



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EM LEVEDURAS POR UPLC-MS/MS

Christiane G. Campos, José Antônio de A. Ribeiro, Patrícia P. K. G. Costa,
Clenilson M. Rodrigues, Patrícia V. Abdelnur

*Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica (pqEB),
PqEB s/nº, CEP 70770-901, Brasília, DF
patricia.abdelnur@embrapa.br*

A demanda por fontes sustentáveis e renováveis de energia, bem como a substituição de combustíveis fósseis têm estimulado diversos estudos para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, como o etanol de segunda geração (2G). No entanto, um dos desafios na produção deste biocombustível consiste no desenvolvimento de tecnologias eficientes para converter xilose em etanol no processo de fermentação de açúcares. Uma das alternativas promissoras é a utilização da metabolômica para identificar alvos moleculares, os quais podem ser utilizados no melhoramento de microrganismos utilizados no processo fermentativo. Vários estudos utilizam o LC-MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas) como uma ferramenta de trabalho ideal em metabolômica, para identificação e quantificação de metabólitos presentes em um sistema, por ser de fácil utilização, sensível, robusta tanto para a matriz, como na operação de rotina. Este trabalho objetiva desenvolver um método analítico baseado em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* (UPLC-MS/MS) para quantificar, de forma otimizada, robusta, rápida, seletiva e sensível, os metabólitos presentes na via metabólica de leveduras para a conversão de xilose a etanol. Inicialmente, a análise direta por espectrometria de massas (DIMS) foi utilizada para identificar os padrões de metabólitos presentes na via, utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador tipo triplo quadrupolo (QqQ) (TQD, Waters). As análises foram realizadas em modo negativo (ESI(-)-MS/MS) e em modo positivo (ESI(+)-MS/MS), variando-se alguns parâmetros analíticos para garantir a máxima ionização da amostra 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 sensível por MRM (Multiple Reaction Monitoring). A separação dos metabólitos foi realizada utilizando cromatografia de ultra alta eficiência (UPLC) (Acquity, Waters), testando-se diferentes colunas e fases móveis. Devido a natureza química dos compostos presentes na via metabólica de interesse, foi necessário o desenvolvimento de dois métodos de separação: um método de cromatografia por pareamento iônico em fase reversa, utilizando uma coluna do tipo HSS-T3; e outro método de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), utilizando uma coluna do tipo amida. Com base nos resultados obtidos, 17 metabólitos presentes na via metabólica de interesse foram identificados e podem ser quantificados a partir dos dois métodos desenvolvidos por UPLC-MS/MS. A próxima etapa do trabalho consiste na otimização do preparo de amostra e na análise dos metabólitos presentes em leveduras. Estes resultados poderão ser utilizados futuramente no melhoramento genético de leveduras fermentadoras de xilose.

Os autores agradecem a Embrapa Agroenergia e a Universidade de Brasília pelo apoio e suporte financeiro.