

Desenvolvimento de protocolo analítico para raízes de dendê utilizando UPLC-ESI-Q-TOF-MS

Maria Esther Ricci-Silva¹, Jorge C. Rodrigues Neto^{1,2*}, José Antônio de Aquino Ribeiro¹, Clenilson Martins Rodrigues¹, Patrícia V. Abdelnur^{1,2}.

Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) possui uma alta produção de óleo, sendo, portanto, uma matéria-prima promissora para a produção do biodiesel (EDEM et. al., 2002). No entanto, esta cultura é afetada pelo “amarelecimento fatal (AF)”, uma doença que resulta na morte das plantas (BERGMAN et. al., 2013). A análise dos compostos químicos presentes no dendê pode auxiliar na descoberta da causa do AF.

Este trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento de protocolo analítico na extração de metabólitos secundários presentes na raiz de dendê, assim como a análise preliminar das frações polar e apolar do extrato, feita por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com o intuito de, futuramente, analisar folhas com e sem sintomas de AF identificando as diferenças químicas decorrentes da doença.

Diversos trabalhos mostram resultados da identificação de metabólitos em frutos (TEH et al., 2013) e folhas (HASHIM et al., 2013), assim como proteínas em raiz (AL-OBAIDI, 2014), mas não são mostrados resultados de metabólitos em raiz, o que torna o presente trabalho inovador em seu objetivo, já que os metabólitos encontrados na raiz provavelmente serão diferentes dos encontrados em outras partes da planta.

Métodos

A raiz foi coletada na Embrapa Agroenergia, armazenada a -80°C e seus metabólitos foram extraídos com metanol (LISEC et. al., 2006). Foram pesados 100 mg de raiz em tubos eppendorff, sendo feitas 3 réplicas biológicas. As raízes foram trituradas em moinho de bolas utilizando 2 esferas de metal de 3 mm usando nitrogênio líquido. Foram adicionados 1,4 mL de metanol 100% e 20 µl de ampicilina (2.5 mg/ml), sendo vortexados. A seguir, os tubos foram agitados em bloco thermomixer a 70°C durante 10 minutos a 600 rpm. Os tubos foram centrifugados a 11.000G por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo maior, onde foram adicionados 750 µl de clorofórmio e 1400 µl de água milli-Q, posteriormente vortexados. Foi feita a centrifugação a 3.000G durante 15 minutos e 150 µl do sobrenadante e 150 µl da fase inferior (apolar) foram transferidos para um tubo

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil, 74001-970.

*jorge.rodrigues@colaborador.embrapa.br

ependorff e solubilizada em isopropanol:acetonitrila (3:7). A parte superior foi solubilizada em água. Para as análises por cromatografia líquida, foi utilizado o sistema Nexera X2 (Shimadzu). A coluna utilizada foi a Acquity UPLC BEH C8 (1.7 um 2.1x150 mm) (marca Waters), mantida a 45°C. A fase móvel foi composta por solução A (100% água milli-Q), solução B (100% acetonitrila), solução C (5% ácido fórmico) e solução D (100% isopropanol), com fluxo de 0.4 mL/min e programa de gradiente. A análise no espectrômetro de massas MaXis 4G (Bruker Daltonics) foi realizado no modo positivo, voltagem do capilar +4000V, fonte a 200°C, sob fluxo de nitrogênio de 9 L/min e 4 bar, *end plate offset* 500V, range de massas m/z de 90 a 1200, tune funnel 1RF 200 Vpp, energia de colisão 8 eV, transfer time 100 us, colisão RF 800 Vpp, pré-pulse storage 10 us, range de spectra 2 Hz. Os dados foram adquiridos através do software otof control versão 3.4 (Bruker Daltonics) e Hystar versão 3.2 (Bruker Daltonics). Posteriormente, os dados cromatográficos e espectros obtidos foram analisados com auxílio do software DataAnalysis versão 4.2 (Bruker Daltonics).

Resultados e Conclusões

Foram detectados 106 compostos na fração polar do extrato da raiz de dendê utilizando UHPLC-MS. Alguns picos co-eluíram, nos tempos de 5 a 12 min e 15 a 18 min. Nas próximas etapas, serão realizadas alterações no gradiente do solvente a fim de obter maior resolução na separação dos compostos. A fração apolar ainda não foi avaliada e faz parte dos próximos passos do projeto, assim como a otimização do método para análise de MS/MS para identificação dos compostos detectados. Assim que o protocolo estiver desenvolvido, ele será utilizado para a comparação metabólica de raízes de dendê com e sem sintomas de AF.

Apoio Financeiro

Embrapa, CAPES e FINEP.

Referências

- AL-OBAIDI, J. R. Identification of Proteins of Altered Abundance in Oil Palm Infected with *Ganoderma boninense*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 5175-5192, 2014.
- BERGMANN, J. C. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, n. 3-4, p. 319-341, 2002.
- HASHIM, T., RAMLI, U. S. Identification of oil palm (*Elaeis guineensis*) spear leaf metabolites using mass spectrometry and neutral loss analysis. **Journal of Oil Palm Research**, v. 25, n. 1, p. 72-83, 2013.
- LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387-396, 2006.
- TEH, H. F. et al. Differential metabolite profiles during fruit development in high-yielding oil palm mesocarp. **Plos One**, v. 8, n. 4, e61344, 2013.