



9º SIMPÓSIO DE
SEGURANÇA
ALIMENTAR



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS DO GUABIJU POR *Aspergillus brasiliensis*: UMA ABORDAGEM METABOLÔMICA

C. C. Martins¹, S. B. da Silva², D. M. Rossi³, R. R. da Silva⁴, E. Rodrigues⁵, G. D. Mercali⁶

1 – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-9793 – e-mail: (caroline.carboni@ufrgs.br)

2 – Escola Politécnica – Universidade do Vale do Rio dos Sinos – CEP: 93022-750 – São Leopoldo – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3591-1122 – e-mail: (susebs@unisinos.br)

3 – Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP 90035-007 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-2196 – e-mail: (daniele.misturini@ufrgs.br)

4 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – CEP: 14040-903 – Ribeirão Preto – SP – Brasil, Telefone: 55 (16) 3315-4221 – e-mail: (ridasilva@usp.br)

5 – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-9786 – e-mail: (eliseu.rodrigues@ufrgs.br)

6 – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-9849 – e-mail: (giovana.mercali@ufrgs.br)

RESUMO – A biotransformação de compostos por fungos pode alterar sua biodisponibilidade e propriedades. Neste estudo, foi aplicada uma abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massas para avaliar a biotransformação de compostos no cultivo de *Aspergillus brasiliensis* em guabiju (*Myrcianthes pungens*). O cultivo em estado sólido foi realizado por cinco períodos: 0, 3, 7, 10 e 15 dias. As amostras foram extraídas e analisadas via UHPLC-QTOF-MS. A análise de dados, realizada em R, excluiu *features* irrelevantes e manteve 2688 *features* para o modo negativo. A análise de componentes principais mostrou que cerca de 83% da variância dos dados foi explicada pelos primeiros dois componentes. Observa-se a influência do tempo de cultivo na modificação dos metabólitos do guabiju, com destaque para a liberação de ácido gálico, além do aumento significativo de ácido cítrico durante o período de cultivo. Esses resultados sugerem o impacto do cultivo fúngico na biotransformação dos compostos.



ABSTRACT – Biotransformation of compounds by fungi can alter their bioavailability and properties. In this study, a metabolomics approach based on mass spectrometry was applied to evaluate the biotransformation of compounds in the cultivation of *Aspergillus brasiliensis* on guabiju (*Myrcianthes pungens*). The solid-state cultivation was carried out over five periods: 0, 3, 7, 10, and 15 days. Samples were extracted and analyzed via UHPLC-QTOF-MS. The data analysis, performed in R, excluded irrelevant features and retained 2688 for the negative mode. Principal component analysis showed that approximately 83% of the data variance was explained by the first two components. The influence of cultivation time on the modification of guabiju metabolites was observed, with emphasis on the release of gallic acid, in addition to the significant increase in citric acid during the cultivation period. These results suggest the impact of fungal cultivation on the biotransformation of the compounds.

PALAVRAS-CHAVE: biotransformação; frutas nativas; metabólitos.

KEYWORDS: biotransformation; native fruits; metabolites.

1. INTRODUÇÃO

A biotransformação pode ocorrer através da modificação de compostos por microrganismos, como bactérias e fungos, muitas vezes modificando a sua biodisponibilidade e suas propriedades (Liang *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2022). Essas reações são alternativas interessantes em comparação com os processos químicos, especialmente por serem mais seletivas e produzirem um menor impacto ambiental (Hegazy *et al.*, 2015). Diversos compostos são metabolizados por microrganismos, como os fungos endofíticos, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Phomopsis*, resultando em produtos comercialmente importantes para as indústrias de biomedicina, agricultura, alimentos e biotecnologia (Torres-Mendoza, Ortega e Cubilla-Rios, 2020). Entretanto, é fundamental compreender as transformações metabólicas e a produção de compostos ao longo deste processo, pois os produtos resultantes dependem de fatores como potencial genético do microrganismo e parâmetros do cultivo.

Nesse sentido, a metabolômica é uma abordagem que possibilita avaliar as mudanças induzidas por processos complexos, como os que ocorrem nos processos fermentativos, facilitando a compreensão das transformações metabólicas presentes. O guabiju (*Myrcianthes pungens*) apresenta



uma rica composição química, destacando-se os compostos fenólicos (Spinelli *et al.*, 2023), possibilitando essas avaliações. Assim, uma abordagem metabolômica não direcionada foi utilizada para avaliar a biotransformação de compostos em cultivos fúngicos com *Aspergillus brasiliensis* em guabiju.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo fúngico

O cultivo em estado sólido foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de guabiju liofilizado e soluções de minerais e micronutrientes, esterilizados por autoclavagem (121 °C, 15 min), adaptado de Menezes, Rossi e Ayub (2017). Cada frasco foi inoculado com 1×10^8 esporos de *Aspergillus brasiliensis* previamente cultivados em ágar BDA (30 °C, 10 dias), e incubados a 30 °C por cinco períodos: 0, 3, 7, 10 e 15 dias. Controles negativos sem inoculação fúngica foram mantidos em condições idênticas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2 Preparo do extrato

Para aquisição de dados metabolômicos, as amostras provenientes do cultivo fúngico foram extraídas com solução de metanol-água acidificada com ácido fórmico 0,35% (v/v), através da mistura, agitação (180 rpm, 20 min) e centrifugação (12,000 g, 15 min). Posteriormente, os extratos foram diluídos, quando necessário, e filtrados (PTFE, 0,22 μ m) para análise via cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-QTOF-MS).

2.3 Análise via UHPLC-QTOF-MS

Dados de varredura completa não direcionados foram obtidos usando um UHPLC (Nexera X2, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas (Impact II MS, Bruker). As amostras foram, de forma randomizada, injetadas em uma coluna ACQUITY UPLC® column T3 (50 \times 2.1 mm, tamanho de partícula de 1,8 μ m). A fase móvel era composta de: (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. O UHPLC foi acoplado ao QTOF-MS com uma fonte ESI. Amostras controle (combinação de alíquotas de cada amostra) foram usadas para garantir a qualidade dos dados e auxiliar no processo de avaliação dos resultados (Broadhurst *et al.*, 2018).



2.4 Pré-processamento e análise dos dados

Os dados obtidos pela análise UHPLC-QTOF-MS foram processados usando o *software* livre MZmine2 (Pluskal *et al.*, 2010). A filtragem dos dados e a análise estatística foram realizadas usando R (versão 4.4.0). As *features* que não foram pelo menos 10 vezes maiores nas amostras de controle de qualidade (QCs) do que no branco do processo foram excluídas da análise. A análise foi então restrita a *features* que estão presentes em 100% dos QCs e aquelas com um coeficiente de variação menor que 30% nos QCs. Todos os dados foram transformados em \log_2 . Os dados foram analisados estatisticamente usando uma combinação de ferramentas: análise univariada (teste *t* e ANOVA, $p < 0,05$) e análise multivariada (análise de componentes principais).

2.5 Identificação dos compostos

Dados de fragmentação foram coletados de maneira semelhante ao descrito na seção 2.3. Os metabólitos determinados como de interesse foram identificados usando uma abordagem multifacetada, através da comparação com padrões, pesquisa em plataformas (GNPS), bancos de dados públicos e literatura. Além disso, os metabólitos foram anotados de acordo com as diretrizes da *Metabolomics Standard Initiative* (Sumner *et al.*, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** mostra o gráfico de análise de componentes principais (PCA) dos dados MS1. A PCA com todas as amostras e *features*, incluindo os controles de qualidade (QCs) (**Figura 1a**), indica que, pelo agrupamento dos QCs, que as medidas foram consistentes, uma vez que os QCs foram avaliados ao longo de toda a corrida e estão sobrepostos, demonstrando que amostras idênticas podem ser medidas de forma reprodutível. Os dados foram analisados comparando cultivo e controles (sem fungos) em cinco grupos de tratamento (0, 3, 7, 10 e 15 dias). Na **Figura 1b**, é possível observar que a componente principal 1 (PC1) é responsável por 77% da variância total, enquanto a componente principal 2 (PC2) explica cerca de 6%. O gráfico mostra uma separação clara entre amostras controle e cultivo no dia 0 (B e C0) e cultivadas (C3-C15) ao longo da PC1. Em relação a PC2, as amostras cultivadas a partir dos três dias (C3) foram visualmente separadas dos outros tratamentos, sugerindo diferenças entre tratamentos com tempos de cultivo variados.

Para avaliar essas diferenças, os resultados dos testes *t* univariados comparando os tratamentos C0 *versus* C7 e C7 *versus* C10 estão representados graficamente na **Figura 2**. Ao comparar C0 e C7, 926 *features* mostraram diferenças estatisticamente significativas, com pelo



menos o dobro da abundância relativa. Já a comparação entre C7 e C10 revelou apenas 62 features estatisticamente diferentes, com variação mínima de duas vezes na abundância relativa, demonstrando que as mudanças moleculares mais significativas ocorrem no dia 7 (C7). Dentre essas *features*, destaca-se o ácido cítrico, um composto presente naturalmente na matriz, mas que apresentou um expressivo incremento ao longo do tempo de cultivo. Produzido pelo ciclo de Krebs, o ácido cítrico é um metabólito característico de outras espécies do gênero *Aspergillus* e utilizado em diversas aplicações, como alimentos, bebidas e fármacos (Zhang, Zhang e Yang, 2013).

Figura 1 - Análise de componentes principais visualizando a estrutura de dados metabolômicos não direcionados com as amostras de QCs (a) e excluindo as amostras de QCs (b).

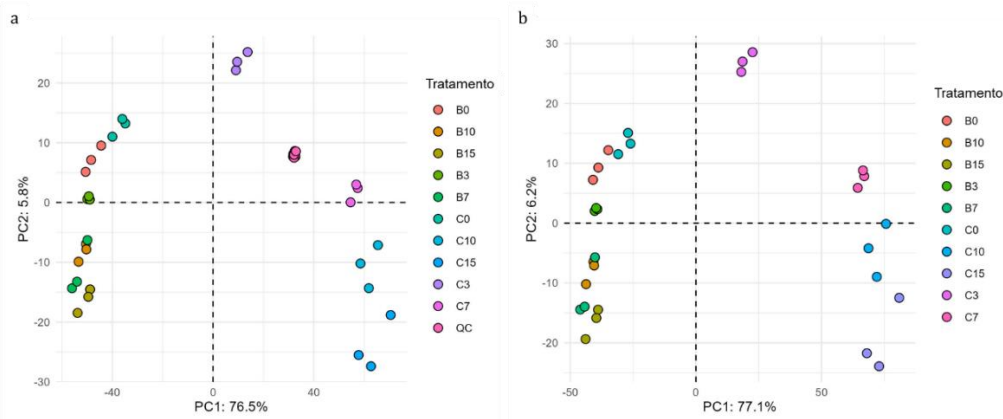
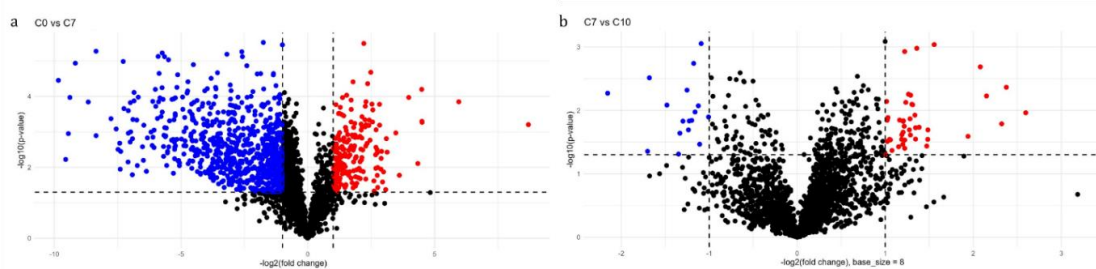


Figura 2 - Volcano plot de *features* detectadas por metabolômica no direcionada comparando: (a) C0 versus C7; (b) C7 versus C10.



Algumas *features* importantes, o ácido gálico e seu derivado, foram perdidas no processamento de dados no MZmine2 (Pluskal *et al.*, 2010). Assim, para sua identificação e discussão, foi realizada uma análise manual. Embora o ácido gálico também ocorra naturalmente no guabiju, o processo de cultivo parece também aumentar sua concentração. Esse efeito é provavelmente devido à liberação desse ácido fenólico simples a partir de taninos hidrolisáveis e galatos de (epi)catequina.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

4. CONCLUSÕES

As descobertas indicam que *A. brasiliensis* modula efetivamente a composição de compostos fenólicos, com destaque para o ácido gálico, e ácidos orgânicos, especialmente ácido cítrico. As mudanças nos perfis de metabólitos ressaltam a importância de otimizar as condições de fermentação para maximizar as propriedades funcionais dos alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROADHURST, David *et al.* Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. **Metabolomics**, v. 14, n. 6, p. 1–17, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>.

HEGAZY, Mohamed Elamir F. *et al.* Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 17–33, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2014.11.009>.

LIANG, Zijian *et al.* Impact of fermentation on the structure and antioxidant activity of selective phenolic compounds. **Food Bioscience**, v. 56, n. July, p. 103147, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103147>.

LIU, Tong *et al.* The interplays between epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and *Aspergillus niger* RAF106 based on metabolism. **Fungal Biology journal**, v. 126, p. 727–737, 2022.

MENEZES, Bruna da Silva; ROSSI, Daniele Misturini; AYUB, Marco Antônio Záchia. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12, 2017.

PLUSKAL, Tomáš *et al.* MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 2010.

SPINELLI, Liziane V *et al.* Uncovering the phenolic diversity of Guabiju fruit: LC-MS/MS-based targeted metabolomics approach. **Food Research International**, v. 173, n. 113236, 2023.

SUMNER, Lloyd W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

TORRES-MENDOZA, Daniel; ORTEGA, Humberto E.; CUBILLA-RIOS, Luis. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 2020.

ZHANG, Kun; ZHANG, Baohua; YANG, Shang-Tian. Production of citric, itaconic, fumaric, and malic acids in filamentous fungal fermentations. **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. 2013. p. 375–397.