

USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO NO ESTUDO DE METABÓLITOS PROVENIENTES DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS

Luiz Regis Prado Junior (PIBIC/CNPq), Daniele Maria Zanzarin (PG), Rafaela Takako de Almeida (PG), Rodolpho Martin do Prado (PQ), Carla Porto (PQ), Eduardo Jorge Pilau (Orientador), e-mail: epilau@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR

1.06.04.00-6 Química Analítica/1.06.04.01-4 Separação

Palavras-chave: metabolômica, rúmen, espectrometria de massas

Resumo

O aumento da população, expectativa de vida e poder aquisitivo representa uma maior demanda de água, energia e alimentos. A indústria pecuária representa um importante papel socioeconômico no Brasil, e a eficiência na produção animal está diretamente relacionada com um bom manejo nutricional e sanitário. O rúmen é uma grande câmara de fermentação e apresenta ecossistema complexo e a simbiose realizada com o hospedeiro. A degradação e fermentação ruminal culmina no fornecimento de nutrientes e metabólitos para o animal. Assim, explorar as interações e funcionalidades do microbioma ruminal é fundamental para melhorar a eficiência alimentar, diminuir emissão de metano e descobrir novas enzimas e agentes antimicrobianos. Os animais utilizados receberam uma dieta específica por 21 dias. O líquido ruminal foi coletado e centrifugado e os metabólitos foram extraídos pela associação de diferentes métodos. A análise metabolômica foi feita a partir de UHPLC-MS/MS em associação à ferramenta *Molecular Networking*. Metabólitos como enterolactona e alguns ácidos graxos dicarboxílicos foram identificados. Os resultados obtidos contribuem para a investigação do papel de compostos químicos envolvidos na manutenção e modulação do ecossistema do rúmen, bem como na saúde e produção animal.

Introdução

Os ruminantes constituem um dos grupos de maior importância econômica na pecuária moderna. A capacidade única na conversão de forragens e subprodutos em alimentos de alta qualidade como leite e carne, se deve pela simbiose com a microbiota ruminal, onde as enzimas provenientes dos microrganismos atuam de forma sinérgica, promovendo a degradação dos materiais lignocelulósicos (Hobson e Stewart, 1997). Explorar as interações e funcionalidades microbianas do rúmen é fundamental para melhorar a eficiência alimentar, diminuir a emissão de metano e para a prospecção de novas enzimas e compostos bioativos. Pouco se conhece sobre a composição química dos metabólitos do rúmen e o recente avanço das tecnologias “ômicas” impulsiona o avanço na compreensão da ecologia no ambiente ruminal. Dessa forma, investigação

metabólica a partir de uma abordagem abrangente, assim como a associação de diferentes métodos de extração, torna-se capazes de representar as características químicas existentes em uma amostra complexa.

Os estudos metabolômicos não direcionados são baseados em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (UHPLC-MS/MS). A instrumentação empregada exibe alta sensibilidade e rapidez na detecção de compostos em baixa concentração. Os dados gerados por tal análise requerem o uso de ferramentas de bioinformática. Neste estudo foi aplicado o *Molecular Networking*, que permite a avaliação visual e estrutural de metabólitos relacionados com padrão de fragmentação semelhantes. Assim, as famílias moleculares podem ser agrupadas em um mapa químico, proporcionando a possibilidade de interpretar os conjuntos de dados de metabolômica.

Materiais e métodos

Para a realização do presente estudo, foi coletado 300 mL de líquido ruminal de uma vaca Holstein múltipara, não lactante. O conteúdo foi filtrado em gaze estéril, seguido de centrifugação a 13.000 g durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante livre de células foi filtrado usando filtros de membrana com tamanho de poro 0,45 µm e 0,22 µm. As alíquotas foram extraídas pelo método de extração líquido-líquido, empregando os solventes acetato de etila, acetato de etila acidificado (1% de ácido fórmico) e acetato de etila basificado (1% de hidróxido de amônio). Em todos os métodos, adicionou-se 1,0g de NaCl e as amostras foram agitadas em vórtex durante 2 minutos. Após separação das fases, a camada orgânica foi reservada e a camada inferior foi novamente extraída. Os extratos foram analisados por cromatografia (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada à espectrometria de massas (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha), equipado com fonte de ionização por *eletrospray*. O mapa químico no MN foi gerado com os dados espectrais de fragmentação MS/MS. Os espectros foram comparados com o banco de dados do GNPS (*Global Natural Products Social*), e o mapa químico foi visualizado no Cytoscape.

Resultados e Discussão

Os métodos de extração líquido-líquido são amplamente empregados em estudos metabolômicos e resultaram em 1166 entidades químicas identificadas. O mapa químico (Figura 1) gerado com auxílio da ferramenta MN forneceu informações sobre a distribuição dos íons e também propiciou a identificação de alguns compostos que corresponderam ao banco de dados do GNPS.

A partir da análise, foi possível observar o uso da monensina ($[M+Na]^+$ m/z 693,415 como aditivo alimentar no ruminante, que é comumente utilizado para aumentar a eficiência através da regulação da fermentação ruminal (Van Nevel e Demeyer, 1977) (Figura 2).



Figura 1: Mapa químico gerado pela ferramenta *Molecular Networking* dos metabólitos ruminais analisados por UHPLC-MS/MS

Além disso, compostos como a enterolactona ($[M+H]^+$ m/z 299.126), a principal enterolignana de mamíferos produzido no rúmen, foi identificada a partir desta análise.

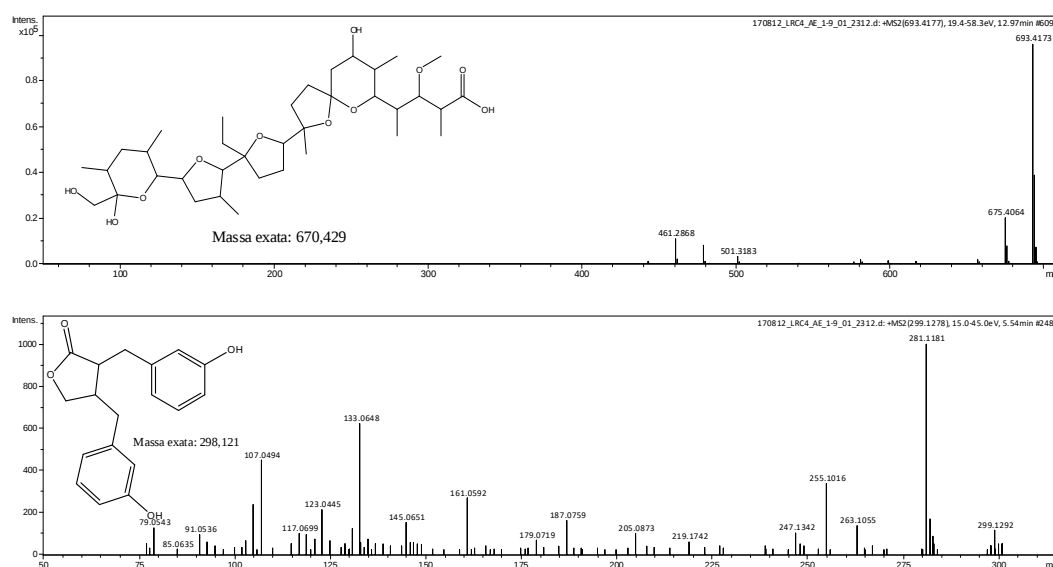


Figura 2: Espectros de MS/MS de metabólitos identificados no líquido ruminal. **(A)** Espectro da monensina, íon foi identificado como $[M+Na]^+$ e com 0,93 ppm de erro. **(B)** Espectro da enterolactona, íon foi identificado como $[M+H]^+$ com 1,79 ppm de erro.

A formação de clusters possibilitou identificar, de acordo com a biblioteca do GNPS, a família dos ácidos dicarboxílicos (Figura 3), sendo o ácido decanodióico ($[M+H]^+$ m/z 203,127) e ácido dodecanodióico ($[M+H]^+$ m/z 231,159). Estes ácidos são derivados da hidrogenação microbiana dos ácidos dienóicos formados a partir do ácido linoleico (Goularte, et al., 2011).

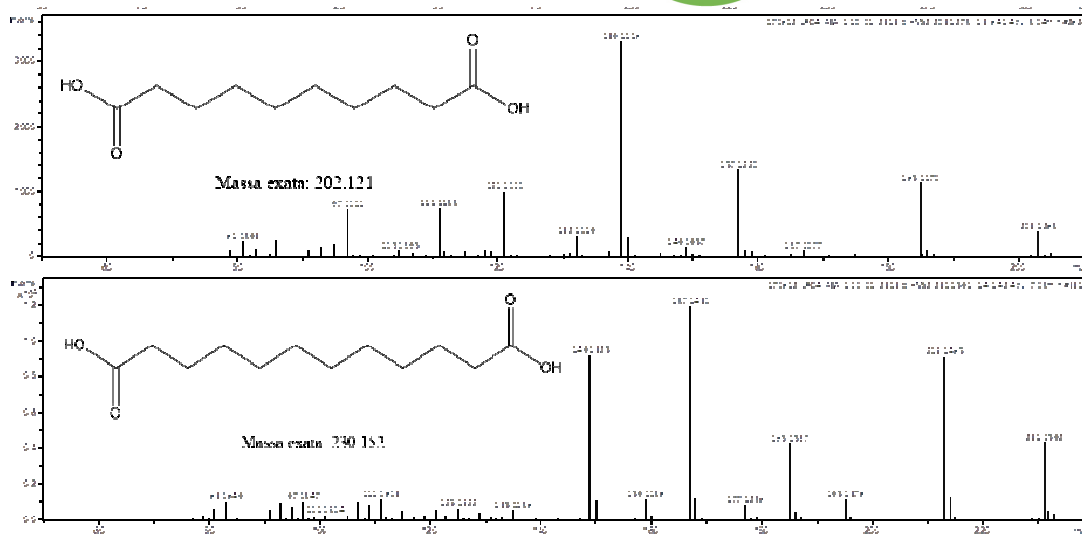


Figura 2: Espectros de MS/MS de metabólitos identificados no líquido ruminal. **(A)** Espectro de MS/MS do ácido decanodióico, o íon foi identificado como $[M+H]^+$ com 3,61 ppm de erro. **(C)** Espectro de MS/MS do ácido dodecanodióico, o íon foi identificado como $[M+H]^+$ com 1,88 ppm de erro.

Conclusões

Os resultados do estudo metabolômico possibilitou a identificação de compostos químicos presentes no rúmen. Isso auxilia a investigação de metabólitos envolvidos na manutenção e modulação do ecossistema ruminal e sobre como a variação neste ecossistema tem influência direta na saúde animal e na eficiência alimentar e produção animal. Ainda, o emprego da ferramenta *Molecular Networking* propiciou a análise de modo mais eficiente.

Agradecimentos

CNPq, FINEP, COMCAP – UEM

Referências

GOULARTE, S., ÍTAVO, L., SANTOS, G., et al. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p.1479-1486, 2011.

HOBSON, P.N., STEWART, C.S. The rumen microbial ecosystem. **Springer Science & Business Media**, Holanda, 1997.

VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, Estado Unidos, v. 34, n. 3, p. 251-257, 1977.