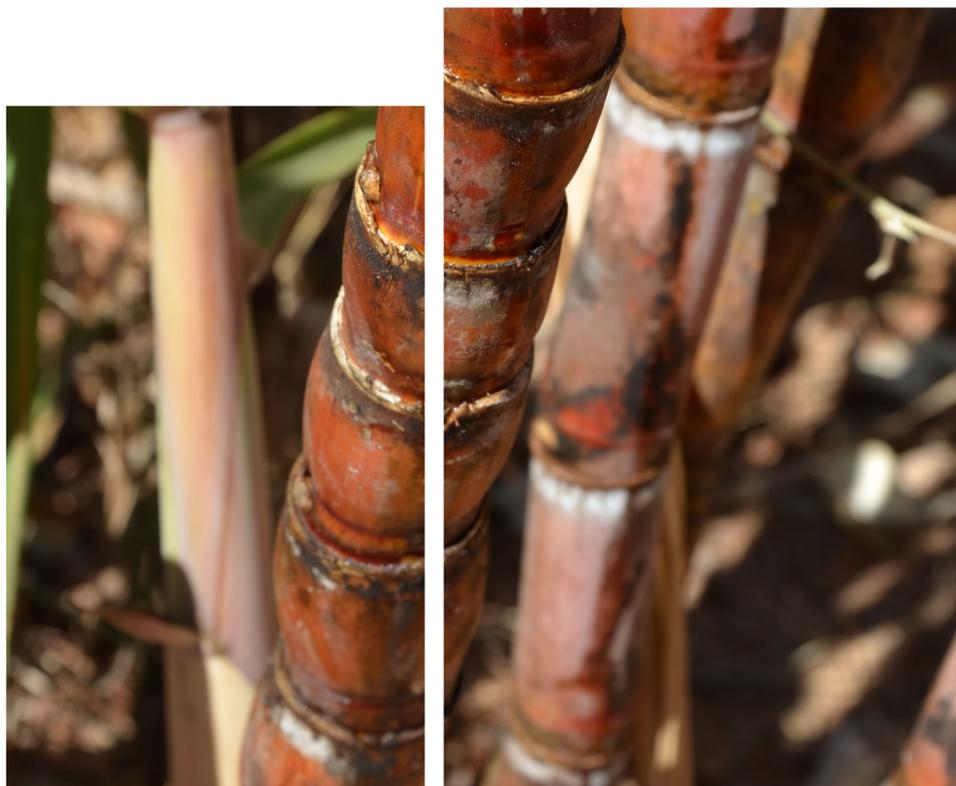


**Desenvolvimento de métodos baseados
nas técnicas HILIC-UHPLC-MS para análise
metabolômica de apoplasto de cana-de-açúcar**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
12**

**Desenvolvimento de métodos baseados
nas técnicas HILIC-UHPLC-MS para análise
metabolômica de apoplasto de cana-de-açúcar**

*José Antônio de Aquino Ribeiro
Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa
Patrícia Verardi Abdelnur*

**Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2018**

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações
da Unidade Embrapa Agroenergia

Presidente
Alexandre Alonso Alves

Secretária-Executiva
Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola

Membros
*André Pereira Leão, Bruno Galvêas Laviola,
Emerson Leo Schultz, Luciane Chedid Melo
Borges, Maria Iara Pereira Machado, Rosana
Falcão, Sílvia Belém Gonçalves*

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Maria Iara Pereira Machado

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e foto da capa
Maria Goreti Braga dos Santos

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

Ribeiro, José Antônio de Aquino.

Desenvolvimento de métodos baseados nas técnicas HILIC-UHPLC-MS para
análise metabômica de apoplasto de cana-de-açúcar / por José Antônio de
Aquino Ribeiro, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa e Patrícia Verardi Abdelnur.
– Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2018.

20 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, INSS
2177-0395 ; 12)

Disponível em: <http://www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes>

1. Cana-de-açúcar. 1. Apoplasto. 2. Metabômica. 3. Cromatografia líquida. 4.
HILIC. 5. Espectrometria de massa. I. Título. II. Série.

CDD 22. – 543.65

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	19
Referências	19

Desenvolvimento de métodos baseados nas técnicas HILIC-UHPLC-MS para análise metabolômica de apoplasto de cana-de-açúcar

José Antônio de Aquino Ribeiro¹

Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa²

Patrícia Verardi Abdelnur³

Resumo – O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos baseados nas técnicas HILIC-UHPLC-MS para avaliação do perfil metabolômico de apoplasto de cana-de-açúcar. O espaço apoplástico é comumente colonizado por bactérias diazotróficas, e sua composição desenvolve papel fundamental na atividade metabólica e expressão gênica dessas bactérias. O líquido apoplástico é composto por substâncias hidrofílicas altamente polares, que não apresentam retenção adequada utilizando técnicas tradicionais de separação por cromatografia líquida em fase reversa. Foram desenvolvidos dois métodos de separação utilizando colunas cromatográficas com fase estacionária de sílica funcionalizada com substituintes que conferem o mecanismo de Interação Hidrofílica. Os parâmetros que apresentaram maior influência na separação dos compostos polares foram: proporção inicial de água na fase móvel, inclinação da curva de composição da fase móvel no gradiente de eluição, temperatura da coluna e pH da fase móvel. Os métodos HILIC-UHPLC desenvolvidos, acoplados a um Espectrômetro de Massa de Alta Resolução, foram utilizados para avaliar o perfil metabólico de amostra de líquido apoplástico, permitindo detectar mais de 50 compostos.

Termos para indexação: cana-de-açúcar, apoplasto, metabolômica, cromatografia líquida, HILIC, espectrometria de massa.

¹ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

² Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

³ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

Development of methods based on HILIC-UHPLC-MS techniques for evaluation of the metabolomic profiling of sugarcane apoplast

Abstract – The objective of this study was to develop analytical methods based on HILIC-UHPLC-MS techniques to evaluate the metabolomic profiling of sugarcane apoplast. The apoplastic space is commonly colonized by diazotrophic bacteria, and its composition seems to play a fundamental role in the metabolic activity and gene expression of these bacteria. The apoplast is composed of highly polar hydrophilic substances that do not exhibit adequate retention using traditional techniques of reverse phase liquid chromatography separation. Two separation methods were developed using Chromatographic Columns of Hydrophilic Interaction. The parameters that showed the greatest influence on the separation of the polar compounds were the initial proportion of water in the mobile phase, slope of the elution gradient, column temperature and mobile phase pH. The developed HILIC-UHPLC methods, coupled to a High Resolution Mass Spectrometer, were used to evaluate the metabolic profile of apoplastic fluid sample, allowing to detect more than 50 compounds.

Index terms: sugarcane, apoplast, metabolomics, liquid chromatography, HILIC, mass spectrometry.

Introdução

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao gênero *Saccharum*, que se caracteriza pela elevada produção de sacarose, um dissacarídeo não redutor composto por glicose e frutose interligadas por meio de seus carbonos anoméricos. A sacarose é produzida pelo processo fotossintético das folhas, acumulando-se posteriormente no simplasto (líquido intracelular) e no espaço apoplástico do caule da planta (Velázquez et al., 2008).

O apoplasto é um espaço líquido intercelular das plantas. Suas principais funções fisiológicas incluem regulação do crescimento, transporte de substâncias, manutenção da homeostase, adesão célula a célula, proteção contra dessecação, patógenos e fatores ambientais, entre outras (Sakurai, 1998). O líquido apoplástico da cana-de-açúcar é primariamente composto por açúcares, tanto monômeros livres, como glicose e frutose, quanto o dímero sacarose, sendo este em concentrações bem maiores que os demais (Wang et al., 2013). No entanto, outros compostos estão presentes em menores concentrações, como ácidos orgânicos de cadeia curta, compostos nitrogenados (nitrito, nitrato e amônio) e aminoácidos (Asis Junior et al., 2003; Tejera et al., 2006).

O espaço apoplástico da cana-de-açúcar é comumente colonizado por bactérias diazotróficas endofíticas, que se desenvolvem sem causar danos aos seus hospedeiros. As bactérias diazotróficas são capazes de converter o gás nitrogênio (N) do ar em amônio, constituindo uma importante fonte de entrada de N nas plantações (Carvalho et al., 2014). O uso de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio no cultivo de cana-de-açúcar tem se apresentado como interessante alternativa aos fertilizantes inorgânicos nitrogenados, permitindo promover o crescimento das plantas com significativa redução nos custos e no impacto ambiental da cultura (Reis et al., 2009).

Os inoculantes utilizados no plantio da cana-de-açúcar geralmente constituem-se de uma mistura de estirpes de espécies de bactérias isoladas da própria cultura. As bactérias são cultivadas de forma individualizada, misturadas em turfa estéril e distribuídas no solo por ocasião do plantio (Reis et al., 2009). Observa-se, no entanto, que nem todas as variedades de cana-de-açúcar respondem de forma similar ao uso de inoculantes, sugerindo uma forte interação genótipo x solo x ambiente (Schultz et al., 2015). Nesse con-

texto, o líquido apoplástico parece desenvolver papel fundamental na atividade metabólica e expressão gênica das estirpes de bactérias presentes no inoculante utilizado.

A análise do metaboloma refere-se à determinação do conjunto de todas as moléculas químicas produzidas por um organismo, que correspondem aos produtos finais do metabolismo celular. Os metabólitos desempenham papel fundamental na regulação das diferentes vias bioquímicas que operam dentro das células, e a determinação do seu nível representa uma informação integrativa da função celular em resposta a alterações ambientais ou genéticas (Villas-Bôas; Gombert, 2006).

O metaboloma é composto por grande variedade de moléculas com propriedades químicas diversas, compreendendo carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, cetonas, lipídeos e outras classes de compostos. A complexidade química, associada à enorme variação de concentrações, torna praticamente impossível a análise simultânea de todo o metaboloma de um organismo (Abdelnur et al., 2014; Villas-Bôas; Gombert, 2006).

Do ponto de vista analítico, duas abordagens principais podem ser utilizadas para análise do metaboloma: (1) análise direcionada (*targeted*) e (2) análise não direcionada (*untargeted*). Enquanto na primeira abordagem procura-se determinar um grupo de metabólitos predefinidos, geralmente envolvidos em uma via metabólica de interesse, na análise não direcionada procura-se determinar todo o conjunto de metabólitos detectados em uma amostra, usando uma técnica analítica particular, associada a uma avaliação quantitativa (absoluta ou relativa) (Abdelnur et al., 2014; Campos et al., 2017; Vargas et al., 2016; Villas-Bôas; Gombert, 2006).

Para caracterizar e quantificar um conjunto tão complexo de analitos, é necessário utilizar técnicas analíticas e equipamentos específicos, conforme as características das classes de compostos que se deseja analisar. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS – do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) vem sendo considerada componente fundamental na análise do metaboloma, sendo a técnica mais comumente utilizada (Abdelnur, 2011; Abdelnur et al., 2014).

Em estudos prévios conduzidos no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis da Embrapa Agroenergia, a análise do perfil metabólico de apoplasto de cana-de-açúcar foi realizada utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS – do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) e Infusão Direta em Espectrômetro de Massas (DIMS – do inglês *Direct Infusion Mass Spectrometry*). No entanto, ambas as técnicas se mostraram inadequadas às características da amostra, resultando na detecção de um número limitado de compostos e na contaminação dos equipamentos utilizados em função da elevada concentração de sacarose presente no líquido apoplástico (Araújo, 2015).

Grande parte dos métodos de LC-MS disponíveis para análise do metaboloma baseia-se em separações cromatográficas de fase reversa (RP – do inglês *Reversed Phase*), que cobrem uma ampla faixa de estruturas moleculares biológicas. No entanto, métodos RPLC não são indicados para separação de biomoléculas altamente polares, visto que tais moléculas não são adequadamente retidas nesse tipo de fase estacionária. Uma alternativa seria a utilização de aditivos como agentes de pareamento iônico, porém, esses são preteridos quando se usa detecção MS, em função da contaminação do espectrômetro e interferência com a detecção provocada pelos referidos agentes (Spagou et al., 2010).

Para a análise de biomoléculas polares, a Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC – do inglês *Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography*) tem sido utilizada como técnica analítica de separação complementar. De fato, o número de publicações de estudos de metabolômica baseadas em HILIC-UHPLC-MS tem crescido significativamente nos últimos anos, demonstrando o potencial de aplicação dessa técnica para a separação de analitos altamente polares que não podem ser separados em colunas de fase reversa (Cubbon et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos baseados em HILIC-UHPLC-MS para análise do metaboloma de líquido apoplástico de cana-de-açúcar utilizando colunas com diferentes mecanismos de interação hidrofílica. Idealmente, os métodos devem permitir a detecção do maior número possível de compostos polares presentes na amostra, sem que seja necessário tratamento prévio para remoção do composto majoritário, a sacarose.

Material e Métodos

Reagentes

Água ultrapura utilizada foi obtida de um sistema Milli-Q Direct 16 (Merck Millipore). Acetonitrila, ácido fórmico, hidróxido de amônio e acetato de amônio utilizados foram grau LC-MS (Merck Millipore). Os padrões glicose, frutose, sacarose, xilitol, ácido málico e ácido succínico utilizados foram grau analítico (Sigma-Aldrich). Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura para o preparo das Soluções Estoque (SE) a 5 mg/mL. Uma mistura padrão contendo 10 µg/mL de cada composto foi preparada a partir das SE utilizando acetonitrila 80% como diluente.

Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados utilizando um Cromatógrafo a Líquido de Ultra Eficiência (UHPLC) modelo Nexera XR (Shimadzu) equipado com bomba quaternária, autoamostrador e forno de colunas, e um Espectrômetro de Massas modelo maXis 4G (Bruker Daltonics). O espectrômetro de massas foi operado nos modos de ionização *electrospray* positivo [ESI(+)-MS], e negativo, [ESI(-)-MS]. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de 70 – 1000 *m/z*, com taxa de aquisição de 2 Hz, energia de capilar de 4000 V, temperatura de dessolvatação de 200 °C, pressão do gás de nebulização de 4 bar, fluxo do gás de dessolvatação de 9 L/min. Para desenvolvimento dos métodos HILIC-UHPLC-MS, foram utilizadas duas colunas cromatográficas analíticas:

- 1) SeQuant ZIC-HILIC (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) com pré-coluna SeQuant ZIC-HILIC (20 x 2,1 mm) (Merck Millipore);
- 2) Acquity Glycan BEH Amide (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) com pré-coluna VanGuard Glycan BEH Amide (5 x 2,1 mm) (Waters).

Experimentos

Para a coluna SeQuant ZIC-HILIC, foram preparadas duas fases móveis: (A) acetonitrila/água (90/10, v/v) + acetato de amônio 10 mM; e

(B) acetonitrila/água (40/60, v/v) + acetato de amônio 10 mM. Os testes de separação da mistura padrão foram realizados em modo de eluição gradiente, utilizando misturas de diferentes proporções de (A) e (B). Os principais parâmetros testados para o desenvolvimento do método HILIC-UHPLC-MS SeQuant foram: vazão da fase móvel, proporção de água no início da curva de eluição gradiente, inclinação da curva do gradiente (variação da proporção de água em função do tempo) e temperatura da coluna, conforme sumarizado na Tabela 1. Para cada condição analítica avaliada, foram realizadas injeções em triplicata da mistura padrão, de modo a garantir a repetibilidade das condições cromatográficas testadas.

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos testados para desenvolvimento do método HILIC-UHPLC-MS com a coluna SeQuant ZIC-HILIC.

Teste	Vazão da Fase Móvel	Proporção inicial de água	Inclinação do gradiente	Temperatura da coluna
SeQuant T1	0,20 mL/min	10%	5,0%/min	35 °C
SeQuant T2	0,20 mL/min	25%	3,5%/min	35 °C
SeQuant T3	0,15 mL/min	20%	4,0%/min	60 °C
SeQuant T4	0,50 mL/min	10%	3,3%/min	40 °C
SeQuant T5	0,30 mL/min	20%	3,3%/min	35 °C

Para a coluna Glycan BEH Amide, foram preparadas duas fases móveis: (A) acetonitrila/água/hidróxido de amônio (90/10/0,1; v/v); e (B) acetonitrila/água/hidróxido de amônio (40/60/0,1; v/v). Os testes de separação cromatográfica da mistura padrão foram realizados em modo de eluição em gradiente, utilizando misturas de diferentes proporções de (A) e (B). Os parâmetros testados para o desenvolvimento do método HILIC-UHPLC-MS Glycan foram similares aos utilizados no desenvolvimento do método SeQuant, conforme sumarizado na Tabela 2. Para cada condição analítica avaliada, foram realizadas injeções em triplicata da mistura padrão.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos testados para desenvolvimento do método HILIC-UHPLC-MS com a coluna Glycan BEH Amide.

Teste	Vazão da Fase Móvel	Proporção inicial de água	Inclinação do gradiente	Temperatura da coluna
Glycan T1	0,17 mL/min	20%	6,0%/min	35 °C
Glycan T2	0,15 mL/min	20%	6,0%/min	45 °C
Glycan T3	0,15 mL/min	10%	5,7%/min	50 °C
Glycan T4	0,15 mL/min	20%	4,0%/min	50 °C
Glycan T5*	0,15 mL/min	20%	4,0%/min	50 °C

*Condições idênticas ao Glycan T4, exceto que o Hidróxido de Amônio da fase móvel foi substituído por Ácido Fórmico na mesma proporção (0,1%, V/V).

Após o estabelecimento das condições ótimas de análise utilizando cada coluna, foram realizadas injeções de amostra de apoplasto em dois níveis de diluição, 1:500 e 1:50, utilizando Acetonitrila 80% como diluente. Para prevenir a contaminação do espectrômetro de massa com sacarose, composto majoritário presente no líquido apoplástico, durante a injeção da amostra concentrada (1:50), utilizou-se um sistema de válvula (*divert valve*) para direcionar o fluxo de fase móvel para o descarte no período correspondente ao tempo de retenção da sacarose. Desse modo, durante a injeção das amostras concentradas, o pico da sacarose foi descartado.

Todos os dados foram processados utilizando o software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics). A ferramenta *Dissect* do software foi utilizada para identificação de picos cromatográficos e extração dos respectivos espectros nas amostras de líquido apoplástico injetadas.

Resultados e Discussão

As condições de análise inicialmente testadas para o desenvolvimento dos métodos UHPLC-HILIC-MS SeQuant e Glycan foram selecionadas com base em documentos de aplicação publicados pelos fabricantes das colunas (Appelblad et al., 2008; Paglia et al., 2013) e em revisões de literatura relacionadas à análise do metaboloma de compostos polares (Spagou et al., 2010; Contrepois et al., 2015). Os componentes da mistura padrão foram se-

leccionados com base nas classes de compostos que se espera encontrar no líquido apoplástico (ácidos orgânicos, compostos neutros polares, hexoses e dissacarídeos). A inclusão de pelo menos duas hexoses (frutose e glicose) foi importante para avaliar a capacidade dos métodos em separar isômeros. Em todos os experimentos, o espectrômetro de massas foi operado em ambas as polaridades [ESI(+)] e [ESI(-)]. Os cromatogramas apresentados a seguir correspondem aos que apresentaram melhor sensibilidade para detecção dos compostos da mistura padrão e da amostra conforme as condições de separação empregada em cada método.

Nas Figuras 1, 2 e 3, são apresentados os cromatogramas dos íons extraídos obtidos com a mistura padrão utilizando as condições otimizadas para os métodos UHPLC-HILIC-MS SeQuant e Glycan.

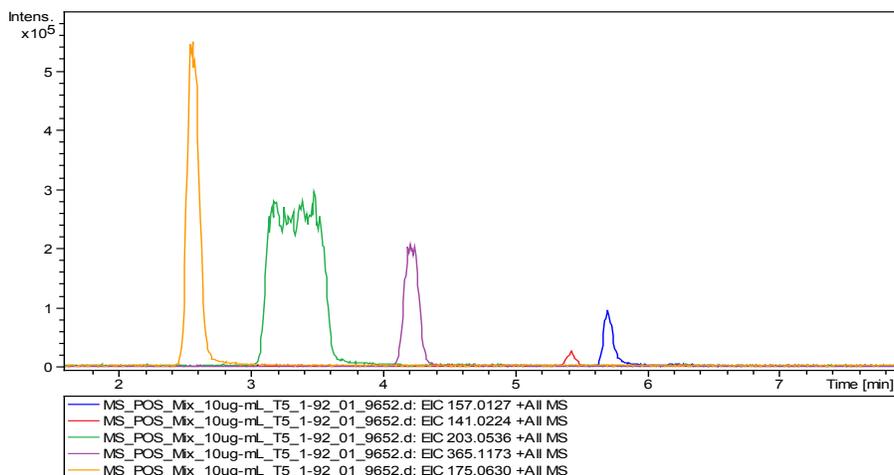


Figura 1. Cromatograma de íons extraídos (EIC) obtido para a mistura padrão com o método otimizado UHPLC-HILIC-ESI(+)-MS SeQuant (T5) (laranja = xilitol; verde = frutose e glicose; roxo = sacarose; vermelho = ácido succínico; azul = ácido málico).

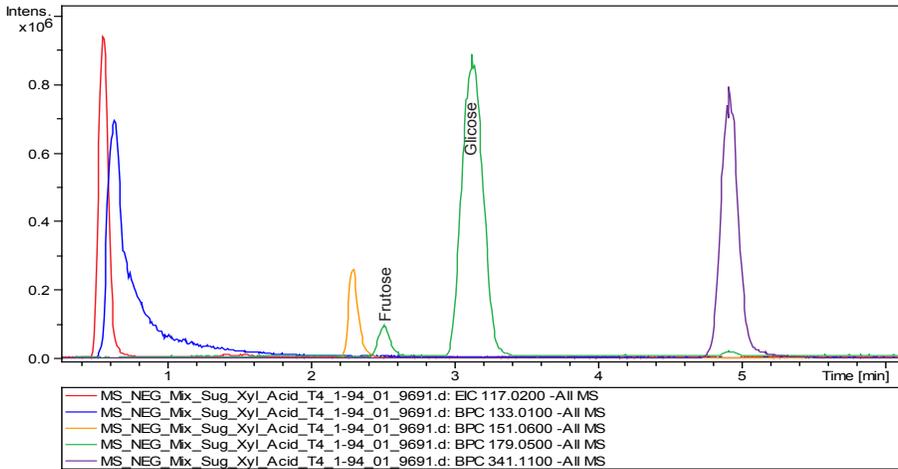


Figura 2. Cromatograma de íons extraídos (EIC) obtido para a mistura padrão com o método otimizado UHPLC-HILIC-ESI(-)-MS Glycan Alcalino (T4) (laranja = xilitol; verde = frutose e glicose; roxo = sacarose; vermelho = ácido succínico; azul = ácido málico).

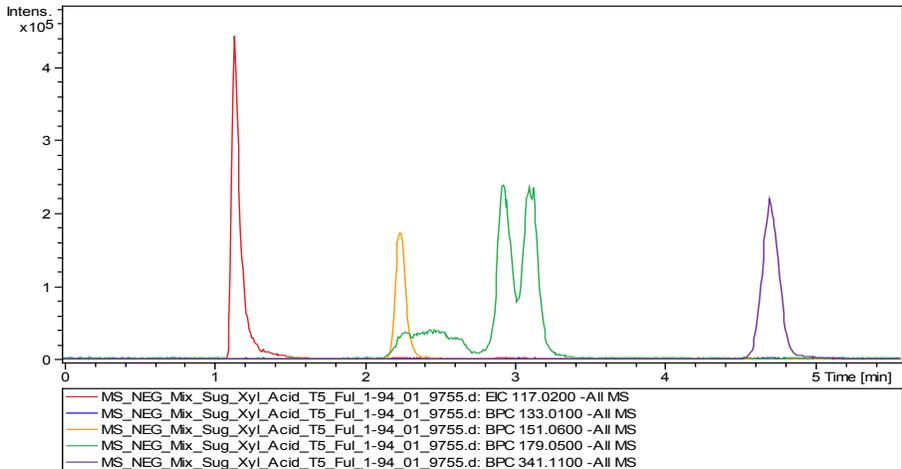


Figura 3. Cromatograma de íons extraídos (EIS) obtido para a mistura padrão com o método otimizado UPLC-HILIC-ESI(-)-MS Glycan Ácido (T5) (laranja = xilitol; verde = frutose + glicose; roxo = sacarose; vermelho = ácido succínico; azul = ácido málico).

Para a coluna SeQuant ZIC-HILIC, observou-se que os parâmetros mais importantes para a otimização da separação foram a proporção inicial de água na fase móvel e a inclinação do gradiente. A fase estacionária dessa coluna caracteriza-se pela presença de grupos funcionais zwitteriônicos (com carga formal negativa e positiva) altamente hidrofílicos. De modo diverso de outros modos de separação cromatográfica, no modo HILIC a fase móvel é parte integral da fase estacionária. A concentração de água no eluente, portanto, tem grande influência no processo de separação, que ocorre por meio da partição dos analitos do eluente para esse ambiente hidrofílico. Quanto mais hidrofílico o composto, maior a sua retenção.

Com a proporção inicial de 20% de água, inclinação do gradiente em 3,3%/min, vazão de fase móvel de 0,3 mL/min e temperatura do forno em 35 °C (SeQuant T5), foi possível obter picos simétricos e com boa resolução para ácidos orgânicos, xilitol e sacarose utilizando a coluna SeQuant. Observou-se, no entanto, picos com formato e resolução inadequada para frutose e glicose, provavelmente em função do conhecido efeito mutarrotacional anomérico característico desses compostos (Jenkins, 2015).

Em solução, hexoses podem alternar livremente entre suas formas α e β , criando um equilíbrio entre os anômeros. Como resultado, é comum observar a formação de múltiplos picos cromatográficos, com alargamento de banda e resolução inadequada. Entre as abordagens frequentemente utilizadas para minimizar esse efeito, estão a utilização de pH alcalino e de temperaturas elevadas, que aumentariam a velocidade da mutarrotação, e associadas a uma menor vazão de fase móvel, facilitariam o colapso dos anômeros em um único pico cromatográfico (Jenkins, 2015). Desse modo, o experimento SeQuant T3 foi realizado tendo-se em vista a obtenção de picos cromatográficos adequados para frutose e glicose, utilizando-se uma menor vazão de fase móvel e uma maior temperatura no forno de colunas. Entretanto, não foi observada melhoria significativa no aspecto dos picos desses analitos, mesmo utilizando-se uma temperatura de 60 °C. A faixa de pH recomendada para a coluna SeQuant ZIC-HILIC é de 3,0 a 8,0. Por esse motivo, não foi possível realizar testes de separação em pH alcalino utilizando essa coluna, sendo necessário o uso de uma coluna diferente para obter uma separação adequada das hexoses.

Para a coluna Glycan BEH Amide, os parâmetros mais importantes para a otimização da separação foram: temperatura da coluna, proporção inicial de água na fase móvel e inclinação da curva do gradiente, com destaque para o primeiro. Como uma separação adequada de ácido málico, ácido succínico, xilitol e sacarose já havia sido obtida com o método SeQuant, a otimização do método Glycan foi focada na melhoria dos picos cromatográficos de frutose e glicose. A fase estacionária da coluna Glycan BEH Amide é constituída de uma partícula de sílica híbrida, com capacidade de operar na faixa de pH de 2 a 12, contendo grupos amida trifuncionalizados ligados à superfície das partículas de sílica. A interação dos analitos com a fase estacionária se dá por meio de interações eletrostáticas fracas do tipo dipolo induzido e ligações de hidrogênio, e a concentração de água, novamente, exerce papel fundamental na retenção dos compostos altamente hidrofílicos.

Com uma proporção inicial de 20% de água, inclinação do gradiente em 4%/min, vazão de fase móvel de 0,15 mL/min, temperatura do forno em 50 °C e fase móvel com pH alcalino (Glycan T4), foi possível obter picos com resolução e formato adequado para todos os compostos, exceto para o ácido málico, que apresentou acentuado efeito de *tailing*. Adicionalmente, verificou-se que os ácidos orgânicos apresentaram tempo de retenção muito pequeno, compatível com o volume morto da coluna, o que não é desejável.

Esse comportamento dos ácidos orgânicos em separações com a coluna BEH Amide em pH alcalino já havia sido observado em estudos anteriores realizados no laboratório (Campos et al., 2017). Desse modo, para avaliar o efeito do pH sobre a retenção dos ácidos orgânicos na coluna BEH Amide, um novo experimento foi realizado utilizando as mesmas condições otimizadas em Glycan T4, mas utilizando-se ácido fórmico no lugar do hidróxido de amônio. Em pH ácido, observou-se uma melhora no tempo de retenção do ácido succínico, que apresentou bom formato de pico e se deslocou do volume morto, mas o pico do ácido málico não foi detectado, um comportamento inesperado tendo-se em vista a melhora nos parâmetros cromatográficos observados para o ácido succínico. Entre as possíveis causas para esse efeito, destaca-se o fato de que, no pH da fase móvel (em torno de 2,8), o ácido málico ($pK_1 = 3,55$) está parcialmente ionizado, o que tende a gerar duplicação ou alargamento do pico cromatográfico. Soma-se a isso o fato de que, nessas condições (pH ácido), a ionização desses compostos é desfavoreci-

da, prejudicando sua detecção no espectrômetro de massa, particularmente no modo negativo.

Em pH ácido observou-se, ainda, uma piora nos picos relativos a frutose e glicose, o que reforça a importância do pH alcalino na minimização do já mencionado efeito mutarrotacional anomérico. Os demais compostos, xilitol e sacarose, se comportaram de forma similar em ambas as faixas de pH, o que era esperado, tendo-se em vista que são compostos neutros.

Nas Figuras 4 e 5, são apresentados os cromatogramas obtidos com amostra de líquido apoplástico diluído 50x injetado nas condições otimizadas para os métodos UHPLC-HILIC-MS SeQuant e Glycan.

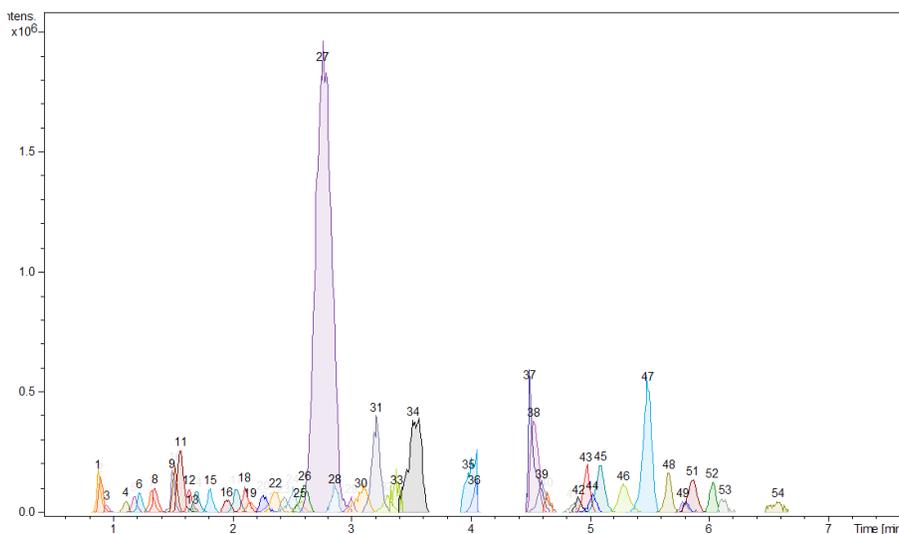


Figura 4. Cromatograma *dissect* obtido para o líquido apoplástico diluído 50x injetado nas condições do método otimizado UHPLC-HILIC-ESI(+)-MS SeQuant (T5). De 4,1 min a 4,5 min, o eluente é direcionado para o descarte para evitar contaminação do espectrômetro de massas com sacarose.

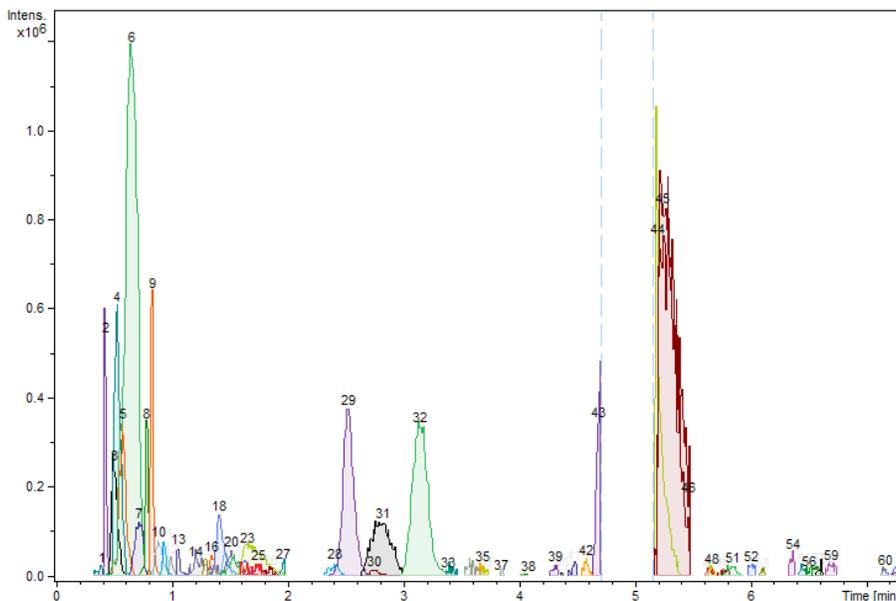


Figura 5. Cromatograma *dissect* obtido para o líquido apoplástico diluído 50x injetado nas condições do método otimizado UHPLC-HILIC-ESI(-)-MS Glycan pH alcalino (T4). De 4,7 min a 5,2 min, o eluente é direcionado para o descarte para evitar contaminação do espectrômetro de massas com sacarose.

Foram detectados no líquido apoplástico 54 compostos utilizando o método UHPLC-HILIC-ESI(+)-MS SeQuant e 60 compostos utilizando o método UHPLC-HILIC-ESI(-)-MS Glycan, demonstrando a capacidade dos métodos desenvolvidos em separar e detectar compostos polares altamente hidrofílicos. A título de comparação, nos experimentos anteriormente realizados no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis, haviam sido detectados apenas 5 compostos utilizando a técnica GC-MS e 6 compostos utilizando a técnica DIMS.

Conclusões

Os métodos UHPLC-HILIC-MS desenvolvidos demonstraram grande potencial para aplicação na análise do metaboloma de amostras contendo compostos polares altamente hidrofílicos. Os métodos permitem a análise de grande número de amostras, em função dos tempos de análises relativamente curtos, e ainda permitem a detecção de compostos majoritários e minoritários, por meio da injeção de diferentes diluições da amostra e do uso da *divert valve*. A técnica HILIC é uma importante ferramenta complementar aos métodos RPLC tradicionais, e seu uso deve ser avaliado conforme as características químicas dos compostos presentes na amostra de interesse.

Referências

- ABDELNUR, P. V. **Metabolômica e espectrometria de massas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 4 p. il. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 010).
- ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. M. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 2-9, 2014.
- APPELBLAD, P.; JONSSON, T.; PONTÉN, E.; VIKLUND, C.; JIANG, W. **A practical guide to HILIC**. Umea: Merck SeQuant AB, 2008.
- ARAÚJO, L. L. **Identificação de compostos presentes no apoplasto da cana-de-açúcar por técnicas de espectrometria de massas**. 2015. Monografia (graduação) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- ASIS JUNIOR, C. A.; SHIMIZU, T.; KHAN, M. K.; AKAO, S. Organic acid and solution sugar contents in sugarcane stem apoplast and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 49, n. 6, p. 915-920, 2003.
- CAMPOS, C. G.; VERAS, H. C. T.; RIBEIRO, J. A. A.; COSTA, P. P. K. G.; ARAÚJO, K. P.; RODRIGUES, C. M.; ALMEIDA, J. R. M.; ABDELNUR, P. V. New protocol based on UHPLC-MS/MS for quantitation of metabolites in xylose-fermenting yeasts. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 12, p. 2646-2657, 2017.
- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, 5631-5642, 2014.
- CONTREPOIS, K.; JIANG, L.; SNYDER, M. Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (HILIC) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)-mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 1684-1695, 2015.
- CUBBON, S.; ANTONIO, C.; WILSON, J.; THOMAS-OATES, J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 5, p. 671-684, 2010.
- JENKINS, K. HILIC separation of carbohydrates using BEH amide particle technology. **Chromatography Today**, p. 14-18, Nov./Dec. 2015.

PAGLIA, G.; LANGRIDGE, J.; ASTARITA, G. **Development of a metabolomic assay for the analysis of polar metabolites using HILIC UPLC/QToF MS**: application note. Milford, MA: Waters Corporation, 2013.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar**: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11335), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Circular técnica, 30).

SAKURAI, N. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1101, p. 133-148, 1998.

SCHULTZ, N.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. **Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada**: fontes nitrogenadas, formas de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2015. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 298).

SPAGOU, K.; TSOUKALI, H.; RAIKOS, N.; GIKA, H.; WILSON, I. D.; THEODORIDIS, G. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 6-7, p. 716-727, 2010.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 80-85, 2006.

VARGAS, L. H. G.; RODRIGUES NETO, J. C.; RIBEIRO, J. A. A.; RICCI-SILVA, M. E.; SOUZA JR, M. T.; RODRIGUES, C. M.; OLIVEIRA, A. E.; ABDELNUR, P. V. Metabolomics analysis of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf: evaluation of sample preparation steps using UHPLC-MS/MS. **Metabolomics**, v. 12, n. 10, artigo 153, 2016.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118-124, 2008.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, p. 58-69, 2006.

WANG, J.; NAYAK, S.; KOCH, K.; MING, R. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum species*). **Frontiers in Plant Science**, v. 4, article 201, 2013.

Embrapa

Agroenergia



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

