submetida ao tratamento estatístico através do *software MetaboAnalyst*, versão 4.0 (Xia Lab, Montreal), no qual os dados foram escalonados com base no método de Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes (Van Den Berg et al., 2006).

Resultados e Discussão

As análises metabolômicas dos metabólitos secundários presentes em TCA-fermentado pelo macrofungo *Schizophyllum commune* (BRM 060008) foram realizadas utilizando UHPLC-ESI-MS/MS, incluindo triplicata biológica e triplicata de extração. Foi desenvolvido um método rápido e robusto, capaz de extrair uma ampla quantidade de metabólitos em TCA-fermentado com BRM 060008. O uso do UHPLC favoreceu um menor tempo de corrida cromatográfica (11 min ESI(+)-MS e 8 min ESI(-)-MS) e melhor resolução dos picos (Goodpaster; Ramadas; Kennedy, 2011).

Análises dos metabólitos por UHPLC-ESI-(+)-MS

A partir das análises por UHPLC-ESI(+)-MS/MS foram detectados 76 picos na amostra TCA-fermentado (Figura 1A) e 51 picos no TCA-controle (Figura 1B).

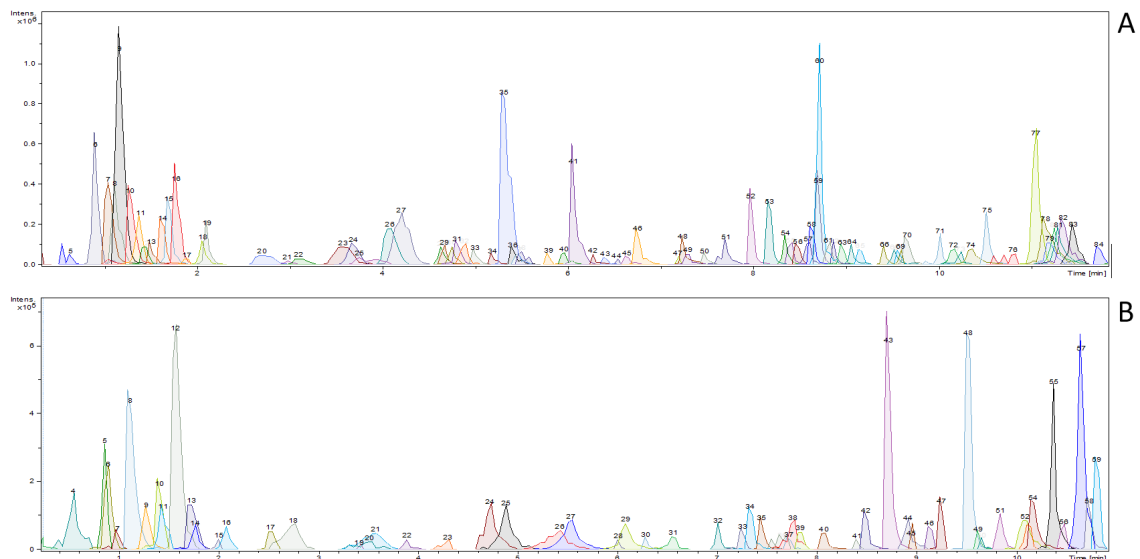


Figura 1. Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500 μ L de extrato etanólico da amostra em 1000 μ L de solvente). (A) TCA-fermentado *S. commune* BRM 060008 e (B) TCA-controle (sem presença do macrofungo).

O cromatograma do TCA-fermentado do macrofungos FPB117 apresentou perfil de picos semelhantes ao do controle (Figura 1), tornando a interpretação visual das alterações metabólicas nas amostras dispendiosa devido a grande quantidade de variáveis presentes. Com isso, os dados espectrais de UHPLC-ESI(+)-MS foram combinados com a análise quimiométrica. Dessa forma, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada para verificar as tendências dos grupos, reduzindo a dimensionalidade. Os modelos formados por PCA mostraram uma discriminação de dois grupos referentes às amostras TCA-fermentado FPB117 e TCA-controle (Figura 2). Os íons mais influentes nessa separação são apresentados no gráfico de *loading* (Figura 2B).

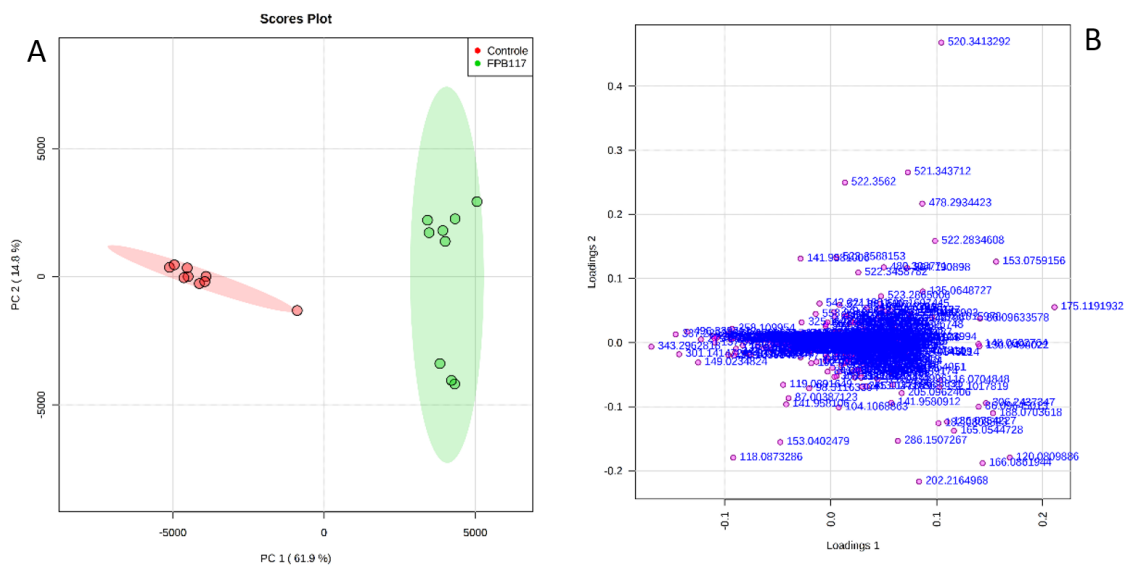


Figura 2. PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado *S. commune* FPB 117 e TCA-controle submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

A identificação dos metabólitos majoritários foi realizada pela comparação com o peso molecular e padrão de fragmentação de MS/MS das amostras com os compostos depositados no banco de dados ou através de referências à biblioteca dos bancos de dados KEGG e ChEBI. Assim, um total de 15 fórmulas moleculares foram atribuídas aos íons mais intensos (Tabela 1).

Tabela 1. Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. Os íons destacados em vermelho foram observados no controle.

m/z medido	Fórmula neutra	Compostos químicos
175,1196	$C_6H_{14}N_4O_2$	Arginina
118,0875	$C_5H_{11}NO_2$	Valina + 9 isômeros
118,0864	$C_5H_{11}NO_2$	Valina + 9 isômeros
116,0702	$C_5H_9NO_2$	Proline
153,0754	$C_5H_{12}O_5$	Xilitol, Ribitol ou Arabitol
225,0966	$C_8H_{16}O_7$	n.i.
189,1239	$C_8H_{13}NO_3$	Lactona N-butil-L-homoserina
286,1512	$C_{11}H_{16}N_4O_4$	Desoxicoformicina
136,0755	C_8H_9NO	Fenacilamina
165,0545	$C_9H_8O_3$	Fenilpiruvato + 8 isômeros
227,1025	$C_{10}H_{11}NO_4$	N-Benziloxicarbonilglicina + 2 isômeros
352,2485	$C_{20}H_{30}O_4$	Resolvina E2 + 13 isômeros
226,1804	$C_{13}H_{23}NO_2$	n.i.
318,3013	$C_{18}H_{39}NO_3$	Fitosfingosina
158,1541	$C_9H_{19}NO$	n.i.

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Análises dos metabólitos por UHPLC-ESI(-)-MS

A análise UHPLC-ESI(-)-MS foi realizada como análise complementar devido algumas moléculas ionizarem somente no modo de ionização negativo. A partir das análises por UHPLC-ESI(-)-MS/MS foram detectados 50 picos na amostra TCA-fermentado (Figura 3A) e 42 picos no TCA-controle (Figura 3B).

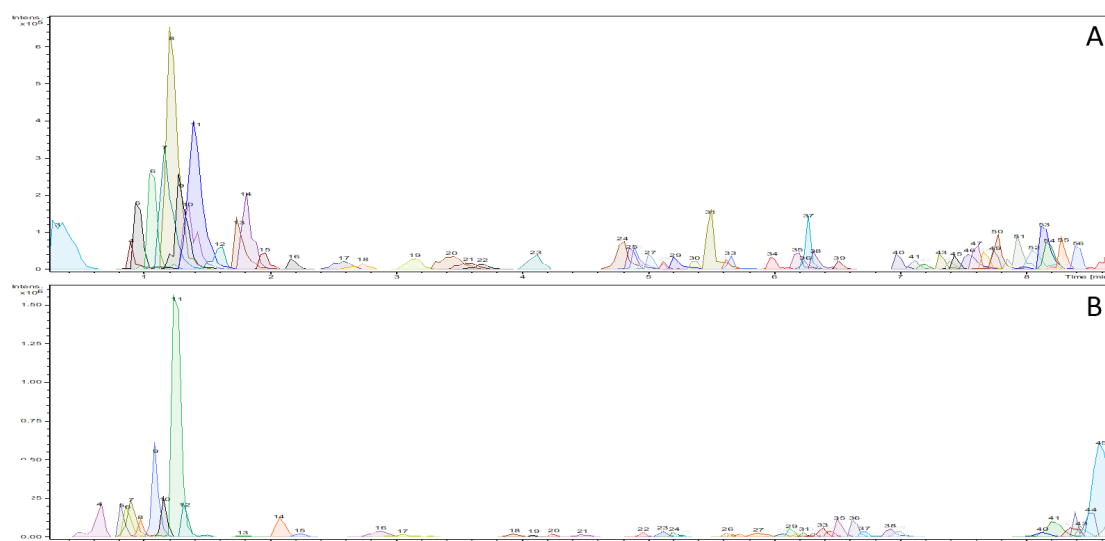


Figura 3. Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *S. commune* BRM 060008 e (B) TCA-controle.

Nos testes estatísticos, observou-se a separação de dois grupos referentes as amostras de TCA-fermentado de BRM 060008 e o TCA-control (Figura 4A).

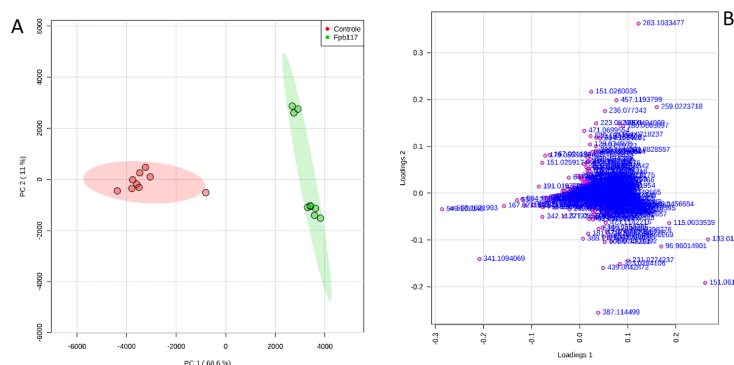


Figura 4. PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de *S. commune* BRM 060008 e TCA-control e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

Os íons mais influentes e intensos foram investigados e um total de 11 fórmulas moleculares foram atribuídas (Tabela 2).

Tabela 2. Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* Fpb117, analisadas por UHPLC(-)-ESI-MS/MS. Os íons destacados em vermelho foram observados no controle.

<i>m/z</i> medido	Fórmula neutra	Compostos
283,1044	$C_{11}H_{16}N_4O_5$	Coformicina
133,0137	$C_4H_6O_5$	Ácido málico
167,0211	$C_5H_4N_4O_3$	Urate
151,0260	$C_5H_4N_4O_2$	Xantina
257,0781	$C_{10}H_{14}N_2O_6$	Espongotimidina ou (1-ribosilimidazol) -4-acetato
267,0725	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	Inosina
164,0719	$C_9H_{11}NO_2$	Fenilalanina + 6 isômeros
225,0881	$C_{10}H_{14}N_2O_4$	Porfobilinogênio
200,0928	$C_9H_{15}NO_4$	Dihidroantcapsina
241,1192	$C_{11}H_{18}N_2O_4$	n.i.
275,1032	$C_{14}H_{16}N_2O_4$	n.i.

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Conclusão

A TCA-fermentado *Schizophyllum commune* (BRM 060008) apresentou alterações significativas na composição metabólica de torta de caroço de algodão, demonstrando ser favorável para degradar a lignina e produção de novos compostos, agregando valor a torta de caroço de algodão. Compostos químicos das classes dos lipídeos, aminoácidos, oligossacarídeos, nucleosídeos e nucleotídeos foram detectados no presente estudo.

Pela primeira vez foi possível identificar os compostos N-butil-L-homoserina lactona, di-hidroanticapsina e inosina, os quais não foram relatados na literatura relacionados com os fungos em estudo.

A abordagem metabolômica aplicada neste trabalho contribuiu grandemente para o entendimento do metabolismo fúngico de *Schizophyllum commune* em torta de caroço de algodão utilizando cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas *tandem* como ferramenta analítica. Esta ferramenta poderá ainda ser aplicada para estudos de outros fungos e biomassas gerando informações relevantes para a integração de cadeias produtivas de biodiesel (caroço de algodão), fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de nutrição animal (insumos), além de contribuir para estudos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica.

Referências

- BARBOSA, E. N. R. **Torta de algodão com suplementação enzimática para frangos de corte**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- CARVALHO, P. P. **Manual do algodoeiro**. Instituto de Investigação Científica Tropical, Portugal, 1996.
- CUNHA, J. R. B. P. **Processo de destoxificação da torta da semente de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) utilizando enzimas extracelulares de macrofungos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, 2017.
- GANGWAR, M.; SHANKAR, J. Molecular Mechanisms of the Floral Biology of *Jatropha curcas*: Opportunities and Challenges as an Energy Crop. **Frontiers in Plant Science**, 11, 2020.
- GOMES, T. G. et al. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: Encontro de pesquisa e inovação da Embrapa Agroenergia. **Anais**, 2015.
- GOODPASTER, A. M.; RAMADAS, E. H.; KENNEDY, M. A. Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR-and LC/MS-based metabolomics studies of urine from newborn babies. **Analytical chemistry** **83**, 896-902, 2011.
- LEE, J. A. Cotton as a world crop. **Cotton**, 1-25, 1984.
- MACHADO, A. E. V. **Casca de coco verde em combinação com outros resíduos agroindustriais para produção de cogumelos comestíveis**. União Pioneira da Integração Social, 2016.
- VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics** **7**, 142, 2006.
- ZHANG, W. J. et al. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science** **111**, 1-9, 2007.
- ZHU, N. et al. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. **Biotechnology for biofuels** **9**, 42, 2016.