

1º Encontro Nacional de Química e Sustentabilidade

 14 a 15 de Julho de 2021

Identificação por UHPLC-HRMS dos principais metabólitos bioativos de extratos de aveia preta obtidos por processos de extração aquosa e hidroalcoólica

Identificação por UHPLC-HRMS dos principais metabólitos bioativos de...



Área

Produção de produtos químicos de alto valor agregado a partir de fontes renováveis

Autores

Gonçalves Campos, C. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Nascimento de Melo, R.W. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Andreani Carvalho, L. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Aquino Ribeiro, J.A. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Verardi Abdelnur, P. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Martins Rodrigues, C. (EMBRAPA AGROENERGIA)

Resumo

Devido à alta demanda por estratégias de controle de pragas agrícolas mais sustentáveis, muitos estudos têm sido direcionados para investigar metabólitos biocidas em biomassas. A aveia preta (*Avena strigosa*) está entre as espécies promissoras para a produção de pesticidas naturais. A determinação do processo de extração e a escolha da metodologia analítica são fundamentais na identificação destes compostos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar dois diferentes processos extrativos, hidroalcoólico e aquoso, em amostras de sementes de aveia preta e, realizar a caracterização química dos extratos por UHPLC-HRMS. A identificação do perfil metabólico dos processos extrativos empregados servirá de estratégia na escolha do extrato que apresente maior número de metabólitos biocidas.

Palavras chaves

extratos biocidas; espectrometria de massas ; cromatografia líquida

Introdução

As pragas agrícolas prejudicam o transporte de água e a absorção dos nutrientes das plantas, além disso diminuem o rendimento na produção gerando prejuízos econômicos (Desmedt et al., 2020). De forma geral, agrotóxicos sintéticos têm sido usados em grande escala para o controle de pragas. No entanto, o prejuízo ambiental causado por estes produtos torna imperativa a busca de alternativas mais sustentáveis e seguras para o controle de pragas. Algumas biomassas provenientes de resíduos agroindustriais possuem alto potencial para a obtenção de compostos naturais com atividade biológica específica para o controle de fitopatógenos. O estudo de aveia branca (*Avena sativa*), por exemplo, tem se mostrado promissor na identificação de compostos químicos com ação biocida (Soriano et al, 2004). Dentre as estratégias que podem ser empregadas para se obter os compostos biocidas, podem ser citados os processos de extração: aquoso e hidroalcoólico. Neste contexto, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (do inglês Ultra high liquid chromatography – high resolution mass spectrometry – UHPLC-HRMS) tem sido amplamente utilizada na análise de extratos polares contendo metabólitos biocidas ou com outras aplicações biológicas, isso pelo fato de ser uma técnica versátil e capaz de analisar uma grande variedade de compostos com diferentes classes químicas (Shimizu et al, 2018). Desta maneira, o presente trabalho consistiu em realizar a análise metabolômica não direcionada de extratos de aveia preta, a fim de comparar dois diferentes tratamentos de extração, aquoso e hidroalcoólico, utilizando UHPLC–HRMS como metodologia analítica.

Material e métodos

O processo de refluxo em solução aquosa foi realizado utilizando um condensador com banho de óleo a 100°C e agitação magnética por 1 h. Para a extração em solução hidroalcolica utilizou-se uma solução contendo etanol/água/ácido acético 70/29,5/0,5% sob agitação por 48 h. Após a remoção do primeiro solvente extrativo, o material sólido remanescente foi extraído novamente por mais 24 h e os líquidos extrativos combinados. Os extratos foram secos e armazenados em freezer até o momento da análise. Os extratos foram solubilizados em uma mistura de acetonitrila:água (1:1) (v/v) e analisados por um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF-MS MaXis 4G (Bruker) e operado em modo de ionização positiva (ESI(+)-MS) e negativa (ESI(-)-MS). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: tensão capilar: 3.800 V, nebulizador: 4,0 bar, temperatura da fonte: 200°C, fluxo de gás N₂: 9,0 L/min. A separação dos compostos foi realizada utilizando o sistema UHPLC (Nexera X2, Shimadzu), a coluna cromatográfica utilizada empregou fase reversa do tipo HSS-T3 (2,1 x 150 mm, 1,8 µm) (Waters), com temperatura do forno de coluna a 40°C. A Fase móvel consistia de A: H₂O + 0.1% ácido fórmico e B: acetonitrila + 0.1% ácido fórmico. O sistema de eluição empregou programação em modo gradiente linear com tempo total de 25 min, sendo iniciando com 100% da fase A e vazão de 400 µL/min.

Resultado e discussão

O total de 22 metabólitos majoritários foram identificados considerando as análises por UHPLC-ESI(+)-HRMS e UHPLC-ESI(-)-HRMS de aveia preta para os dois tipos de extratos obtidos: aquoso e hidroalcolico (Tabela 1). Os resultados foram comparados com os disponíveis nas bases de dados (KEGG, ChEBI e PubChem), desta forma foi possível inferir de forma putativa a ocorrência de alguns compostos nas amostras de aveia preta e correlacioná-los com aqueles apontados na literatura para outras espécies de aveia e/ou com ação biocida indicada (Desmedt et al., 2020). As saponinas (compostos 12 e 13) e flavonoides (composto 11), são grupos de metabólitos secundários, relatados na literatura como responsáveis por conferir resistência a doenças em aveia. A aveia também contém outros compostos biologicamente importantes, como as fitoalexinas e avenantramidas, derivados do ácido antranílico (composto 4), que são produzidos nos brotos da aveia em resposta ao ataque de fungos (S. Bahraminejad et al, 2008). O ácido 2-deoxi mugênico (composto 14) é um precursor para a síntese do ácido avênico (composto 15) presente em espécie de aveias e atribuído a tolerância para deficiência de ferro em plantas (Kawai S. et al, 1994). Os compostos 11 a 13, identificados neste trabalho e relatados na literatura com ação biocida, foram encontrados apenas no extrato com tratamento hidroalcolico (11-13). Desta forma, é possível inferir que este tratamento é o mais adequado para disponibilizar metabólitos com ação biocida ou ação biológica a partir das sementes de aveia preta.

Tabela 1. Identificação por UHPLC-HRMS dos principais metabólitos de extratos de aveia preta obtidos por processos de extração aquosa e hidroalcoólica, sinalizados por: ausente(-) e presente(+). A identificação putativa foi realizada com base nas buscas em bancos de dados metabolômicos (KEGG, ChEBI e PubChem).

No	RT (min)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	FM	Composto	Hidroalcoólico	Aquoso
1	1.00	-	195.0510	C6H12O7	Ácido glucônico	+	+
2	1.02	118.0863	-	C5H11NO2	Valina	+	+
3	1.02	148.0604	-	C5H9NO4	Glutamato	+	+
4	1.12	138.0550	-	C7H7NO2	Ácido antranílico	+	+
5	1.12	163.0601	-	C6H10O5	3-Etil malato	+	+
6	1.20	-	267.0722	C9H16O9	2-o-(alfa-D-manosil)-D-glicerato	+	+
7	1.30	-	341.1089	C12H22O11	Sucrose	+	+
8	3.60	136.0604	-	C4H9NO4	2-hidroxi metilsena	+	+
9	3.60	268.1027	-	C9H17NO8	Ácido neuramínico	+	+
10	4.95	188.0706	-	C11H9NO2	Ácido 3-indol acrílico	+	+
11	4.95	409.1857	-	C21H28O8	Altissimacoumarina E	+	-
12	9.24	431.3156	-	C27H42O4	Nuatigenina	+	-
13	9.24	593.3684	-	C33H52O9	3-o-Beta-D-glucosídeo	+	-
14	13.77	305.1343	-	C12H20N2O7	Ácido 2-deoxi magênic	+	+
15	13.80	-	321.1303	C12H22N2O8	Ácido avênico	+	+
16	14.46	520.3341	-	C23H45N5O8	Ácido 2-[3-[(4-aminociclohexil)metil]-4-(carboximetil)-7,10-bis(2-hidroperoxietil)-1,4,7,10-tetrazaciododec-1-il]acético	+	-
17	15.04	496.3341	-	C21H45N5O8	N(2')-acetilgentamicina c1a	+	-
18	15.23	522.3425	-	C29H47NO7	Mycinamicina vii	+	-
19	15.3	-	295.2279	C18H32O3	Ácido vernólico	+	-
20	17.47	321.2357	-	C11H28N8O3	2-[[1-amino-2-(azido-(2-etoxietilamino)amino)-1-(2-metoxietilamino)etil]amino]etanol	+	-
21	17.50	-	297.2435	C18H34O3	Ácido ricinoléico	+	-
22	19.15	289.1285	-	C16H16N2O2	Ácido lisérgico	+	-

Conclusões

A metabolômica não direcionada envolve a escolha de um protocolo de extração eficiente e de uma metodologia analítica adequada. A metodologia por UHPLC-HRMS foi capaz de separar de forma rápida e sensível compostos com diferentes classes químicas. Dessa forma, foi possível estabelecer, que o processo de extração utilizando solução hidroalcoólica teve maior eficácia na recuperação de metabólitos com ação biocida. Este protocolo se configura como uma estratégia crucial para a etapa de seleção, tanto de biomassas quanto dos processos extrativos mais apropriados para a obtenção de compostos bioativos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Agroenergia e ao CNPq pelo apoio e suporte financeiro.

Referências

SORIANO, I. R.; ASENSTORFER, R. E.; SCHMIDT, O.; RILEY, I. T. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, 94, 1207–1214, 2004.

SHIMIZU, T.; WATANABE, M.; FERNIE, A. R.; TOHGE, T. Targeted LC-MS analysis for plant secondary metabolites. In *Plant Metabolomics*; Humana Press: New York, NY, USA, 2018; pp. 171–181.

BAHRAMINEJAD, S.; ASENSTORFER, R. E.; WILLIAMS, K. J.; HAYASAKA, Y.; ZWER, P. K.; RILEY, I. T.; SCHULTZ, C. J. Analysis of the Antimicrobial Activity of Flavonoids and Saponins Isolated from the Shoots of Oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathology*, 156, 1-7, 2008.

WILLEM DESMEDT, SVEN MANGELINCKX, TINA KYNDT AND BARTEL VANHOLME, A. Phytochemical Perspective on Plant Defense Against Nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 11, 602079.

KAWAI, S.; SASAKI, O.; HAYASAKA, Y.; SEI-ICHI. Biosynthesis of avenic acid A in oat cv. Onward: studies with ^{14}C or ^{15}N labeled compounds. Plant and Soil, 165, 285-289, 1994.

PATROCINADORES



(<http://crq3.org.br/>)

APOIO



ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA.

☎ (21) 2224-4480 ✉ abqeventos@abq.org.br
🌐 <https://www.abq.org.br> (<https://www.abq.org.br>)