

Impressão digital metabólica de folhas de *Elaeis guineensis* em diferentes condições de preparo de amostra utilizando UHPLC-MS

Jorge Candido Rodrigues Neto¹, Luiz Henrique Galli Vargas², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Maria Esther Ricci da Silva⁴, Manoel Teixeira Souza Júnior⁵, Clenilson Martins Rodrigues⁶, Anselmo Elcana de Oliveira⁷, Patrícia Verardi Abdelnur⁸

Resumo

Neste trabalho, é apresentado um protocolo de alta eficiência para extração e detecção de metabólitos em folhas de dendê (*Elaeis guineensis*) utilizando UHPLC-MS com posterior tratamento estatístico de dados no modelo ASCA (*ANOVA simultaneous component analysis*). O objetivo é comparar a impressão digital metabólica quando diferentes métodos de coleta e extração são empregados, simulando coleta em locais remotos, onde normalmente são localizadas as plantações de dendê. A partir desses resultados, buscou-se verificar qual o melhor método de preparo de amostra de modo a manter a integridade dos metabólitos presentes nas folhas.

Introdução

O óleo de dendê é o mais consumido no mundo, dentre os óleos vegetais, com 35,05% do mercado em 2014/15. Originário da África, tem no seu mesocarpo a maior fonte de óleo vegetal do mundo e foi trazido ao nosso país pelos escravos no século XVII (ALVES et al., 2011). Além de ser utilizado na culinária há muitos anos, também é usado na produção de sabões e produtos de limpeza, cosméticos, farmacêuticos, plásticos, lubrificantes e na produção de biodiesel (DENDÊ ..., 2007). Sua cultura é afetada por doenças ou condições anômalas, como o

¹ Químico, mestrando em Química, Universidade Federal de Goiás, jorgecrn@hotmail.com

² Engenheiro-agrônomo, mestre em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, zealotrs@gmail.com

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, esthericci@hotmail.com

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Patologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manael.souza@embrapa.br

⁶ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em Química, Universidade Federal de Goiás, elcana.iqf@gmail.com

⁸ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

amarelecimento fatal (AF), que pode afetar uma ou mais vias metabólicas da planta e demanda um estudo de suas causas.

A estratégia metabolômica tem como uma de suas vertentes a impressão digital metabolômica (*metabolic fingerprinting*), que consiste na análise rápida e eficiente dos analitos detectáveis e posterior análise multivariada de diferentes amostras com relação à intensidade de picos cromatográficos ou sinais de espectros de massas (ABDELNUR et al., 2014). Técnicas hífenadas são amplamente utilizadas nessa estratégia por promoverem a separação de misturas complexas antes da detecção e identificação de compostos presentes na amostra (FIEHN, 2001). O uso de cromatógrafos a líquido de ultra-alta eficiência, como o UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS) permite a obtenção de *screening* com alta sensibilidade e rapidez, além de permitir a elucidação de compostos químicos.

Assim, neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de um protocolo analítico para a obtenção da impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*) de folhas de *Elaeis guineensis*. O protocolo consiste na análise por UHPLC-MS, quando diferentes métodos de transporte e extração são empregados, seguido do tratamento de dados multivariados, para que sejam identificados compostos característicos de cada grupo de amostras. Dessa forma, é possível determinar a melhor condição de extração do maior número de metabólitos possíveis ou na investigação de metabólitos específicos.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo da impressão digital metabólica de folhas de dendê simulando coleta em campo e transporte de amostras utilizando três condições: nitrogênio líquido, gelo seco e temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento da extração e análise, que aconteceram 24 horas depois.

Outro fator que influencia na análise metabolômica é o solvente utilizado na extração dos metabólitos. Portanto, três solventes foram utilizados, sendo eles: i) etanol 100%, ii) etanol 70% e iii) etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.

Foram realizadas análises por UHPLC-ESI(+)-MS em quintuplicata analítica (Tabela 1). De forma a avaliar as variações metabólicas de um grande número de

amostras e de variáveis (espectros de massas complexos), fez-se necessário o uso da ferramenta estatística ASCA (*ANOVA simultaneous component analysis*).

Tabela 1. Amostras de folha de dendê analisadas por UHPLC-ESI(+)-MS sob diferentes condições de transporte (TA, gelo e N₂) e extração (100E, 70E e FA70E).

Número amostra (#)	Condição de transporte	Solvente de extração	Replicata
1-5	TA	100E	R1-R5
6-10	TA	70E	R1-R5
11-15	TA	FA70E	R1-R5
16-20	Gelo	100E	R1-R5
21-25	Gelo	70E	R1-R5
26-30	Gelo	FA70E	R1-R5
31-35	N ₂	100E	R1-R5
36-40	N ₂	70E	R1-R5
41-45	N ₂	FA70E	R1-R5

TA = temperatura ambiente; N₂ = nitrogênio líquido; 100E = etanol 100%; 70E = 70:30 etanol:água; FA70E = 70:30 etanol:água + 0,1% ácido fórmico.

Os experimentos de UHPLC-ESI-MS foram realizados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) equipado com coluna de fase-reversa *Acquity UPLC BEH C8* (1,7 μm, 2,1x150 mm) (Waters Technologies, Estados Unidos). O espectrômetro de massas utilizado foi o modelo Maxis 4G (Bruker Daltonics, Alemanha), equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador de massas de alta resolução tipo TOF (*Time of flight*).

Após o tempo de transporte e armazenamento, microtubos de 2 mL contendo 100 mg de cada amostra de folha descrita na Tabela 1 foram submetidos à extração de metabólitos secundários baseada em método previamente descrito (TAHIR et al., 2012). Posteriormente, 0,2 μL de amostra foram injetados no sistema cromatográfico com gradiente de fase móvel e fluxo de 400 μL/min em corridas cromatográficas de 22 minutos.

Os dados foram adquiridos pelo *software HyStar Application*, versão 3.2. Para elucidar a fórmula molecular dos íons detectados, foi utilizado o algoritmo *SmartFormula (DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha). No

tratamento estatístico foi utilizado o *software* MatLab, versão R2014b (The MathWorks Inc, Estados Unidos) e o *software* PLS Toolbox versão 7.9 (Eigenvector Research Inc, Estados Unidos), contemplando as corridas cromatográficas de 0,6 a 10 minutos (em que os picos cromatográficos de interesse se apresentaram), na faixa de m/z 80 a 1200. Os compostos foram relacionados às respectivas massas utilizando-se o algoritmo FMF (*Find Molecular Features*).

Resultados e discussão

Os cromatogramas de pico-base (BPC – *Base Peak Chromatogram*) são mostrados na Figura 1, em que a média de 44, 50 e 54 picos cromatográficos foram atribuídos, na análise por ESI(+)-MS, aos métodos de extração 100E, 70E e FA70E, respectivamente, com uso do algoritmo FMF (Bruker Daltonics, Alemanha).

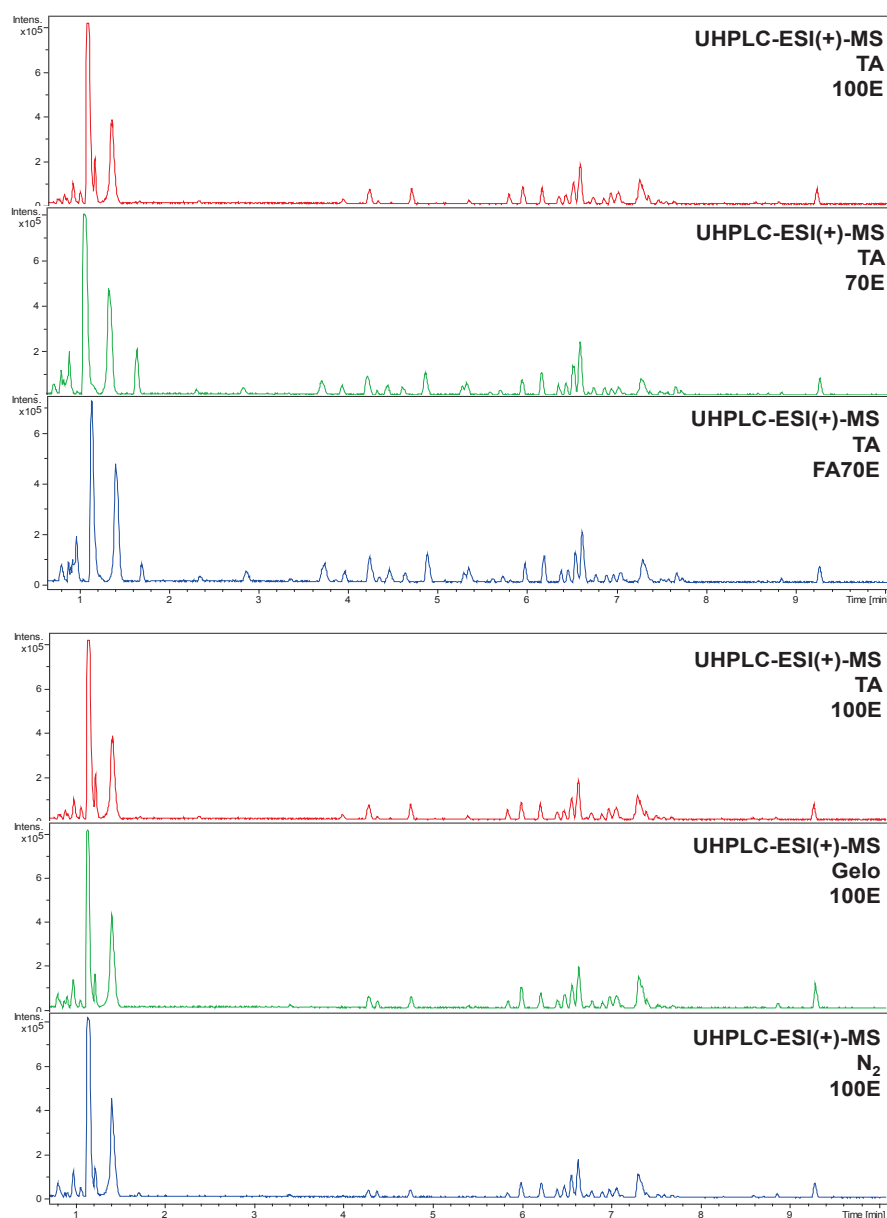


Figura 1. Cromatogramas de pico-base (BPC) de extratos de dendê em diferentes métodos de transporte e solventes de extração.

TA: temperatura ambiente; 100E: etanol 100%; 70E: etanol 70%; FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.

Os efeitos de transporte e solvente foram avaliados por modelos de análise de componente principal (PCA – *Principal Component Analysis*) e são apresentados na Figura 2a. Houve a discriminação de três grupos de acordo com condições de transporte, assim como de solventes. As avaliações foram feitas considerando-se valores de *loadings* maiores que 0,1 e menores que -0,1. Na Figura 2b e Tabela 2, são mostrados os dois íons de cada grupo com maior relevância estatística para a separação das variáveis nos gráficos de *score*.

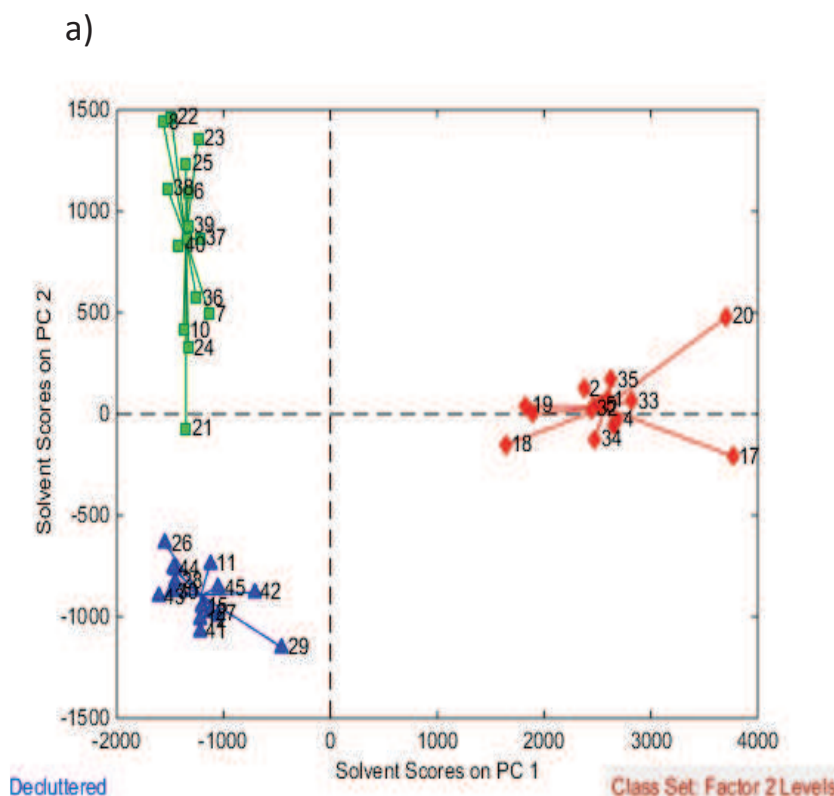


Figura 2. Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo à separação de grupos. b) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70%; azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon m/z 147,044 é um fragmento do íon m/z 379,0528.

b)

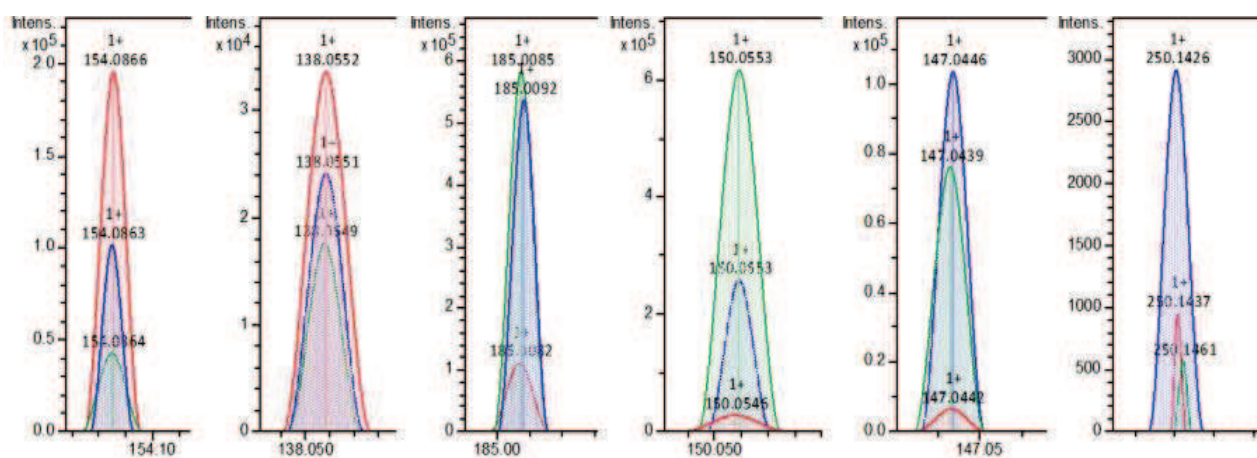


Tabela 2. UHPLC-ESI(+)-MS para análise do efeito de solvente.

Loadings		Tempo de retenção (min)	m/z	Intensidades médias			Fórmula empírica	Principal condição
PC1	PC2			100E	70E	FA70E		
0,2395		1,17	154,086	597.342	97.740	188.458	C ₈ H ₁₂ NO ₂	100E
0,1167	0,1365	1,04	138,057	456.791	350.454	377.669	C ₇ H ₇ NO ₂	100E
-0,3373	0,2494	1,17	185,009*	151.801	1.443.287	1.145.015	C ₇ H ₄ O ₆	70E
-0,1520	0,4891	1,74	150,055	38.666	739.486	142.659	C ₈ H ₇ NO ₂	70E
-0,1396		4,92	147,044	13.574	186.457	207.316	C ₉ H ₆ O ₂	FA70E
	-0,1380	5,41	250,144	3.027	2.885	52.146	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	FA70E

Na análise por ESI(+)-MS, 22 metabólitos destacaram-se na separação dos grupos na análise estatística. Os metabólitos m/z 154,086: rt 1,17 min (C₈H₁₂NO₂) e m/z 138,057: rt 1,04 min (C₇H₇NO₂) foram majoritariamente extraídos quando utilizado etanol 100% (100E), enquanto os metabólitos m/z 185,009: rt 1,17 min (C₇H₄O₆) e m/z 150,055: rt 1,74 min (C₈H₇NO₂) foram melhor detectados com uso de etanol 70% no processo de extração. Usando etanol 70% + 0,1% de ácido fórmico, os metabólitos m/z 147,044: rt 4,92 min (C₉H₆O₂) e m/z 250,144: rt 5,41 min (C₁₄H₁₉NO₃) foram melhor extraídos. Esses resultados mostram que metabólitos são extraídos em diferentes intensidades dependendo do solvente utilizado. Espectros de massas ESI(+)-MS foram analisados (Figura 2b) para confirmar os dados obtidos pelo ASCA.

Com relação ao efeito de transporte, 18 metabólitos destacaram-se na separação dos grupos na análise estatística e foram analisados seguindo os mesmos critérios do efeito de solvente. Os dados de ASCA e espectrometria de massas são mostrados na Figura 3 e Tabela 3.

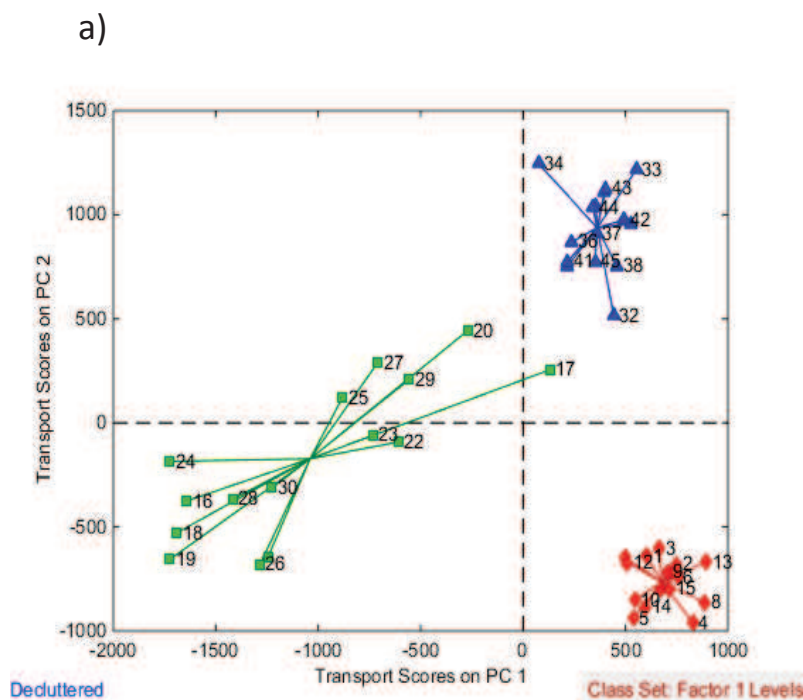


Figura 3. Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de transporte. a) Gráfico de scores relativos à separação de grupos. b) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado.

Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo; azul: nitrogênio líquido.

b)

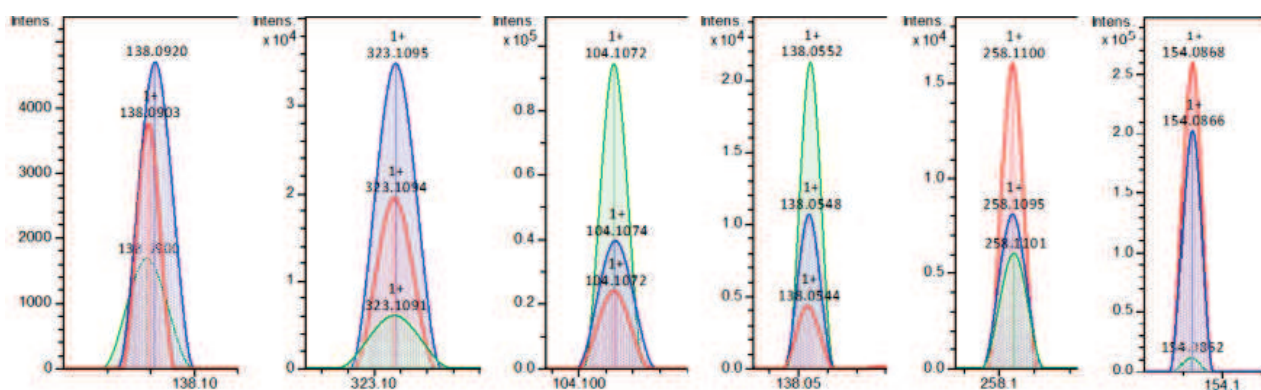


Tabela 3. UHPLC-ESI(+)-MS para análise do efeito de transporte.

Loadings	Tempo de retenção (min)	m/z	Intensidades médias			Fórmula empírica	Principal condição	
			TA	Gelo	N ₂			
0,1033	1,39	138,091	67.947	41.045	73.970	C ₈ H ₁₁ NO	N ₂	
	0,1128	4,39	323,110	41.675	35.385	69.941	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	N ₂
-0,1376	0,94	104,107	108.105	170.064	110.319	C ₅ H ₁₃ NO	Gelo	
-0,1219	1,04	138,057	427.995	430.030	326.888	C ₇ H ₇ NO ₂	Gelo	
0,1612	-0,1357	0,98	258,110	100.907	23.710	38.581	C ₈ H ₁₉ NO ₃	TA
0,1457	1,17	154,086	339.210	220.618	323.712	C ₈ H ₁₂ NO ₂	TA	

Os metabólitos com m/z 138,091: rt 1,39 min ($C_8H_{11}NO$) e m/z 323,110: rt 4,39 min ($C_{16}H_{18}O_7$) foram detectados em maior intensidade utilizando nitrogênio líquido como transporte. Já os metabólitos com m/z 104,107: rt 0,94 min ($C_5H_{13}NO$) e m/z 138,057: rt 1,04 min ($C_7H_7NO_2$) foram melhor extraídos quando transportados em gelo. Os metabólitos m/z 258,110: rt 0,98 min ($C_8H_{19}NO_3$) e m/z 154,086: rt 1,17 min ($C_8H_{12}NO_2$) foram detectados em maior intensidade quando transportados em temperatura ambiente.

O método de análise multivariada ASCA foi aplicado à estrutura de dados gerada pelas *bucket tables*, com escalonamento Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes. Os fatores de transporte e solvente foram estatisticamente significantes ($P = 0,05$) e, dentre os dois fatores, o efeito do solvente (48,37) foi indicado como o mais importante em relação ao efeito do transporte (9,34).

Conclusão

O protocolo de extração e transporte se mostrou eficiente na análise da impressão digital metabólica de folhas, evidenciando a diferença nas intensidades de massas de certos metabólitos extraídos quando diferentes solventes ou modos de transporte são empregados. A análise multivariada permitiu a distinção de grupos que podem ser avaliados quando metabólitos específicos são investigados, como o íon m/z 154,086 que está presente em todas as amostras, mas é melhor extraído com uso de etanol 100% ou o íon m/z 138,091, que é melhor extraído quando transportado em nitrogênio líquido. O uso de nitrogênio líquido é o mais indicado por promover o *quenching* dos metabólitos, mas foi observada uma influência com uso de diferentes solventes. Assim, foi estabelecido um protocolo analítico confiável de preparo de amostra ao tratamento estatístico dos dados para prospecção de analitos previamente reportados ou novos, utilizando métodos cromatográficos rápidos e com alta sensibilidade. Na próxima etapa do projeto, será feita a identificação dos compostos por UHPLC-ESI-MS/MS e comparação dos fragmentos com a literatura existente e com bancos de dados públicos de metabolômica.

Apoio financeiro

Os autores agradecem à Embrapa, Capes, Finep e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

ALVES, S. A. O.; DE LEMOS, O. F.; DOS SANTOS FILHO, B. G.; DA SILVA, A. L. L.. In vitro protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2011.

DENDÊ: produtos, mercado e potencialidade. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007. 1 folder.

ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 22, p. 1-9, 2014.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, Sussex, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

TAHIR, N. I.; SHAARI, K.; ABAS, F.; PARVEEZ, G. K. A.; ISHAK, Z.; RAMLI, U. S. Characterization of apigenin and luteolin derivatives from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 45, p. 11201-11210, 2012.