

Estudo de marcadores químicos da doença causada pelo nematoide *Aphelenchoides besseyi* na soja por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas e análise de componentes principais

Vitor H. G. Murakami (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo J. Pilau
(Orientador), e-mail: ra114945@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Química/ Maringá, PR.
Centro de Ciências Exatas e da Terra/Maringá, PR

Química e Química analítica

Palavras-chave: Metabólitos; PCA; UHPLC-QTOF-MS/MS;.

Resumo

A soja tem uma grande importância para o agronegócio mundial e algumas pragas como o nematoide *Aphelenchoides besseyi* tem causado expressivas perdas. O estudo dos metabólitos envolvidos podem trazer importantes informações para o entendimento da doença. Com o objetivo de melhor entender a relação planta-nematoide, foi utilizada a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e análise de componentes principais para análise de amostras de folha de soja controle e inoculadas com *A. besseyi*. A partir da análise dos espectros de massas das amostras, foi possível distinguir os grupos em razão de íons de razão massa-carga média 116.070, 219.174, 275.200, 277.215, 291.195, 293.210, 315.192, 338.341, 398.231, 553.423, 593.273, 603.423, 607.394, 609.268. Foi possível identificar putativamente a classes de 6 íons, sendo 2 ácidos graxos, 1 ácido graxo, 1 amida primária, 1 terpeno e 1 feoforbídeo.

Introdução

O agronegócio tem sido prejudicado pela diversas pragas, em especial nematoides, responsáveis por um prejuízo de 30 bilhões de reais por ano (MACHADO, 2015). O nematoide *Aphelenchoides besseyi*, causador da doença “Soja Louca II”, tem ganhado destaque devido às grandes perdas que causa (FERRAZ; BROWN, 2016). Durante o processo de reprodução da soja o nematoide causa deformidades e assim diminui a quantidade de grãos produzidos (MEYER, 2015). Marcadores químicos são substâncias características da amostra que podem ser utilizadas na detecção de alterações nos processos metabólicos causadas por algum tipo de estresse sofrido pela planta (AMORIM, 2003).

Por conta disso, são necessários estudos para melhor entender a relação planta-nematoide e suas implicações metabólicas. Para tal, a abordagem metabolômica pode ser aplicada através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*), por conta de sua combinação de sensibilidade e seletividade, permitindo identificar, quantificar e caracterizar a estrutura de metabólitos (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; LEI et al.,

2011; EL-ANEED; COHEN; BANOU 2009). Devido à grande quantidade de dados obtidos por LC-MS, muitas vezes a análise visual ou por métodos univariados não é suficiente para identificar semelhanças e diferenças entre as amostras, assim é necessário utilizar métodos multivariados como a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*) que apresenta formas mais representativas dos dados através da eliminação de informações redundantes e redução de dimensionalidade. Dessa forma, as informações relevantes são separadas e ampliadas, tornando mais evidentes as diferenças entre as variáveis e similaridades das amostras (FERREIRA, 2015) e facilitando entendimento da interação entre *A. besseyi* e soja, juntamente com a comparação entre plantas infectadas e saudáveis na busca por marcadores químicos.

Materiais e métodos

Após 15 dias de inoculação, folhas das amostras controle e inoculadas com *A. besseyi* foram recolhidas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em gral com auxílio de pistilo. Para cada amostra, foram retirados dois microtubos estéreis contendo 100 mg do material vegetal homogeneizado cada, que foram incorporados a uma solução extratora composta por Clorofórmio, Metanol e Água, 3:1:1 (v/v/v). A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 10 s e ultrassom com banho de gelo por 20 minutos. Após filtração com filtro de seringa com membrana de PTFE hidrofóbico 0,22 µm o solvente foi evaporado com fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em Acetonitrila e Água 1:1 (v/v) para análise em UHPLC-MS/MS. Foram injetados 0,2 µL dos extratos em UHPLC com coluna C18 acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF com fonte de electrospray operando no modo positivo. Para a separação cromatográfica foi utilizada como fase móvel uma mistura de solventes em gradiente, em que o solvente A utilizado foi Água acidificada com Ácido Fórmico a 0,1% (v/v) e o solvente B por Acetonitrila acidificada com Ácido Fórmico a 0,1% (v/v). A mistura de gradiente dos solventes A e B foi como segue: 5% B 0-1 min, 70% B 1-10 min, 98% B 12-15 min e mantida a 5% de B 16-20 min a 40°C, sendo os quatro minutos finais destinados à reconstituição da coluna para a próxima análise.

Os espectros de massas obtidos foram pré-processados e organizados em formato matricial utilizando o *software* ProfileAnalysis. A Análise de Componentes Principais foi feita através do *software* MATLAB R2007b e pacote de ferramentas computacionais do PLS-Toolbox.

A identificação putativa dos íons de interesse foi realizada a partir do cálculo do erro de massa em conjunto com a comparação entre o padrão de fragmentação obtido e o descrito na literatura.

Resultados e Discussão

Foram adquiridos espectros de massas das amostras controle e inoculadas com *A. besseyi* e, a partir deste conjunto de dados, foi construída uma matriz com base na intensidade de cada íon medido. Para avaliar as

semelhanças e diferenças entre os grupos controle e inoculado, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA), em que foram necessárias 5 PCs para explicar 93,64% da variância total dos dados.

A partir dos *scores* da contraposição de PC1 e PC2, que acumulam 75,64% de variância explicada, foi possível observar a separação entre os grupos controle e inoculado em relação a PC1. Na Figura 1 estão apresentados os *scores* (A) de PC1 vs PC2 e os *loadings* (B) de PC1, que representam quanto cada variável (*m/z*) influencia na separação observada.

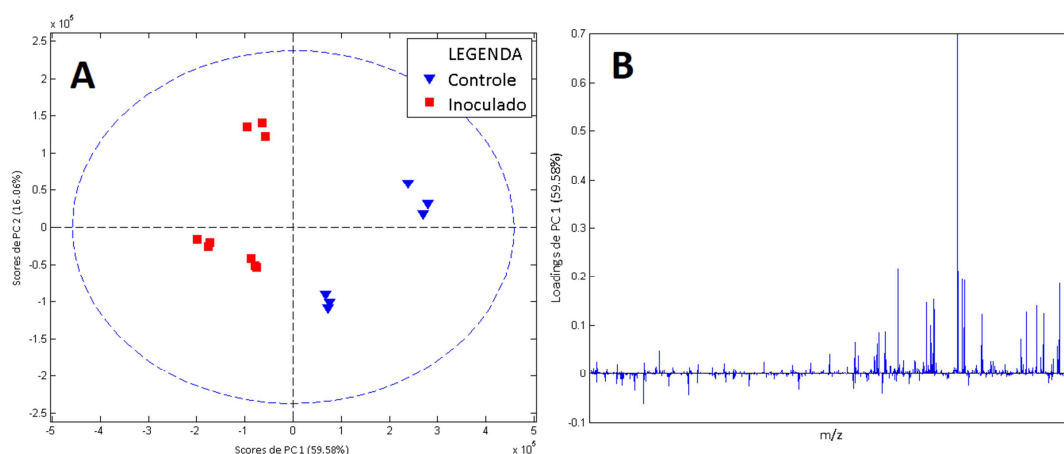


Figura 1 - Scores de PCA (PC1 vs PC2) dos espectros de massas de amostras controle e inoculadas com *A. besseyi* (A) e *loadings* de PC1 (B).

A análise dos *loadings* sugere que a separação entre os grupos controle e inoculado é influenciada pelos íons de razão massa-carga média 116.070, 219.174, 275.200, 277.215, 291.195, 293.210, 315.192, 338.341, 398.231, 553.423, 593.273, 603.423, 607.394, 609.268.

Dentre esses, a classe de 6 foram putativamente identificados e estes resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Classes dos metabólitos importantes para a diferenciação entre amostras controle e inoculadas com *A. besseyi*.

Classe	Fórmula molecular	tR (min)	[M+H] ⁺ medida	[M+H] ⁺ teórica	Erro de massa (ppm)
Acila graxa	C18H26O2	8,77	275,1999	275,2005	-2,38
Acila graxa	C18H28O3	10,44	293,2102	293,2111	-3,14
Ácido graxo	C18H28O2	11,45	277,2153	277,2162	-3,27
Terpeno	C15H22O	11,95	219,1738	219,1743	-2,47
Feoforbídeo	C35H36N4O5	14,7	593,2732	593,2758	-4,46
Amida primária	C22H43NO	17,2	338,3416	338,3417	-0,41

Conclusões

A Análise de Componentes Principais dos espectros de massas de amostras de soja controle e inoculadas com *Aphelenchoides besseyi* mostrou que há diferença metabólica entre os grupos e indicou quais íons são importantes nessa diferenciação. A partir do cálculo de erro de massa e comparação dos espectros de fragmentação com o que já foi descrito na literatura, foram putativamente identificadas algumas classes destes íons, como acilas graxas, ácidos graxos insaturados, terpenos, feoforbídeos e amidas primárias.

Agradecimentos

UEM/DQI, PIBIC/CNPq.

Referências

ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, n. March, p. 1–20, 2015.

AMORIM. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.* Vol. 6, Nº 2. Belo Horizonte, 2003.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam*, v. 24, p. 285-294, 2005.

EMBRAPA . Soja em números (safra 2020/2021). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 21 ago. 2021.

FERREIRA, M. M., C. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Ed. 251 p, 2016.

MACHADO, A. Nematóide: a praga que custa R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro, 2015.