

# Desenvolvimento de método para identificação e quantificação de fito-hormônios produzidos por macro e microalgas utilizando UHPLC-MS/MS

*Christiane Gonçalves Campos<sup>1</sup>, Patrícia Pinto Kalil<sup>2</sup>, Patrícia Abdelnur<sup>3</sup>, Cesar Heraclides Behling Miranda<sup>4</sup>*

## Resumo

Diversos estudos têm mostrado os benefícios da aplicação de extratos de diferentes espécies de macroalgas marinhas para fins agrícolas, devido à presença de compostos bioestimulantes de crescimento, denominados de fito-hormônios. A utilização destes compostos com potencial agrícola, promove benefícios ambientais e financeiros para a agricultura. Neste sentido, o desenvolvimento de uma metodologia capaz de identificar e quantificar estes compostos em algas, é essencial para a seleção dos microrganismos mais promissores. Desta forma, a utilização de tecnologias analíticas avançadas, como a espectrometria de massas (MS) acoplada a cromatografia líquida (LC), tem sido amplamente utilizada na identificação destes microrganismos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de análise utilizando a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem (UHPLC-MS/MS) para a separação simultânea de dez principais padrões de fito-hormônios descritos na literatura (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4). O método analítico desenvolvido e otimizado apresentou boa separação cromatográfica e foi capaz de quantificar, de forma rápida, sensível e seletiva os padrões de fito-hormônios em estudo, os quais apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,99. Os valores de LOD (limite de detecção) variaram de 0,001 a 0,05 µg/mL e os valores de LOQ (limite de quantificação) variaram de 0,05 a 0,1 µg/mL. Estes resultados poderão ser aplicados na análise dos fito-hormônios presentes em amostras de macro, microalgas e cianobactérias.

**Palavras-chave:** algas, fito-hormônios, espectrometria de massas, cromatografia líquida.

## Introdução

A crescente demanda para exploração do potencial fisiológico das plantas, através do aumento da produção de biomassa, sem a utilização de agrotóxicos prejudiciais a saúde tem impulsionado os estudos em direção a buscar fontes alternativas na natureza. O uso de substâncias bioestimuladoras do crescimento de plantas tem se mostrado

<sup>1</sup> Química, doutora em Química, colaboradora da Embrapa Agroenergia, camposgchristiane@gmail.com

<sup>2</sup> Química, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

<sup>3</sup> Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Bioquímica e Microbiologia do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

promissor em relação à melhoria da germinação de sementes, estabelecimentos de plantas, desenvolvimento, resistência a pragas e doenças, e produtividade.

Estas substâncias bioestimuladoras são denominadas de fito-hormônios, (hormônios) que fazem parte das redes de sinalizações dos processos metabólicos que regulam as respostas fisiológicas das plantas, causando inibição ou modificação, direta ou indiretamente, de processos de desenvolvimento ou adaptação frente algum estímulo externo (Šimura et al., 2018). Por isso, são classificados como substâncias biorreguladoras de crescimento. Seu potencial no desenvolvimento de plantas tem sido amplamente explorado e cerca de 40 ingredientes ativos de fito-hormônios já são comercializados (Rademacher, 2015) com destaque para aqueles originados de algas marinhas (Thuy; Chowanska; Chojnacka, 2013).

Devido ao seu rápido crescimento e adaptabilidade, as algas (macro ou micro, bem como as cianobactérias), podem ser uma boa fonte natural de fito-hormônios (Wang et al., 2014). A identificação e quantificação dos compostos fito-hormônios em amostras de algas é uma etapa crucial para auxiliar na seleção dos microrganismos mais promissores. Um dos desafios para a realização desta etapa é a escolha de metodologias e equipamentos específicos capazes de analisar simultaneamente compostos de diferentes classes químicas, amostras complexas com compostos fito-hormônios em baixa concentração e variabilidade biológica, com diferentes substratos ou meios de cultura.

Neste contexto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) tem sido amplamente utilizada na análise de compostos fito-hormônios por ser uma técnica versátil e capaz de analisar uma grande variedade de compostos com diferentes classes químicas (Mori et al., 2017). Além disso, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Ultra high liquid chromatography - mass spectrometry* – UHPLC-MS) permite análises eficientes de alto rendimento, reduzindo o uso de solventes, melhorando a resolução do pico e consequentemente, a separação dos compostos.

O presente trabalho consiste no desenvolvimento e otimização de um método para a identificação e quantificação simultânea de dez principais compostos fito-hormônios descritos na literatura (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4) utilizando UHPLC – MS/MS. Os parâmetros de espectrometria de massas foram determinados individualmente para os compostos em estudo e o método cromatográfico em modo gradiente utilizou uma coluna do tipo BEH C18. Além disso, parâmetros analíticos como limite de detecção e quantificação, foram determinados para o preparo da curva de calibração.

## Material e Métodos

### Parâmetros MS/MS

O espectrômetro de massas (MS) utilizado possui fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador tipo triplo quadrupolo (QqQ) (TQD, Waters). O MS foi operado em modo de ionização negativa (ESI(-)-MS/MS) e positiva (ESI(+)-MS/MS) usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: tensão capilar

3500 V, temperatura de desolvatação: 350 °C, temperatura da fonte: 150 °C, fluxo de gás do cone: 20 L/h e fluxo de desolvatação: 700 L/h. As análises foram realizadas variando-se alguns parâmetros analíticos para garantir a máxima ionização dos compostos e melhor fragmentação, como voltagem do cone e do capilar, temperaturas e energia de colisão. Estes dados foram posteriormente utilizados para o desenvolvimento de um método mais seletivo por MRM.

## UHPLC

A separação dos compostos foi realizada utilizando cromatografia de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity, Waters), utilizando metodologia adaptada de (Delatorre et al., 2017), a coluna cromatográfica utilizada foi do tipo BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) (Waters), com temperatura do forno de coluna a 40 °C. A Fase móvel (A: H<sub>2</sub>O + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de Formiato de amônio e B: MeOH + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de Formiato de amônio) foi utilizada em modo gradiente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Gradiente cromatográfico usado na separação dos padrões de fito-hormônios, fase móvel A: H<sub>2</sub>O + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de formiato de amônio e B: MeOH + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de formiato de amônio, a 40°C.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A (vol. %)	Eluente B (vol. %)
7,0	0,450	50	50
9,0	0,450	0	100
11,0	0,450	0	100
12,0	0,450	90	10
14,0	0,450	90	10

## Quantificação dos padrões de fito-hormônios

Soluções padrões individuais (SI) dos compostos em estudo foram preparados a uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram utilizadas diluições das SI para o preparo de soluções intermediárias dos 10 padrões de fito-hormônios em estudo (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4) a concentração de 100 µg/mL. A curva analítica definitiva foi preparada a partir das soluções estoque e das soluções intermediárias contendo a mistura dos 10 padrões de fito-hormônios nas concentrações 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,02 e 0,005 µg/mL. Os valores reais de concentração foram obtidos plotando-se a área do pico versus a concentração teórica de cada padrão, a curva analítica foi ajustada com o modelo de regressão polinomial de segunda ordem.

## Resultados e Discussão

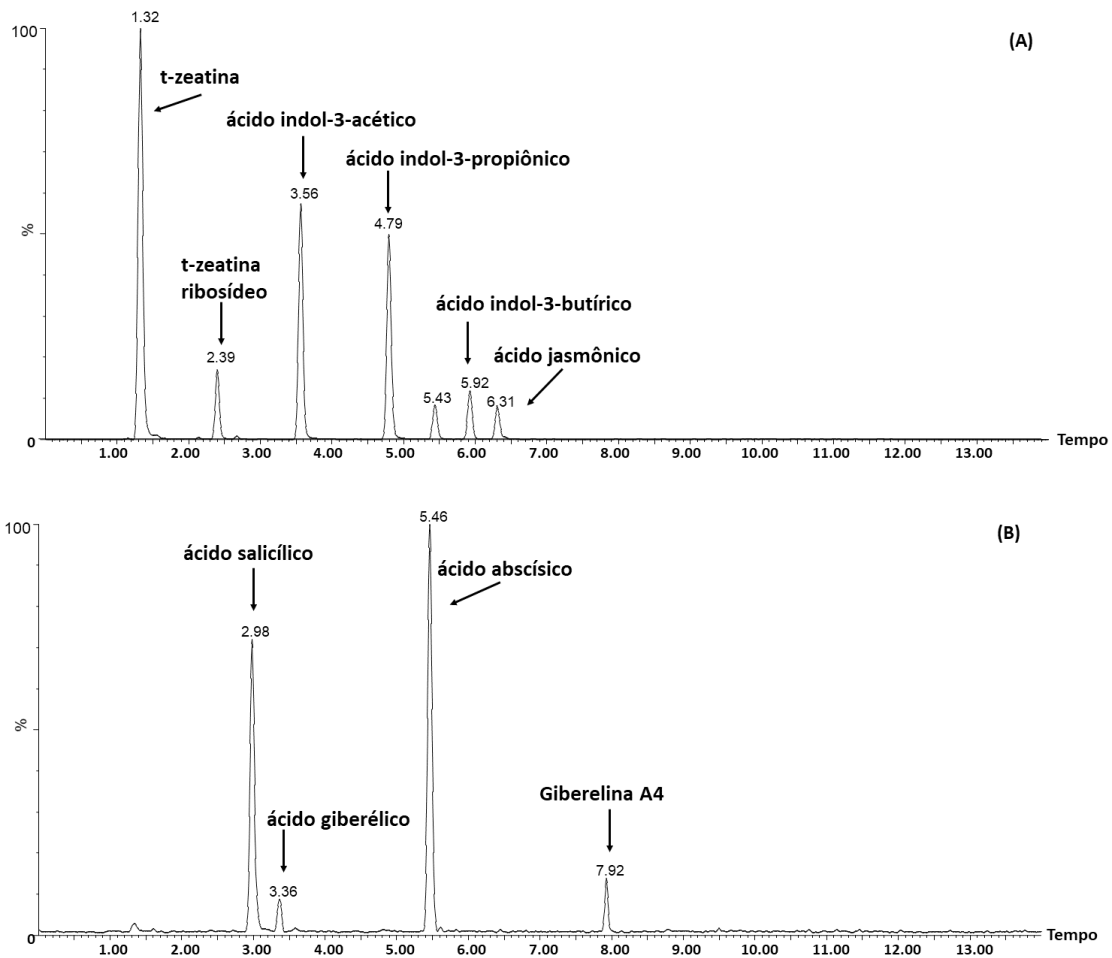
### UHPLC-MS/MS

O método analítico baseado em UHPLC-MS/MS foi desenvolvido e otimizado para a análise de fito-hormônios presentes em amostras de algas. A espectrometria de massas de infusão direta (DIMS) foi utilizada para otimizar a fonte de ionização e as tensões das células de colisão para cada fito-hormônio. Os fito-hormônios em estudo foram detectados com melhor sensibilidade usando ESI(-)-MS e ESI(+)-MS. Os valores da energia do capilar e da energia de colisão foram otimizados para cada padrão. No entanto, a energia do capilar foi a mesma para todos os compostos (3500 V). Os íons fragmento mais alto e/ou seletivo foram selecionados para análises por MRM (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros do espectrômetro de massas: voltagem do cone (V), valores de m/z Q1 e Q3 e energia de colisão (eV), otimizados para cada composto para a realização dos experimentos de MRM.

Fito-hormônios	Ionização	Voltagem do cone (V)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Energia de colisão (eV)
Ácido Jasmônico	ESI(+)	20	211	133	15
Ácido indole-3-acético	ESI(+)	25	176	130	15
Ácido indole-3-propiónico	ESI(+)	25	190.2	130	15
Ácido indole-3-butírico	ESI(+)	25	204	186	20
Ácido giberélico	ESI(-)	30	345	239	20
Ácido abscísico	ESI(-)	25	263	153	15
Ácido salicílico	ESI(-)	30	137	93	25
trans-zeatina	ESI(+)	35	220.2	136	25
trans-zeatina ribosídeo	ESI(+)	35	352.3	220.2	25
Giberelina A4	ESI(-)	30	331.1	257	20

A Figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos na análise da mistura dos dez padrões de fito-hormônios com concentração de 1,0 µg/mL, utilizados para o desenvolvimento do método analítico por UHPLC-MS/MS. Este método permitiu a separação rápida, sensível e seletiva dos compostos fito-hormônios em estudo. Desta forma poderá ser aplicado em análise de amostras de algas.



**Figura 1.** (A) Cromatograma de 6 canais de MRM (*trans*-zeatina, *trans*-zeatina ribosídeo, ácido indol-3-acético, ácido indol-3-propiónico, ácido indol-3-butírico e ácido jasmônico) obtidos na análise da mistura contendo 10 padrões de fito-hormônios por UHPLC-ESI(+)-MS; (B) Cromatograma de 4 canais de MRM (ácido acetil salicílico, ácido giberélico, ácido abscísico e giberelina A4) obtidos na análise da mistura contendo 10 padrões de fito-hormônios por UHPLC-ESI(-)-MS.

## Quantificação dos padrões de fito-hormônios

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), o tempo de retenção e os coeficientes de regressão ( $R^2$ ) para cada composto foram estabelecidos a fim de serem utilizados na análise quantitativa de fito-hormônios em amostras de algas (Tabela 3). As curvas de calibração variaram de 0,02 a 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram definidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (estabelecido pelo cálculo de três vezes a estimativa do desvio padrão das medidas do sinal do branco) e quantificável, respectivamente. Os valores dos coeficientes de regressão obtidos ficaram acima de 0,99 para todos os padrões analisados. Inicialmente, as curvas foram processadas utilizando o modelo linear, no entanto, observou-se que a

maior parte dos compostos em estudo apresentaram uma tendência quadrática, sendo este o modelo matemático escolhido para o cálculo das concentrações.

**Tabela 3.** Coeficientes de regressão ( $R^2$ ), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) e tempo de retenção (RT) determinados para os padrões de fito-hormônios em estudo.

Fito-hormônios	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$R^2$	Tempo de retenção (min)
Ácido Jasmônico	0,005	0,02	0,99961	6,31
Ácido indole-3-acético	0,001	0,005	0,99996	3,56
Ácido indole-3-propiónico	0,001	0,005	0,99826	4,79
Ácido indole-3-butírico	0,001	0,005	0,99794	5,92
Ácido giberélico	0,005	0,10	0,99148	3,36
Ácido abscísico	0,001	0,05	0,99673	5,46
Ácido salicílico	0,05	0,10	0,99652	2,98
trans-zeatina	0,001	0,005	0,99543	1,32
trans-zeatina ribosídeo	0,001	0,005	0,99569	2,39
Giberelina A4	0,05	0,10	0,99241	7,92

## Conclusões

Embora a análise de fito-hormônios em algas seja um processo desafiador seu emprego em estudos com macro e microalgas pode contribuir grandemente para a seleção de espécies promissoras produtoras de fito-hormônios de interesse. O método analítico desenvolvido e otimizado por UHPLC-MS/MS foi capaz de identificar e quantificar, de forma rápida, sensível e seletiva dez compostos padrões de fito-hormônios. Este método será aplicado na quantificação de compostos fito-hormônios em amostras com matrizes complexas. A utilização deste protocolo de análise em amostra de algas será uma ferramenta auxiliar poderosa no desenvolvimento de processos de produção destes compostos por via biotecnológica.

## Referências

DELATORRE, C.; RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, L.; MAJADA, J. P.; ORDÁS, R. J.; FEITO, I. Hormonal profiling: Development of a simple method to extract and quantify phytohormones in complex matrices by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1040, p. 239–249, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.007>

MORI, I. C.; IKEDA, Y.; MATSUURA, T.; HIRAYAMA, T.; MIKAMI, K. *Phytohormones in red seaweeds: A technical review of methods for analysis and a consideration of genomic data*. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0056>

RADEMACHER, W. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 845–872, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>

ŠIMURA, J.; ANTONIADI, I.; ŠIROKÁ, J.; TARKOWSKÁ, D.; STRNAD, M.; LJUNG, K.; NOVÁK, O. Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 476–489, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>

THUY, L., CHOWANSKA, J., CHOJNACKA, K. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth: review. **CHEMIK**, v. 67, n. 7, p. 636–641, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>

WANG, X.; ZHAO, P.; LIU, X.; CHEN, J.; XU, J.; CHEN, H.; YAN, X. Quantitative profiling method for phytohormones and betaines in algae by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 2, p. 275–280, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.3018>