

ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA A QUALIDADE DE GRÃOS E DERIVADOS

por Jessica Fernanda Hoffmann, Joseph Pesek, Moacir Cardoso Elias e Nathan Levien Vanier

A metabolômica é uma das tecnologias “ômicas”, que também inclui genômica, transcriptômica e proteômica, e consiste no estudo dos metabólitos presentes em amostras biológicas (alimentos, plantas, solo, sangue, urina, entre outros). Por meio da análise metabolômica é possível descrever quais são os metabólitos presentes em um organismo e em que concentração (relativa ou absoluta) eles se encontram. Como os metabólitos são altamente influenciados por fatores genéticos e ambientais eles representam muito bem o fenótipo.

Os trabalhos com metabolômica são realizados por meio de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta/ultra performance (HPLC e UPLC) e eletroforese capilar (CE). Cada técnica tem suas particularidades, vantagens e desvantagens. Bons aparelhos permitem a detecção – ou seja, a identificação e quantificação – de várias dezenas, até mesmo de algumas centenas de metabólitos simultaneamente, em uma mesma amostra biológica. No Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPEL, no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas (LACEM) é possível realizar estudos metabolômicos utilizando LC-MS e GC-MS.

Bom, mas em que tipos de amostras a metabolômica pode ser utilizada? Cabe destacar que a variedade é ilimitada. Pode se avaliar sangue e urina humanos, extrato de folhas, água do mar, linhagens celulares, petróleo, vinhos, sucos, grãos, bactérias e meios de cultura celular, por exemplo.

Na ciência e tecnologia de alimentos, ela é utilizada especialmente para a avaliação da segurança, da qualidade física, química e nutricional e dos efeitos do processamento nos alimentos.

Através da metabolômica é possível discriminar a origem das amostras e até mesmo avaliar se pesticidas e fertilizantes foram utilizados nos processos produtivos. Além disso, é possível diferenciar variedades de valor comercial distinto, como, por exemplo, arroz aromático, sucos, vinhos e óleos, bem como detectar fraudes em amostras adulteradas. Crucial para a metabolômica é o propósito de identificar biomarcadores, ou seja, compostos que se correlacionem com as doenças, a toxicidade, as variações genéticas ou as alterações ambientais.

Quando pensamos em qualidade de grãos, diversos aspectos vêm na mente: resistência a doenças, características físicas, aroma, valor nutricional, entre outras. Três são os pilares para avaliação da metabolômica em grãos e derivados (Figura 1): qualidade e segurança alimentar, saúde dos consumidores e processamento de alimentos.

A utilização da metabolômica pode iniciar na seleção e no melhoramento genético de grãos com alta qualidade, como, por exemplo, obtenção de grãos de milho com maior teor de carotenoides, até a descoberta de biomarcadores relacionados com a ingestão de alimentos e a ocorrência de doenças.



Figura 1. Pilares da análise metabolômica em grãos e derivados.

Adaptado de: Kim et al., Current Opinion in Biotechnology, 37:16-23, 2016.

Abaixo estão listados alguns exemplos de aplicação da análise metabolômica na área de grãos e derivados:

- Avaliação da adaptação das culturas frente à mudanças climáticas;
- Seleção e melhoramento de grãos com alta qualidade;
- Efeito de fatores pré-colheita na qualidade de grãos;
- Avaliação dos fatores pós-colheita que afetam a qualidade de grãos;
- Detecção de desordens fisiológicas;
- Seleção de biomarcadores para controlar as respostas biológicas;
- Garantia da segurança de organismos geneticamente modificados (OGM's);
- Avaliação de micotoxinas, pesticidas e agrotóxicos;
- Classificação de alimentos;
- Avaliação da adulteração e autenticidade dos alimentos;
- Relação entre atributos sensoriais e composição química;
- Controle de qualidade na indústria;
- Efeitos do processamento na composição dos alimentos;

Estratégias de avaliação

Existem quatro abordagens conceituais na metabolômica: análise direcionada, perfil de metabólitos, metabolômica e "impressão digital" (*fingerprinting* metabólico).

A análise direcionada é utilizada há muito tempo e inclui a identificação e quantificação de um grupo específico de metabólitos de interesse (alvos) usando uma técnica analítica que apresente o melhor desempenho para aqueles compostos. Como exemplo, pode-se citar a análise do perfil de isoflavonas em isolados proteicos de soja.

O perfil de metabólitos, por outro lado, visa à análise de um conjunto maior de compostos, ou seja, metabólitos que participem de uma ou mais vias metabólicas, e busca identificar e compreender a relação entre eles.

A metabolômica emprega metodologias analíticas complementares, por exemplo, LC-MS/MS, GC-MS e/ou RMN, a fim de determinar e quantificar o maior número possível de metabólitos, uma vez que cada tecnologia analítica apresenta afinidade por grupos diferentes de metabólitos.

A quarta abordagem conceitual é a impressão digital metabólica. Nesta, é gerada uma "assinatura metabólica" para cada amostra e depois elas são comparadas para detectar se há ou não diferenças entre as amostras. Se houver sinais (metabólitos) que possam discriminar significativamente entre as amostras, eles são identificados e a relevância biológica desse composto pode ser esclarecida, reduzindo consideravelmente o tempo de análise.

Etapas de uma análise metabolômica

Na Figura 2 está apresentado um esquema geral para a realização de uma análise metabolômica.

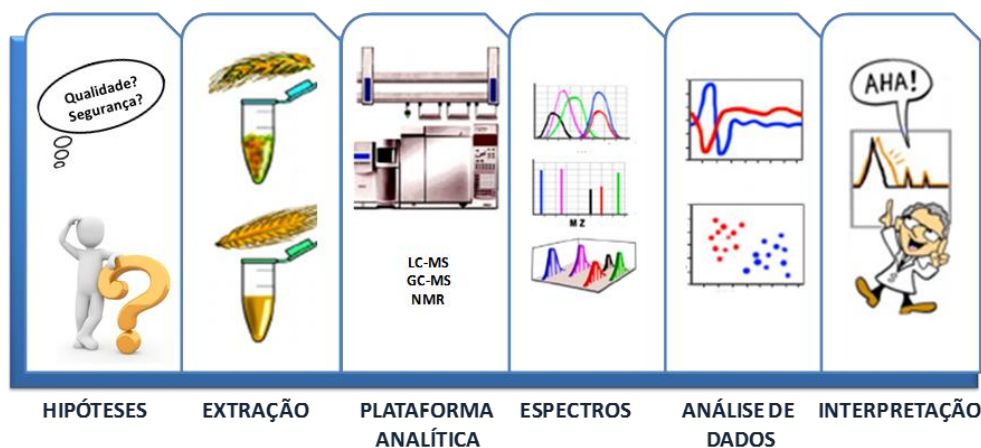


Figura 2. Etapas de uma análise metabolômica.

Primeiramente são definidas as hipóteses do trabalho e a estratégia de análise a ser utilizada. Após, a análise consiste no preparo da amostra (extração, separação e derivatização), na detecção (seleção da plataforma analítica) e na análise de dados.

Uma das principais diferenças entre as estratégias de análise é a etapa de extração. Nas análises direcionadas, é preciso utilizar solventes de extração, purificação e concentração compatíveis com o metabólito de interesse. Já para as análises não direcionadas, como não se deseja focar em um único grupo de metabólitos, pode-se utilizar solventes universais, como o metanol ou uma mistura de metanol-clorofórmio-água, que possibilitará a extração de uma ampla gama de compostos.

Após a obtenção do extrato, ele precisa ser analisado por uma ou mais das técnicas analíticas. Como comentado anteriormente, pode-se utilizar LC-MS, GC-MS, CE-MS ou RMN.

A seleção de qual técnica utilizar vai depender do metabólito ou grupo de metabólitos de interesse.

RMN é utilizada para a detecção de metabólitos altamente polares, enquanto GC-MS ou LC-MS são melhores para amostras contendo baixas concentrações de metabólitos voláteis e semi-polares, respectivamente.

Por fim, após a obtenção de dezenas ou centenas de metabólitos, é preciso extrair a informação biológica de interesse. Na etapa de análise de dados ocorre a identificação, quantificação e diferenciação dos metabólitos.

Como essas técnicas analíticas geram um grande número de compostos é preciso utilizar análise estatística multivariada (análise de componentes principais, análise de quadrados mínimos parciais, entre outras) para classificar e diferenciar as amostras. Dessa forma são encontrados metabólitos responsáveis (biomarcadores) pela diferenciação das amostras.

Exemplos de aplicações da metabolômica em arroz

Seleção de genótipos

A seleção de genótipos com características contrastantes é essencial para o melhoramento genético. Em um trabalho utilizando metabolômica por GC-MS, com seis genótipos de arroz aromático, foi possível diferenciar os genótipos através da variação do perfil de compostos voláteis (Yang et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56:2780-2787, 2008).

Os autores identificaram treze compostos responsáveis pela diferenciação do aroma do arroz, sendo eles: 2-acetil-1-pirrolina, hexanal, (E)-2-nonenal, octanal, heptanal, nonanal, 1-octen-3-ol, (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-nonadienal, 2-heptanone, (E,E)-2,4-decadienal, decanal, e guaiacol. Os autores comentam que a análise multivariada demonstrou que as variedades de arroz podem ser separadas e caracterizadas utilizando estes compostos, e que eles podem ser utilizados como marcadores no melhoramento genético de arroz quando o foco for aroma.

Em outro trabalho, os autores Daygon et al. (2016) utilizaram a metabolômica por GC-MS combinada com a análise sensorial para a discriminação de sete genótipos de arroz aromático das variedades indica e japônica, cultivados em dois ambientes diferentes (Ásia e Austrália). Nesse trabalho os compostos 2-AP, α -pineno, acetoína, limoneno, 2,3-butanediona, 2-acetilpirol foram considerados os marcadores de qualidade que diferenciam variedades indica e japônica aromáticas das variedades não-aromáticas.

Autenticidade e origem geográfica de arroz

A autenticidade de alimentos é considerada uma questão-chave na indústria de alimentos, pois visa proteger os interesses dos consumidores conscientes da qualidade de determinado produto, das partes interessadas (empresas, supermercados, etc.) e dos países importadores.

O arroz Basmati e Jasmine são reconhecidos mundialmente por serem produtos aromáticos e com valor agregado. A adulteração do arroz pode ocorrer desde as etapas da colheita até chegar aos consumidores. Cabe destacar que a adulteração pode ocorrer no arroz integral, no arroz polido, na farinha de arroz, no bolo de arroz e no óleo de farelo de arroz. Essa adulteração ocorre com a mistura de grãos não-aromáticos que tenham estrutura física semelhante a do arroz Basmati ou Jasmine.

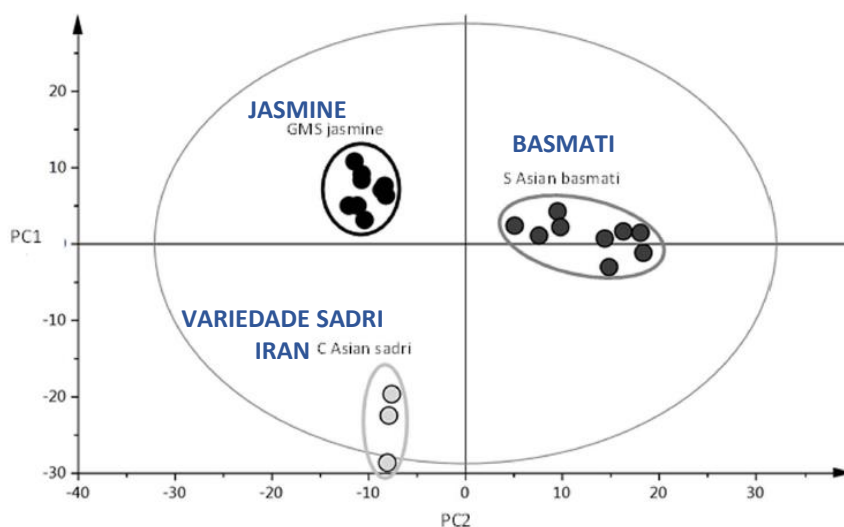


Figura 4. Autenticidade de arroz Jasmine e Basmati. Fonte: Calingacion et al., Plos One, 9, 2014.

Dessa forma, com o desenvolvimento das tecnologias analíticas é possível discriminar um arroz aromático de um arroz não-aromático. Diversos estudos estão sendo realizados nesse sentido, e já é possível através da análise metabolômica diferenciar esses produtos. De acordo com o local de cultivo, o solo, o método de preparo, entre outros, as amostras apresentam um perfil químico único (Figura 4).

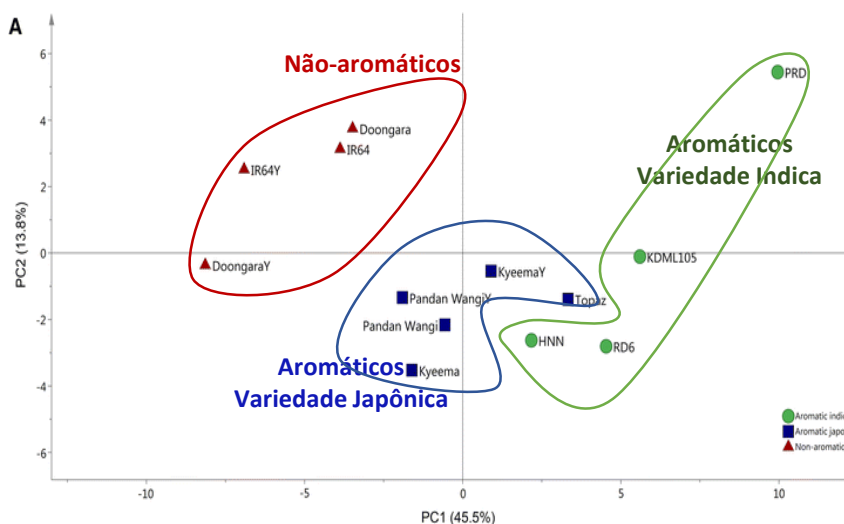


Figura 3. Diferenciação de genótipos das variedades indica e japônica. Adaptado de: Daygon et al., Metabolomics, 12:1-15, 2016.

Relação entre metabólitos e análise sensorial

A metabolômica também pode ser aplicada para correlacionar os metabólitos encontrados com os atributos sensoriais de arroz aromático. Daygon e colaboradores (2016) avaliaram o perfil de compostos voláteis por GC-MS e realizaram a análise sensorial de arroz Jasmine, correlacionando estes dados. Foram identificados diversos compostos que apresentam desde aroma sulfuroso até aroma de pipoca. Essa correlação está apresentada na tabela abaixo.

Tabela 1. Relação entre compostos aromáticos identificados por GC-MS e o aroma descrito na análise sensorial.

Compostos	Aroma
Sulfato de dimetilo	Sulfuroso
2-etilfurano	Pão
2-Acetil-1-pirrolina	Pipoca
2-Acetilpirrole	Pão
Indol	Animal
Limoneno	Limão, ervas
α -Pineno	Ervas doces
1-Hexanol	Gramma
2-Metil butanal	Fermentado
2-Octen-1-ol	Cogumelos
2,3-Butanediona	Crema, manteiga
Acetoína	Leite, manteiga
1-Butanol	Alcoólico, frutal

Adaptado de: Daygon et al., 2016.

Alterações durante o armazenamento

Pesquisadores do Centro de Pesquisa de Arroz dos Estados Unidos (USDA-ARS) observaram que não há alteração no perfil de compostos voláteis em arroz aromático armazenado por três meses a -10, 4 e 30 °C, quando comparados ao arroz recém-colhido.

Trabalhos realizados no LABGRÃOS

Professores e pesquisadores do Labgrãos-UFPEL também têm utilizado a metabolômica em trabalhos de pesquisa.

Em um trabalho colaborativo com a Embrapa Arroz e Feijão e a *Healthy Processed Foods Research Unit* do *United States Department of Agriculture (USDA, Califórnia)* serão avaliados diferentes genótipos de arroz aromático cultivados em seis localidades (três municípios do RS e três municípios de SP). A ideia principal no trabalho é ver como o perfil de compostos voláteis altera de acordo com o genótipo (quatro genótipos), o estado (RS x SP) e os municípios cultivados, visando a discriminação de origem geográfica e a agregação de valor ao arroz aromático produzido no Brasil. Para atender essa resposta será realizada uma análise não-direcionada por GC-MS a fim de identificar compostos que discriminem os genótipos e a origem geográfica dos produtos.



Dra. Jessica Fernanda Hoffmann
Pós-Doutoranda no Labgrãos
jessicafh91@hotmail.com



Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias
Labgrãos-DCTA-FAEM-UFPEL
eliasmc@uol.com.br



Prof. PhD Joseph J. Pesek
San Jose State University – CA, USA
joseph.pesek@sjsu.edu



Prof. Dr. Nathan Levien Vanier
Labgrãos-DCTA-FAEM-UFPEL
nathanvanier@hotmail.com