

UFG

IQ

J  
O  
R  
G  
E

C  
A  
N  
D  
I  
D  
O

R  
O  
D  
R  
I  
G  
U  
E  
S

N  
E  
T  
O

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Prospecção de marcadores químicos  
relacionados ao Amarelecimento Fatal em  
folhas de *Elaeis guineensis* utilizando  
abordagem metabolômica

JORGE CANDIDO RODRIGUES NETO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

GOIÂNIA - 2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Jorge Candido Rodrigues Neto

Título do trabalho: Prospecção de marcadores químicos relacionados ao Amarelecimento Fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando abordagem metabolômica

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Jorge Candido Rodrigues Neto  
Assinatura do (a) autor(a) <sup>2</sup>

Data: 29 / 03 / 2017

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Prospecção de marcadores químicos relacionados ao Amarelecimento  
Fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando abordagem  
metabolômica**

Jorge Candido Rodrigues Neto

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Federal de Goiás  
como exigência parcial, para obtenção do  
título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur

Goiânia  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rodrigues Neto, Jorge Candido  
Prospecção de marcadores químicos relacionados ao Amarelecimento Fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando abordagem metabolômica [manuscrito] / Jorge Candido Rodrigues Neto. - 2017.  
viii, 75 f.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2017.  
Bibliografia.  
Inclui abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Elaeis guineensis*. 2. Espectrometria de Massas. 3. Metabolômica. 4. Quimiometria. 5. Imagem química. I. Abdelnur, Patrícia Verardi, orient. II. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)**

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de Jorge Cândido Rodrigues Neto, aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aos dias 03 (três) de março do ano de 2017 (dois mil e dezessete), com início às 14:00 hs (catorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dr. Patrícia Verardi Abdelnur (Embrapa), Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG) e Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Jorge Cândido Rodrigues Neto intitulada: “Prospecção de marcadores químicos relacionados ao amarelecimento fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando abordagem metabolômica”. A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, o candidato foi arguido pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur: APROVADO  
Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves: Aprovado  
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovado

A seguir, na presença do público e do candidato, a presidente da Banca Examinadora declarou que Jorge Cândido Rodrigues Neto, candidato ao título de Mestre em Química foi: Aprovado( ); Reprovado ( ). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente cumprimentou o candidato e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 03 de março de 2017.

---

Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur (EMBRAPA)

---

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)

---

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Marly, e à Aline.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Química pela possibilidade de realização do curso de mestrado.

À Embrapa Agroenergia, pelo apoio institucional e por proporcionar uma estrutura excepcional, além de viabilizar o contato com pesquisadores e analistas de extrema competência.

À CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

À pesquisadora Dra. Patrícia Verardi Abdelnur, pela orientação, compreensão, apoio e confiança no meu trabalho.

Aos analistas José Antônio de Aquino Ribeiro e Patrícia Pinto Kalil Gomes Costa, pelos valorosos ensinamentos no uso dos equipamentos do laboratório.

Aos amigos e colegas do LQB, Augusto, Christiane, Flávia, Jéssica Macêdo, Jéssica Souza, Mauro, Paula, Pedro, Rodrigo Wesley, Tallyta, Vanda e Vinícius, pelo ótimo convívio, apoio e amizades formadas.

Ao Prof. Dr. Alselmo Elcana de Oliveira, pela colaboração nas análises de ASCA.

Aos professores que contribuíram para a minha formação.

Aos meus pais João e Marly, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões e pela educação que levo comigo pra sempre.

À minha irmã Camila que, mesmo distante, sempre está presente e torcendo por mim.

À Aline, meu grande amor, por todo o carinho, compreensão e apoio, fundamental para que nossos objetivos sejam alcançados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE ESQUEMAS.....	iv
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. <i>Elaeis guineensis</i> .....	2
1.2. Amarelecimento Fatal (AF).....	3
1.3. Metabolômica .....	4
1.3.1. Preparo de amostra em metabolômica.....	6
1.3.2. Técnicas analíticas aplicadas a metabolômica.....	6
1.3.3. Processamento de dados em metabolômica.....	14
1.4. Metabolômica aplicada a dendê .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3. CAPÍTULO 1 .....	20
3.1. Procedimento experimental .....	21
3.1.1. Materiais e métodos .....	21
3.1.2. Aquisição do material .....	21
3.1.3. Extração dos metabólitos .....	23
3.1.4. Análise por UHPLC-MS/MS .....	23
3.2. Resultados e Discussão .....	25
3.2.1. Dados UHPLC-ESI(+)-MS .....	29
3.2.2. Dados UHPLC-ESI(-)-MS.....	32
3.2.3. Identificação dos metabólitos de interesse.....	35
3.3. Conclusão Parcial.....	36
4. CAPÍTULO 2 .....	37
4.1. Procedimento experimental .....	38
4.1.1. Materiais e métodos .....	38
4.1.2. Aquisição de material .....	38
4.1.3. Extração dos metabólitos .....	39
4.1.4. Análise por UHPLC-MS/MS .....	39

4.2. Resultados e Discussão .....	41
4.2.1. Dados UHPLC-ESI(+)-MS .....	43
4.2.3. Identificação dos Metabólitos .....	45
4.2. Conclusão Parcial .....	51
5. CAPÍTULO 3 .....	52
5.1. Procedimento experimental .....	53
5.1.1. Materiais e métodos .....	53
5.1.2. Aquisição de material .....	53
5.1.2. Experimento de imagem química por MALDI-MSI.....	54
5.1.3. Experimento de imagem química por LDI-MS .....	56
5.2. Resultados e discussão .....	56
5.2.1. Otimização do preparo de amostra .....	56
5.2.2. Otimização dos parâmetros instrumentais .....	57
5.2.3. Imagem química com uso da matriz DHB .....	58
5.2.2. Imagem química com uso da matriz 9-AA.....	59
5.2.3. Imagem química sem uso de matriz (LDI-MSI) .....	61
5.3. Conclusão Parcial.....	64
6. CONCLUSÃO.....	65
7. PERSPECTIVAS.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Cultivo de <i>Elaeis guineensis</i> . B) Cacho e frutos maduros de dendê após colheita.....	2
<b>Figura 2.</b> Dendzeiros afetados pelo Amarelecimento Fatal.....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema geral de formação de íons por eletrospray .....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema geral de Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).....	10
<b>Figura 5.</b> Esquema do analisador TOF (a) linear e (b) refletor.....	13
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. *TA: Temperatura Ambiente. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%..	26
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. *100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.....	26
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. *N <sub>2</sub> : nitrogênio líquido. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. .....	27
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. *TA: Temperatura Ambiente. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%..	27
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. *100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.....	28
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. *N <sub>2</sub> : nitrogênio líquido. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. .....	28
<b>Figura 12.</b> Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de transporte. A) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. B) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. C) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo e azul: nitrogênio líquido.. .....	30
<b>Figura 13.</b> Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70% e azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon $m/z$ 147,044 é um fragmento do íon $m/z$ 379,0528.....	32
<b>Figura 14.</b> Dados UHPLC-ESI(-)-MS com análise da condição de transporte. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo e azul: nitrogênio líquido.....	33

<b>Figura 15.</b> Dados UHPLC-ESI(-)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70% e azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon $m/z$ 366,995 é um dímero do íon 182,994. ....	35
<b>Figura 16.</b> Protocolo de extração de compostos químicos em tecido vegetal. Adaptado de Giavalisco et al., 2011. ....	38
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R1 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF. ....	42
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R2 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF. ....	42
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R3 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF. ....	43
<b>Figura 20.</b> Dados de PCA dos extratos de folha de dendê com e sem AF, após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. A) Scores plot. B) Loadings plot. ....	44
<b>Figura 21.</b> Análise de cluster por heatmap dos possíveis biomarcadores de AF em folha de dendê.....	45
<b>Figura 22.</b> Espectro ESI(-)-MS/MS do íon $m/z$ 563,151. ....	47
<b>Figura 23.</b> Experimento de MS/MS e íons fragmentados no tempo de retenção 1,00 min. ....	48
<b>Figura 24.</b> Espectro ESI(+)-MS/MS do ácido quelidônico ( $m/z$ 185,008). ...	48
<b>Figura 25.</b> Espectro ESI(+)-MS/MS da arginina ( $m/z$ 175,120).....	49
<b>Figura 26.</b> Espectro ESI(+)-MS referente ao tempo de retenção 1,00 min. ....	49
<b>Figura 27.</b> Espectro ESI(+)-MS/MS do íon $m/z$ 138,091. ....	50
<b>Figura 28.</b> Espectro ESI(+)-MS/MS da glicerofosforilcolina ( $m/z$ 258,108). ....	50
<b>Figura 29.</b> Preparo de amostra para imagem química por MALDI-MSI. ....	54
<b>Figura 30.</b> Folha de dendê após aplicação de matriz DHB, imagem química de todos os íons detectados e imagem química do íon $m/z$ 505,23. A) aplicação com spray. B) aplicação com pipeta. ....	59
<b>Figura 31.</b> Folha de dendê após aplicação de matriz 9-AA, imagem química de todos os íons detectados e imagem química do íon $m/z$ 341,54. A) aplicação com spray. B) aplicação com pipeta. ....	60
<b>Figura 32.</b> Segmento da folha de dendê antes da análise e somatória de todos os íons detectados por imagem química em LDI-MS.....	62
<b>Figura 33.</b> Imagem química e espectro de massas por MALDI-MS do íon $m/z$ 121.52, atribuído a um fragmento do íon 138.09 (Tiramina) .....	62
<b>Figura 34.</b> Imagem química e espectro de massas do íon $m/z$ 108.44, atribuído a 2-aminofenol, 4-aminofenol e 3-hidroxi-n-metilpiridina.....	63
<b>Figura 35.</b> Imagem química e espectro de massas do íon $m/z$ 148.17, atribuído a N-butilanilina .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Amostras de folha de dendê analisadas por UHPLC-ESI(+/-)-MS sob diferentes condições de transporte e extração.....	22
<b>Tabela 2.</b> Gradiente de eluição aplicado no método UHPLC otimizado. ....	24
<b>Tabela 3.</b> Metabólitos identificados em folhas de <i>E. guineensis</i> após análise por HRMS e MS/MS. ....	36
<b>Tabela 4.</b> Possíveis biomarcadores identificados em folhas de <i>E. guineensis</i> por análise em UHPLC-MS.....	50
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros instrumentais para análise de metabólitos de folhas por MALDI-MSI. ....	55
<b>Tabela 6.</b> Imagem química de metabólitos de dendê. ....	61

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Etapas gerais realizadas em um experimento de impressão digital metabólica ( <i>metabolic fingerprinting</i> ).....	5
<b>Esquema 2.</b> Preparo de amostra com aplicação de matriz e análise por MALDI-MSI .....	11
<b>Esquema 3.</b> Coleta e preparo de amostra em diferentes métodos de transporte e solvente. ....	22

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

9-AA	9-aminoacridina (do inglês, <i>9-aminoacridine</i> )
AF	Amarelecimento Fatal
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of Variance</i> )
ASCA	Análise de componente simultâneo e análise de variância (do inglês, <i>ANOVA simultaneous component analysis</i> )
BPC	Cromatograma de Pico Base (do inglês, <i>Base Peak Chromatogram</i> )
ChEBI	Entidades Químicas de Interesse Biológico (do inglês, <i>Chemical Entities of Biological Interest</i> )
Da	Dalton
DHB	Ácido 2,5-dihidróxibenzóico (do inglês, <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i> )
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês, <i>Electrospray Ionization</i> )
FMF	Busca de Características Moleculares (do inglês, <i>Find Molecular Features</i> )
GC-MS	Cromatografia a gás – Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> )
Hz	Hertz
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidróxicinâmico (do inglês, <i><math>\alpha</math>-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> )
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (do inglês, <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> )
ITO	Óxido de Índio e Estanho (do inglês, <i>Indium Tin Oxide</i> )
KEGG	Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )
LC-MS	Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> )
LDI	Ionização por Dessorção a Laser (do inglês, <i>Laser Desorption Ionization</i> )
$m/z$	Razão massa-carga

MALDI	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> )
MeOH	Metanol
MSI	Imagem por Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Mass Spectrometry Imaging</i> )
MTBE	Metil-terc-butil-éter
NaOH	Hidróxido de sódio
PCA	Análise de Componente Principal (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i> )
rT	Tempo de Retenção (do inglês, <i>Retention Time</i> )
TOF	Tempo de Voo (do inglês, <i>Time of Flight</i> )
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (do inglês, <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )
V	Volts
$\lambda$	Comprimento de onda

## RESUMO

O dendê, fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é a maior fonte de óleo vegetal do mundo e teve boa adaptação ao clima subtropical brasileiro. Seu cultivo no Brasil, que tem maior extensão no Pará, é afetado pelo Amarelecimento Fatal (AF), uma condição que pode provocar a morte da planta e tem causa desconhecida. O objetivo deste projeto de mestrado foi prospectar e identificar marcadores químicos relacionados ao AF utilizando uma abordagem metabolômica. Para que o estudo dessa causa fosse realizado, pela primeira vez foram avaliados diferentes métodos de transporte e extração de folhas para verificar a estabilidade do perfil metabólico desta espécie. Diferenças significativas foram observadas utilizando a estratégia de *metabolic fingerprinting*, com análise dos metabólitos por cromatografia de ultra alta eficiência – espectrometria de massas (UHPLC-MS) e análise quimiométrica dos dados por análise de componente simultâneo e análise de variância (ASCA). Após este estudo, folhas com e sem sintomas de AF foram transportadas utilizando protocolo otimizado anteriormente, analisadas e cinco potenciais biomarcadores foram identificados e relacionados as suas respectivas vias metabólicas, utilizando a análise de componentes principais (PCA) como ferramenta quimiométrica. Por fim, fez-se uso da recente e avançada técnica de imagem química em espectrometria de massas, com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS *Imaging*), que vem se destacando como uma poderosa ferramenta para a identificação de compostos químicos presentes na superfície de um tecido com localização espacial e foi utilizada pela primeira vez em um *screening* de metabólitos em folhas de dendê na busca dos marcadores previamente identificados. Um protocolo analítico foi desenvolvido para análise com aplicação de matriz e sem aplicação de matriz, com o intuito de abranger uma maior faixa de massas e um dos possíveis marcadores foi detectado utilizando a técnica de imagem sem matriz.

## ABSTRACT

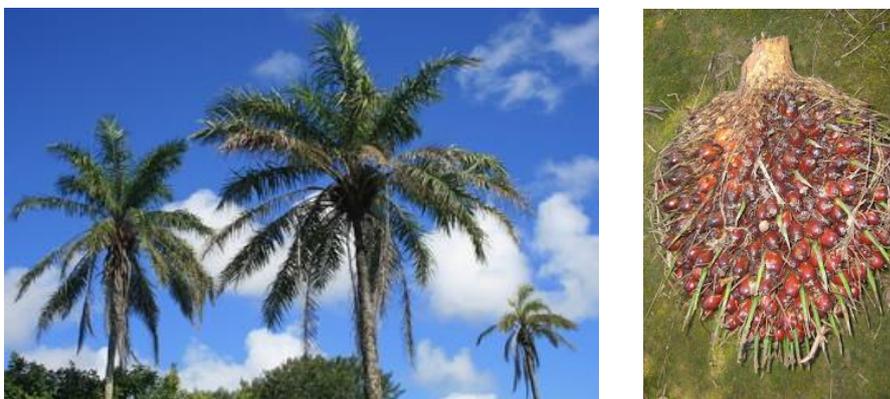
Oil palm (*Elaeis guineensis*) is the world's major source of vegetable oil and it has been able to adapt to the Brazilian subtropical area. Its growth, largely done in Para, is affected by Fatal Yellowing (FY), a condition that can cause plant's death and has unknown cause. The aim for this master's project was to prospect and identify, using a metabolomics approach, possible biomarkers of FY. To accomplish this study, for the first time different transport and extraction methods were evaluated in order to verify the metabolic profile stability in this species. Significant differences were noted and described using a metabolic fingerprinting approach, with ultra high precision liquid chromatography – mass spectrometry (UHPLC-MS) as the chemical analysis and ANOVA simultaneous component analysis (ASCA) as the multivariate statistic tool. After this study, leaves with and without FY symptoms were transported using the previously optimized protocol, analyzed and five potential biomarkers were identified and related to their metabolic pathways, using PCA as the chemometric tool. Finally, for the first time, the use of advanced analytical techniques as MALDI imaging, which has been highlighted as a powerful tool for identification of chemical compounds present on tissue surface with spatial localization, has been applied to oil palm leaves in order to perform a metabolic screening and search for the previously identified biomarkers. An analytical protocol was established for analysis with and without matrix application, for a wide range mass coverage and one of the possible biomarkers was detected using the matrix-free approach.

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Elaeis guineensis*

O dendê, fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (Figura 1), tem no seu mesocarpo a maior fonte de óleo vegetal do mundo (Alves et al., 2012). Apesar da possibilidade do uso da casca, das fibras, do óleo da amêndoa (palmiste) e do cacho vazio do dendezeiro em diversos segmentos industriais, o óleo extraído da polpa do dendê é o mais utilizado pela boa qualidade e baixo custo de produção, com um rendimento entre 4 e 5 toneladas de óleo por hectare plantado. Além de ser utilizado na culinária há muitos anos, também é usado na produção de sabões e produtos de limpeza, cosméticos, farmacêuticos, plásticos, lubrificantes, entre outros (EMBRAPA, 2007).



**Figura 1.** A) Cultivo de *Elaeis guineensis*. Fonte: br.fotolia.com. B) Cacho e frutos maduros de dendê após colheita. Fonte: www.aplantadavez.com.br.

O óleo de dendê é o mais consumido no mundo, dentre os óleos vegetais, com aproximadamente 35% do mercado em 2016/2017, equivalente a produção de 64 milhões de toneladas métricas, à frente da produção do óleo de soja, 53 milhões de toneladas métricas. Os maiores produtores de óleo de dendê são Indonésia e Malásia com 85% da produção mundial (USDA, 2016).

Os primeiros registros industriais de dendê no Brasil são da década de 60 nos estados da Bahia e do Pará, porém o dendê tem sua origem na África e foi trazido ao nosso país pelos escravos no século XVII (Alves *et al.*, 2012), onde foi observada uma boa adaptação ao clima subtropical.

A ascensão do plantio e cultivo de dendê, no Brasil, ocorreu a partir do lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), em 2005, que estabeleceu a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel com alteração para 5% em 2013 de acordo com a Lei nº 11.097/2005. Atualmente deve ser feita a adição de 10%, de acordo com a Lei nº 13.263/2016 (MME – Ministério de Minas e Energia).

## 1.2. Amarelecimento Fatal (AF)

No Brasil, a região do Pará concentra a maior área de plantio do dendê. No entanto, as plantações são afetadas pelo Amarelecimento Fatal (AF) (Figura 2), uma condição que pode levar a morte da planta pela necrose dos folíolos que vai da extremidade para a base da folha flecha, causando o apodrecimento da base e de seu meristema, estrutura responsável pela diferenciação celular onde pode ocorrer crescimento do indivíduo (de Franqueville *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Dendzeiros afetados pelo Amarelecimento Fatal (Boari *et al.*, 2012).

O AF atinge as folhas e raízes do dendezeiro e sua causa é desconhecida, mesmo com diversos estudos sendo realizados desde a década de 80. Soluções atuais para este problema são os cultivos do híbrido interespecífico BRS Manicoré, que é conhecido pela tolerância ao AF, e da espécie *Elaeis oleifera*, que não possui registros de casos de AF.

No entanto é contínua a busca pela causa do AF em *Elaeis guineensis* devido a sua maior produção de óleo dentre as outras variedades (De Franqueville, 2003; Alves et al., 2012). Além disso, o *E. guineensis* apresenta diferente composição química do híbrido e *E. oleifera*, com uma maior concentração de ácidos graxos livres (como o ácido palmítico e oléico) (Mozzon et al., 2013).

Atualmente existem as abordagens de pesquisa biótica e abiótica em relação as possíveis causas do AF. Bergamin et al. (1998) demonstraram que a disposição do AF no espaço e no tempo não possuem um padrão característico de doenças fitopatogênicas e que o AF teria, portanto, origem abiótica. Estudos das propriedades físicas do solo e influência de macro e micro nutrientes também foram avaliados, porém nenhum dos estudos revelou resultados conclusivos sobre a causa do AF (Boari et al., 2012). Relações físico-hídricas foram relatadas e apenas indicaram que áreas com drenagem reduzida e muito próximas a cursos de água possuem maior incidência de plantas com AF (Bernardes, 2000; Bergamin et al., 1998).

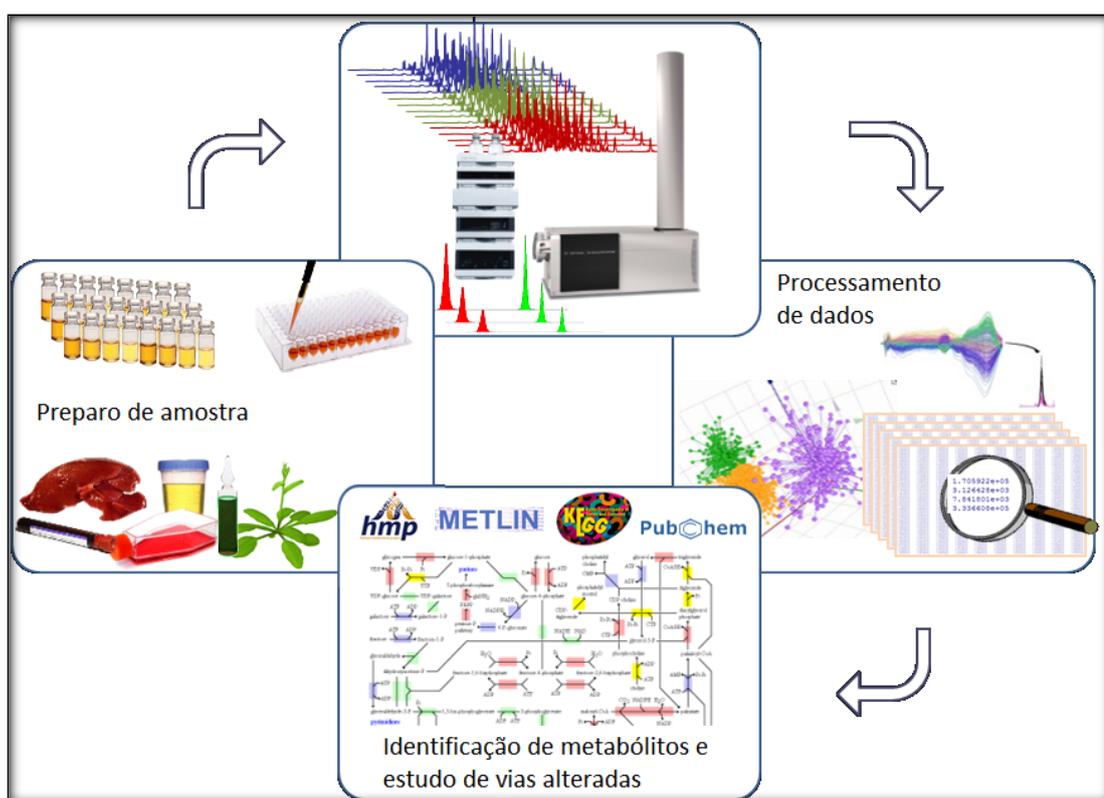
Assim, novas abordagens são propostas para a investigação da causa do AF, como a metabolômica e suas vertentes, na busca de marcadores químicos presentes em vias metabólicas.

### **1.3. Metabolômica**

A metabolômica, definida como a análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos (ou da sua maioria) em um sistema biológico (Fiehn, 2002), é uma abordagem que vem sendo cada vez mais utilizada para

relacionar características genóticas e fenotípicas, na busca de marcadores químicos de doenças (Abdelnur, 2014; Roessner et al., 2001), influência no perfil metabólico por estímulo externo, interação planta-herbívoros, controle de qualidade, dentre outros (Wolfender et al., 2013).

Devido a alta complexidade da matriz vegetal, abordagens mais específicas são utilizadas dependendo do objetivo do experimento. A impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*) consiste na análise rápida e eficiente dos analitos detectáveis e posterior análise multivariada dos dados de diferentes amostras com relação a intensidade de picos cromatográficos ou sinais de espectros de massas.



**Esquema 1.** Etapas gerais realizadas em um experimento de impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*). Adaptado de CIAL, Plataforma de Metabolômica. Fonte: [www.cial.uam-csic.es](http://www.cial.uam-csic.es).

A seguir serão descritas as etapas de preparo de amostra, análise química por espectrometria de massas, processamento de dados e identificação de metabólitos, mostradas no Esquema 1.

### **1.3.1. Preparo de amostra em metabolômica**

Em metabolômica, o preparo de amostra é crucial para prevenção de alterações enzimáticas dos compostos entre a coleta e a análise, como fatores ambientais (oxidação ou degradação por exposição à luz) que podem ocorrer por uma ativação do mecanismo de defesa do metabolismo celular (Pholosoph-Hadas et al., 1994).

De forma a inativar os processos metabólicos, diversos métodos de *quenching* são reportados na literatura (Ruijter et. al., 1996; Smits et al., 1998, Scafer et al. 1999; Villas-Bôas et al. 2005). Os métodos mais utilizados são: *quenching* em metanol à frio e em nitrogênio líquido (Jorge et al., 2015). Hajjaj et al. (1998) demonstraram que ambos são igualmente eficientes quando se deseja uma rápida coleta e preparo de amostra.

Geralmente, o cultivo de *Elaeis guineensis* ocorre em locais de difícil acesso, como a floresta amazônica, onde existem campos de cultivo experimental da Embrapa. Logo, a aplicação de protocolos ideais como o *quenching* em nitrogênio líquido pode ser um desafio, que demanda a avaliação da estabilidade dos metabólitos em métodos de transporte adequados.

### **1.3.2. Técnicas analíticas aplicadas a metabolômica**

Em metabolômica, as técnicas analíticas que promovem a elucidação de estruturas químicas têm destaque como, por exemplo, a ressonância magnética nuclear (RMN), que já foi utilizada para identificação de triterpenóides, esteróides e derivados de benzeno em fungos isolados do dendê (Kinge et al., 2011). Em conjunto com técnicas quimiométricas, a RMN demonstra alta eficiência em metabolômica, pela alta reprodutibilidade e rapidez nas análises, porém com menor sensibilidade que a espectrometria de massas (Schripsema, 2010).

A espectrometria de massas têm sido cada vez mais utilizada em metabolômica quando acoplada a técnicas de separação tais como a cromatografia líquida (LC-MS, do inglês *liquid chromatography – mass spectrometry*) ou a cromatografia gasosa (GC-MS, do inglês *gas chromatography - mass spectrometry*). A eficiência deste sistema analítico é observada pelo acoplamento de um cromatógrafo, que auxilia na separação de misturas complexas antes de sua análise, com um espectrômetro de massas, que possui alta sensibilidade e possibilita a elucidação estrutural por padrões de fragmentação, garantindo um *screening* com alta rapidez e especificidade.

### **1.3.2.1. Espectrometria de Massas**

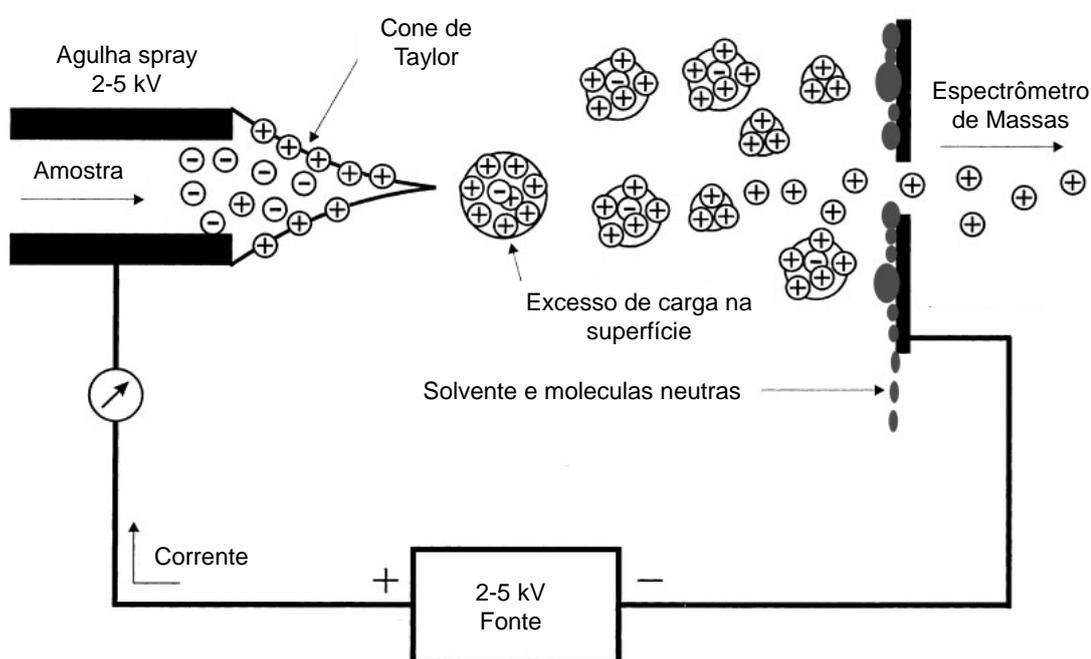
Em espectrometria de massas, são utilizadas diversas fontes de ionização (ESI, MALDI, EI) e analisadores (TOF, *ion trap*, *orbitrap*, FT-ICR) em análises de impressão digital metabólica. Nos próximos tópicos serão discutidos os usos das fontes e analisadores utilizados neste trabalho, que geralmente são os mais utilizados em metabolômica.

#### **Ionização por Eletrospray**

A técnica de ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), introduzida por Fenn e Yamashita (1984), foi uma revolução em espectrometria de massas devido as vantagens em relação aos métodos anteriores, como a possibilidade do acoplamento de cromatógrafos líquidos a espectrômetros de massas, a alta sensibilidade mesmo com analitos em baixas concentrações, ionização branda a pressão atmosférica, análise de compostos polares de alto peso molecular e a possibilidade de formação de múltiplas cargas, essencial na análise de proteínas.

Neste método, um campo elétrico, obtido com a aplicação de uma diferença de potencial na ordem de 3-6 kV, é gerado e aplicado, em pressão atmosférica, na amostra líquida pré-ionizada que passa por um capilar sob baixo fluxo, em geral de 1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Com esse campo elétrico, as cargas são

acumuladas no final do capilar e então expelidas, gerando um feixe de microgotas carregadas na direção do interior do analisador (Figura 3). Assim, a técnica se mostra eficiente na análise de compostos polares no modo positivo e negativo de ionização, além de aplicável a diversas áreas, como proteínas (Kinter et al., 2005), vírus (Bothner et al., 2004), bactérias (Wilkins et al., 2005) e imagem química com o advento da fonte DESI (*desorption electrospray ionization*) (TAKÁTS et al., 2004).



**Figura 3.** Esquema geral de formação de íons por eletrospray. Adaptado de Cech et al., 2001.

Em metabolômica vegetal, a fonte ESI vem sendo utilizada para análise de diversas classes de compostos, como flavonas glicosiladas (Tahir et al., 2011, 2012) e ácidos graxos em *Elaeis guineensis* (Fauzi et al., 2011), ácidos orgânicos e aminoácidos em *Arabidopsis thaliana* (Fiehn et al., 2000), glicoalcalóides, ácidos clorogênicos e flavonóides em tomate (Rogachev et al., 2012). Esta variada aplicação na análise de compostos polares e possibilidade de acoplamento com sistemas cromatográficos como a cromatografia de ultra alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra high performance*

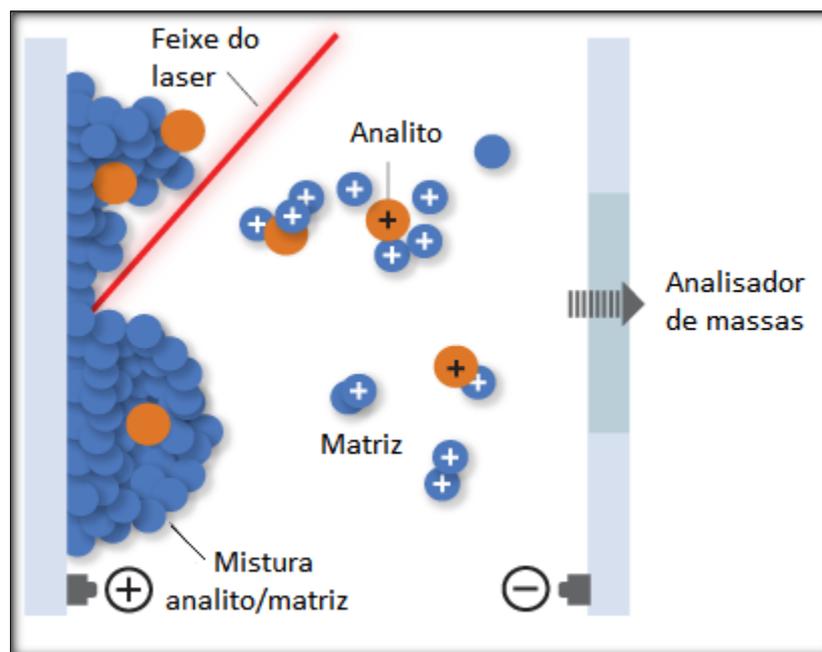
*liquid chromatography*) e analisadores de massas de alta resolução mostram a viabilidade desta fonte de ionização em análise de metabólitos para busca de biomarcadores.

### **Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz**

A técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization*) foi introduzida em 1988 por Karas e Hillenkamp e se disseminou pela capacidade de analisar compostos termo-lábeis e não voláteis de alta massa molecular como proteínas, oligonucleotídeos e polímeros em decorrência da dessorção/ionização com auxílio de moléculas orgânicas pequenas, denominadas matrizes, que auxiliam na geração de íons em fase gasosa pela absorção de radiação no comprimento de onda do laser (Vestal et al., 1995).

Na análise por MALDI, o analito de interesse é misturado com uma matriz e depositado sobre uma placa de MALDI. Após evaporação do solvente e cristalização da matriz, é gerada uma fina camada sólida na placa que é inserida no espectrômetro de massas. Dentro da fonte de ionização, é gerado alto vácuo (ordem de  $10^{-6}$  bar) e ocorre uma ablação por laser pulsado por curtos períodos de tempo, onde a matriz absorve a energia do laser e gera uma “pluma” de íons de matriz e analito, que são levados ao interior do analisador de massas (Figura 4).

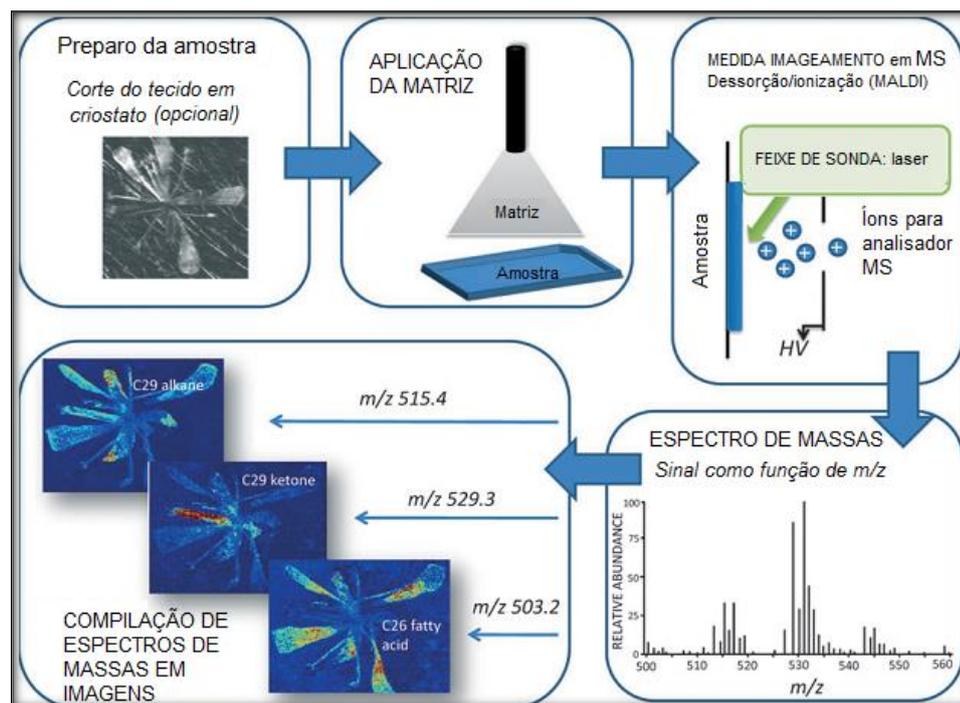
Dentre os lasers mais utilizados em MALDI, é possível citar o laser de nitrogênio, com  $\lambda = 337$  nm e o Nd:YAG com  $\lambda = 355$  nm. As matrizes utilizadas dependem da classe do analito a ser estudada e normalmente várias matrizes são testadas para que o experimento seja otimizado. Para moléculas de baixa massa molecular, normalmente são usadas as matrizes ácido 2,5-dihidróxibenzóico (DHB, do inglês 2,5 dihydroxybenzoic acid) e ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidróxicinâmico (HCCA, do inglês  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) para o modo MALDI(+)-MS e a 9-aminoacridina (9-AA, do inglês 9-aminoacridine) para o modo MALDI(-)-MS.



**Figura 4.** Esquema geral de Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Fonte: nationalmaglab.org.

### MALDI-Imaging MS

Muitos metabólitos têm a função de defesa contra patógenos ou predadores e devem se distribuir de forma não homogênea na sua superfície de forma a otimizar suas funções biológicas, quando sob stress biótico ou abiótico. O desenvolvimento de um protocolo para análise de imagem química em folha de dendê mostra-se promissor para elucidar a localização de marcadores químicos do AF e facilitar o entendimento de suas possíveis rotas metabólicas afetadas pela relação com organelas ou estruturas biológicas que têm localização espacial definidas.



**Esquema 2.** Preparo de amostra com aplicação de matriz e análise por MALDI-MSI. Adaptado de Lee et al., 2012.

As recentes técnicas de imagem química por MALDI-MSI (do inglês, MALDI - *mass spectrometry imaging*) e LDI-MSI (sem uso de matriz) têm sido amplamente utilizadas para esse propósito pela possibilidade do uso de analisadores de alta resolução e com ampla faixa de massas analisável, como tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*), e por permitir uma melhor resolução de imagem (menores *pixels*) com uso de *lasers* cada vez mais sofisticados, que em módulos comerciais vão de 20 a 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro e em módulos não comerciais chegam a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (McDonnell, 2007).

O maior desafio no desenvolvimento de protocolos de imagem química em MALDI está na aplicação de matriz, já que esta deve ser realizada de forma a obter uma superfície o mais uniforme possível. Quando aplicada a tecidos animais, como em ratos (Khatib-Shahidi et al., 2006) ou tecido tumoral (Abdelnur, 2010), é utilizado um criostato equipado com lâmina que promove cortes uniformes e finos, na ordem de 10  $\mu\text{m}$ , o que diminui a incidência de partes rugosas ou declives que possam acumular a matriz depositada e não reproduzir fielmente as localizações de espécies químicas. Na análise de

folhas, tal preparo de amostra se torna inviável pela impossibilidade do corte ser feito em uma estrutura naturalmente fina, com cerca de 200 µm de espessura. Essa não-uniformidade do tecido vegetal e sua consequência nas análises de imagem química têm sido debatidas e autores propõem a utilização de ferramentas matemáticas que possam provar a uniformidade dos picos obtidos após análises consecutivas da mesma massa (Annangudi et al., 2015).

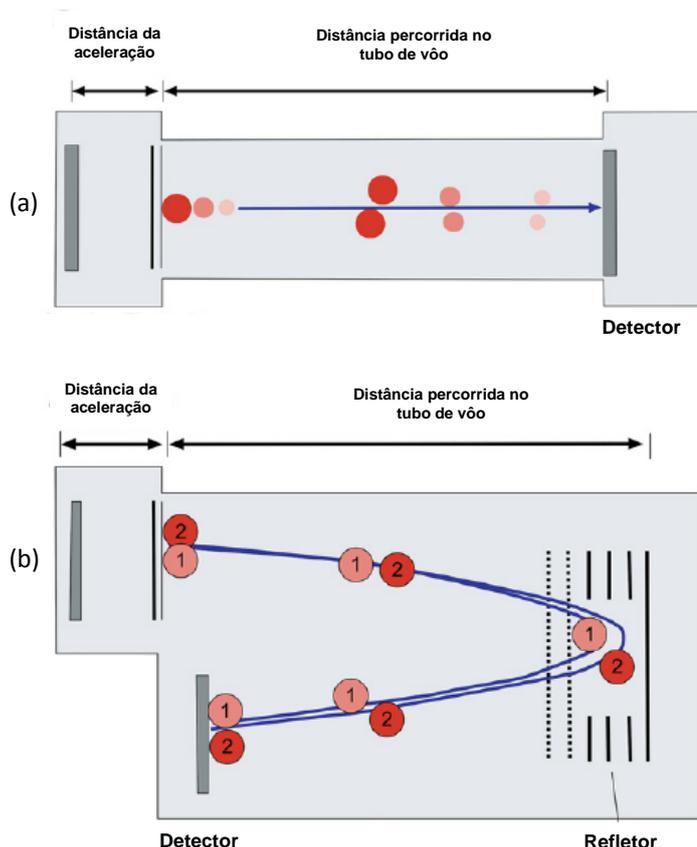
Outro desafio é o acesso do laser ao interior da folha, que contém espessas camadas cerosas acima da epiderme vegetal, que diminuem a mobilidade da matriz aplicada. Nesse sentido, são propostos procedimentos de lavagem para remoção química da película constituída basicamente por lipídeos que não são de interesse analítico.

A escolha da matriz também se mostra essencial no desenvolvimento de protocolos de MALDI-MSI. Além de absorver energia no comprimento de onda do laser, a matriz deve ser adequada para a análise na faixa de massa desejada. A matriz 9-AA é reconhecida no auxílio da ionização e detecção com localização espacial de moléculas de baixa massa, como lipídeos em tumores (Dekker et al., 2014) e folhas de *Arabidopsis thaliana* (Shroff et al., 2008). A matriz DHB também é reconhecida na análise de compostos de massa molecular baixa, como alcalóides em fruto de *Mycena metata* (Jaeger et al., 2013) e compostos fenólicos em fruto de *Vaccinium virgatum* (Yoshimura et al., 2012).

Diversas classes de metabólitos já foram estudadas utilizando a técnica de MALDI-MSI como flavonóides e antocianinas (Cha et al., 2008; Hoelscher et al., 2009; Korte et al., 2011) e fosfolipídeos em semente de arroz (Zaima et al., 2010). No entanto, a técnica MALDI-MS e a abordagem de imagem química (MALDI-MSI) ainda não foram utilizadas na análise de metabólitos em dendê.

## Analizador por tempo de voo

O analisador TOF se baseia no princípio da medida da massa a partir do tempo que os íons demoram para percorrer um espaço definido. Quanto menor a massa do íon  $m/z$ , menor o tempo para alcançar o detector. Um esquema do funcionamento do analisador TOF é mostrado na Figura 5.



**Figura 5.** Esquema do analisador TOF (a) linear e (b) refletor. Adaptado de Soares et al., 2012.

Analísadores TOF podem ser operados na configuração linear (Figura 5a) e refletor (Figura 5b), sendo a linear ideal para análise de compostos de alta massa, como proteínas; e o refletor, ideal para análise de compostos de baixa ou média massas, pelo aumento na resolução dos sinais que ocorre devido a correção das dispersões espacial, temporal e cinética.

Fontes de ionização pulsadas como o MALDI acopladas a analisadores do tipo TOF se mostram eficientes no estudo de metabolômica por avaliar uma ampla faixa de massas e permitir, com o advento da técnica de imagem

química, uma análise da localização espacial de metabólitos, lipídeos e proteínas presentes em uma superfície.

Devido a sua alta resolução de sinais de massas (entre 20.000 e 100.000 em equipamentos comerciais), o analisador TOF tem grande importância na análise de metabolômica, por possibilitar a atribuição de fórmulas moleculares com base na massa exata do composto e no padrão isotópico.

### **Analisador *ion trap***

Em metabolômica, além do uso de alta resolução para atribuição de fórmulas moleculares às estruturas, a fragmentação dos compostos é crucial na elucidação de metabólitos de interesse. O analisador *ion trap* permite não só a fragmentação de metabólitos (experimentos MS/MS) como também a quebra sucessiva dos fragmentos gerados (experimentos MS<sup>n</sup>), o que facilita o entendimento na identificação de moléculas em metabolômica.

### **1.3.3. Processamento de dados em metabolômica**

A quimiometria é uma ferramenta importante em metabolômica pela capacidade de organizar e facilitar o entendimento dos processos que ocorrem quando uma grande quantidade de dados é gerada, por meio da representação visual da informação e um sentido biológico para um fenômeno. Assim, o reconhecimento de padrões relacionados a doenças ou stress conduzido é facilitado quando uma grande quantidade de replicatas biológicas, técnicas e analíticas são estudadas ao mesmo tempo.

Para que a maior quantidade de informação seja extraída de um experimento feito em sistema LC-MS, antes das análises multivariadas, faz-se necessário um pré-processamento dos dados, na construção de uma matriz de variáveis, ou *bucket table*. Desta forma, as informações contidas

dentro de cromatogramas e espectros de massas são ordenadas em uma tabela com variáveis de interesse, como tempo de retenção e intensidade de massa.

Na construção da matriz de variáveis, alguns parâmetros devem ser considerados para uma melhor representação dos dados nas subseqüentes análises quimiométricas, como o algoritmo responsável pela detecção dos picos (*peak detection*), o alinhamento de picos cromatográficos e a normalização dos dados, normalmente feita com o auxílio de um padrão interno com concentração e massa conhecida.

O algoritmo do *peak detection* deve ser otimizado de forma a fielmente descrever, na matriz de dados, a intensidade e o tempo de retenção da massa analisada. Se essa otimização não for feita, alguns problemas como a somatória de massas vicinais (relativos ao padrão isotópico) podem ocorrer, gerando informações que serão mal-interpretadas. Outro parâmetro importante é a normalização dos dados, necessário para diminuição dos erros analíticos que ocorrem em análises sequenciais, como pequenas variações nos volumes adicionados ou retirados de recipientes, erros de calibração de balanças analíticas, de equipamento, variações de temperatura do laboratório, etc. A normalização é feita quando um padrão interno, com massa e concentração conhecidos, é adicionado a cada amostra e no momento da construção da *bucket table*, o valor da intensidade de massa do padrão é normalizado. O alinhamento dos picos cromatográficos também é indicado para que haja uma redução na variação do tempo de retenção que ocorre entre as corridas cromatográficas e muitas vezes são quase imperceptíveis, mesmo com o uso de sistemas cromatográficos cada vez mais sofisticados.

A análise de componente principal (PCA) é a ferramenta quimiométrica mais utilizada em metabolômica, por apresentar um modelo de separação não-supervisionado, onde os grupos são projetados no espaço (*score plot*) simplesmente pela diferença de intensidade das variáveis em cada amostra. Este modelo também apresenta a projeção das variáveis responsáveis por tal separação (*loadings plot*) e o nível de importância nessa separação de grupos

(Trygg et al., 2006). Assim, o PCA se mostra útil no estudo de problemas de duas classes, como por exemplo na avaliação de dois grupos (sadio e afetado) na busca de possíveis biomarcadores.

Quando a observação é feita sobre mais de dois grupos, análises multivariadas são necessárias no tratamento de dados, como a análise de variância com componente simultâneo (ASCA, Smide et al., 2005), que alia as metodologias do PCA e análise de variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*) e já foi utilizado como teste quimiométrico com foco em metabolômica humana (Lemanska et al., 2012). Em metabolômica vegetal, as análises de multigrupo podem relacionar entre si diversas variáveis, tipos de extração de metabólitos e transporte de amostras, para desenvolvimento de métodos de análise, como é o caso deste projeto, onde o ASCA foi pela primeira vez utilizado para tratamento quimiométrico de metabólitos vegetais.

#### **1.4. Metabolômica aplicada a dendê**

Poucos trabalhos de análise química em dendê, utilizando diferentes técnicas analíticas como LC, RMN e MS, foram descritos na literatura, e nenhum emprega a abordagem global de metabolômica.

Nas raízes do dendê, os ácidos orgânicos siríngico, caféico e 4-hidróxibenzóico foram identificados por cromatografia de alta performance acoplado a detector de comprimento de onda variável (HPLC-VWD) (Chong et al., 2011). Em fungos isolados do dendê foram identificados triterpenóides, esteróides e derivados de benzeno com uso de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons (EI-MS) (Kinge et al., 2011). Por HPLC-MS/MS foram analisadas folhas do dendezeiro, com ênfase na identificação de flavonas glicosiladas (Tahir et al., 2012) e no perfil de fragmentação de ácidos orgânicos e polifenóis por perda neutra (Tahir et al., 2013). Análises por UPLC-MS/MS detectaram a presença de ácidos graxos em óleo de dendê (Fauzi et al., 2011), que não foram identificados.

Devido a pouca quantidade de trabalhos relacionados a análise de folhas de dendê (Tahir et al., 2012, 2013), uma maior investigação do perfil metabólico é necessária para entendimento das causas do AF, que afeta esta parte da planta. O *metabolic fingerprinting* e a imagem química, que até então não foram utilizadas em análises de *E. guineensis*, são abordados nos três capítulos deste trabalho, que tem foco na análise de folhas de dendê e são descritos a seguir.

---

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral dessa dissertação de mestrado é prospectar marcadores químicos relacionados ao amarelecimento fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando técnicas analíticas avançadas baseadas em espectrometria de massas, UHPLC-MS/MS e MALDI-MSI, com abordagem metabolômica.

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Verificar a estabilidade dos metabólitos presentes em folhas de *E. guineensis* utilizando a estratégia metabolômica de “impressão digital metabólica” (*metabolic fingerprinting*);
- Analisar folhas de dendê com e sem sintomas de AF por UHPLC-MS/MS na busca de marcadores químicos;
- Otimizar um protocolo analítico para visualização espacial dos metabólitos presentes nas folhas de *Elaeis guineensis* utilizando MALDI-MSI.

---

### **3. CAPÍTULO 1**

**Estudo da estabilidade dos metabólitos presentes em folhas de dendê utilizando a estratégia metabolômica de “impressão digital metabólica” (*metabolic fingerprinting*)**

### **3.1. Procedimento experimental**

#### **3.1.1. Materiais e métodos**

Etanol 99,7% foi obtido da J.T.Baker, ácido fórmico 99% foi obtido da Carlo Erba, acetonitrila >99.9% foi obtida da Fluka Analytical, hidróxido de sódio >97% foi obtido da Sigma-Aldrich.

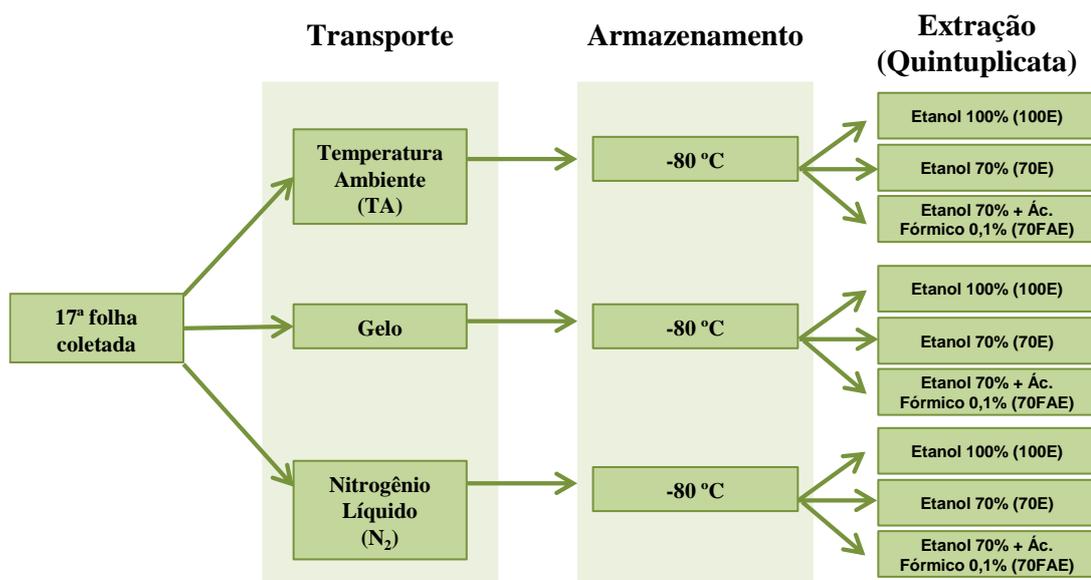
#### **3.1.2. Aquisição do material**

Segmentos da folha 17 foram coletados na vitrine da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, localizado em 15°36'09.1"S 47°43'35.0"W. No estudo da impressão digital metabólica de folhas de dendê simulando uma coleta no campo e transporte de amostras, foram utilizadas três condições:

- a) Transporte em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) por 5 horas;
- b) Transporte em gelo seco (gelo) por 12 horas;
- c) Transporte em temperatura ambiente (TA) por 12 horas.

Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração e análise, que aconteceram 24 horas depois.

Na extração dos metabólitos, três solventes foram avaliados, sendo eles: i) etanol 100%, ii) etanol 70% e iii) etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



**Esquema 3.** Coleta e preparo de amostra em diferentes métodos de transporte e solvente.

Para a identificação do maior número de metabólitos presentes nas folhas, foram realizadas análises por UHPLC-ESI(-)-MS e UHPLC-ESI(+)-MS, mostradas na Tabela 1. De forma a avaliar as variações metabólicas de um grande número de amostras e de variáveis (espectros de massas complexo), fez-se necessário o uso da ferramenta estatística ASCA.

**Tabela 1.** Amostras de folha de dendê analisadas por UHPLC-ESI(+/-)-MS sob diferentes condições de transporte e extração.

Amostras analisadas por UHPLC-ESI(-)-MS				Amostras analisadas por UHPLC-ESI(+)-MS			
Número amostra (#)	Condição de transporte	Solvente de extração	Replicata	Número amostra (#)	Condição de transporte	Solvente de extração	Replicata
1-5	TA	100E	R1-R5	46-50	TA	100E	R1-R5
6-10	TA	70E	R1-R5	51-55	TA	70E	R1-R5
11-15	TA	FA70E	R1-R5	56-60	TA	FA70E	R1-R5
16-20	Gelo	100E	R1-R5	61-65	Gelo	100E	R1-R5
21-25	Gelo	70E	R1-R5	66-70	Gelo	70E	R1-R5
26-30	Gelo	FA70E	R1-R5	71-75	Gelo	FA70E	R1-R5
31-35	N <sub>2</sub>	100E	R1-R5	76-80	N <sub>2</sub>	100E	R1-R5
36-40	N <sub>2</sub>	70E	R1-R5	81-85	N <sub>2</sub>	70E	R1-R5
41-45	N <sub>2</sub>	FA70E	R1-R5	86-90	N <sub>2</sub>	FA70E	R1-R5

\*TA (Temperatura ambiente); N<sub>2</sub> (Nitrogênio líquido); 100E (etanol 100%); 70E (70:30 etanol:água)/ FA70E (70:30 etanol:água + 0,1% ácido fórmico)

### 3.1.3. Extração dos metabólitos

Após o tempo de transporte e armazenamento, microtubos de 2 mL contendo 100 mg de cada amostra de folha, descritas na Tabela 1, foram refrigerados em nitrogênio líquido e levados a um moinho de bolas do tipo *mini beadbeater* (Biospec Products, Estados Unidos) por 30 segundos. Em seguida, 1 mL do solvente correspondente foi adicionado a cada microtubo. Os microtubos foram incubados em *thermomixer* (Eppendorf, Alemanha) a 4 °C por 30 minutos e então sonificados por 30 minutos em banho de gelo. Foi feita uma centrifugação (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 12000 rpm por 5 minutos a 8 °C e 250 µL do sobrenadante foram transferidos para vials de 1 mL para análise. Os vials foram mantidos em um autoamostrador a 4 °C até análise.

### 3.1.4. Análise por UHPLC-MS/MS

Finalizada a extração, 0,2 µL de amostra foram injetados no sistema hifenado constituído por UHPLC modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) equipado com coluna de fase-reversa Acquity UPLC BEH C8 (1,7 µm, 2,1x150 mm) (Waters Technologies, Estados Unidos) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Maxis 4G (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com fonte ESI e analisador de massas de alta resolução tipo TOF. Foi utilizado o seguinte gradiente de fase móvel descrito na Tabela 2, onde o solvente A foi ácido fórmico 0,1% em água (v/v) e o solvente B ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v). O fluxo utilizado foi de 400 µL/min. Foram feitas corridas cromatográficas de 22 minutos, sendo os 4 minutos finais para reconstituição da coluna para a próxima análise.

**Tabela 2.** Gradiente de eluição aplicado no método UHPLC otimizado.

Etapas	Tempo (min)	Eluente A (vol %)	Eluente B (vol %)
1	Início-0,5	96	4
2	0,5-10	66	34
3	10-15	0	100
4	15-18	0	100

No espectrômetro de massas foram utilizados os modos de ionização positivo (ESI(+)-MS) e negativo (ESI(-)-MS), com parâmetros instrumentais: voltagem do capilar 4,5 kV; pressão do nebulizador 4 bar; fluxo de gás de secagem 9 L/min; temperatura do cone 200 °C; temperatura da coluna 40 °C; taxa de aquisição de espectros 3 Hz; faixa de massas monitorada 80-1200 Da. A calibração do equipamento foi feita com cluster de formiato de sódio (solução de NaOH 10 mM em solução isopropanol:água 1:1 (v/v) contendo 0,2% de ácido fórmico), inserido diretamente no início de cada corrida por uma válvula de 6 portas. A normalização dos dados foi feita com a adição do padrão interno ampicilina ( $m/z$  350,110; tempo de retenção 7,29 min).

Os dados foram adquiridos pelo *software HyStar Application*, versão 3.2. Para atribuição da fórmula molecular dos ions detectados, foi utilizado o algoritmo *SmartFormula (DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha) e a identificação dos metabólitos foi feita usando o *software CompoundCrawler (DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha) que correlaciona a fórmula molecular a todos os isômeros presentes em bancos de dados públicos Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e/ou Entidades Químicas de Interesse Biológico (ChEBI, do inglês *Chemical Entities of Biological Interest*).

Utilizando o *software ProfileAnalysis*, versão 4.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), os dados foram processados com a elaboração de uma matriz de

variáveis (*bucket table*) que representa as intensidades dos sinais em uma respectiva janela de tempo de retenção, contemplando as corridas cromatográficas de 0,6 a 10 minutos (onde os picos cromatográficos de interesse se apresentaram), na faixa de  $m/z$  80 a 1200. Os compostos foram relacionados as respectivas massas utilizando-se o algoritmo busca de características moleculares (FMF, do inglês *find molecular features*).

No tratamento estatístico foi utilizado o software *MatLab*, versão R2014b (The MathWorks Inc, Estados Unidos) e o *software PLS Toolbox* versão 7.9 (Eigenvector Research Inc, Estados Unidos). Foi utilizado o escalonamento Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes. O teste de ASCA aqui apresentado foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Anselmo Elcana de Oliveira, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

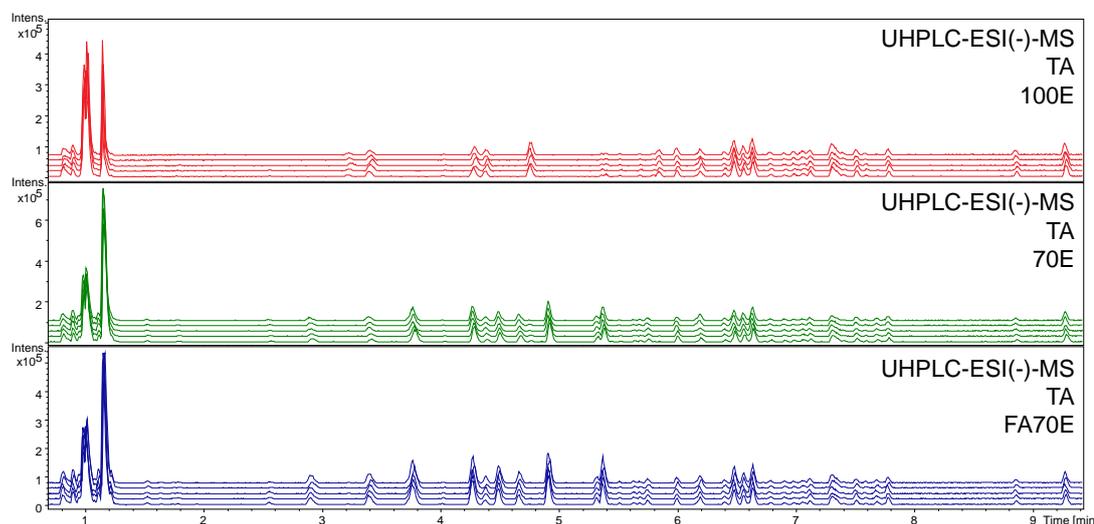
### 3.2. Resultados e Discussão

De acordo com a filotaxia do dendezeiro, a folha 17 foi coletada porque esta numeração de folha é a ideal para análise foliar de plantas que tenham mais de 3 anos de plantio. Desta forma, as características fisiológicas do dendezeiro adulto são melhor expressas (Rodrigues et al., 2007).

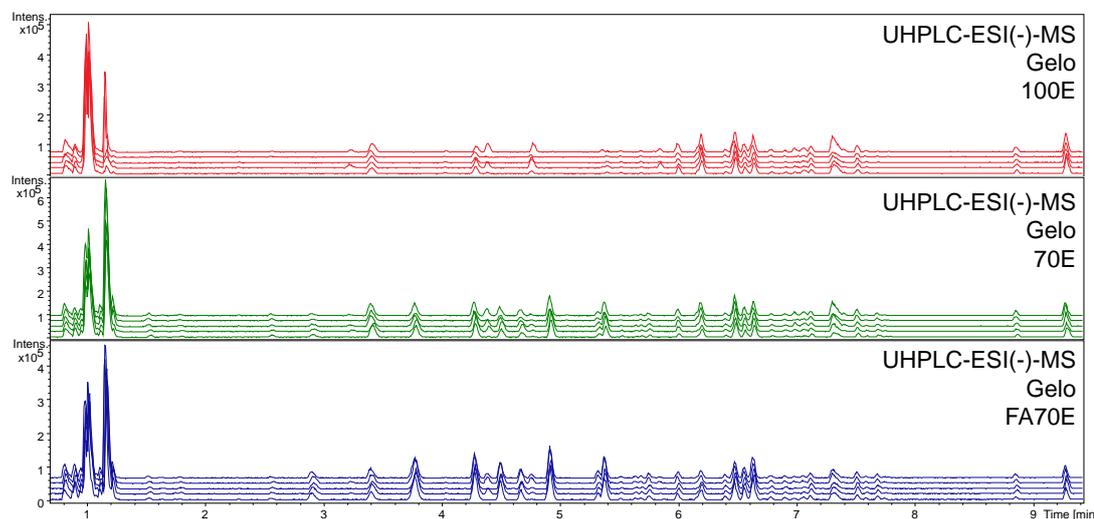
Assim, foi desenvolvido um método rápido e robusto, capaz de extrair e detectar um grande número de metabólitos em folha de dendê e avaliar a estabilidade dos metabólitos em diferentes modos de preparo e transporte. O uso de alta pressão em coluna UHPLC proporcionou o tempo de corrida cromatográfica de 18 minutos, sendo que os métodos previstos anteriormente eram mais longos (corridas de 30-60 minutos) e com menor resolução na separação dos picos cromatográfico (Tahir et al., 2012), devido ao uso de sistema de HPLC.

Os cromatogramas de pico base (BPC, do inglês *base peak chromatograms*) são mostrados na Figura 6-11, onde uma média de 44, 50 e 54 picos cromatográficos foram atribuídos, na análise por ESI(+)-MS, aos

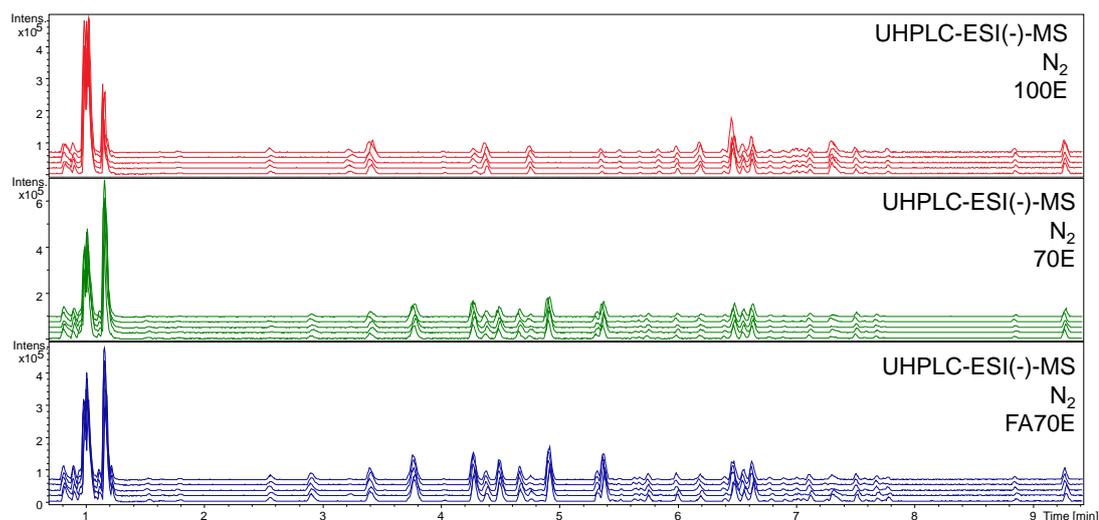
métodos de extração 100E, 70E e FA70E, respectivamente. Nas análise por ESI(-)-MS, as médias são de 104, 121 e 128 picos cromatográficos atribuídos aos métodos de extração 100E, 70E e FA70E, respectivamente. A atribuição de picos cromatográficos foi feita usando o algoritmo FMF.



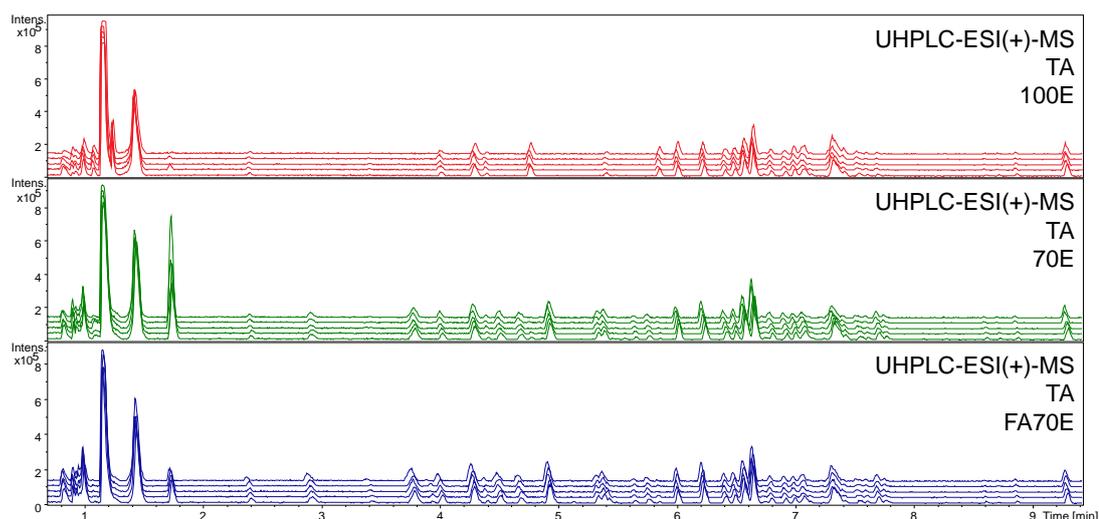
**Figura 6.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. \*TA: Temperatura Ambiente. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



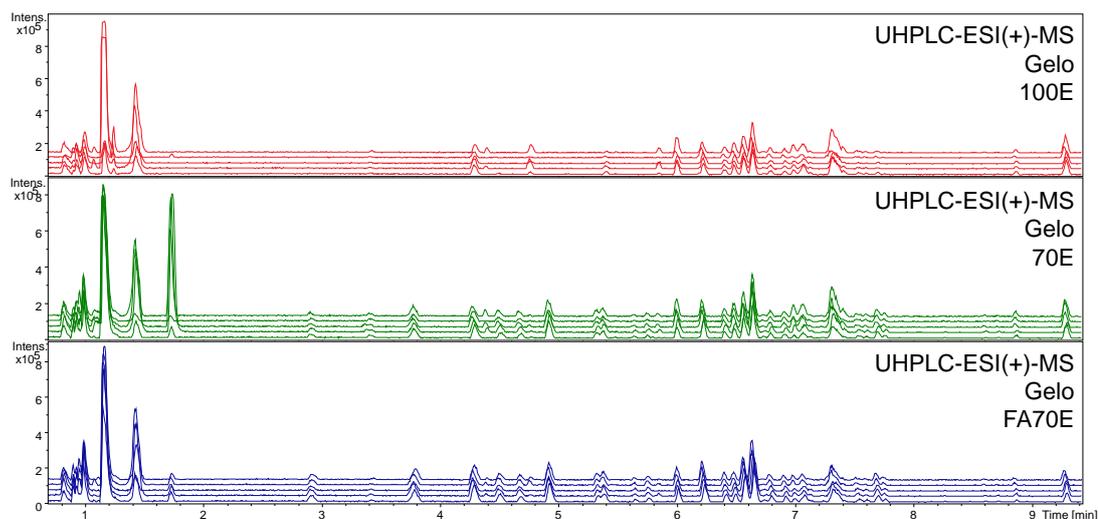
**Figura 7.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. \*100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



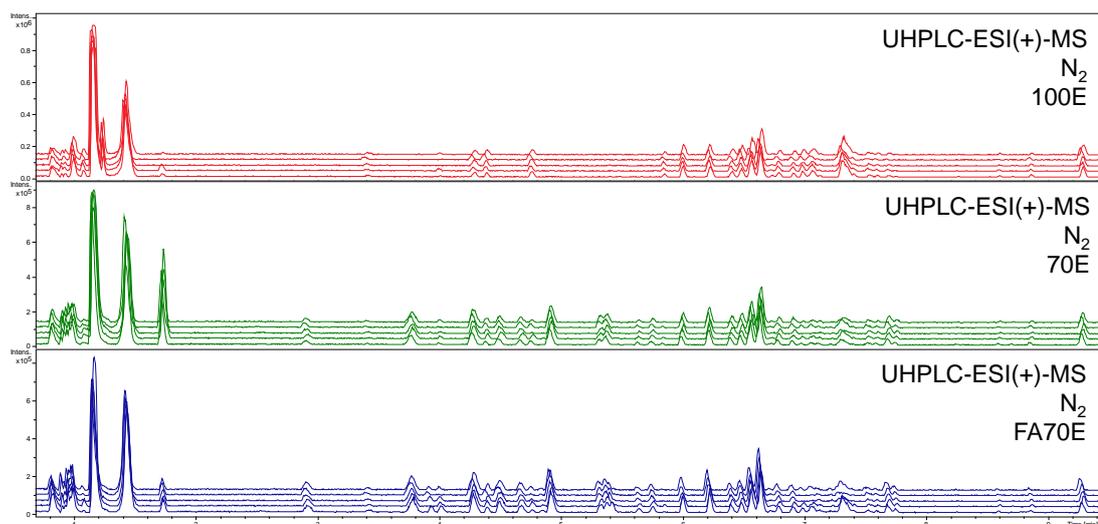
**Figura 8.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(-)-MS. \*N<sub>2</sub>: nitrogênio líquido. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



**Figura 9.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. \*TA: Temperatura Ambiente. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



**Figura 10.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. \*100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.



**Figura 11.** Cromatogramas de pico base (BPC) de extratos folha de dendê após análise por UHPLC-ESI(+)-MS. \*N<sub>2</sub>: nitrogênio líquido. 100E: etanol 100%, 70E: etanol 70%, FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.

O espectrômetro de massas de alta resolução utilizado é capaz de prever a fórmula molecular de um composto considerando o valor da razão massa/carga ( $m/z$ ), erro da medida (correlação entre massa teórica e massa experimental) e seu mSigma (relacionado ao perfil isotópico). Foram feitas identificações de alguns metabólitos de interesse (sessões 3.2.1 e 3.2.2) após a separação dos grupos na análise por ASCA com base nas análises por

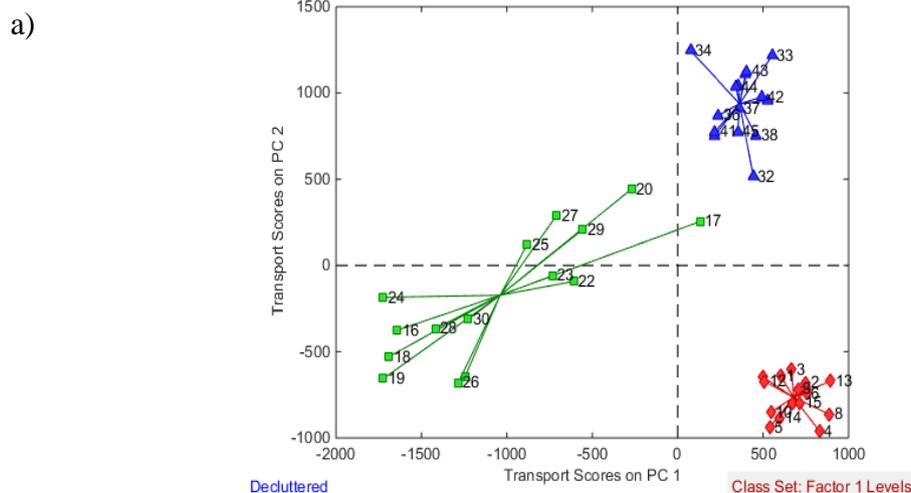
espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *high resolution mass spectrometry*), MS/MS e comparação com a literatura.

Com o uso de gradiente de fase móvel (acetonitrila/água) em coluna de fase reversa, é possível distinguir o grupo polar (0,6 a 2 minutos), grupo de polaridade média (2 a 8 minutos) e grupo apolar (8 a 10 minutos) (Figura 6-11).

### 3.2.1. Dados UHPLC-ESI(+)-MS

Os efeitos de transporte e solvente foram avaliados por modelos de PCA e são apresentados nas Figuras 12a-15a . Houve uma discriminação de três grupos de acordo com condições de transporte, assim como de solventes. As avaliações foram feitas levando-se em conta valores de *loadings* maiores que 0,1 e menores que -0,1. Nas Figuras 12-15 são mostrados os dois íons de cada grupo com maior relevância estatística para a separação das variáveis nos gráficos de *score*.

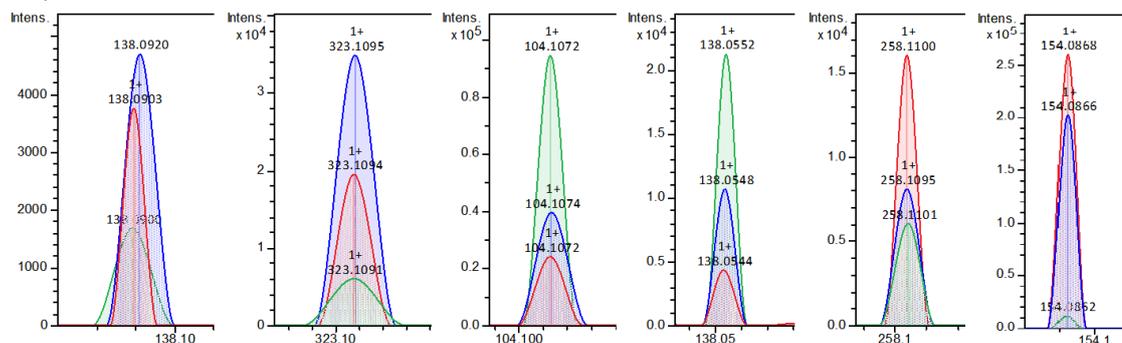
Na análise por ESI(+)-MS, 18 metabólitos foram encontrados com a capacidade de distinguir os grupos relacionados ao modo de transporte (Figura 12). Os metabólitos com  $m/z$  138,091: rt 1,39 min ( $C_8H_{11}NO$ ) e  $m/z$  323,110: rt 4,39 min ( $C_{16}H_{18}O_7$ ) foram detectados em maior intensidade utilizando nitrogênio líquido como transporte. Já os metabólitos com  $m/z$  104,107: rt 0,94 min ( $C_5H_{13}NO$ ) e  $m/z$  138,057: rt 1,04 min ( $C_7H_7NO_2$ ) foram melhor extraídos quando transportados em gelo. Os metabólitos  $m/z$  258,110: rt 0,98 min ( $C_8H_{19}NO_3$ ) e  $m/z$  154,086: rt 1,17 min ( $C_8H_{12}NO_2$ ) foram detectados em maior intensidade quando transportados em temperatura ambiente.



b)

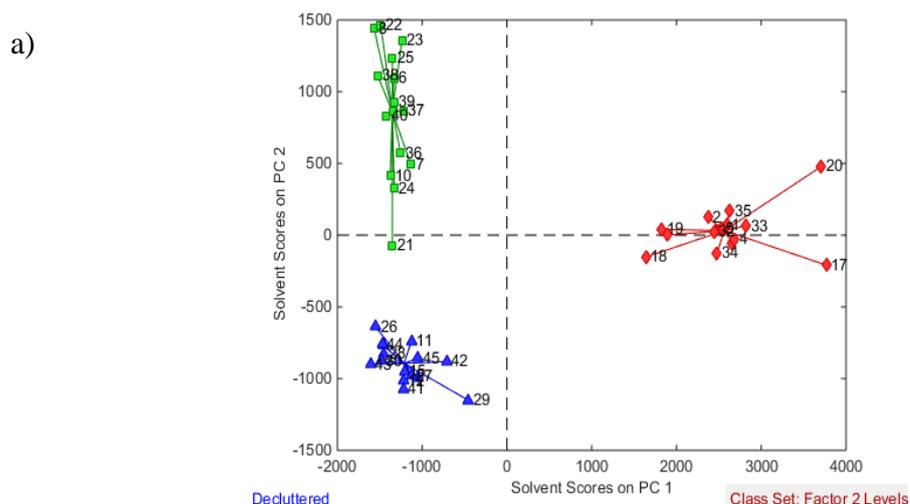
UHPLC-ESI(+)-MS para análise de transporte									
Loadings		rT(min)	m/z	Erro (ppm)	Intensidades médias			Fórmula molecular	Principal condição
PC1	PC2				TA	Gelo	N <sub>2</sub>		
0,1033		1,39	138,091	0,6	67.947	41.045	73.970	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	N <sub>2</sub>
	0,1128	4,39	323,110	-2,0	41.675	35.385	69.941	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	N <sub>2</sub>
-0,1376		0,94	104,107	-3,5	108.105	170.064	110.319	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO	Gelo
-0,1219		1,04	138,057	-0,5	427.995	430.030	326.888	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Gelo
0,1612	-0,1357	0,98	258,110	1,6	100.907	23.710	38.581	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	TA
0,1457		1,17	154,086	-1,4	339.210	220.618	323.712	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	TA

c)



**Figura 12.** Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de transporte. A) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. B) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. C) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo e azul: nitrogênio líquido..

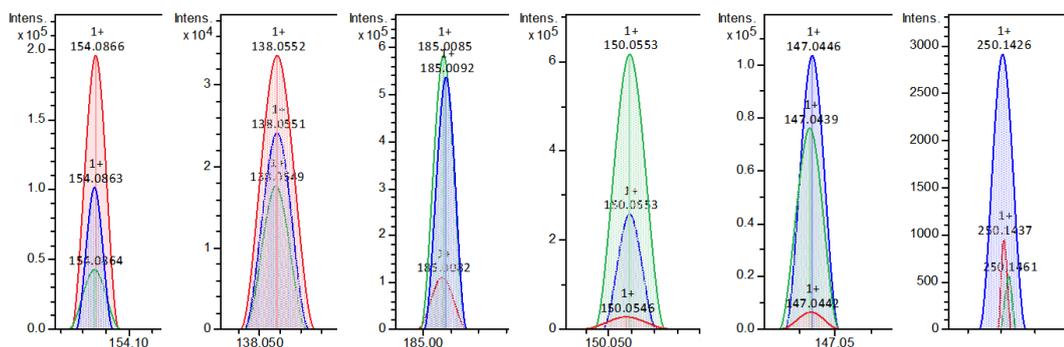
Com relação ao efeito de solvente, 22 metabólitos destacaram-se na separação dos grupos na análise estatística (Figura 13). Os metabólitos  $m/z$  154,086: rt 1,17 min ( $C_8H_{12}NO_2$ ) e  $m/z$  138,057: rt 1,04 min ( $C_7H_7NO_2$ ) foram majoritariamente extraídos quando utilizado etanol 100% (100E) enquanto que os metabólitos  $m/z$  185,009: rt 1,17 min ( $C_7H_4O_6$ ) e  $m/z$  150,055: rt 1,74 min ( $C_8H_7NO_2$ ) foram melhor detectados com uso de etanol 70% no processo de extração. Usando etanol 70% + 0,1% de ácido fórmico, os metabólitos  $m/z$  147,044: rt 4,92 min ( $C_9H_6O_2$ ) e  $m/z$  250,144: rt 5,41 min ( $C_{14}H_{19}NO_3$ ) foram melhor extraídos. Estes resultados confirmam que metabólitos são extraídos dependendo do solvente utilizado. Espectros de massas ESI(+)-MS foram analisados (Figuras 12c e 13c) para confirmar os dados obtidos pelo ASCA.



b)

UHPLC-ESI(+)-MS para análise de solvente									
Loadings		rT(min)	m/z	Erro (ppm)	Intensidades médias			Fórmula molecular	Principal condição
PC1	PC2				100E	70E	FA70E		
0,2395		1,17	154,086	-4,5	597.342	97.740	188.458	$C_8H_{12}NO_2$	100E
1167	0,1365	1,04	138,057	-3,3	456.791	350.454	377.669	$C_7H_7NO_2$	100E
-0,3373	0,2494	1,17	185,009*	-0,7	151.801	1.443.287	1.145.015	$C_7H_4O_6$	70E
-0,1520	0,4891	1,74	150,055	-4,1	38.666	739.486	142.659	$C_8H_7NO_2$	70E
-0,1396		4,92	147,044	-0,8	13.574	186.457	207.316	$C_9H_6O_2$	FA70E
	-0,1380	5,41	250,144	-0,1	3.027	2.885	52.146	$C_{14}H_{19}NO_3$	FA70E

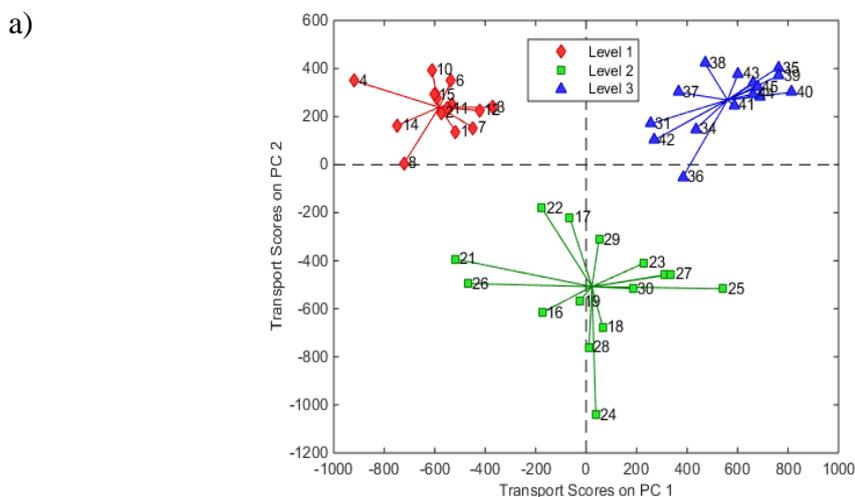
c)



**Figura 13.** Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70% e azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon  $m/z$  147,044 é um fragmento do íon  $m/z$  379,0528.

### 3.2.2. Dados UHPLC-ESI(-)-MS

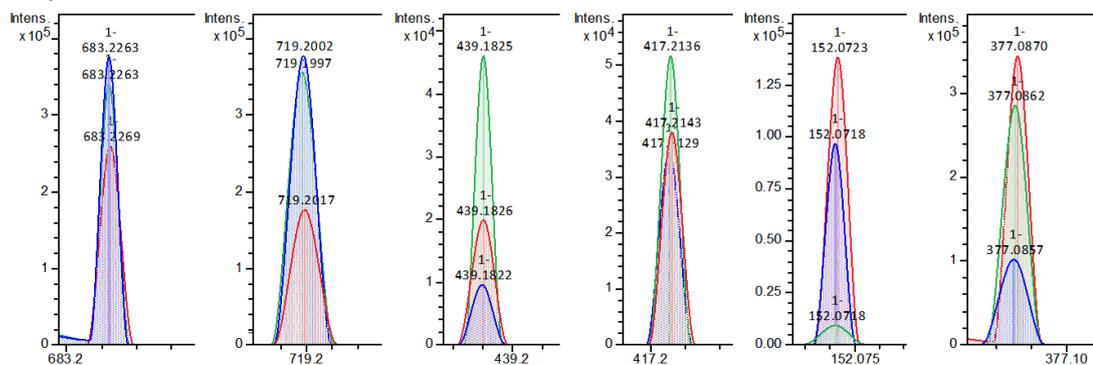
Um efeito similar quanto a intensidade de metabólitos foi visualizado na análise por ESI(-)-MS. Três grupos também foram formados dependendo das condições de transporte e solvente de extração (Figuras 14 e 15). Segundo dados do ASCA, 30 metabólitos foram considerados significantes para distinção de grupos relacionados ao transporte (Figura 14). Metabólitos  $m/z$  683,226: rt 1,00 min ( $C_{24}H_{44}O_{22}$ ) and  $m/z$  719,202: rt 1,02 ( $C_{30}H_{40}O_{20}$ ) foram melhor extraídos no transporte com nitrogênio líquido. Metabólitos  $m/z$  439,183: rt 6,19 min ( $C_{18}H_{32}O_{12}$ ) e  $m/z$  417,214: rt 9,27 min ( $C_{20}H_{34}O_9$ ) foram melhor extraídos após transporte em gelo enquanto que  $m/z$  152,072: rt 1,16 min ( $C_8H_{10}NO_2$ ) e  $m/z$  377,086: 1,02 min ( $C_{18}H_{18}O_9$ ) foram melhor observados após transporte em temperatura ambiente.



b)

UHPLC-ESI(-)-MS para análise de transporte									
Loadings		rT(min)	m/z	Erro (ppm)	Intensidades médias			Fórmula molecular	Principal condição
PC1	PC2				RT	Ice	N <sub>2</sub>		
0,3526		1,00	683,226	-2,7	284.308	376.503	428.376	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>22</sub>	N <sub>2</sub>
0,2834		1,02	719,202	1,0	134.035	178.733	213.692	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	N <sub>2</sub>
	-0,2400	6,19	439,183	-2,0	35.891	59.561	32.394	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	Gelo
	-0,1841	9,27	417,214	1,8	56.141	72.068	53.269	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	Gelo
-0,1021	0,2096	1,16	152,072	-2,7	147.389	57.823	102.149	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	TA
-0,1691		1,02	377,086	4,2	229.707	158.550	140.523	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	TA

c)

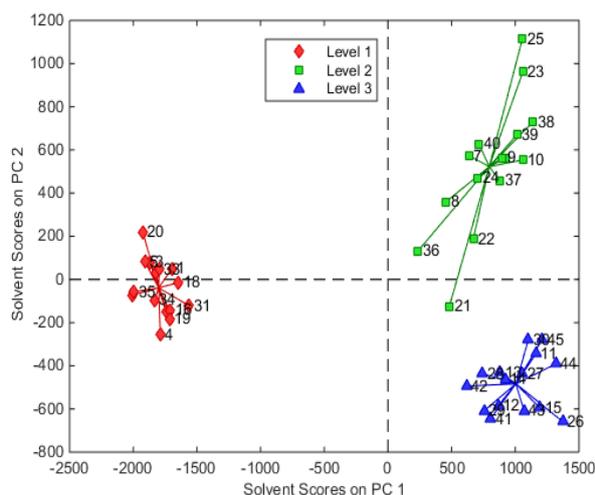


**Figura 14.** Dados UHPLC-ESI(-)-MS com análise da condição de transporte. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo e azul: nitrogênio líquido.

Um total de 20 metabólitos foi considerado relevante para distinguir os três grupos relacionados ao solvente de extração (Figura 15). Metabólitos  $m/z$  683,226: rt 1,00 min (C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>22</sub>) e  $m/z$  152,072: rt 1,16 min (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>) foram

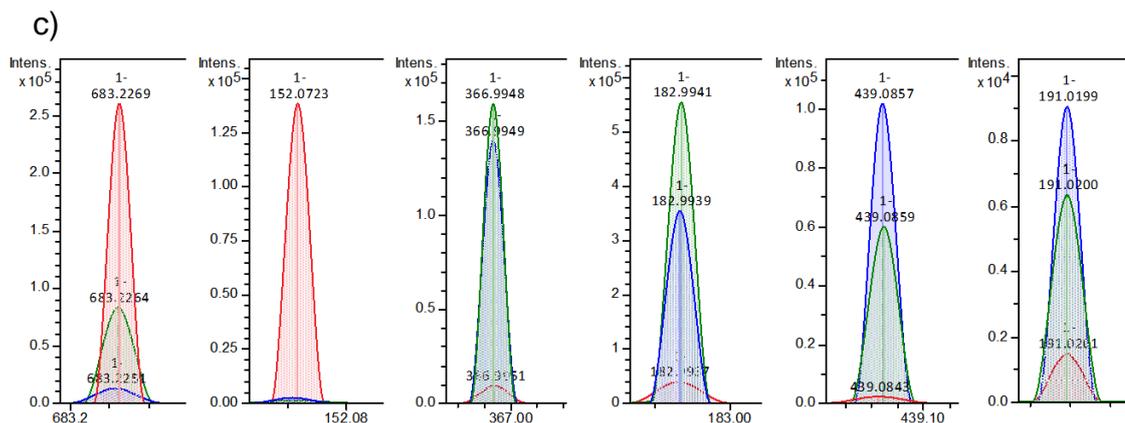
melhor extraídos com etanol 100%. Metabólitos  $m/z$  182,994:  $rt$  1,17 ( $C_7H_4O_6$ ) e seu dímero  $m/z$  366,995:  $rt$  1,17 min ( $C_{14}H_8O_{12}$ ) foram melhor extraídos com etanol 70%. Já os metabólitos  $m/z$  439,086:  $rt$  1,01 min ( $C_{19}H_{20}O_{12}$ ) e  $m/z$  191,020:  $rt$  1,12 min ( $C_6H_8O_7$ ) foram melhor extraídos com uso de etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. Os espectros de massas ESI(-)-MS confirmaram os resultados de ASCA (Figuras 14c e 15c).

a)



b)

UHPLC-ESI(-)-MS para análise de solvente									
Loadings		rT(min)	m/z	Erro (ppm)	Intensidades médias			Fórmula molecular	Principal condição
PC1	PC2				100E	70E	FA70E		
-0,2073	0,1820	1,00	683,226	-2,1	494.574	337.976	256.638	$C_{24}H_{44}O_{22}$	100E
-0,2554		1,16	152,072	-2,7	292.386	1.874	13.100	$C_8H_{10}NO_2$	100E
0,2117	0,2212	1,17	366,995	-1,5	23.952	230.861	176.130	$C_{14}H_8O_{12}$	70E
0,3819	0,4257	1,17	182,994	-2,5	67.846	759.472	563.667	$C_7H_4O_6$	70E
0,1775	-0,2266	1,01	439,086	3,5	625.000	91.629	163.962	$C_{19}H_{20}O_{12}$	FA70E
0,1882		1,12	191,020	1,1	7.340	72.222	92.474	$C_6H_8O_7$	FA70E



**Figura 15.** Dados UHPLC-ESI(-)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo a separação de grupos. b) Íons com maior distinção entre as condições de transporte. c) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70% e azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon  $m/z$  366,995 é um dímero do íon 182,994.

O método de análise multivariada ASCA foi aplicado à estrutura de dados gerada pelas *bucket tables*. Nos modos de ionização ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, os fatores de transporte e solvente foram estatisticamente significantes ( $P = 0,05$ ) e dentre os dois fatores, o efeito do solvente (48,37) foi indicado como o mais importante em relação ao efeito do transporte (9,34).

### 3.2.3. Identificação dos metabólitos de interesse

A Tabela 3 descreve os principais íons detectados e sua identificação por HRMS e MS/MS, seguida de comparação com bancos de dados (KEGG, ChEBI e Metlin). A identificação por MS/MS foi realizada em um espectrômetro de massas com fonte de ionização ESI e analisador *ion trap*, a partir de infusão direta da amostra.

Dos treze metabólitos atribuídos, sete foram reportados anteriormente em folhas de *E. guineensis* (Tahir et al., 2012 e Tahir et al., 2013).

**Tabela 3.** Metabólitos identificados em folhas de *E. guineensis* após análise por HRMS e MS/MS.

rt (min)	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	Fórmula Molecular	Composto atribuído
1.02	-	721.200	721.200	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	Ácido apigenina-6-C-hexose-8-C-deoxihexose-O-hidroximetil glutárico <sup>#</sup>
1.04	138.057	-	110.0561; 94.0617; 65.0370	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Ácido 4-aminobenzóico ou ácido antranílico
1.12	-	191.020	191.020	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido cítrico <sup>†</sup>
1.17	154.086	152.072	137.0554; 119.0451; 91.0511; 65.0368	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Dopamina ou vanililamina
1.17	185.009	182.994	185.0016; 141.0135; 97.0248; 71.0102	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Ácido quelidônico <sup>†</sup>
1.17	-	366.995	366.995	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	Dímero do ácido quelidônico <sup>†</sup>
1.39	138.091	-	121.0611; 105.0408; 103.0508; 91.0510	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	Tiramina
1.74	150.055	-	122.0564; 111.0277; 94.0620; 82.0262	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Gentianadina
3.34	-	315.109	315.109	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Dihidroxibenzoil-O-hexosídeo <sup>#</sup>
4.39	301.127	299.114	299.114	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Hidróxibenzoil-O-hexosídeo <sup>#</sup>
4.92	147.044	-	119.0453; 92.0548; 65.0368	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Cumarina
5.41	250.144	-	215.1067; 200.0832; 189.0784; 173.0597; 161.0597; 149.0597; 123.0441; 91.0542	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	4-O-dimetilalil-L-tirosina
7.30	-	577.157	433.0991; 397.0786; 337.0600; 313.0606; 283.0502	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	Apigenina-O-hexose-deoxihexose <sup>#</sup>

### 3.3. Conclusão Parcial

A partir do estudo feito nesse capítulo, conclui-se que a estabilidade dos metabólitos de folhas de dendê varia com a aplicação de diferentes métodos de transporte e deve ser avaliada no caso de uma coleta no campo. Assim, o transporte após *quenching* em nitrogênio líquido foi adotado como padrão para análises do metabólico fingerprinting de folhas com e sem sintomas de Amarelecimento Fatal, na busca de biomarcadores.

---

## **4. CAPÍTULO 2**

### **Prospecção de marcadores químicos relacionados ao Amarelecimento Fatal em folhas de dendê**

## 4.1. Procedimento experimental

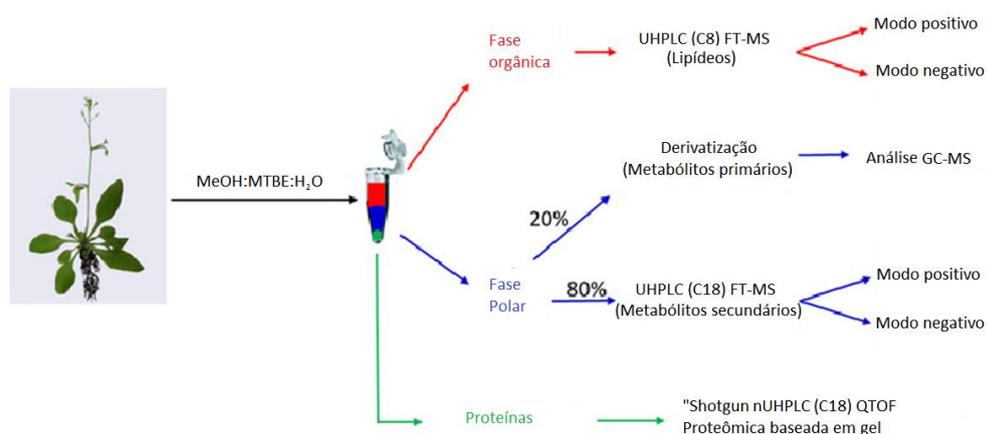
### 4.1.1. Materiais e métodos

Metanol grau UPLC >99,9% foi obtido da Fluka Analytical, MTBE (metil-terc-butil-éter) grau padrão analítico foi obtido da Fluka Analytical, ácido fórmico 99% foi obtido da Carlo Erba, acetonitrila >99,9% foi obtida da Fluka Analytical.

### 4.1.2. Aquisição de material

As folhas de dendê com e sem sintomas de AF foram cedidas pela empresa Marborges Agroindústria S.A. e coletadas em Moju-PA, localizada em 1°53'04.12"S 48°45'55.83"O. As folhas com sintomas de AF costumam apresentar as primeiras anomalias na folha mais nova da planta, chamada folha flecha, que foi coletada de 8 plantas com e sem sintomas de AF, em triplicata técnica.

Foi utilizado o protocolo "All-in-One" com adaptações (Giavalisco et al., 2011), onde são obtidas três frações finais de um processo de extração, sendo uma polar para análise de metabólitos secundários, uma orgânica para análise de lipídeos e um *pellet* para análise de proteínas (Figura 16).



**Figura 16.** Protocolo de extração de compostos químicos em tecido vegetal. Adaptado de Giavalisco et al., 2011.

#### 4.1.3. Extração dos metabólitos

Foram coletados 50 mg de folha de cada planta (8 com sintomas de AF e 8 sem sintomas de AF) em microtubos de 2 mL, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida levados ao laboratório em caixa térmica com gelo seco, onde ficaram armazenados até o momento da extração em freezer -80°C. Os microtubos com as amostras foram resfriados em nitrogênio líquido e em seguida processados em moinho de bolas do tipo *mini beadbeater* (Biospec Products, Estados Unidos) por 30 segundos. Em seguida, 1 mL de uma solução MeOH:MTBE 1:3 (v/v) foi adicionado a cada microtubo, que foi vortexado até completa homogeneização. Os microtubos foram incubados por 10 minutos a 4 °C em *thermomixer* (Eppendorf, Alemanha) e depois por mais 10 minutos em ultrassom com banho de gelo. Em seguida, 500 µL de uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O 1:3 (v/v) foram adicionados a cada microtubo, e estes foram vortexados novamente até homogeneização. Os microtubos foram então centrifugados (Thermo Scientific, Estados Unidos) por 5 minutos a 4 °C e três fases foram observadas: a fase superior apolar e a inferior polar, além do *pellet* no fundo do microtubo contendo material vegetal. A fase superior foi transferida para outro microtubo e guardada, já que a fase lipídica não seria analisada, e 500 µL da fase inferior, correspondente a fração polar foram transferidos para microtubo de 1,5 mL. Os microtubos foram levados a concentrador de amostras do tipo *speedvac* à temperatura ambiente onde ficaram *overnight* e reconstituídos em 1 mL da solução MeOH:H<sub>2</sub>O 1:3 (v/v). Os microtubos foram então levados ao ultrassom por 5 minutos, centrifugados em *mini-spin* por 5 minutos e 850 µL do volume foram transferidos para vials de 1 mL para análise em UHPLC-ESI-MS.

#### 4.1.4. Análise por UHPLC-MS/MS

Após a extração, 0,2 µL de amostra foram injetados no sistema UHPLC modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) equipado com coluna de fase-reversa *Acquity* UPLC BEH C8 (1,7 µm, 2,1x150 mm) (Waters Technologies, Estados

Unidos), acoplado ao espectrômetro de massas modelo *Maxis 4G* (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI e analisador TOF. O gradiente de fase móvel, o fluxo de amostra, o tempo de corrida e os parâmetros instrumentais foram os mesmos usados na sessão 3.1.4. As replicatas técnicas foram preparadas e analisadas em três dias consecutivos.

No pré-processamento dos dados, foi utilizada a ferramenta XCMS Online (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), que consiste em um pacote de programação R destinado a análise metabolômica com LC-MS. Nesta ferramenta foi construída a matriz de dados com alinhamento dos tempos de retenção na configuração *obiwarp*, utilizando os parâmetros:

- *profStep* = 1; intervalo usado (em *m/z*) para geração do perfil dos dados brutos.
- *mzwid* = 0,015; largura dos intervalos de *m/z* superpostos para uso na criação dos cromatogramas de densidade de picos e picos agrupados nas amostras.
- *minfrac* = 0,5; menor fração de amostras necessária em ao menos um dos grupos de amostras para que este seja um grupo válido.
- *bw* = 5; desvio aceitável no tempo de retenção (em segundos).

Foi utilizado o algoritmo de *peak detection* centwave, com os parâmetros:

- $\Delta m/z = 15$  ppm; máximo desvio tolerado em leituras consecutivas.
- *minimum peak width* = 10 s; largura mínima do pico cromatográfico.
- *maximum peak width* = 120 s; largura máxima do pico cromatográfico.

Os cromatogramas de cada amostra foram individualmente convertidos para a extensão mzXML e foram criados dois *datasets*, um de amostras com AF (CAF) e um de amostras sem AF (SAF).

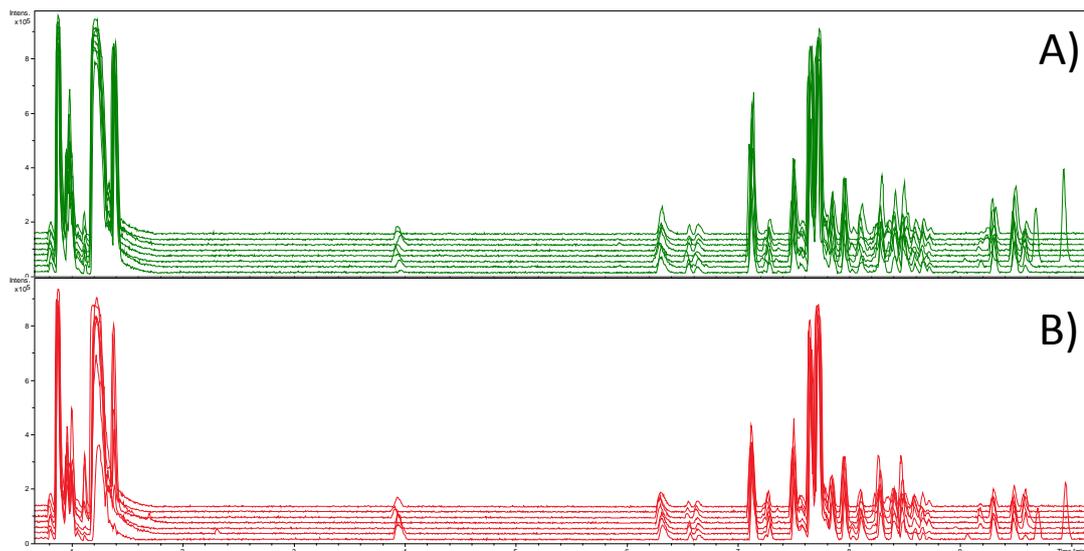
No tratamento estatístico, foi feito um PCA utilizando o *software The Unscrambler*, versão 9,7 (CAMO Software, Noruega). Foi utilizada a normalização com o padrão interno ampicilina ( $m/z$  350,11; tempo de retenção tR 7,29 min).

## 4.2. Resultados e Discussão

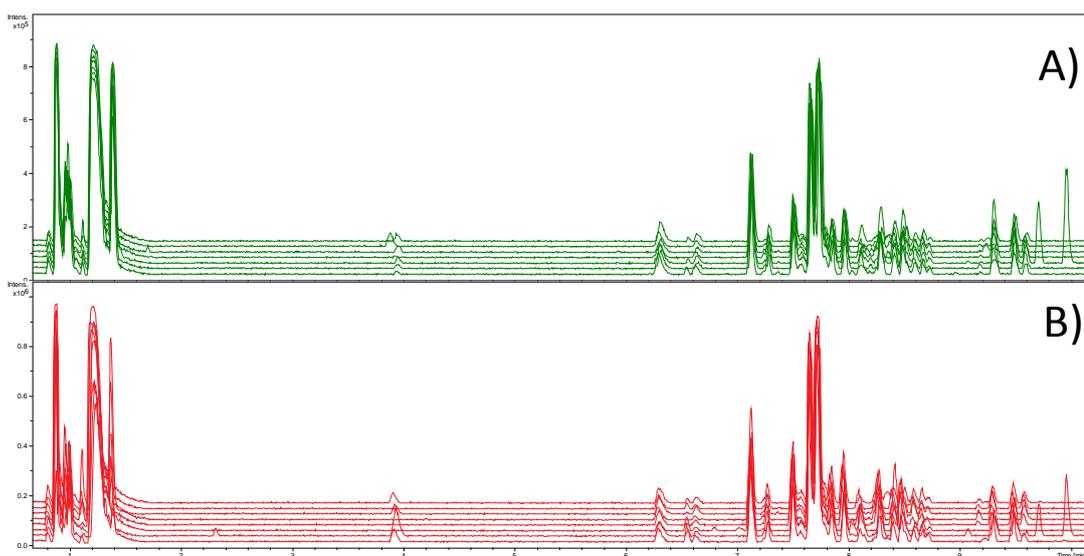
Como um dos objetivos desse projeto é a realização de uma impressão digital metabólica na busca por marcadores químicos relacionados ao AF, foi empregada uma técnica de alta eficiência e sensibilidade para que fosse possível detectar o maior número de metabólitos possível, mesmo com intensidade baixa, para que se tenha um entendimento mais completo sobre as vias metabólicas afetadas. Como descrito no Capítulo 1, o uso de diferentes métodos de transporte e extração influenciam na quantidade e intensidade de metabólitos detectados. No intuito de se detectar e identificar metabólitos mantendo a estabilidade dos mesmos, o transporte foi realizado com *quenching* do material vegetal em nitrogênio líquido, o que promove a interrupção do metabolismo e evita a degradação de metabólitos por fatores ambientais ou produção de metabólitos como mecanismo de defesa.

O uso de UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas permitiu uma corrida cromatográfica rápida de 20 minutos, com a detecção de uma grande quantidade de compostos de diversas classes químicas.

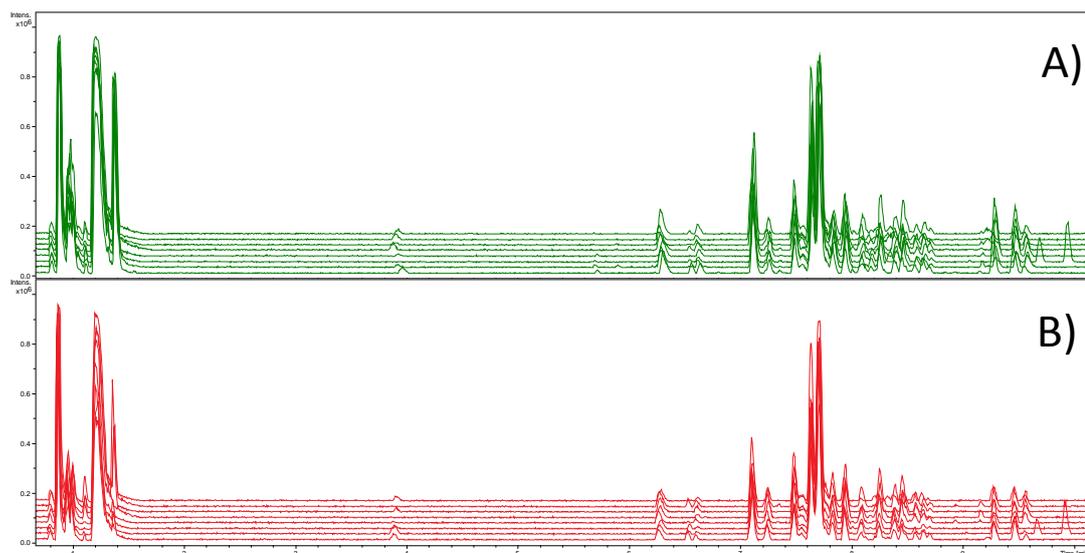
Os BPC são mostrados nas Figuras 17-19, referentes as replicas R1 a R3, mostrando as diferenças no perfil cromatográfico das amostras com AF (vermelho) e sem AF (verde) no modo de ionização ESI(+)-MS, provando a necessidade de um tratamento estatístico para este grande número de variáveis.



**Figura 17.** Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R1 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF.



**Figura 18.** Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R2 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF.



**Figura 19.** Cromatogramas de pico base (BPC) da réplica R3 após análise por UHPLC-MS. A) Amostras sem AF. B) Amostras com AF.

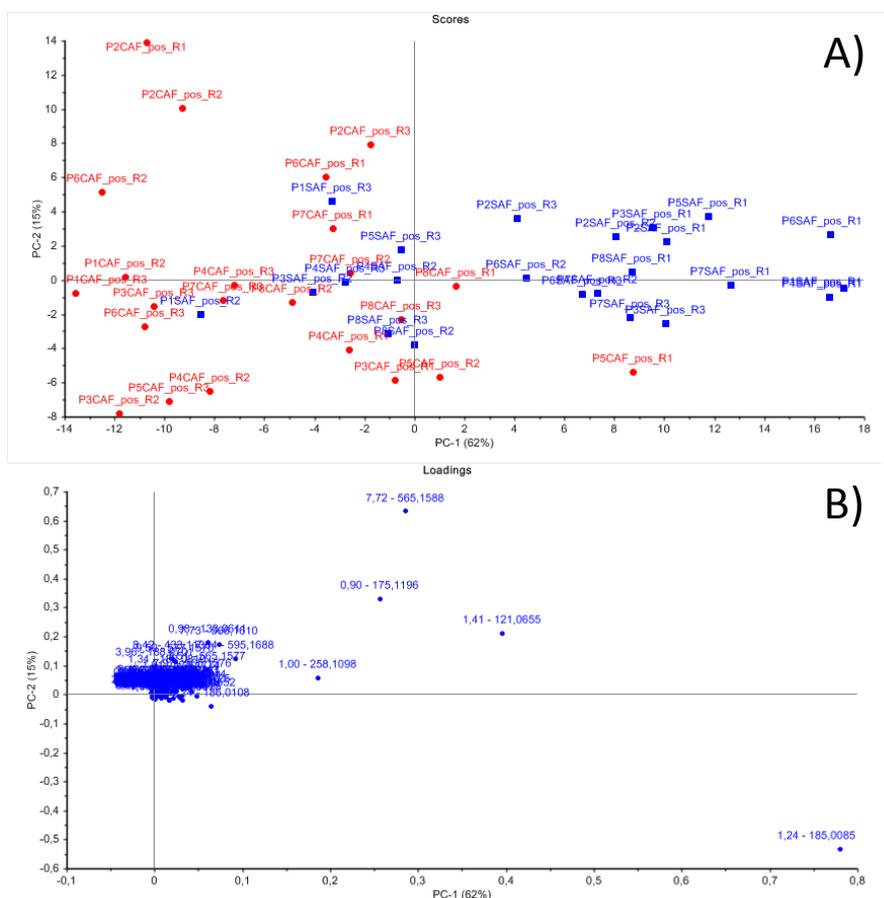
O método de PCA foi aplicado à estrutura de dados gerada pelas *bucket tables*, que a partir de gráficos de *scores* e *loadings* de PC1xPC2 puderam ilustrar os grupos que se diferenciaram e os íons que influenciaram essa diferenciação.

#### 4.2.1. Dados UHPLC-ESI(+)-MS

Os dados de amostras com e sem AF foram avaliados por modelos de PCA e são apresentados na Figura 20. Mesmo utilizando uma técnica de análise não-discriminatória, onde não são inseridos dados sobre as amostras, foi possível observar uma distinção entre as amostras com sintomas de AF (em vermelho no gráfico de *scores*) e as amostras sem sintomas de AF (em azul no gráfico de *scores*). As avaliações foram feitas levando-se em conta *loadings* maiores que 0,1 e menores que -0,1.

Na análise por ESI(+)-MS, 5 metabólitos foram encontrados com a capacidade de distinguir os grupos relacionados as amostras sem sintomas de AF. Foram eles os metabólitos com  $m/z$  121,065: rt 1,41 min;  $m/z$  258,109: rt 1,00 min;  $m/z$  185,008: rt 1,24 min;  $m/z$  175,119: rt 0,90 e  $m/z$  565,158: rt

7,72 min. Nenhum metabólito apresentou influência na separação do grupo de amostras com sintomas de AF.

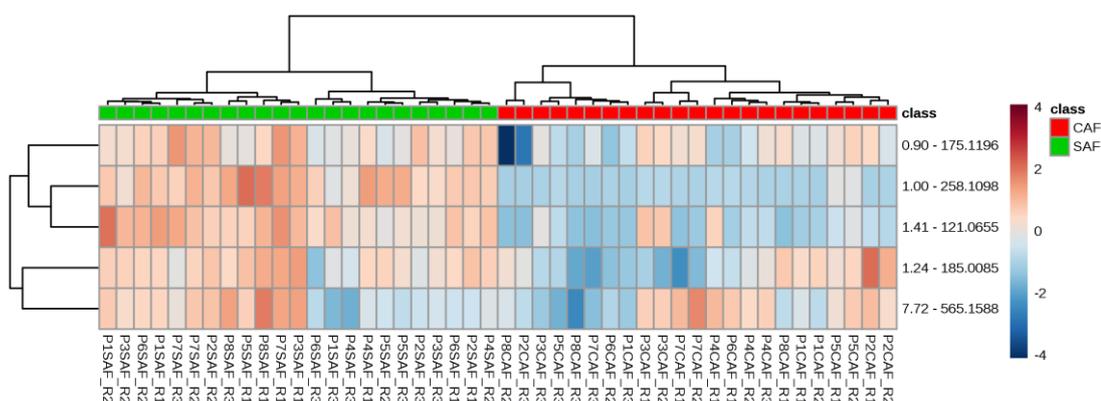


**Figura 20.** Dados de PCA dos extratos de folha de dendê com e sem AF, após análise por UHPLC-ESI-(+)-MS. A) *Scores plot*. B) *Loadings plot*.

É possível observar que no centro dos componentes principais do gráfico de scores há uma sobreposição de amostras com e sem AF. Sugere-se que o AF tenha diversos níveis, dependendo de como esta condição afeta as plantas. Estes níveis de AF não são bem estabelecidos, assim as características fisiológicas de plantas com níveis mais brandos de AF podem ser próximas das características de plantas sem AF.

Os dados obtidos no modo negativo foram tratados estatisticamente da mesma forma, porém não foi possível observar uma boa separação de grupos nem a identificação de marcadores para tais separações.

A análise de *cluster* por *heatmap* foi realizada, utilizando como variáveis do modelo os íons observados no gráfico de *loadings*. Após normalização pareto e escolha dos parâmetros (medida de distância euclidiana, algoritmo de *clustering* Ward), o *heatmap* foi gerado e é mostrado na Figura 21. As classes de amostras são indicadas na parte superior do heatmap, como amostras sem AF (em verde) e com AF (em vermelho). O gradiente de cor, que vai do rosa ao azul, indica a intensidade dos metabólitos, sendo rosa a maior intensidade.



**Figura 21.** Análise de *cluster* por *heatmap* dos possíveis biomarcadores de AF em folha de dendê.

É possível observar a mesma tendência da análise por PCA, onde os possíveis biomarcadores são detectados nas amostras sem sintomas de AF. São observadas pequenas variações na intensidade dos metabólitos entre as amostras, evidenciando a existência de níveis de AF, que ainda não são bem estabelecidos.

#### 4.2.3. Identificação dos Metabólitos

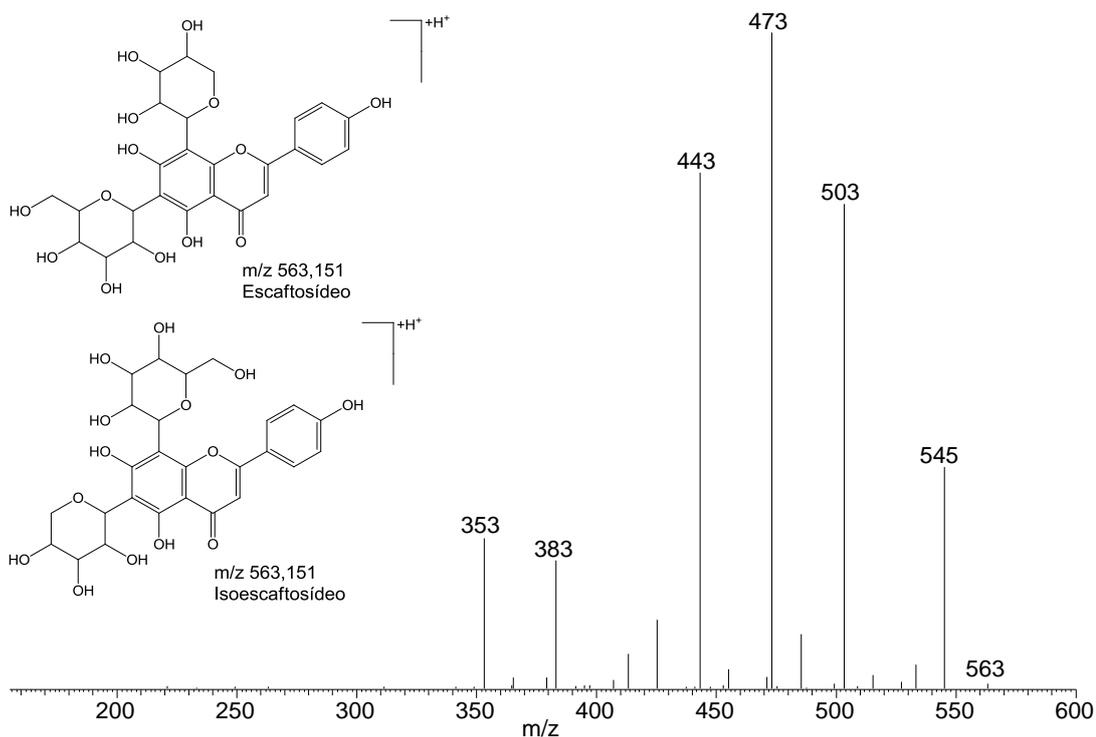
O uso de HRMS foi novamente capaz de prever a fórmula molecular dos compostos considerando seu valor *m/z*, massa teórica (e erro em relação a massa obtida) e seu *mSigma*, utilizando-se do algoritmo FMF. Com isso, foi

possível realizar a triagem das fórmulas moleculares adquiridas e relacioná-las com possíveis metabólitos com uso de banco de dados de metabólitos e padrão de fragmentação.

Para identificação do íon  $m/z$  565,158, foi realizado experimento de fragmentação (MS/MS) utilizando um espectrômetro de massas modelo LTQ XL com analisador *ion trap* linear (Thermo Scientific, Estados Unidos). Este equipamento permite, através do analisador *ion trap* linear, experimentos de  $MS^n$ , em que o íon precursor é fragmentado e, em seguida, um dos fragmentos pode ser selecionado e fragmentado novamente diversas vezes, sendo uma importante ferramenta para elucidação estrutural.

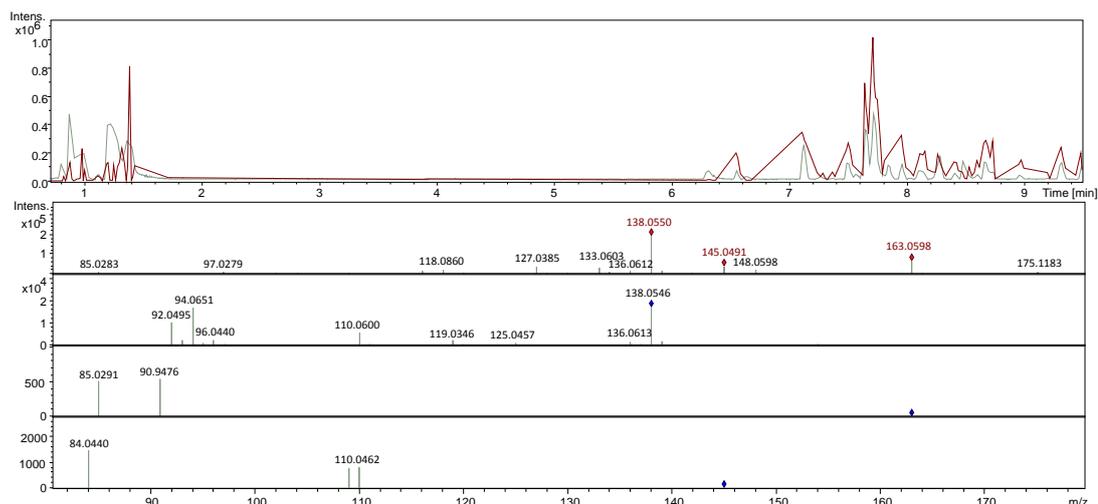
No experimento de MS/MS foi realizada a extração das folhas utilizando o mesmo protocolo do experimento anterior (Figura 16). As amostras foram analisadas por DIMS (do inglês, *direct infusion mass spectrometry*) no modo ESI(-)-MS. É mostrado na Figura 22 o espectro de MS/MS do íon  $m/z$  563,151 que, após fragmentação, foi atribuído as flavonas C-glicosiladas escaftosídeo e isoescaftosídeo ( $C_{26}H_{28}O_{14}$ ).

Os fragmentos  $m/z$  545 [(M - H) - 18],  $m/z$  503 [(M - H) - 60] e  $m/z$  473 [(M - H) - 90] são descritos como fragmentações que ocorrem em uma das unidades de glicose ligadas a flavona. O fragmento  $m/z$  443 [(M - H) - 120] corresponde a uma perda de glicose e os fragmentos  $m/z$  383 [(M - H) - 180] e  $m/z$  353 [(M - H) - 210] são atribuídos ao padrão de fragmentação de flavonas C-glicosiladas (Tahir et al., 2012).



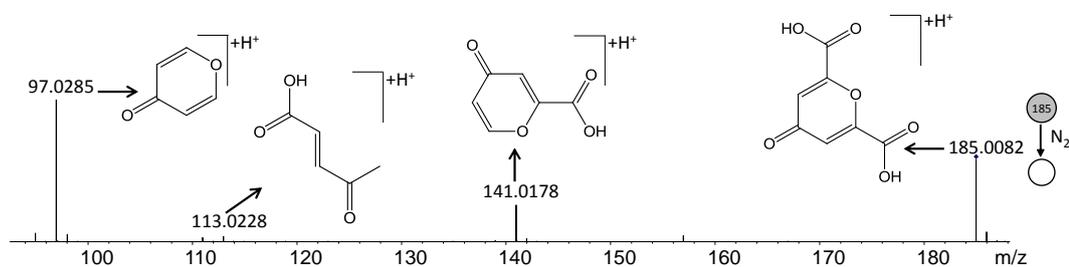
**Figura 22.** Espectro ESI(-)-MS/MS do íon  $m/z$  563,151.

Para identificação dos íons  $m/z$  121,065,  $m/z$  175,120,  $m/z$  185,008 e  $m/z$  258,109, foi realizado experimento de fragmentação, utilizando o mesmo espectrômetro das análises de MS descritas neste capítulo. Este equipamento conta com uma ferramenta chamada AutoMS, onde é feita uma corrida cromatográfica e no momento em que um íon com intensidade mínima é detectado, o mesmo é fragmentado. Assim é gerado um cromatograma contendo diversos espectros de fragmentação. As frações polares das 8 plantas da réplica R1 foram utilizadas para tal experimento, exemplificado pela amostra da planta 1 na Figura 23, que mostra os íons detectados e fragmentados no tempo de retenção de 1,0 min.



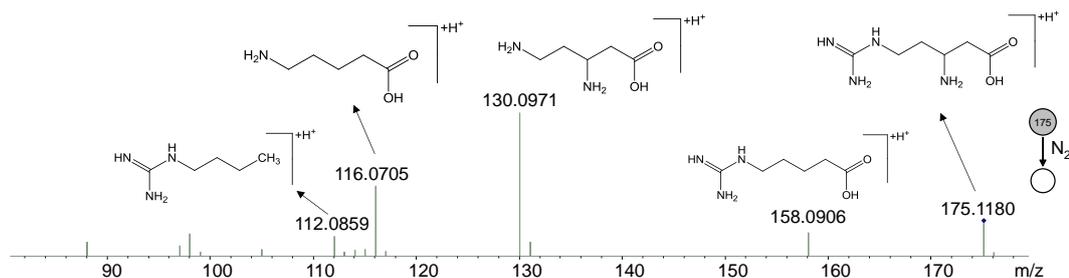
**Figura 23.** Experimento de MS/MS e íons fragmentados no tempo de retenção 1,00 min.

Assim, o espectro de fragmentação do íon  $m/z$  185,008 foi obtido no modo ESI(+)-MS e atribuído ao ácido quelidônico ( $C_7H_4O_6$ , massa teórica 185,0080). Seu padrão de fragmentação já havia sido mostrado por Tahir et al., 2013 e foi confirmado neste experimento (Figura 24).



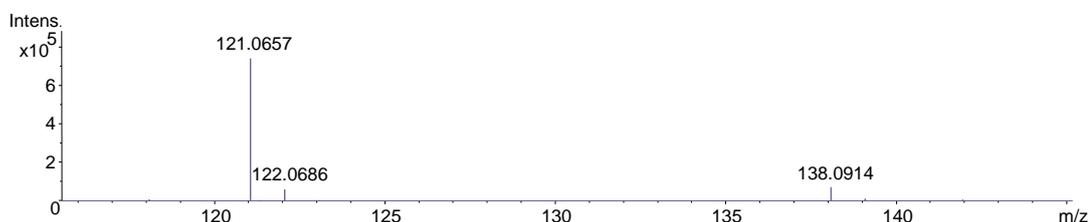
**Figura 24.** Espectro ESI(+)-MS/MS do ácido quelidônico ( $m/z$  185,008).

O íon  $m/z$  175,120 foi atribuído ao aminoácido arginina ( $C_6H_{14}N_4O_2$ , massa teórica 175,1190) por comparação com banco de dados (KEGG e CheBI) com confirmação pela comparação dos fragmentos obtidos no experimento AutoMS no modo ESI(+)-MS (Figura 25).



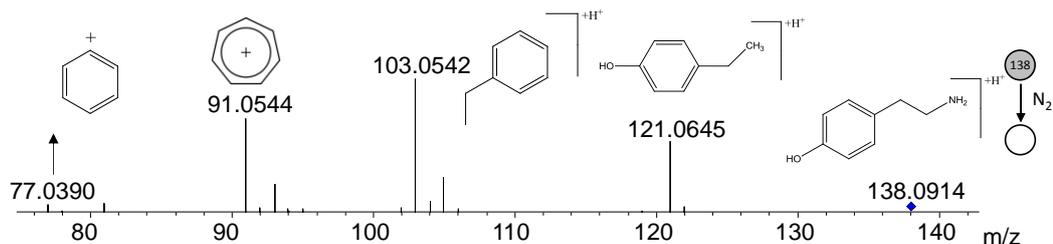
**Figura 25.** Espectro ESI(+)-MS/MS da arginina ( $m/z$  175,120).

O íon  $m/z$  121,065 foi encontrado com alta intensidade de massa no mesmo tempo de retenção do íon  $m/z$  138,091 (Figura 26). Foi então realizado o experimento de fragmentação do íon  $m/z$  138,091, e observou-se o fragmento  $m/z$  121,064 no espectro de ESI-MS/MS, o que indica uma fragmentação do íon  $m/z$  138,091 na fonte. O fato do fragmento apresentar uma intensidade maior que o íon precursor pode ser atribuído a grande estabilidade do íon  $m/z$  121,064 que apresenta a perda de um grupo amina, que facilmente ocorre na ionização ESI(+)-MS.



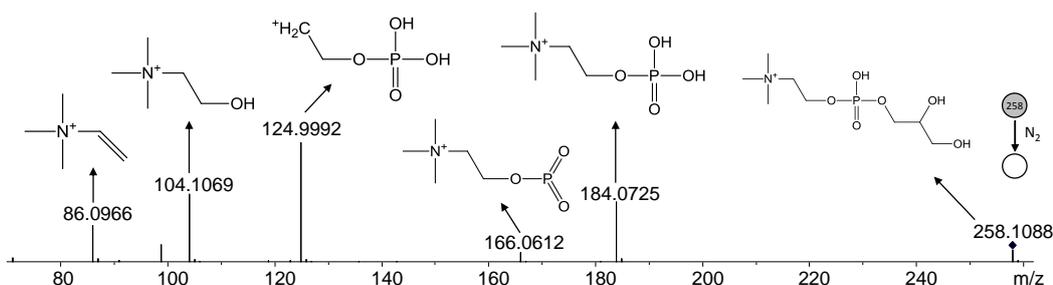
**Figura 26.** Espectro ESI(+)-MS referente ao tempo de retenção 1,00 min.

Desta forma, foi realizada a identificação do íon  $m/z$  138,091, que pelo padrão de fragmentação poderia ser atribuído a tiramina e a 1-(p-hidróxifenil)etilamina. A 1-(p-hidróxifenil)etilamina nunca foi reportada em seres vivos e a enzima responsável pela transformação da tirosina em tiramina, na via metabólica que precede a via de alcalóides isoquinolínicos, já foi isolada e sequenciada em *E. guineensis*, segundo o banco de genes KEGG. Assim, o íon  $m/z$  138,091 ( $C_8H_{11}NO$ , massa teórica 138,0913) foi atribuído a tiramina, que tem seu padrão de fragmentação apresentado na Figura 27.



**Figura 27.** Espectro ESI(+)-MS/MS do íon  $m/z$  138,091.

O íon  $m/z$  258,109 foi submetido ao mesmo experimento de AutoMS e, pelo padrão de fragmentação, este íon foi atribuído a glicerofosforilcolina ( $C_8H_{21}NPO_6$ , massa exata 258,1101) (Figura 28). O padrão de fragmentação já havia sido reportado por Lin et al., 2011 e foi confirmado neste experimento.



**Figura 28.** Espectro ESI(+)-MS/MS da glicerofosforilcolina ( $m/z$  258,108).

Com isso, os metabólitos identificados foram relacionados a vias metabólicas por comparação com banco de dados Metlin e KEGG e são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Possíveis biomarcadores identificados em folhas de *E. guineensis* por análise em UHPLC-MS.

$m/z$	Tempo de retenção	Intensidade média	Composto atribuído	Via metabólica relacionada
258.1098	1.00	543,816	Glicerofosforilcolina	Metabolismo de glicerofosfolipídeos
121.0655	1.41	817,064	Fragmento da tiramina	-
138.0914	1.41	126,596	Tiramina	Biosíntese de alcalóides isoquinolínicos
565.1588	7.72	548,160	Escaftosídeo Isoescaftosídeo	Biosíntese de flavonas e flavonóis
175.1196	0.90	817,716	Arginina	Via do chiquimato
185.0085	1.24	812,580	Ácido quelidônico	-

## **4.2. Conclusão Parcial**

O estudo realizado nesse capítulo mostra como a abordagem metabolômica foi utilizada para conseguir diferenciar quimicamente as plantas com e sem AF utilizando um modelo estatístico não-supervisionado para separação de grupos de possíveis biomarcadores. Os compostos de interesse foram identificados por padrão de fragmentação e/ou comparação com bancos de dados em metabolômica e a literatura. Diferentes grupos de compostos químicos (flavonas, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos e fosfolipídeos) foram, assim, relacionados a diferentes vias metabólicas as quais pertencem.

---

## **5. CAPÍTULO 3**

**Desenvolvimento de protocolo analítico para análise de folhas de dendê por Imagem Química em MALDI-MSI e LDI-MSI**

## 5.1. Procedimento experimental

### 5.1.1. Materiais e métodos

#### 5.1.2. Aquisição de material

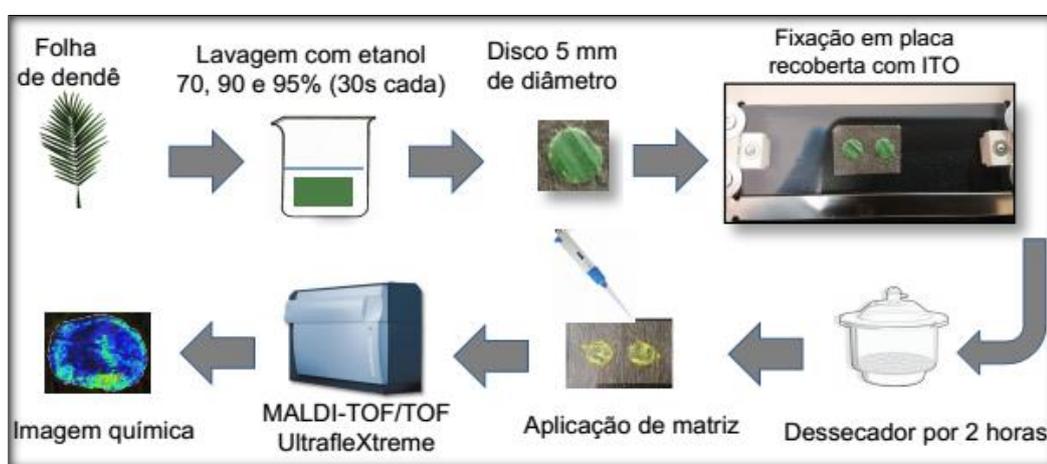
A matriz 9-AA >99,5% o e ácido trifluoroacético 99% foram obtidos da Sigma-Aldrich, DHB >99,5% foi obtido da Bruker Daltonics, metanol grau HPLC 99,9% foi obtido da Panreac, acetonitrila >99,9% foi obtida da Fluka Analytical, etanol 99,7% foi obtido da J.T.Baker, ácido fórmico 99% foi obtido da Carlo Erba. De acordo com a filotaxia do dendezeiro, a folha 17 foi coletada na vitrine da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, localizado em 15°36'09.1"S 47°43'35.0"W.

#### 5.1.1.2. Métodos instrumentais

No preparo de amostra, foram utilizados perfurador de papel, fita dupla face condutora, placas de vidro com cobertura de óxido de estanho e índio (ITO, do inglês *indium tin oxide*) (Bruker Daltonics, Alemanha), placa de imagem química em MALDI (*MTP Slide Adapter II*, Bruker Daltonics, Alemanha) e *spray* para cromatografia com reservatório de 10 mL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Os experimentos de MALDI-MSI foram feitos no espectrômetro de massas modelo *UltrafleXtreme* (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com fonte de ionização MALDI e analisador de massas de alta resolução do tipo TOF, com possibilidade de uso no modo linear ou refletor. Os dados de imagem foram obtidos no *software flexImaging*, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) e os espectros de massas obtidos das imagens foram avaliados no *software flexAnalysis*, versão 3.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).

### 5.1.2. Experimento de imagem química por MALDI-MSI

Pedaços de folha foram cortados e imersos em solução de etanol 70%, 90% e 95% por 30 segundos cada. Em seguida, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram obtidos com perfurador de papel e fixados com fita dupla face condutora em placas de vidro com ITO. Para retirada da umidade presente no interior da folha e do etanol previamente utilizado na lavagem, as placas foram colocadas em dessecador por 2 horas e, em seguida, a matriz foi aplicada de acordo com o ensaio adequado (Figura 29).



**Figura 29.** Preparo de amostra para imagem química por MALDI-MSI.

#### 5.1.2.1. Aplicação das matrizes

Para aplicação de DHB com pipeta, 20 mg da matriz foram solubilizados em 1 mL de solução TA30, constituída de 30% acetonitrila e 70% de solução 0,1% de ácido trifluoroacético. Para aplicação com *spray*, 100 mg da matriz foram solubilizados em 5 mL de solução TA30.

Para aplicação de 9-AA com pipeta, foi preparado 1 mL de solução de 9-AA em metanol grau HPLC na concentração de 5 mg/mL. Para aplicação com *spray*, foram preparados 9 mL de solução de 9-AA em metanol grau HPLC na concentração de 5 mg/mL.

Nas análises de MALDI-MSI foram avaliadas duas aplicações de matriz: pipeta e *spray* para cromatografia. Na aplicação com pipeta, foi

utilizada uma micropipeta (20-200  $\mu$ L) e uma gota da matriz foi aplicada sobre o tecido vegetal. Após secagem do solvente, outra gota da solução de matriz foi aplicada. Este procedimento foi repetido até que fosse observada uma camada de matriz depositada uniformemente sobre o tecido vegetal.

Na aplicação de matriz com *spray* para cromatografia, 2 mL da solução preparada foram transferidos para um microtubo que foi colocado dentro do reservatório do aplicador de *spray*. Após uso dos 2 mL, o microtubo foi retirado do reservatório e preenchido novamente com matriz. O aplicador foi posicionado a cerca de 15 cm de distância da placa com o material vegetal e o *spray* foi aplicado por 1 segundo. Após secagem do solvente, o processo é repetido até a utilização de todo o volume de matriz ou observação de uma camada uniforme de matriz depositada sobre o material vegetal.

#### 5.1.2.2. Espectrometria de massas

Antes das análises de imagem química de folhas de dendê, os parâmetros do equipamento foram otimizados para cada matriz utilizada. Assim, sinais de massas intensos foram observados. Os parâmetros são descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros instrumentais para análise de metabólitos de folhas por MALDI-MSI.

	<b>DHB</b>	<b>9-AA</b>
Poder do <i>laser</i> (%)	80	60
Número de disparos	500	500
Frequência (Hz)	500	1000
Modo do analisador	Refletor positivo	Refletor negativo
Ganho do detector	8.0x	9.0x
Faixa de massas	<i>m/z</i> 360-1000	<i>m/z</i> 200-1000
Resolução de imagem ( $\mu$ m)	120	120

### **5.1.3. Experimento de imagem química por LDI-MS**

No preparo de amostra para análise sem aplicação de matriz, pedaços de folha foram cortados e imersos em solução de etanol 70%, 90% e 95% por 30 segundos cada. Em seguida, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram obtidos com perfurador de papel e fixados com fita dupla face condutora em placas de vidro com ITO. Para retirada da umidade presente no interior da folha e do etanol previamente utilizado na lavagem, as placas foram colocadas em dessecador por 2 horas.

#### **5.1.3.1. Espectrometria de Massas**

Para a análise de imagem química por LDI-MSI, os parâmetros do equipamento foram otimizados para a obtenção de sinais de massas intensos: poder do *laser* 60%; 1000 disparos; frequência 1000 Hz; modo do analisador refletor negativo; ganho do detector 20,0x, faixa de massas  $m/z$  100-1000, resolução de imagem de 200  $\mu\text{m}$ .

## **5.2. Resultados e discussão**

Para desenvolvimento do protocolo de imagem química de folhas de dendê por MALDI-MSI, foram estudadas as matrizes mais adequadas para análise de metabólitos (DHB para modo MALDI(+)-MS, 9-AA para MALDI(-)-MS), a melhor aplicação de cada matriz, o modo de lavagem da camada cerosa e as imagens químicas formadas.

Também foi realizado um experimento de LDI-MS, onde não há a aplicação de matriz, para avaliação das imagens produzidas e dos íons detectados.

### **5.2.1. Otimização do preparo de amostra**

No preparo de amostra, a etapa crítica do desenvolvimento de protocolo de imagem química em MALDI está na aplicação da matriz. Foram

avaliadas duas formas de aplicação disponíveis, ambas manuais: micropipeta e *spray* para cromatografia.

Na aplicação de matriz com uso de micropipeta, são aplicadas gotas sobre o material vegetal que, a nível microscópico, representam um grande volume de solvente e deve ser avaliado. Foi observada uma dificuldade na cristalização do DHB (aplicado com micropipeta), que é solubilizado em água/acetona. A demora na secagem das gotas aplicadas sobre o material vegetal levou a uma deposição não uniforme dos cristais da matriz. Por outro lado, a aplicação com micropipeta da matriz 9-AA, que é solubilizada em metanol, apresentou melhor formação de cristais devido a rápida secagem do solvente.

Na aplicação de matriz com uso de *spray*, a solução solvente/matriz é nebulizada para que o DHB seja aplicado com uma menor quantidade de solvente, facilitando a secagem e melhorando a formação dos cristais sobre o material vegetal.

Como discutido anteriormente, a película cerosa protetora do material vegetal pode ser quimicamente retirada com uma etapa de lavagem antes da aplicação de matriz, no caso do MALDI-MSI, ou antes da análise, no caso do LDI-MSI. Esta lavagem foi avaliada com uso de diversos solventes orgânicos (clorofórmio, metanol, metanol/clorofórmio, etanol), e dentre eles, o etanol se mostrou como a melhor alternativa após avaliação das imagens produzidas.

### **5.2.2. Otimização dos parâmetros instrumentais**

Os parâmetros instrumentais, mostrados na Tabela 5, foram otimizados para que imagens de melhor qualidade fossem obtidas. O poder do laser é um dos parâmetros mais importantes, já que ele determina a quantidade de energia que incide no material vegetal, determinando a eficácia na ionização dos compostos presentes naquele ponto. O poder do laser varia de 0-100% e em experimentos de MS usam-se geralmente valores entre 60-90%, de

acordo com a matriz usada e a aplicação da mesma. Esse valor deve ser otimizado antes do experimento de imagem química, com disparos aleatórios no material vegetal até que um valor apresente melhor reprodutibilidade. Na análise de imagem química com uso da matriz DHB o valor de poder do laser mais eficiente foi de 80%, enquanto que para a matriz 9-AA o valor foi de 60% e na análise de LDI o valor também foi de 60%.

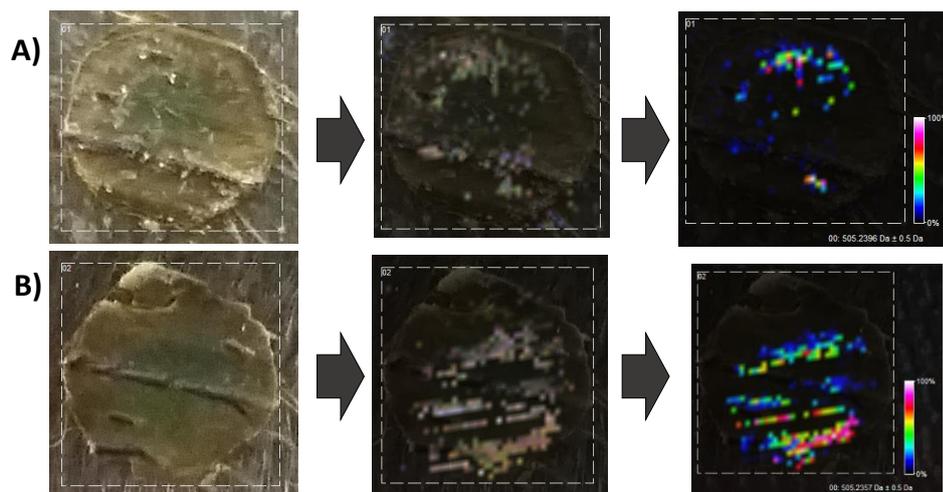
O modo do analisador foi refletor em todos os protocolos, o que é ideal em análise de compostos com massa baixa (metabólitos e lipídeos), pelo aumento na resolução dos sinais que é observado devido a correção das dispersões espacial, temporal e cinética decorrentes na fonte de ionização.

O ganho do detector também é um parâmetro importante durante o desenvolvimento do protocolo e foi otimizado antes das análises, para que sinais tivessem maior intensidade e conseqüentemente fossem formadas imagens de melhor qualidade. Na análise com uso da matriz DHB foi utilizado ganho de detector de 8,0x, para matriz 9-AA foi utilizado ganho de 9,0x. Para a análise por LDI, como não há matriz para auxílio na ionização, os sinais apresentaram menor intensidade e por esse motivo, o ganho de detector teve que ser aumentado para 20,0x.

### **5.2.3. Imagem química com uso da matriz DHB**

Após o preparo de amostra, mostrado na Figura 29, uma placa de imagem para MALDI-MSI foi preparada com dois discos de folha, um coberto com matriz DHB aplicada com pipeta e um coberto com matriz DHB aplicada com *spray*, para avaliação das imagens obtidas com essa matriz nas diferentes aplicações.

A Figura 30 mostra os discos de folha após aplicação de matriz com pipeta e *spray*, assim como a imagem química de todos os íons detectados com intensidade relativa mínima de 20%, mostrando que a ionização não ocorreu em toda a superfície da folha, independente do modo de aplicação de matriz.

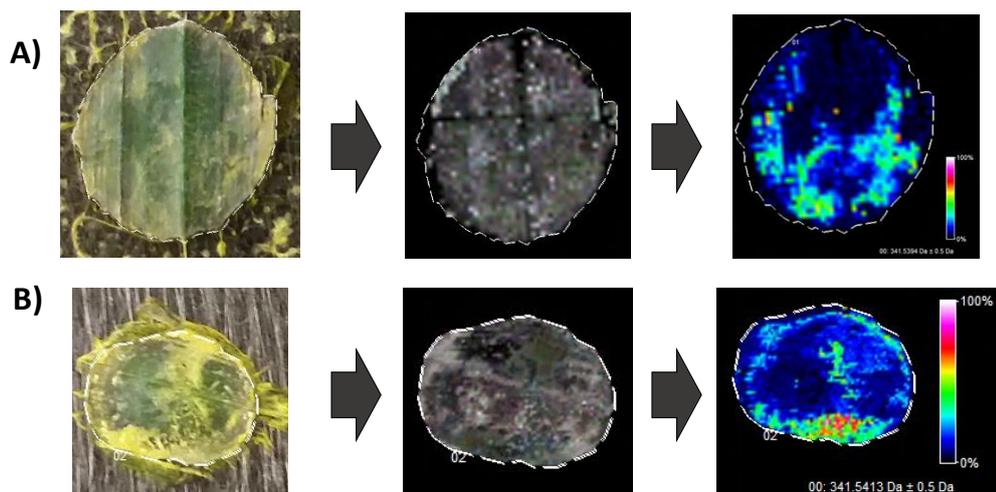


**Figura 30.** Folha de dendê após aplicação de matriz DHB, imagem química de todos os íons detectados e imagem química do íon  $m/z$  505,23. A) aplicação com spray. B) aplicação com pipeta.

### 5.2.2. Imagem química com uso da matriz 9-AA

Após o preparo de amostra, mostrado na Figura 27, uma placa de imagem para MALDI-MSI foi preparada com dois discos de folha, um coberto com matriz 9-AA aplicada com pipeta e um coberto com matriz 9-AA aplicada com *spray*, para avaliação das imagens obtidas com essa matriz nas diferentes aplicações.

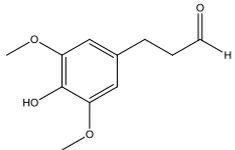
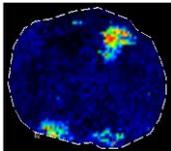
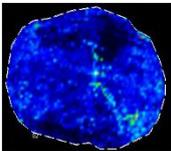
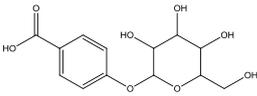
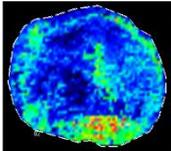
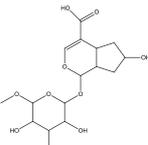
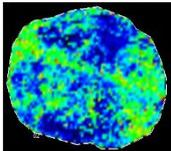
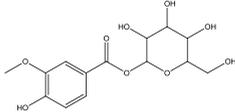
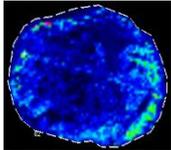
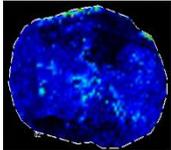
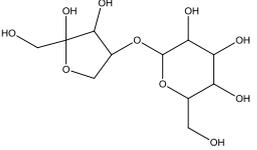
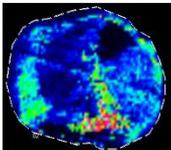
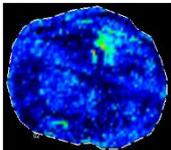
A Figura 31 mostra os discos de folha após aplicação de matriz com pipeta e *spray*, assim como a imagem química de todos os íons detectados com intensidade relativa mínima de 20%, mostrando que a ionização ocorreu em toda a superfície da folha, nos dois modos de aplicação de matriz. Foi possível aplicar uma maior quantidade de matriz com uso da micropipeta, gerando uma camada mais espessa de 9-AA, com boa reprodutibilidade. Por esse motivo, o modo de aplicação com micropipeta foi utilizado no experimento de identificação dos metabólitos.



**Figura 31.** Folha de dendê após aplicação de matriz 9-AA, imagem química de todos os íons detectados e imagem química do íon  $m/z$  341,54. A) aplicação com spray. B) aplicação com pipeta.

A identificação dos metabólitos detectados por MALDI-MSI foi feita por comparação com a massa exata dos metabólitos identificados por UHPLC-ESI-MS (Capítulo 2). Devido a menor capacidade de extração dos metabólitos e, conseqüentemente, menor ionização dos mesmos, poucos íons apresentaram intensidade suficiente para formar uma imagem química, em comparação com a grande quantidade de metabólitos detectados na análise por UHPLC-MS. A Tabela 6 relaciona as imagens químicas obtidas por MALDI-MSI e os metabólitos identificados por HRMS ou isômeros correspondentes a uma fórmula molecular.

**Tabela 6.** Imagem química de metabólitos de dendê.

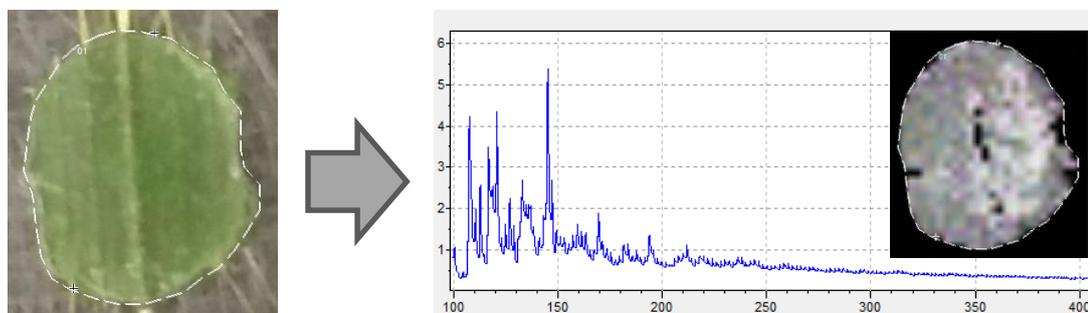
<i>m/z</i>	Metabólito	Imagem	<i>m/z</i>	Metabólito	Imagem
207,08	 Sinapoil aldeído		357,11	3 isômeros fórmula $C_{16}H_{22}O_9$	
299,07	 Ácido 4-glicobenzóico		375,11	 Ácido logânico	
329,04	 1-O-Vanilloil-glicose		445,14	10 isômeros fórmula $C_{22}H_{22}O_{10}$	
341,10	 Lactulose		447,06	12 isômeros fórmula $C_{21}H_{20}O_{11}$	

### 5.2.3. Imagem química sem uso de matriz (LDI-MSI)

Uma placa de imagem para MALDI-MSI foi preparada com um disco de folha sem aplicação de matriz, para avaliação das imagens obtidas, seguindo as etapas de lavagem, corte e secagem da Figura 29.

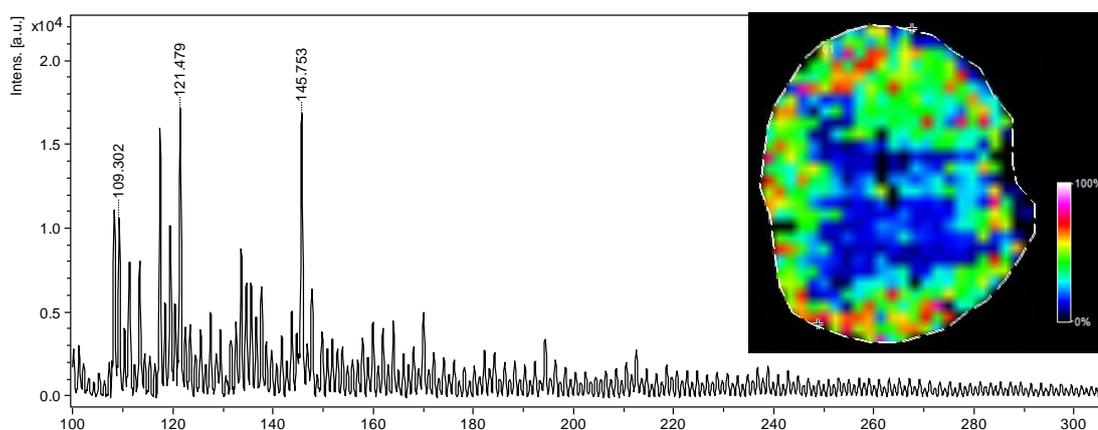
Antes da análise de imagem química, os parâmetros do equipamento foram otimizados para a obtenção de sinais de massas intensos: poder do *laser* 80%; 1000 disparos; frequência 1000 Hz; modo do analisador refletor positivo; ganho do detector 20,0x, faixa de massas *m/z* 100-1000. Utilizando esses parâmetros, foram realizadas análises de imagem química sem

aplicação de matriz, com resolução de imagem de 200  $\mu\text{m}$ . A Figura 32 mostra os discos de folha após fixação na placa MALDI, assim como a imagem química de todos os íons detectados com intensidade relativa mínima de 20%, mostrando que a ionização ocorreu em toda a superfície da folha.



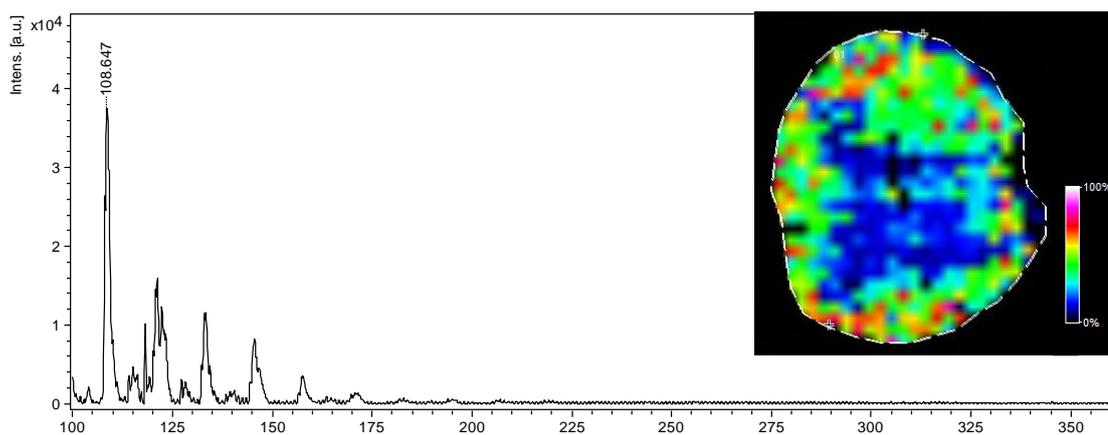
**Figura 32.** Segmento da folha de dendê antes da análise e somatória de todos os íons detectados por imagem química em LDI-MS.

Como não há aplicação de matriz na análise por LDI-MSI, a aquisição de massas pôde ser realizada na faixa de  $m/z$  100-1000. A intensidade dos sinais e a resolução observada foram baixas, porém foram detectados sinais referentes a metabólitos na faixa de interesse na busca de biomarcadores do AF, como o íon  $m/z$  121,52 (Figura 33), atribuído ao fragmento da tiramina ( $m/z$  138,09), que foi apresentado como potencial biomarcador do AF no Capítulo 2.

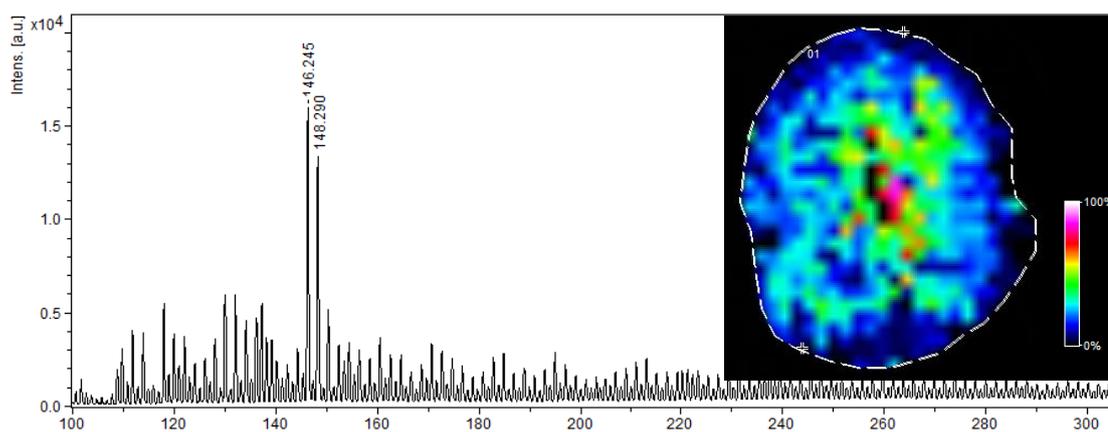


**Figura 33.** Imagem química e espectro de massas por MALDI-MS do íon  $m/z$  121.52, atribuído a um fragmento do íon 138.09 (Tiramina)

Outras massas foram observadas na análise por LDI-MSI, como o íon  $m/z$  108,44 (atribuído aos metabólitos 2-aminofenol, 4-aminofenol e 3-hidróximetilpiridina), representado na Figura 34, e o íon  $m/z$  148,17 (atribuído a butilamina), representado na Figura 35, que foram atribuídos por comparação com banco de dados em metabolômica de *E. guineensis* em desenvolvimento pelo grupo de pesquisa da Embrapa.



**Figura 34.** Imagem química e espectro de massas do íon  $m/z$  108.44, atribuído a 2-aminofenol, 4-aminofenol e 3-hidroxi-n-metilpiridina.



**Figura 35.** Imagem química e espectro de massas do íon  $m/z$  148.17, atribuído a N-butilanilina

### 5.3. Conclusão Parcial

A partir dos dados de imagem química obtidos por MALDI-MSI e LDI-MSI, um protocolo foi estabelecido para detecção e identificação de metabólitos em folhas de dendê. Apesar das limitações no preparo de amostra, as técnicas apresentam grande potencial na localização espacial desses compostos e podem ser utilizadas de forma conjunta, visto que a faixa de massas observada no LDI-MSI foi entre 100-300 Da, enquanto que no MALDI-MSI com o uso da matriz 9-AA a faixa de massas observada foi entre 300-500 Da, abrangendo grande parte da região de massas de interesse na metabolômica. Utilizando o protocolo de análise por imagem química sem aplicação de matriz foi possível detectar o íon  $m/z$  121,52, atribuído no capítulo 2 ao fragmento de um dos possíveis marcadores do Amarelecimento Fatal.

---

## **6. CONCLUSÃO**

Este projeto de mestrado foi dividido em três partes: i) avaliação da estabilidade dos metabólitos de folha quando diferentes métodos de transporte e solvente de extração são utilizados; ii) detecção e identificação de marcadores químicos relacionados a AF; e iii) desenvolvimento de um método de análise de folhas por imagem química, para um *screening* espacial dos biomarcadores identificados, utilizando uma técnica com pouco preparo de amostra.

O protocolo de extração e transporte se mostrou eficiente na análise da impressão digital metabólica de folhas, onde o efeito dos solventes de extração teve maior influência. Os dados foram quimiometricamente tratados com uso do ASCA e os principais íons responsáveis pela diferenciação dos grupos foram descritos e identificados. Foram apresentadas as diferenças nas intensidades de massas de cinco metabólitos em cada tipo de solvente ou modo de transporte empregados. Foi avaliada a estabilidade dos metabólitos quando são aplicados métodos de transporte diferentes do *quenching* tradicional e observou-se, por exemplo, a diminuição na intensidade de íons como o  $m/z$  104,107 ( $C_4H_{13}NO$ ) e  $m/z$  138,057 ( $C_7H_7NO_2$ ) que apresentaram maior intensidade após transporte em gelo e os íons  $m/z$  258,110 ( $C_5H_{21}NPO_6$ ) e  $m/z$  154,086 ( $C_8H_{12}NO_2$ ) que apresentaram maior intensidade após transporte em temperatura ambiente. Assim, a variação na estabilidade dos metabólitos levou a adoção do *quenching* como método padrão de transporte de folhas para análise da impressão digital metabólica.

A comparação de folhas com e sem sintomas de AF avaliada com análises em sistema UHPLC-MS e a análise quimiométrica por PCA demonstrou a presença de cinco possíveis marcadores químicos desta condição em folhas sem sintomas de AF:  $m/z$  121,065 ( $C_8H_8O$ , atribuído a um fragmento da tiramina);  $m/z$  258,109 ( $C_5H_{21}NPO_6$ , atribuído a glicerofosforilcolina, descrito por Lin et al., 2011);  $m/z$  175,119 ( $C_6H_{14}N_4O_2$ , atribuído a arginina);  $m/z$  185,008 ( $C_7H_4O_6$ , atribuído ao ácido quelidônico, descrito por Tahir et al., 2011) e  $m/z$  565,158 ( $C_{26}H_{28}O_{14}$ , atribuído as flavonas escaftosídeo e isoescaftosídeo, descrito por Tahir et al., 2012). Estes possíveis marcadores químicos foram identificados com uso de padrão de

fragmentação e/ou comparação com bancos de dados de metabolômica e relacionados com suas vias metabólicas.

Foi desenvolvido, pela primeira vez, um protocolo de análise química por MALDI-MSI e LDI-MSI para folhas de dendê. Diferentes matrizes ou a análise sem matriz levam a ionizações e conseqüentemente imagens químicas distintas e devem ser avaliadas quando um metabólito específico for investigado. Na análise por MALDI-MSI, foi observada uma otimização nas imagens químicas resultantes quando a matriz 9-AA foi utilizada e aplicada com micropipeta, o que resultou em imagens na faixa de massas entre  $m/z$  300-500.

Foram atribuídas estruturas ou fórmulas moleculares a oito compostos detectados:  $m/z$  207,08 ( $C_{11}H_{12}O_4$ , atribuído ao sinapoil aldeído), o  $m/z$  299,07 ( $C_{13}H_{16}O_8$ , atribuído ao ácido 4-glicobenzóico), o  $m/z$  329,04 ( $C_{14}H_{18}O_9$ , atribuído ao 1-O-vaniloil-glicose), o  $m/z$  341,10 ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ , atribuído a lactulose), o  $m/z$  357,11 (atribuído a três isômeros de fórmula  $C_{16}H_{22}O_9$ ), o  $m/z$  375,11 ( $C_{16}H_{24}O_{10}$ , atribuído ao ácido logânico), o  $m/z$  445,14 (atribuído a dez isômeros de fórmula  $C_{22}H_{22}O_{10}$ ) e o  $m/z$  447,06 (atribuído a doze isômeros de fórmula  $C_{21}H_{20}O_{11}$ ).

Na análise por LDI-MSI, foram observadas massas na faixa  $m/z$  100-300, que no MALDI-MSI corresponde a faixa de massas da matriz. Foram atribuídas estruturas ou fórmulas moleculares a três compostos detectados:  $m/z$  108,44 ( $C_6H_7NO$ , atribuído ao 2-aminofenol, 4-aminofenol e 3-hidróximetilpiridina),  $m/z$  121,52 (atribuído a um fragmento da tiramina) e o  $m/z$  148,17 ( $C_4H_{11}N$ , atribuído a butilamina).

Assim, a impressão digital metabólica e a imagem química, que não haviam sido aplicadas em análises de folhas de *Elaeis guineensis*, foram descritas para determinar a presença de possíveis biomarcadores relacionados ao AF e detectar diversas classes de metabólitos com informações espaciais através de técnicas recentes e avançadas, como o UHPLC-MS/MS e o MALDI-MSI.

---

## **7. PERSPECTIVAS**

Em etapas futuras deste trabalho, que serão desenvolvidas no curso de doutorado, será dada continuidade ao estudo da metabolômica em *Elaeis guineensis*, com foco no tratamento estatístico de dados de espectrometria de massas aplicado a classificação de plantas que tenham sintomas do AF. Para isso, será construído e validado um modelo quimiométrico supervisionado para diferenciação de plantas com e sem AF, utilizando dados de massas obtidos nas folhas e raízes do dendê, que são afetadas por essa condição.

Além do estudo quimiométrico, a bioinformática será utilizada para correlacionar os biomarcadores com as vias metabólicas afetadas, com o uso de bancos de dados em genômica, como a enciclopédia Kyoto de genes e genomas (KEGG). Neste banco de genoma, são encontradas informações sobre diversas vias metabólicas e enzimas previamente identificadas e sequenciadas no *Elaeis guineensis*.

Será mantido o foco no desenvolvimento do protocolo de análise por imagem química em folhas, com objetivo de validar biomarcadores identificados na impressão digital metabólica. Para desenvolver um protocolo de análise de folhas por imagem química em MALDI-MSI, que teve início em 2015, pelo grupo de pesquisa, será otimizada uma metodologia de aplicação de matriz com uso de aparato de sublimação, adquirido pela Embrapa. Em seguida, as matrizes 9-AA e DHB serão utilizadas para detecção de metabólitos em folha de dendê abrangendo a faixa de massas de interesse na análise metabolômica, com foco na investigação dos biomarcadores do AF.

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDELNUR, P. V. A espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C.. Metabolomics applied in bioenergy. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v.1, 1:22, p.1-9, 2014.

ALVES, S. A. O.; DE LEMOS, O. F.; DOS SANTOS FILHO, B. G.; & DA SILVA, A. L. L.. In vitro protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (HBK) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.2, n.3, 2012.

ANNANGUDI, S. P.; MYUNG, K.; AVILA ADAME, C.; BOWLING, A. J.; DASARI, M.; GILBERT, J. R.. Response to Comment on “MALDI-MS Imaging Analysis of Fungicide Residue Distributions on Wheat Leaf Surfaces”. *Environmental science & technology*, v.49, n.17, p.10747-10749, 2015.

BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F.; BERGER, R. D.; HAU, B. Análise temporal do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia Brasileira*, v.23, n.3, p.391-396, 1998.

BERNARDES, M. S.; VEIGA, A S.; RAMOS, E. A doença de raiz amarelecimento fatal do dendezeiro. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Belém, PA. Resumos in *Revista Brasileira de Fitopatologia*, v.25, p. 454, 2000.

Cacho e frutos maduros de dendê após colheita. Disponível em: <[http://www.aplantadavez.com.br/2016/01/dende-africano-elaeis-guineensis-jacq\\_3.html](http://www.aplantadavez.com.br/2016/01/dende-africano-elaeis-guineensis-jacq_3.html)>. A planta da vez. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

CIAL, Plataforma de Metabolômica. Disponível em: <<http://www.cial.uam-csic.es/metabolomics/workflow.html>>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

BOARI, A.J.; TEIXEIRA, W.G.; VENTURIERI, A.1; MARTORANO, L.1; TREMACOLDI, C.R.1; CARVALHO, K.B. Avanços nos estudos sobre o amarelecimento fatal da palma de óleo (*Elaeis guinnensis* Jacq.). In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM, 2012. Anais.

Cech, N. B., & Enke, C. G.. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, v.20, n.6, p.362-387, 2001.

CHONG, K. P.; ROSSALL, S.; ATONG, M.. HPC fingerprints and in vitro antimicrobial activity of syringic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid against *Ganoderma boninense*. *Journal of Applied Sciences*, v.11, n.13, p.2284-2291, 2011.

Cultivo de *Elaeis guineensis*. Disponível em: <<https://br.fotolia.com/tag/dendezeiro>>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

DE FRANQUEVILLE, H. Oil palm bud rot in Latin America. *Experimental Agriculture*, v.39, n.03, p.225-240, 2003.

DEKKER, T. J.; JONES, E. A.; CORVER, W. E.; VAN ZEIJL, R. J.; DEELDER, A. M.; TOLLENAAR, R. A.; MCDONNELL, L. A.. Towards imaging metabolic pathways in tissues. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.407, n.8, p.2167-2176, 2015.

DRANSFIELD, J.; UHL, N.; ASMUSSEN, C.; BAKER, W.; HARLEY, M.; LEWIS, C.. A New Phylogenetic Classification of the Palm Family, *Arecaceae*. *Kew Bulletin*, v.60 n.4, p.559-569, 2005.

EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. DENDÊ: produtos, mercado e potencialidade. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007. 1 folder.

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNCIO, R. Z.; LOPES, N. P.. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural product reports*, v.31, n.6, p.784-806, 2014.

Esquema geral de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz. Disponível em: <<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/maldi>>. Acesso em 26 de janeiro de 2017.

FAUZI, N. M.; SARMIDI, M. R.; CHUA, L. S.. Metabolites profiling of heat treated whole palm oil extract. *Journal of Applied Sciences*, v.11, n.13, p.2376-2381, 2011.

FIEHN, O.. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*, v.2, n.3, p.155-168, 2001.

FIEHN, O., KOPKA, J., TRETHERWEY, R. N., WILLMITZER, L.. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v.72, n.15, p.3573-3580, 2000.

FIEHN, O.. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, v.48, n.1-2, p.155-171, 2002.

GIAVALISCO, P.; LI, Y.; MATTHES, A.; ECKHARDT, A.; HUBBERTEN, H. M.; HESSE, H.; WILLMITZER, L.. Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N and <sup>34</sup>S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *The Plant Journal*, v.68, n.2, p.364-376, 2011.

HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GOMA, G.; FRANCOIS, J.. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra-

and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v.164, n.1, p.195-200, 1998.

HÖLSCHER, D.; SHROFF, R.; KNOP, K.; GOTTSCHALDT, M.; CRECELIUS, A.; SCHNEIDER, B.; SVATOŠ, A.. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: Distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *The Plant Journal*, v.60, n.5, p.907-918, 2009.

JAEGER, R. J.; LAMSHÖFT, M.; GOTTFRIED, S.; SPITELLER, M.; SPITELLER, P.. HR-MALDI-MS imaging assisted screening of  $\beta$ -carboline alkaloids discovered from *Mycena metata*. *Journal of natural products*, v.76, n.2, p.127-134, 2013.

JORGE, T. F.; RODRIGUES, J. A.; CALDANA, C.; SCHMIDT, R.; VAN DONGEN, J. T.; THOMAS-OATES, J.; António, C.. Mass spectrometry-based plant metabolomics: metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrom.* v. 35, n. 5, p. 620-649, 2015.

KHATIB-SHAHIDI, S.; ANDERSSON, M.; HERMAN, J. L.; GILLESPIE, T. A.; CAPRIOLI, R. M.. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v.78, n.18, p.6448-6456, 2006.

KINGE, T. R.; MIH, A. M.. Secondary metabolites of oil palm isolates of *Ganoderma zonatum* Murill. from Cameroon and their cytotoxicity against five human tumour cell lines. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n.42, p.8440-8447, 2013.

KINTER, M.; SHERMAN, N. E.. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry v.9. John Wiley & Sons, 2005.

KORTE, A. R.; SONG, Z.; NIKOLAU, B. J.; LEE, Y. J.. Mass spectrometric imaging as a high-spatial resolution tool for functional genomics: tissue-specific gene expression of TT7 inferred from heterogeneous distribution of metabolites in *Arabidopsis* flowers. *Analytical Methods*, v.4, n.2, p.474-481, 2012.

LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; SONG, Z.; YEUNG, E. S.; NIKOLAU, B. J.. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *The Plant Journal*, v.70, n.1, p.81-95, 2012.

LEMANSKA, A.; GROOTVELD, M.; SILWOOD, C. J.; BRERETON, R. G.. Chemometric variance analysis of <sup>1</sup>H NMR metabolomics data on the effects of oral rinse on saliva. *Metabolomics*, v.8, n.1, p.64-80, 2012.

LIN, L.; HUANG, Z.; GAO, Y.; YAN, X.; XING, J.; HANG, W.. LC-MS based serum metabolomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *Journal of proteome research*, v.10, n.3, p.1396-1405, 2011.

MCDONNELL, L. A.; HEEREN, R.. "Imaging mass spectrometry." *Mass spectrometry reviews* v.26, n.4, p.606-643, 2007.

MOZZON, M.; PACETTI, D.; LUCCI, P.; BALZANO, M.; FREGA, N. G.. Crude palm oil from interspecific hybrid *Elaeis oleiferax* *Elaeis guineensis*: Fatty acid regiodistribution and molecular species of glycerides. *Food chemistry*, v.141, n.1, p.245-252, 2013.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell*, v.13, n.1, p.11-29, 2001.

RODRIGUES, M.; AMBLARD, P.; BARCELOS, E.; de MACEDO, J. L. V.; da CUNHA, R. N. V., TAVARES, A.. Avaliação do estado nutricional do dendezeiro: análise foliar (reformulada). Embrapa Amazônia Ocidental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007.

ROGACHEV, I., AHARONI, A.. UPLC-MS-based metabolite analysis in tomato. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols*, v. 860, p.129-144, 2012.

RUIJTER, G. J. G.; VISSER, J.. Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods* v.25, n.3, p.295-302, 1996.

SCHAEFER, U.; BOOS, W.; TAKORS, R.; WEUSTER-BOTZ, D.. Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Analytical biochemistry*, v.270, n.1, p.88-96, 1999.

Schripsema, J.. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*, v.21, n.1, p.14-21, 2010.

SHROFF, R.; VERGARA, F.; MUCK, A.; SVATOŠ, A.; GERSHENZON, J.. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.16, p.6196-6201, 2008.

SMILDE, A. K.; JANSEN, J. J.; HOEFSLOOT, H. C.; LAMERS, R. J. A.; VAN DER GREEF, J.; TIMMERMAN, M. E.. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics*, v.21, n.13, p.3043-3048, 2005.

SMITS, H. P.; COHEN, A.; BUTTLER, T.; NIELSEN, J.; OLSSON, L.. Cleanup and analysis of sugar phosphates in biological extracts by using solid-phase extraction and anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical biochemistry*, v.261, n.1, p.36-42, 1998.

TAHIR, N. I.; SHAARI, K.; ABAS, F.; PARVEEZ, G. K. A.; ISHAK, Z.; RAMLI, U. S.. Characterization of Apigenin and Luteolin Derivatives from Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Leaf Using LC-ESI-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.60, n.45, p.11201-11210, 2012.

TAHIR, N. I.; SHAARI, K.; ABAS, F.; PARVEEZ, G. K. A.; HASHIM, T.; RAMLI, U. S.. Identification of oil palm (*Elaeis guineensis*) spear leaf metabolites using mass spectrometry and neutral loss analysis. Journal of Oil Palm Research, v.25, n.1, p.72-83, 2013.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T.. Chemometrics in metabonomics. Journal of proteome research, v.6, n.2, p.469-479, 2007.

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Disponível em <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1490>>. Acesso em 5 de janeiro de 2017.

VILLAS-BÔAS, S.G.; HØJER-PEDERSEN, J.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD J.; NIELSEN J.: Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. Yeast, v.22, n.14, p.1155-1169, 2005.

WOLFENDER, J. L.; RUDAZ, S.; HAE CHOI, Y.; KYONG KIM, H.. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. Current Medicinal Chemistry, v.20, n.8, p.1056-1090, 2013.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B.. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. The Journal of Physical Chemistry, v.88, n.20, p.4451-4459, 1984.

YOSHIMURA, Y.; ENOMOTO, H.; MORIYAMA, T.; KAWAMURA, Y.; SETOU, M., ZAIMA, N.. Visualization of anthocyanin species in rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry, v.403, n.7, p.1885-1895, 2012.

ZAIMA, N.; GOTO-INOUE, N.; HAYASAKA, T.; SETOU, M.. Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v.24, n.18, p.2723-2729, 2010.