

# Ferramentas metabolômicas aplicadas na identificação de marcadores químicos relacionados ao amarelecimento fatal em folhas de *Elaeis guineensis*

Mauro Vicentini Correia<sup>1</sup>, Augusto Lopes Souto<sup>2</sup>, José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>3</sup>, Patrícia Verardi Abdelnur<sup>4</sup>, Clenilson Martins Rodrigues<sup>5</sup>

## Resumo

A palma de óleo ou dendezeiro é uma das culturas vegetais mais rentáveis no mundo. Além do óleo da polpa do fruto, com 34% do mercado, também há exploração comercial da casca, das fibras, do óleo da amêndoa (palmiste) e do cacho vazio do dendezeiro em diversos segmentos industriais. Nas regiões produtoras da América Latina, incluindo o Brasil, a produção do dendê é ameaçada por uma anomalia desconhecida e denominada como amarelecimento fatal (AF), essa condição diminui significativamente a produção do dendezeiro e pode matar a planta. Apesar de ter sido bastante estudado, ainda não se conhece a causa do AF. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores químicos relacionados à ocorrência do AF, utilizando abordagens metabolômicas. As técnicas de análise utilizadas nesta abordagem foram cromatografia acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS). Foram identificadas como marcadores 13 substâncias, sendo 10 detectados pelo modo de ionização ESI(+)-MS e 3 identificados por ESI(-)-MS. Uma estrutura proposta foi confirmada, com base em dados do banco de dados *Metlin* e experimentos de fragmentação (MS/MS).

## Introdução

Das principais espécies vegetais exploradas comercialmente, a palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma das culturas mais rentáveis no mundo.

<sup>1</sup> Farmacêutico, doutor em Química, Universidade de São Paulo, mauro.correia@colaborador.embrapa.br

<sup>2</sup> Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, agosto.souto@colaborador.embrapa.br

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

<sup>4</sup> Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

<sup>5</sup> Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Além do óleo da polpa do fruto, também há exploração comercial da casca, das fibras, do óleo da amêndoa (palmiste) e do cacho vazio do dendezeiro em diversos segmentos industriais (BARCELOS et al., 2015).

O óleo de *E. guineensis* é o mais consumido no mundo dentre os óleos vegetais, com 34% do mercado em 2015, seguido pelo óleo de soja com 29%. Em 2015, a produção de óleo de dendê foi de 60,8 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores a Indonésia e a Malásia, com 85% da produção mundial (ESTADOS UNIDOS, 2016).

O maior entrave na manutenção e expansão da cultura de *E. guineensis* são as doenças, que provocam a diminuição significativa na produção. No Brasil e em outros países da América Latina, como Colômbia e Equador, a produção do dendê é ameaçada por uma anomalia desconhecida e denominada como amarelecimento fatal (AF), uma condição que pode matar a planta (BOARI, 2008). Apesar de ter sido bastante estudada, ainda não foi possível encontrar a causa dessa anomalia e não há evidências de que seja provocada por agentes bióticos como fungos, bactérias, fitoplasma ou viróides (BARCELOS et al., 2015). No entanto, a causa biótica ainda não foi descartada. Por outro lado, há estudos que apontam a origem do AF como sendo um fator abiótico, existindo evidências de que o surgimento do AF no espaço e no tempo não segue padrões de doenças causadas por fitopatógenos; também há relatos de que áreas próximas de cursos de água e com drenagem ineficiente possuem maior incidência de AF (BERGAMIN et al., 1998).

A partir do estudo da composição química de plantas com e sem AF é possível empregar ferramentas metabolômicas para tentar encontrar possíveis vias que são influenciadas. A metabolômica pode ser descrita como o estudo sistemático dos “rastros” deixados por processos celulares específicos em um determinado momento. Esses “rastros”, uma vez identificados, podem revelar o perfil fisiológico de uma célula, tecido ou órgão em um momento determinado (POULSON-ELLESTAD et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi empregar ferramentas metabolômicas no estudo do AF. A estratégia foi analisar extratos de folhas de *E. guineenses* com o uso de técnicas cromatográficas e espectrométricas, seguido de análises estatísticas, e indicar os grupos de metabólitos contrastantes entre amostras de *E. guineenses* com e sem AF.

## Materiais e métodos

### Coleta do material vegetal

As folhas e raízes de plantas de *Elaeis guineenses* (dendê) foram coletadas no Município de Moju, no Estado do Pará, nas áreas de plantio da empresa Marborges Agroindústria S. A. Foram coletadas folhas e raízes de 8 plantas sadias e de 8 plantas anômalas (com AF).

### Pré-tratamento do material vegetal

O material botânico (folhas de dendê) foi lavado em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 2 min, em seguida foi lavado em água corrente, lavado com água destilada e finalmente seco com papel toalha. Após isso, foi acondicionado em papel pardo, identificado, introduzido em estufa de circulação e renovação de ar a 40 °C até adquirir peso constante. Após a secagem, as folhas foram trituradas utilizando-se moinho de facas.

### Preparo dos extratos

Pesou-se, em tubo falcon de 50 mL, 1 g de material vegetal (folhas trituradas), em seguida 10 mL de solução etanol 70% foi adicionada ao tubo, que foi submetido por 5 min a um banho de ultrassom à temperatura ambiente. A amostra foi retirada do banho de ultrassom e adicionou-se 15 mL da solução etanol 70% para completar a proporção de 1 g de folha pulverizada para 25 mL de solução, e novamente a amostra foi submetida por 5 min ao banho de ultrassom.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 9000 rpm por 10 min, depois o sobrenadante foi filtrado, em papel filtro, para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado para 25 mL com solução de etanol 70%. Uma alíquota de 3 mL do extrato hidroalcoólico foi submetida ao processo de extração em fase sólida (SPE), cartucho C18 de 500 mg, com o objetivo de retirar o excesso de clorofila.

Foi coletado 1,3 mL de cada amostra de extrato hidroalcoólico passada por SPE, em um “*vial*” de 1,5 mL. O procedimento foi realizado para cada uma das 16 amostras de folhas, 8 anômalas (F1-F8) e 8 sadias (F9-F16).

## Cromatografia líquida com detecção espectrométrica

As análises dos extratos de folhas de *E. guineensis* foram realizadas nos seguintes equipamentos: UHPLC Nexera X2 (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas maXis-4G (Q-TOF) (Bruker). Utilizou-se a coluna Acquity UPLC® HSS T3 C18 (150 mm de comprimento; 2,1 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 1,8 µm), a temperatura da coluna foi de 40 °C e o volume de injeção de 1 µL. As condições cromatográficas foram: fluxo de 0,4 mL/min; fase móvel A - água Milli-Q + 0,1% ácido fórmico e a fase B - acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico; utilizou-se o gradiente de eluição 4-30-90% de B com um aumento linear de 0-12-15, e 90% de B entre 15-16 min. As condições do espectrômetro de massas maXis-4G foram as seguintes: condições da fonte – *nebulizer gas* (N<sub>2</sub>) em 4,0 bar; *dry gas* (N<sub>2</sub>) em 8,0 L/min; *dry temperature* em 200 °C; *capillary voltage* em 3,5 KV. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo com ionização por *eletrospray* (ESI), a faixa de massas foi de 70 – 1000 *m/z*. A aquisição dos dados foi realizada no software HyStar Versão 4.2.

## Tratamento dos dados e análise estatística

Os dados brutos foram exportados para o formato mzXML utilizando-se o software DataAnalysis versão 4.2 (Bruker Daltonik GmbH), em seguida foi realizado o “*upload*” dos dados para o servidor do software XCMS versão on-line. Os dados foram processados utilizando-se a opção “*pairwise*” e com os parâmetros otimizados para UPLC / Bruker Q-TOF nos modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS. O método estatístico utilizado para avaliar as diferenças entre as plantas com e sem AF foi o teste paramétrico não pareado t-test (*Welch t-test*). A identificação dos íons foi realizada, de maneira automatizada, com busca na base de dados *Metlin*.

## Resultados e discussão

### Separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS)

A partir dos resultados de sobreposição dos cromatogramas das 16 amostras de extrato de folhas, analisadas por UHPLC-MS, ficou evidenciado que não era possível discriminar entre as amostras com e sem AF por simples inspeção visual,

assim foi necessário o uso de ferramentas estatísticas. Nesse conjunto de dados, a amostra F15 (amostra de folha saudável) foi considerada *outlier* e retirada do *set*.

## Tratamento dos dados de UHPLC-MS/MS

O software XCMS é utilizado para análises de *metabolômica “untargeted”*, realizando desde o processamento dos dados brutos e alinhamento dos tempos de retenção até análise estatística e identificação de metabólitos. As etapas básicas da análise foram: detecção de picos, correspondências dos picos entre amostras e correção do tempo de retenção. Em seguida, foi construída uma tabela com informações detalhadas sobre as amostras, como tempo de retenção, intensidade e relação massa-carga ( $m/z$ ) dos íons identificados.

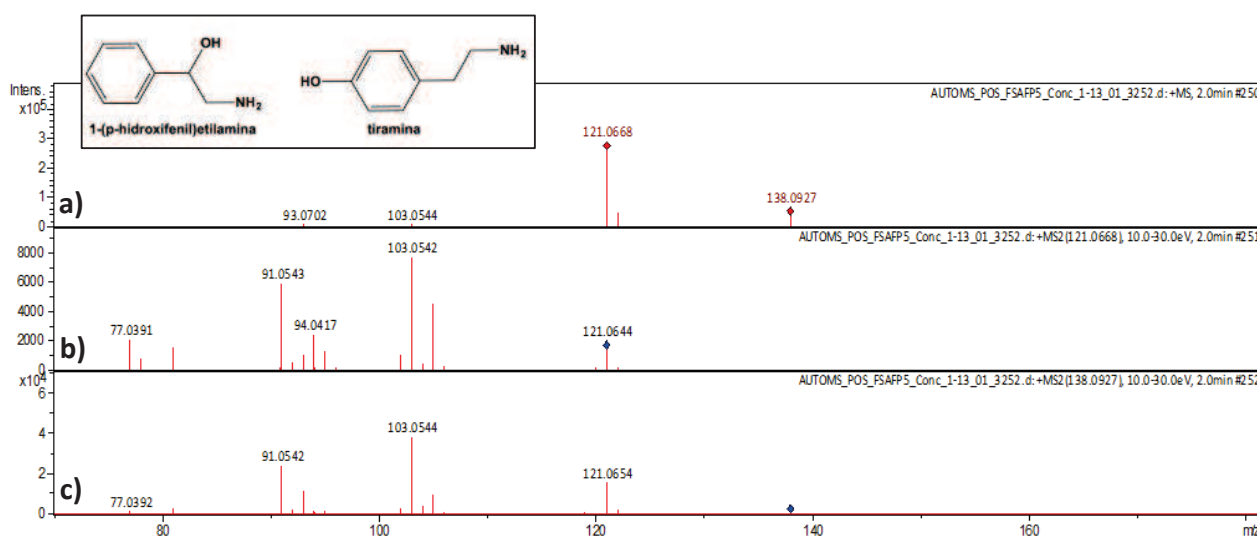
Nas análises estatísticas, utilizando-se os dados de UHPLC-MS dos extratos de folhas foi possível identificar grande número de íons com diferença significativa (valor de  $p < 0,001$ ) e intensidades superiores a 10.000, entre as amostras com e sem AF, 10 no modo ESI(+)-MS e 3 no ESI(-)-MS (Tabela 1).

**Tabela 1.** Íons com maiores diferenças entre as amostras de folhas com e sem AF, com valor de  $p < 1,00E-03$ , modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS.

Experimento	FSAF/FCAF*	Valor de p	m/z	Tempo de retenção (min)	Intensidade máxima
ESI(-)-MS	4,32	6,16E-04	505,1924	10,15	2,60E+04
ESI(+)-MS	3,9	2,90E-04	499,1582	10,15	2,33E+04
ESI(+)-MS	3,9	4,08E-04	479,2325	10,15	1,47E+04
ESI(+)-MS	3,9	4,14E-04	478,2293	10,15	5,59E+04
ESI(+)-MS	7,2	8,50E-04	464,2132	9,80	1,31E+04
ESI(-)-MS	2,39	2,19E-04	461,1663	9,47	2,28E+04
ESI(-)-MS	2,4	1,17E-04	415,1609	9,48	2,20E+04
ESI(+)-MS	3,1	5,67E-04	147,0440	7,00	2,12E+04
ESI(+)-MS	3,7	3,76E-04	138,0915	2,00	8,76E+04
ESI(+)-MS	4,6	6,59E-04	122,0681	2,00	5,74E+04
ESI(+)-MS	4,9	9,42E-04	121,0650	1,99	6,80E+05
ESI(+)-MS	5	4,32E-04	103,0541	2,00	1,60E+04
ESI(+)-MS	5	7,41E-04	93,0698	2,00	1,14E+04

\*Intensidade dos íons de FSAF dividido pela intensidade dos íons de FCAF; FSAF = amostras de folhas sem AF, FCAF= amostras de folhas com AF.

A busca na base de dados *Metlin* gerou um grande número de possíveis estruturas para os íons apresentados na Tabela 1, no entanto, somente para os íons 103,0541 e 121,0650 e 138,092 foi possível atribuir às fragmentações as estruturas encontradas na base de dados. Os íons 103,0541 e 121,0650 são fragmentos do íon 138,0927 (Figura 2). As estruturas compatíveis com o íon 138,0927, após análise dos fragmentos, foram as substâncias tiramina e 1-(p-hidroxifenil)etilamina.



**Figura 2.** a) Espectro de massas obtido por ESI-MS do pico cromatográfico com tempo de retenção de 2 min; b) Espectro de massas MS/MS do íon  $m/z$  121.0668; c) Espectro de massas MS/MS do íon  $m/z$  138.0927. Energias de colisão de 10-30 eV, ionização ESI(+)-MS.

## Conclusões

De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar que existem diferenças entre as amostras com e sem AF. Foram identificados 10 íons no modo positivo e 3 no modo negativo, com diferenças significativas (valor de  $p < 0,001$ ) e intensidade superior à  $1,00E+04$  entre amostras com e sem AF. As substâncias tiramina e 1-(p-hidroxifenil)etilamina foram pospostas como possíveis estruturas do marcador encontrado para o AF. As próximas etapas do trabalho serão direcionadas à identificação dos outros 10 íons e também na identificação das vias de produção dos metabólitos identificados para traçar alguma correlação entre as vias afetadas e o AF.

## Apoio financeiro

Os autores agradecem o apoio financeiro da Finep e CNPq e também à Embrapa Agroenergia, pela estrutura disponibilizada.

## Referências

BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRYCH, A.; KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 190, p. 1-16, 2015.

BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F.; BERGER, R. D.; HAU, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 391-396, 1998.

BOARI, A. de J. **Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (Elaeis guineensis Jacq.) no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 62 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 348).

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Oilseeds: world markets and trade**. [Washington, DC], 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

POULSON-ELLESTAD, K. L.; JONES, C. M.; ROY, J.; VIANT, M. R.; FERNÁNDES, F. M.; KUBANEK, J.; NUNN, B. L. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 111, n. 34, p. 12568-12568, 2014.