

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Julia Raquel Lino e Freitas

Aplicação da técnica DESI-MSI em metabolômica vegetal: estudos de fisiologia e farmacognosia e detecção de transgenia

Belo Horizonte

2018

UFMG / ICE / DQ.1282^a

T. 580^a

Julia Raquel Lino e Freitas

Aplicação da técnica DESI-MSI em metabolômica vegetal: estudos de fisiologia e farmacognosia e detecção de transgenia

Tese apresentada ao Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Doutor em Ciências-Química.

Belo Horizonte

2018

F862a Freitas, Julia Raquel Lino e
2018 Aplicação da técnica DESI-MSI em metabolômica
T vegetal [manuscrito] : estudos de fisiologia e
farmacognosia e detecção de transgenia / Julia Raquel
Lino e Freitas. 2018.
[xvi], 105 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.
Coorientador: Júlio Onésio Ferreira Melo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Espectrometria de
massa - Teses 3. Flavonoides - Teses 4. Menta (Planta)
- Teses 5. Soja - Teses 6. Milho - Teses 7. Alimentos
geneticamente modificados - Teses I. Augusti, Rodinei,
Orientador II. Melo, Júlio Onésio Ferreira,
Coorientador III. Título.

CDU 043



"Aplicação da Técnica DESI-MSI em Metabolômica Vegetal: Estudos de Fisiologia e Farmacognosia e Detecção de Transgenia"

Julia Raquel Lino e Freitas

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Júlio Onésio Ferreira Melo - Coorientador
UFSJ

Prof. Lucilia Kato
UFG

Prof. Amauri Geraldo de Souza
UFSJ

Prof. Marcel Giovanni Costa França
UFMG

Prof. Leticia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2018.
UFMG

Dedico este trabalho aos meus amados
pais, Joaquim e Gilva.

AGRADECIMENTOS

Me tornar uma doutora é um sonho realizado, mas só foi possível porque tive ajuda de muitas pessoas. E neste momento gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização desse sonho.

Em primeiro lugar a Deus por conceder-me sabedoria e persistência e ter permitido mais esta conquista na minha vida acadêmica.

A minha família, meus pais, Joaquim e Gilva, minha irmã Maria Rita e ao meu cunhado Marcelo Martins, por todo apoio, compreensão e por sempre estar presente, mesmo estando longe.

Ao Daniel pelo amor, carinho, paciência e todo apoio que me deu nesses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodinei Augusti, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ter compartilhado o conhecimento e experiência que foi muito além da vida acadêmica.

Ao meu co-orientador Prof Dr. Júlio Onésio que esteve presente desde o início do doutorado, me ensinando e sempre me dando todo o apoio necessário.

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin por ter aberto as portas do seu laboratório e possibilitado a realização deste trabalho. Agradeço a todos os alunos do inesquecível Laboratório ThoMSon, em especial ao Pedro Vendramini, que não foi somente um colaborador, mas se tornou um grande amigo! Sua contribuição foi louvável, sempre serei grata.

Ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz que disponibilizou seu laboratório para a realização desta pesquisa e pelos ensinamentos. Ao LaCEM, em especial à Géssica e a Thays. A Thays, que me ensinou muito e teve participação fundamental no trabalho, posso falar que é uma grande amiga e companheira de “férias”.

Ao Laboratório de Estudos da dor (LED) e ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada por permitir utilizar o laboratório e realizar os cortes de grãos no criostato.

Agradeço a EMBRAPA Arroz e Feijão e ao CTPA por ter fornecido as amostras de soja e todo apoio técnico. Ao meu primo Bruno Victor pelas consultorias técnicas de agronomia.

Ao Laboratório 167, em especial à Susana, Alberto, Lucas, Binatti, Igor, Janaína, vocês são amigos inesquecíveis. Aos vizinhos de laboratório que fizeram parte dessa história, Rosi, Victória, Hebert e Keila.

A todos que de alguma forma me ajudaram.

Muito obrigada!

Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas
as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.

Romanos 11:36

RESUMO

A técnica de ionização ambiente conhecida por DESI (*Desorption Electrospray Ionization*) tem sido utilizada em espectrometria de massas por permitir a análise de amostras em seu estado natural, sem a necessidade de se utilizar métodos de preparo laboriosos. Ao ser acoplada a uma plataforma móvel, imagens químicas de uma amostra podem ser obtidas, numa metodologia conhecida como DESI-MSI (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

Neste trabalho, foram obtidas imagens químicas de 13 metabólitos de transporte e armazenamento (carboidratos, aminoácidos e ureídeos) em folhas de hortelã (*Mentha × piperita* L.) de diferentes idades de maturação (jovem, intermediária e madura), fazendo-se uma comparação da distribuição espacial destes metabólitos em cada um dos tipos de folha analisados. Além disso, foi possível avaliar a distribuição de 21 dentre os principais flavonoides nas folhas maduras desta espécie utilizando a técnica DESI-MSI e a DI-ESI-MS (*Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry*).

A técnica DESI-MSI foi também utilizada para se detectar diferenças metabólicas entre plantas transgênicas e convencionais. Para tanto, foram obtidas imagens químicas de folhas e grãos de soja transgênica e convencional. Foram selecionados 7 metabólitos diagnósticos para a diferenciação entre tais tipos de amostra. Em um estudo análogo, observou-se diferenças marcantes entre as imagens químicas de 12 metabólitos observados em grãos de milho transgênicos e convencionais. Numa investigação paralela, fez-se uso da técnica DI-ESI-MS para se avaliar as alterações metabólicas que ocorrem, em função do tempo, em folhas de soja transgênica e convencional submetidas ao herbicida glifosato. Neste estudo avaliou-se, principalmente, o ácido chiquímico e mais 12 metabólitos que apresentaram comportamento distinto nas amostras transgênica e convencional.

Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, no qual informações relevantes foram obtidas a partir dos dados oriundos, principalmente, das análises por DESI-MSI e, em menor escala, por DI-ESI-MS. Trata-se de um trabalho multidisciplinar que abre um leque de possibilidades imensas para a aplicação destas técnicas em outros estudos de metabolômica vegetal.

Palavras-chaves: DESI-MSI, DI-ESI-MS, espectrometria de massas, transgênicos, flavonoides, *Mentha x piperita*, soja, milho.

ABSTRACT

The ambient ionization technique known as DESI (Desorption Electrospray Ionization) has been used in mass spectrometry to allow the analysis of samples in their natural environment with no need of using laborious sample pre-treatment procedures. When coupled to a mobile platform, chemical images of a sample can be obtained in a methodology known as DESI-MSI (Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging).

In this work, chemical images of 13 metabolites of transport and storage (carbohydrates, amino acids and ureides) were obtained in leaves of peppermint (*Mentha × piperita* L.) of different maturation stages (young, intermediate and mature), making a comparison among the spatial distribution of these metabolites in these leaf types. It was also possible to evaluate the spatial distribution of 21 among the major flavonoids in mature leaves of this species using DESI-MSI and DI-ESI-MS (Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry).

The DESI-MSI technique was also used to detect metabolic differences between transgenic and conventional plants. For this, chemical images of leaves and grains of transgenic and conventional soybean were obtained. Seven (7) diagnostic metabolites were selected for the differentiation between these types of samples. In an analogous study, remarkable differences between the chemical images of 12 metabolites observed in transgenic and conventional corn grains were noticed. In a parallel investigation, DI-ESI-MS was used to evaluate the metabolic changes that occur, as a function of time, in transgenic and conventional soybean leaves submitted to the glyphosate herbicide. In this study, it was selected shikimic acid (mainly) and 12 other metabolites that presented different behavior in the transgenic and conventional samples.

The results presented in this work are unprecedented, in which relevant information was achieved, mainly, from the DESI-MSI and, to a lesser extent, DI-ESI-MS analysis. It is a multidisciplinary work that opens a range of immense possibilities for the application of these techniques in other studies of vegetal metabolomics.

Keywords: DESI-MSI, mass spectrometry, transgenic organisms, flavonoids, *Mentha x piperita*, soybean, corn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 3.1 Número de publicações em MS apresentado na forma de áreas de pesquisa.	5
FIGURA 3.2 Principais componentes do espectrômetro de massas.	6
FIGURA 3.3 Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização DESI-MS.	7
FIGURA 3.4 Número de publicações sobre a técnica DESI-MSI a partir de 2008.	8
FIGURA 3.5 Esquema ilustrativo de como se obter uma imagem por espectrometria de massas.	9
FIGURA 4.1 Núcleo fundamental da estrutura química dos flavonoides.	15
FIGURA 4.2 Esquema do preparo de amostra das folhas de hortelã para análise por DESI-MSI.	19
FIGURA 4.3 Espectrômetro de massas (modelo Q Exactive) acoplado a uma plataforma móvel DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201).	19
FIGURA 4.4 Exemplo de um espectro de massas no modo negativo obtido via DESI-MSI do imprint da folha de hortelã. Para uma melhor visualização, os íons de interesse (flavonoides desprotonados) estão multiplicados por fatores variando de 10 a 400.	21
FIGURA 4.5 Imagens ópticas da folha de hortelã (a) e do imprint resultante (b). Distribuição espacial do flavonoide crisoeriol pela folha de hortelã (c).	24
FIGURA 4.6 Produção da flavanona naringenina através da via fenilpropanoide.	25
FIGURA 4.7 Rota metabólica da naringenina.	25
FIGURA 4.8 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da naringenina.	26
FIGURA 4.9 Rota metabólica da luteolina.	27
FIGURA 4.10 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da luteolina.	28
FIGURA 4.11 Rota metabólica da apigenina.	30
FIGURA 4.12 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da apigenina.	31
FIGURA 4.13 Comparação das intensidades absolutas dos flavonoides obtidas pelas técnicas DESI-MSI multiplicado por um fator de 15 vezes e DI-ESI-MS.	34
FIGURA 5.1 Representação esquemática da relação fonte-dreno em plantas e o transporte de aminoácidos e carboidratos através dos vasos condutores.	41

FIGURA 5.2	Imagens químicas dos aminoácidos e ureídeo livres detectados nas folhas da <i>M. piperita</i> em três estádios de crescimento (jovem, em expansão e adulta): (a) fenilalanina - phe, (b) leucina - leu, (c) histidina -his, (d) aspartato - asp, (e) asparagina - asn, (f) tirosina - tyr, (g) glutamina - glu, (h) ácido alantóico - all.	48
FIGURA 5.3	Imagens químicas dos carboidratos solúveis detectados nas folhas da <i>Mentha x piperita</i> L. em três estádios de maturação jovem, em expansão e madura: (a) hexoses - hex, (b) sacarose - sac, (c) manitol/sorbitol- man.	50
FIGURA 5.4	Imagem química ampliada para a sacarose na folha de hortelã madura. O círculo branco mostra a nervura principal onde a sacarose está concentrada.....	51
FIGURA 5.5	Imagem química ampliada para o manitol/ sorbitol na folha de hortelã madura. Os pontos vermelhos indicam claramente as áreas das nervuras principal e laterais.....	51
FIGURA 6.1	Via do ácido chiquímico e ação da enzima EPSPS sintetase.....	57
FIGURA 6.2	Espectro de massas do extrato metanólico das folhas de soja obtidos no modo de ionização positivo: (a) transgênica e (b) convencional.	64
FIGURA 6.3	Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja.	65
FIGURA 6.4	Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja.	66
FIGURA 6.5	Imagens ópticas das folhas de soja transgênica e convencional (a) e do imprint resultante (b). Distribuição espacial do metabólito trigonelina pelas folhas de soja (c).	69
FIGURA 6.6	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nas folhas de soja transgênica e convencional. a- c: apresentam a trigonelina igualmente presente nas duas plantas; d-g: apresenta metabólitos mais intensos nas folhas convencional; h- k: apresenta metabólitos mais intensos nas folhas transgênica.	69
FIGURA 6.7	Preparo dos grãos de soja para as análises por DESI-MSI.....	73
FIGURA 6.8	Espectro de massas do extrato metanólico dos grãos de soja obtidos no modo de ionização positivo: (a) transgênico e (b) convencional.	75
FIGURA 6.9	Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos dos grãos de soja.	76
FIGURA 6.10	Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos dos grãos de soja.	77
FIGURA 6.11	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nos grãos de soja transgênico e convencional.	79

FIGURA 6.12 Plantas de soja transgênica e convencional com 0, 24, 48, 72, 96 h após a exposição ao glifosato.	82
FIGURA 6.13 Espectros de massas do extrato metanólico das folhas de soja transgênica, antes e após exposição ao herbicida glifosato. Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização positivo.	83
FIGURA 6.14 Espectros de massas do extrato metanólico das folhas de soja convencional, antes e após exposição ao herbicida glifosato. Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização positivo.	83
FIGURA 6.15 Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 dos extratos metanólicos das folhas de soja transgênica e convencional, antes e após a aplicação do glifosato. Símbolos em azul se referem à soja convencional (C) e aqueles em vermelho se referem à soja transgênica (T). Também são indicados os tempos de exposição ao glifosato: ◆ branco (0), ▲ após 24 h (24), * após 48 h (48), ● após 72 h (72) e ■ após 96 h (96).	84
FIGURA 6.16 Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja submetidas ao herbicida glifosato por diferentes tempos.	85
FIGURA 7.1 Preparo dos grãos de milho para as análises por DESI-MSI.	96
FIGURA 7.2 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos metabólitos selecionados nos grãos de milho transgênicos e convencionais.	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 Flavonoides detectados no imprint da folha de hortelã a partir de uma análise por DESI-MSI no modo negativo.....	23
TABELA 5.1 Fórmula molecular e provável identificação dos íons detectados no imprint das folhas de hortelã.....	45
TABELA 6.1 Metabólitos que possuem maior influência na separação entre as amostras de soja transgênica e convencional.....	67
TABELA 6.2 Principais metabólitos detectados no <i>imprint</i> das folhas de soja transgênica e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.....	68
TABELA 6.3 Principais metabólitos detectados nos grãos de soja transgênico e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.....	78
TABELA 6.4 Metabólitos que sofrem as maiores alterações após a aplicação do glifosato nas folhas de soja convencionais.....	86
TABELA 7.1 Principais metabólitos detectados nos grãos de milho transgênico e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo negativo.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
DESI-MS	<i>Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> (possível tradução para o português: Dessorção Induzida por Ionização Electrospray Acoplada à Espectrometria de Massas)
DESI-MSI	<i>Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging</i> (possível tradução para o português: Imageamento por Dessorção Induzida por Ionização <i>Electrospray</i> Acoplada à Espectrometria de Massas)
DI-ESI-MS	<i>Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> (possível tradução para o português: Infusão Direta com Ionização <i>Electrospray</i> Acoplada à Espectrometria de Massas)
PTFE	Politetrafluoretileno
HCD	<i>High Energy Collision Dissociation</i> (Dissociação Induzida por Colisão à Alta Energia)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por <i>Electrospray</i>)
ppm	Parte por milhão
m/z	Razão massa-carga
OGM	Organismos geneticamente modificados
RR	<i>Roundup Ready</i>
EPSPS	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
Referências Bibliográficas	3
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO 3 – ASPECTOS GERAIS.....	5
3.1 Espectrometria de Massas (MS)	5
3.2 Obtenção de imagens químicas por Espectrometria de Massas	8
3.3 Metabolômica	10
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO 4 – Farmacognosia: distribuição espacial de flavonoides em folhas de hortelã	15
4.1 Introdução	15
4.2 Objetivos.....	17
4.2.1 Objetivo geral	17
4.2.2 Objetivos específicos	17
4.3 Materiais e Métodos	18
4.3.1 Materiais	18
4.3.2 Preparo de amostra (imprint)	18
4.3.3 DESI-MSI.....	19
4.3.4 Infusão direta: análise por DI-ESI-MS	20
4.4 Resultados e Discussão	21
4.4.1 Identificação de flavonoides	21
4.4.2 Imagens químicas por DESI-MSI.....	23
4.4.3 Rota da naringenina	25
4.4.4 Rota da luteolina	27

4.4.5 Rota da apigenina	29
4.4.6 DESI-MSI versus DI-ESI-MS	32
4.5 Conclusão	35
Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO 5 – Fisiologia Vegetal: Relação fonte-dreno no transporte de aminoácidos e carboidratos em folhas de hortelã.....	40
5.1 Introdução	40
5.2 Objetivos.....	43
5.2.1 Objetivo geral	43
5.2.2 Objetivos específicos	43
5.3 Materiais e Métodos	44
5.4 Resultados e Discussão.....	45
5.4.1 Transporte de nitrogênio.....	46
5.4.2 Transporte de carboidratos	49
5.5 Conclusão	52
Referências Bibliográficas	53
CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DE TRANSGÊNICIA: GRÃOS E FOLHAS DE SOJA.....	55
6.1 Introdução	55
6.2 Objetivos.....	59
6.2.1 Objetivo geral	59
6.2.2 Objetivos específicos	59
6.3 Divisão do estudo	60
6.4 Avaliação das diferenças metabólicas das folhas de soja transgênica e convencional empregando a técnica DESI-MSI.....	61
6.4.1 Materiais e Métodos	61
6.4.2 Resultados e Discussão.....	63
6.5 Avaliação das diferenças metabólicas de grãos de soja transgênico e convencional empregando a técnica DESI-MSI e DI-ESI-MS.....	72

6.5.1 Materiais e Métodos	72
6.5.2 Resultados e Discussão.....	74
6.6 Análise do perfil metabolômico das folhas de soja transgênica e convencional sob a exposição ao herbicida glifosato em função do tempo	81
6.6.1 Materiais e Métodos	81
6.6.2 Resultados e Discussão.....	82
6.7 Conclusão	88
Referências Bibliográficas.....	89
CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA TRANSGENIA: GRÃOS DE MILHO.....	92
7.1 Introdução	92
7.2 Objetivos.....	94
7.2.1 Objetivo geral	94
7.2.2 Objetivos específicos	94
7.3 Materiais e Métodos	95
7.3.1 Materiais	95
7.3.2 Preparo de amostra	95
7.3.3 Análise por DESI-MSI	96
7.4 Resultados e Discussão.....	96
7.5 Conclusão	101
Referências Bibliográficas.....	102
CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	104

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A espectrometria de massas (MS, do termo em inglês *mass spectrometry*) é uma técnica relativamente antiga que teve início em 1897, com os experimentos conduzidos por J. J. Thomson. Desde seu surgimento até os dias atuais a MS vem se aperfeiçoando com o desenvolvimento de novas fontes de ionização e analisadores de massas. Conseqüentemente, deixou de ser uma técnica utilizada exclusivamente na área de química para ser aplicada em várias áreas da ciência ^[1].

Uma das grandes evoluções na MS foi o desenvolvimento de técnicas de ionização ambiente, especialmente a DESI (*Desorption Electrospray Ionization*), desenvolvida em 2004 pelo Professor Graham Cooks da Universidade de Purdue (*Purdue University*), Estados Unidos. Desde sua primeira demonstração, a técnica se propunha a criar imagens químicas por espectrometria de massas (MSI, do termo em inglês *Mass Spectrometry Imaging*) e aplicá-las na identificação e distribuição espacial de metabólitos em plantas ^[1, 2].

Metabólito é o substrato obtido após uma reação química nas células dos organismos vivos. Os metabólitos são considerados essenciais à vida por exercerem diversas funções no organismo, tais como crescimento, desenvolvimento, reprodução, características fenotípicas, proteção, dentre outras. A ciência que estuda o conjunto de metabólitos é denominada metabolômica ^[3, 4].

O estudo da metabolômica vegetal é imprescindível, haja vista sua implicação nos ecossistemas, sua complexidade e potencialidade farmacológica, nutricional, agrônômica e econômica. A análise do perfil metabolômico das plantas contribui para uma melhor interpretação e entendimento do sistema biológico global, base para realizar qualquer tipo de melhoramento genético ou mudança genética ^[4].

A aplicação de DESI-MSI em metabolômica vegetal vem se desenvolvendo lentamente e possui um futuro promissor. A grande capacidade de expansão nessa área é devido ao pouco conhecimento que se tem sobre a distribuição dos metabólitos na superfície de vários tecidos das plantas e o quanto esse conhecimento pode ser explorado. A localização exata de metabólitos na planta poderá ajudar em investigações científicas nas áreas de modificação gênica, farmacognosia e identificação de princípios ativos. Poderá, também, ser utilizado pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia para a extração de metabólitos nos tecidos nos quais são encontrados ^[5, 6].

Este trabalho visa, portanto, expandir a aplicação da técnica DESI-MSI para as áreas de biologia, farmácia e agronomia com estudos aplicáveis em botânica, fisiologia vegetal, farmacognosia e genômica. Além disso, o conhecimento da distribuição espacial de metabólitos presentes nas plantas permitirá uma correlação com os mecanismos bioquímicos que levam a sua formação. Para exemplificar estas possibilidades, neste trabalho serão avaliados os metabólitos de transporte e armazenamento em folhas de diferentes idades de maturação da planta medicinal popularmente conhecida como hortelã (*Mentha × piperita* L.), bem como a distribuição espacial de seus principais flavonoides. Além disso, procurar-se-á avaliar a diferença metabólica decorrente da inserção de genes em vegetais geneticamente modificados, mapeando-se diversos metabólitos nas folhas e grãos de soja e grãos de milho transgênicos e convencionais.

Referências Bibliográficas

1. Hoffman, E.d.; V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3° ed. 2007, England: John Wiley & Sons Ltd. 489.
2. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. *Science*, 2004. **306** (5695): p. 471-3.
3. Tata, A., et al., *Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2015. **26** (4): p. 641-8.
4. Simões, C.M.O., *Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento*. 2017.
5. Heyman, H.M.; I.A. Dubery, *The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review*. *Phytochem. Rev.*, 2015. **15** (2): p. 297-316.
6. Boughton, B.A., et al., *Mass spectrometry imaging for plant biology: a review*. *Phytochem Rev*, 2016. **15**: p. 445-488.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aplicar a técnica DESI-MSI em estudos de metabolômica vegetal nas amostras de folha de hortelã e soja e em grãos de soja e milho.

2.2 Objetivos Específicos

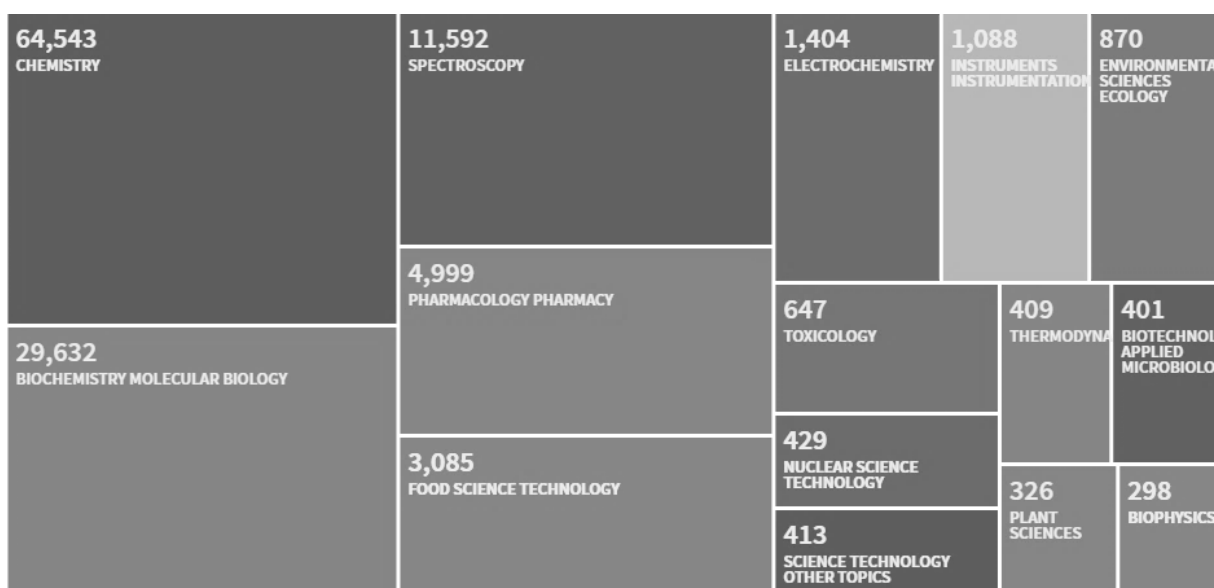
- Avaliar a relação fisiológica fonte-dreno em folhas de hortelã;
- Avaliar a distribuição espacial de flavonoides presentes em folhas de hortelã;
- Diferenciar os aspectos transgênicos, por meio da distribuição espacial de metabólitos, em folhas e grãos de soja;
- Estudar o comportamento dos metabólitos da folha de soja convencional e transgênica após a aplicação do herbicida glifosato utilizando a técnica *Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (DI-ESI-MS);
- Diferenciar os aspectos transgênicos, por meio da distribuição espacial de metabólitos, em grãos de milho.

CAPÍTULO 3 – ASPECTOS GERAIS

3.1 Espectrometria de Massas (MS)

A MS é uma técnica analítica aplicada na identificação de moléculas orgânicas. Possui vantagens significativas em relação às outras técnicas analíticas, como rapidez de análise, alta sensibilidade e exatidão, baixos limites de detecção, além de poder ser aplicada em diversas matrizes e em diferentes áreas da ciência ^[1,2]. A MS não fica restrita apenas à química analítica, podendo, também, ser utilizada em estudos de cinética de reações, química inorgânica e físico-química ^[3]. Atualmente, essa técnica é utilizada na interface entre diversas áreas de pesquisa, tais como bioquímica (proteômica, metabolômica), farmácia, nutrição, medicina, dentre outras, como mostrado na FIGURA 3.1. Esta figura foi construída após uma pesquisa sobre o número de publicações dos últimos dez anos relacionados ao tópico “*mass spectrometry*” e agrupada em áreas no banco de dados *Web of Science* ^[4]. Outras aplicações analíticas que utilizam a MS envolvem controle de poluição e qualidade de alimentos, ciências forenses, produtos naturais ou processos de monitoramento.

FIGURA 3.1 Número de publicações em MS apresentado na forma de áreas de pesquisa.



Fonte: *Web of Science* ^[4].

Um espectrômetro de massas analisa a massa de moléculas capazes de ionizar em uma fonte de ionização. Em seguida, as razões massa-carga (m/z) dos íons são determinadas. O espectrômetro de massas possui cinco componentes principais: (1) unidade de inserção de amostra; (2) fonte de ionização, onde as moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa; os íons são acelerados por um campo eletromagnético e alcançam o (3) analisador de massas, onde há separação dos íons de acordo com as respectivas m/z ; os íons são contados no (4) detector e o (5) sistema de dados registra o sinal ^[3], como apresentado na FIGURA 3.2.

FIGURA 3.2 Principais componentes do espectrômetro de massas.



A partir de 1995 a MS progrediu rapidamente e ainda hoje o progresso e as inovações continuam. Novos instrumentos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar as respostas instrumentais, sendo que as principais modificações ocorrem na fonte de ionização e no analisador de massas ^[3].

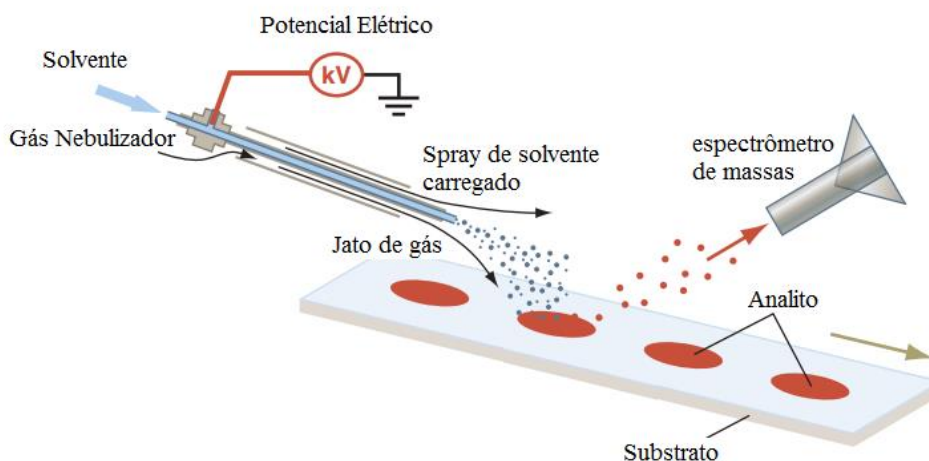
As fontes de ionização sofreram grandes avanços com o aparecimento das técnicas de ionização à pressão atmosférica. Com estas fontes foi possível gerar íons à pressão atmosférica, aumentando a gama de matrizes que poderiam ser analisadas. A partir dessas fontes, em especial ionização por *Electrospray* (ESI), foram desenvolvidas as técnicas de ionização ambiente, como a DESI, em 2004, por Cooks e colaboradores ^[1, 5].

Na técnica DESI, a ionização ocorre sob pressão atmosférica diretamente sobre as amostras no seu estado natural. O preparo de amostra é mínimo, quando necessário é realizado, por exemplo, a transferência dos analitos para uma superfície plana (imprint), congelamento/corte da amostra ^[6, 7]. Esta técnica eliminou um dos principais problemas em MS, pois permitiu transferir o analito na forma ionizada diretamente da amostra para o ambiente de vácuo do espectrômetro de massas ^[5].

Na técnica DESI, um *spray* de gotículas carregadas atinge a amostra, promovendo a dessorção dos analitos da superfície e a ionização dos mesmos por transferência de carga. Com um fluxo de *spray* contínuo, os analitos são dessorvidos da superfície e ionizados,

paralelamente, o fluxo do spray direciona os íons até a entrada do espectrômetro de massas [1, 3, 5, 6, 8, 9]. Na FIGURA 3.3 é mostrada um esquema de funcionamento da técnica.

FIGURA 3.3 Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização DESI-MS.



Fonte: Adaptado de Cooks, 2006 [5].

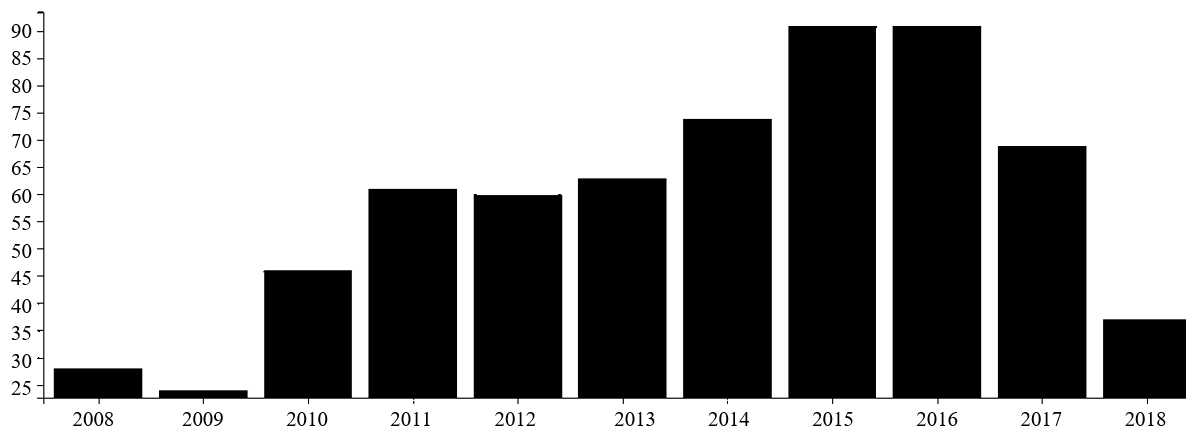
A técnica DESI é aplicável a amostras sólidas, incluindo materiais biológicos complexos, mas pode também ser aplicada a líquidos, soluções congeladas e gases adsorvidos. Conseqüentemente, uma gama de analitos pode ser analisada, tais como moléculas de baixa e alta massa molar, com baixa energia de dessorção (voláteis e semi-voláteis) e de diferentes polaridades. Esse tipo de ionização é considerado brando, pois os íons formados possuem baixo conteúdo de energia interna e sofrem pouca fragmentação. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e rapidez [1, 3, 5, 9].

Nos últimos anos, o uso da técnica DESI tem aumentado devido à possibilidade de acoplar a fonte de ionização a uma plataforma móvel, resultando em uma nova aplicação para a MS: a obtenção de imagens. O gráfico apresentado na FIGURA 3.4 mostra o número de publicações, em função do ano, envolvendo a técnica DESI-MSI [4].

FIGURA 3.4 Número de publicações sobre a técnica DESI-MSI a partir de 2008.

Total de publicações

644



Fonte: *Web of Science* ^[4].

3.2 Obtenção de imagens químicas por Espectrometria de Massas

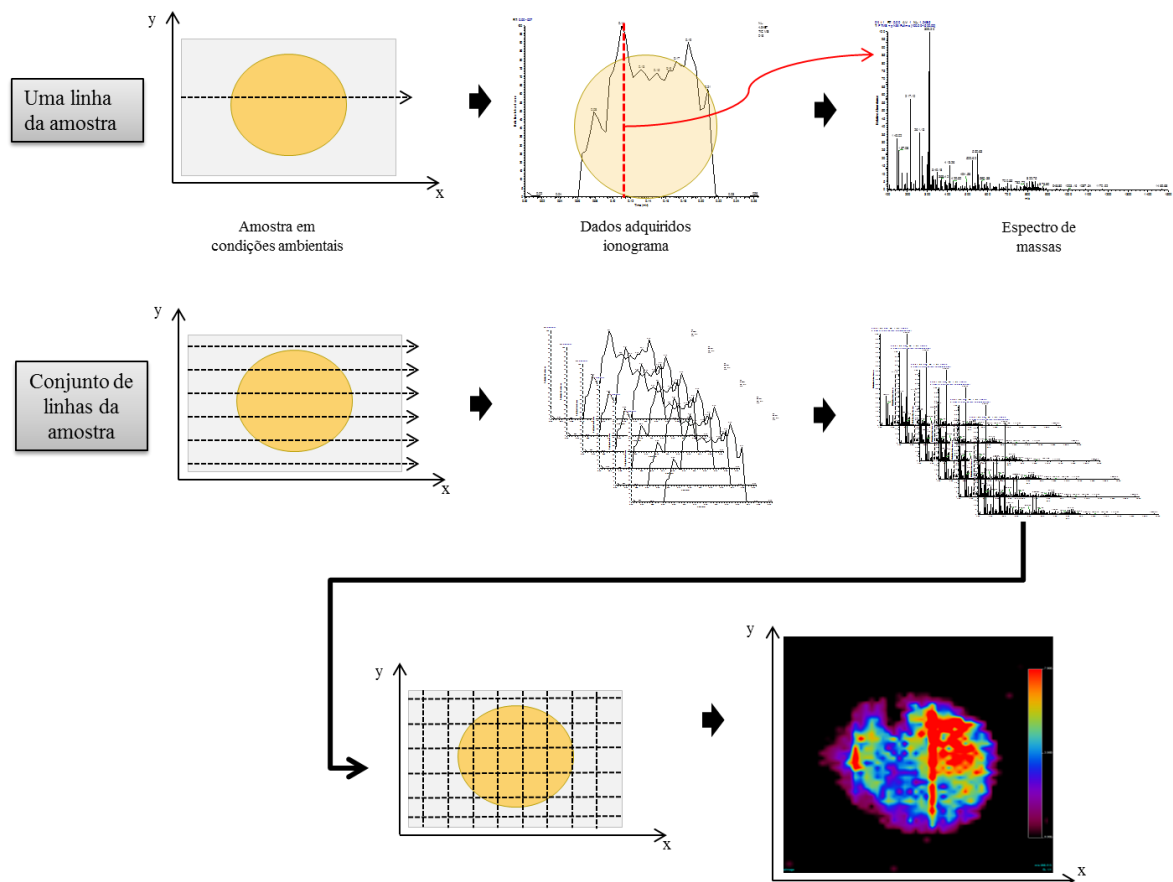
A técnica de imageamento por espectrometria de massas (MSI, do termo em inglês *mass spectrometry imaging*) iniciou-se na década de 1960, mas foi somente nos últimos anos que se tornou largamente utilizada ^[10]. A MSI consiste em explorar os recursos da MS adicionando uma dimensão extra para as abordagens tradicionais (identificação de moléculas orgânicas através da m/z , quantificação e determinação de estruturas), criando imagens químicas da superfície de uma amostra, representando a distribuição espacial e temporal de moléculas conhecidas ou desconhecidas ^[6, 10].

Atualmente, várias fontes de ionização podem ser utilizadas para se obter imagens químicas. *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS) foi a primeira fonte de ionização utilizada para MSI, inicialmente limitada à imagem de compostos inorgânicos e, posteriormente, no final de 1990, aplicada em análises biológicas. A técnica denominada *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) foi introduzida na segunda metade da década de 1980 e tem sido muito utilizada para análise de tecidos biológicos. DESI é uma das mais recentes fontes utilizadas na MSI, tendo sido introduzida em 2004 por Cooks e colaboradores, na análise de tecidos de tomate. Fontes como *Laser Desorption Ionization* (LDI), *Laser Ablation Electrospray Ionization* (LAESI), *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI), *Probe Electrospray Ionization* (PESI), *Desorption Atmospheric Pressure Photoionization* (DAPPI), *Laser Electrospray Mass Spectrometry* (LEMS), *Infrared Laser Ablation Metastable-Induced*

Chemical Ionization (IR-LAMICI) e *Nano Desorption Electrospray Ionization* são algumas das novas fontes que começaram a ser aplicadas em MSI [1, 6, 10-12].

Para se obter uma imagem é necessário fazer uso de uma plataforma móvel automatizada que se movimenta nas direções cartesianas X e Y e uma fonte de ionização compatível para a análise. Na FIGURA 3.5 é ilustrado como as imagens são obtidas, por exemplo, a partir da análise da superfície de um grão de soja.

FIGURA 3.5 Esquema ilustrativo de como se obter uma imagem por espectrometria de massas.



Fonte: autoria própria.

Inicialmente, determina-se a área de interesse da amostra. Apresentando esta área em um plano cartesiano, tem-se as ordenadas e abscissas, Y e X, respectivamente. O eixo X é a linha que compreende a distância percorrida na amostra e o eixo Y é composto por inúmeras linhas com espaçamentos previamente definidos entre si. Assim, a plataforma se movimenta pelo eixo X em velocidade constante e pré-definida, enquanto a fonte de ionização adquire os dados continuamente. Cada linha é formada por um conjunto de pontos e cada um deles produz um espectro de massas. Desde que o eixo Y possui várias linhas, cada uma com vários pontos,

tem-se, no final, um conjunto de espectros de massas que formam uma malha na superfície da amostra. Os dados obtidos são exportados para um programa capaz de converter os espectros de massas em imagens bidimensionais, de acordo com a distribuição espacial e a abundância relativa dos íons nas amostras [7, 8, 13, 14].

Geralmente, as aquisições de dados são realizadas no modo *full scan*, em que são adquiridos todos os íons que compreendem uma faixa de massa específica. Um *software* converte os espectros de massas em imagem e fornece uma imagem para cada íon de m/z específica. Consequentemente, são obtidas inúmeras imagens, cada uma informando a distribuição espacial e as intensidades medidas relativamente de cada substância presente na área amostral.

A aplicação de DESI-MSI abrange várias áreas da ciência. Por exemplo, tem sido aplicada, com grande êxito, na detecção de marcadores cancerígenos em tecidos biológicos [7, 15-20], inclusive em salas de cirurgia para auxiliar na remoção dos tecidos cancerígenos. Estudos em análises forenses [21-23], detecção de drogas [24] e metabolômica humana [17] também tem sido publicados.

Existem, também, vários estudos que estão sendo realizados na área de metabolômica vegetal utilizando DESI-MSI [11, 25]. Dentre estes pode-se destacar: (a) o monitoramento da mudança dos metabólitos da batata quando invadida por patógenos [13]; (b) detecção de produtos de degradação da clorofila em plantas em senescência [26]; (c) distribuição dos metabólitos (principalmente ácidos graxos de cadeia longa) em folhas, flores e pétalas de várias espécies de plantas [27]; (d) distribuição de pesticidas na superfície de folhas e através de secções do caule e folhas [28]; (e) elucidação de produtos naturais marinhos de defesa [29].

3.3 Metabolômica

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorre continuamente nas células e as vias metabólicas são séries de reações químicas em que o substrato de uma reação é o fator determinante para a reação seguinte; estes substratos são denominados metabólitos. A metabolômica é a ciência que estuda um conjunto de metabólitos [13, 30].

Os metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são aqueles considerados essenciais à vida. Os carboidratos, os lipídeos, os aminoácidos e os ácidos nucleicos fazem parte deste grupo. Sem estes metabólitos não haveria síntese de proteínas e de enzimas, que formam o maquinário biológico da planta. Os

metabólitos secundários exercem funções que garantem a sobrevivência do organismo, como proteção contra predadores, atração de polinizadores, ação fungicida e bactericida, proteção contra os raios UV e participação em alelopatias ^[30, 31].

A análise do perfil metabolômico das plantas é importante para apontar problemas biológicos como alteração enzimática, influência do meio externo, influência de herbicidas e patologias. Além de problemas biológicos, o perfil metabolômico também pode ser utilizado para testar a equivalência substancial entre plantas transgênicas e convencionais ^[32]. Sendo assim, a metabolômica, junto com as outras plataformas “ômicas”, contribui para uma melhor interpretação e entendimento de sistema biológico global.

Referências Bibliográficas

1. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-3.
2. Wiseman, J. M.; Laughlin, B. C., *Desorption Electrospray Ionization (DESI) Mass Spectrometry: A brief introduction and overview*, I. Prosolia, Editor.: Indianapolis, USA. p. 4.
3. Hoffman, E.d.; Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3° ed. 2007, England: John Wiley & Sons Ltd. 489.
4. *Web of Science mass spectrometry*. análise de resultados 2018; Disponível em: <http://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do>.
5. Cooks, R. G., et al., *Detection Technologies. Ambient mass spectrometry*. Science, 2006. **311**(5767): p. 1566-70.
6. Wu, C., et al., *Mass spectrometry imaging under ambient conditions*. Mass Spectrom Rev, 2013. **32**(3): p. 218-43.
7. Eberlin, L. S., et al., *Desorption electrospray ionization mass spectrometry for lipid characterization and biological tissue imaging*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 946-60.
8. Dill, A.L., et al., *Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(26): p. 2883-9.
9. Takats, Z., et al., *Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(10): p. 1261-75.
10. Arafah, K., et al., *Applications futures de l'imagerie par spectrométrie de masse*. Bio tribune magazine, 2012. **40**(1): p. 50-57.
11. Heyman, H. M.; I.A. Dubery, *The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review*. Phytochem Rev, 2015. **15**(2): p. 297-316.
12. Amstalden V. H., et al., *A concise review of mass spectrometry imaging*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(25): p. 3946-54.
13. Tata, A., et al., *Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2015. **26**(4): p. 641-8.
14. Ifa, D. R., et al., *Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI)*. Int J Mass Spectrom, 2007. **259**(1-3): p. 8-15.

15. Eberlin, L. S., et al., *Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2010. **82**(9): p. 3430-4.
16. Eberlin, L. S., et al., *Three-dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010. **49**(5): p. 873-6.
17. Masterson, T. A., et al., *Distinctive glycerophospholipid profiles of human seminoma and adjacent normal tissues by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011. **22**(8): p. 1326-33.
18. Eberlin, L. S., et al., *Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry*. *Cancer Res*, 2012. **72**(3): p. 645-54.
19. Pirro, V., et al., *Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections*. *Analyst*, 2012. **137**(10): p. 2374-80.
20. Angolini, C. F., et al., *Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture*. *Anal Chem*, 2015. **87**(13): p. 6925-30.
21. Tang, H. W., et al., *Gold Nanoparticles and Imaging Mass Spectrometry: Double Imaging of Latent Fingerprints*. *Anal Chem*, 2010. **82**: p. 5.
22. Morelato, M., et al., *Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS)*. *Forensic Sci Int*, 2013. **226**(1-3): p. 10-21.
23. Correa, D. N., et al., *Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging*. *Forensic Sci Int*, 2016. **260**: p. 22-6.
24. D'Alvise, J., et al., *Detection of follicular transport of lidocaine and metabolism in adipose tissue in pig ear skin by DESI mass spectrometry imaging*. *Anal Bioanal Chem*, 2014. **406**(15): p. 3735-42.
25. Boughton, B. A., et al., *Mass spectrometry imaging for plant biology: a review*. *Phytochem Rev*, 2015.
26. Muller, T., et al., *Direct plant tissue analysis and imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2011. **83**(14): p. 5754-61.
27. Li, B., et al., *Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. *Int J Mass Spectrom*, 2013. **348**: p. 15-22.
28. Gerbig, S., et al., *Spatially resolved investigation of systemic and contact pesticides in plant material by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI)*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(24): p. 7379-89.
29. Esquenazi, E., et al., Gerwick, *Probing marine natural product defenses with DESI-imaging mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(18): p. 7269-70.

30. Simões, C. M. O., et al., *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. ed. 2010, Editora da UFSC.
31. Lewinsohn, E.; Gijzen, M., *Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism*. *Plant Sci*, 2009. **176**(2): p. 161-169.
32. Baker, J. M., et al., *A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat*. *Plant Biotechnol J*, 2006. **4**(4): p. 381-92.

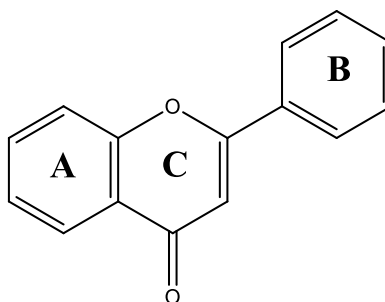
CAPÍTULO 4 – Farmacognosia: distribuição espacial de flavonoides em folhas de hortelã

4.1 Introdução

Flavonoides são metabólitos secundários que possuem anéis fenólicos em suas estruturas, os quais estão presentes no reino Plantae. Embora estejam distribuídos em todas as partes da planta, concentram-se principalmente nas flores, folhas e frutos ^[1-3].

Os flavonoides são sintetizados através da rota dos fenilpropanóides, sendo que sua estrutura química (FIGURA 4.1) é composta por 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por dois anéis aromáticos (anel A e B na FIGURA 4.1), conectados por três unidades de carbono (anel C na FIGURA 4.1) ^[4]. Esses compostos podem ser classificados, de acordo com suas características químicas e biossintéticas, como: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, dihidroflavonóis, flavanas, chalconas, antocianos e auronas. Além disso, os flavonoides podem ser encontrados sob as formas livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos), sendo que as porções de carboidratos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucoramnose, galactose ou arabinose ^[1-4].

FIGURA 4.1 Núcleo fundamental da estrutura química dos flavonoides.



Nas plantas, os flavonoides são responsáveis por uma série de funções, incluindo fixação de nitrogênio nas raízes, atração de polinizadores e proteção contra diversos agentes, tais como: herbívoros, patógenos, oxidação e estresse abiótico (causados por alta incidência de radiação ultravioleta e mudanças na temperatura e umidade do ambiente). Além disso, os flavonoides são responsáveis pelas características fenotípicas das flores, frutas e sementes, como por exemplo cor ^[3, 5-8].

A incorporação dos flavonoides na dieta humana é feita pela ingestão das partes da planta que possuem maior concentração destes compostos, ou seja frutas, flores, folhas e seus derivados. Os chás de folhas ou flores, por exemplo, quando preparados pela infusão em água quente são ricos em flavonoides e geralmente usados para fins medicinais^[6]. Usualmente, estes compostos são utilizados em tratamentos medicamentosos por possuir atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e também propriedades antineoplásicas^[2, 6, 9, 10].

A *Mentha x piperita* L., popularmente conhecida como hortelã, é uma das plantas aromáticas mais importantes no mundo por sua ampla utilização na culinária, medicina e em produtos de higiene pessoal^[11, 12]. Esta planta pertence ao gênero *Mentha* e à família Lamiaceae, sendo um híbrido das espécies *Mentha aquatica* L. e *Mentha spicata* L.. É uma planta herbácea, perene, nativa da Europa, mas atualmente é cultivada em diversas partes do mundo^[13, 14]. A Farmacopeia Europeia e a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) classificaram a hortelã como uma planta medicinal segura, podendo ser utilizada como analgésico, antioxidante, anti-inflamatório, antialérgico, antiviral, fungicida e bactericida, além de ser utilizada no tratamento de doenças nos sistemas gastrointestinal e respiratório^[13-15].

A infusão de folhas de hortelã em água quente pode extrair até 75% dos compostos fenólicos^[16]. Nestas folhas os compostos fenólicos correspondem a 12% do total de flavonoides. Os principais constituintes destes compostos são eriocitrina, luteolin-7-rutinosídeo, esperidoside, compostos hidroxicinâmicos totais e ácido rosmarínico.

A técnica mais comumente usada para a análise de flavonoides nas folhas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do termo em inglês *High Pressure Liquid Chromatography*). Essa metodologia requer o uso de diversos solventes para extrair os compostos das folhas, uso de padrões para confirmação das substâncias encontradas, além do desenvolvimento da metodologia ser limitado, pois muitas vezes não engloba todos os analitos de interesse^[9, 10, 14-20]. Apesar da ampla aplicação na análise de tecidos vegetais, as técnicas cromatográficas não são capazes de fornecer informações sobre a distribuição espacial de metabólitos em uma dada superfície. No entanto, a técnica DESI-MSI pode se tornar uma opção capaz de fornecer grande parte das informações necessárias em uma única análise.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é apresentar a distribuição espacial dos principais flavonoides nas folhas de *Mentha x piperita* L. correlacionando estes dados com as rotas metabólicas conhecidas em plantas.

4.2.2 Objetivos específicos

- Identificar os flavonoides das folhas de hortelã;
- Montar a rota metabólica através de imagens químicas;
- Comparar respostas utilizando a fonte de ionização DESI com a fonte de ionização ESI.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Materiais

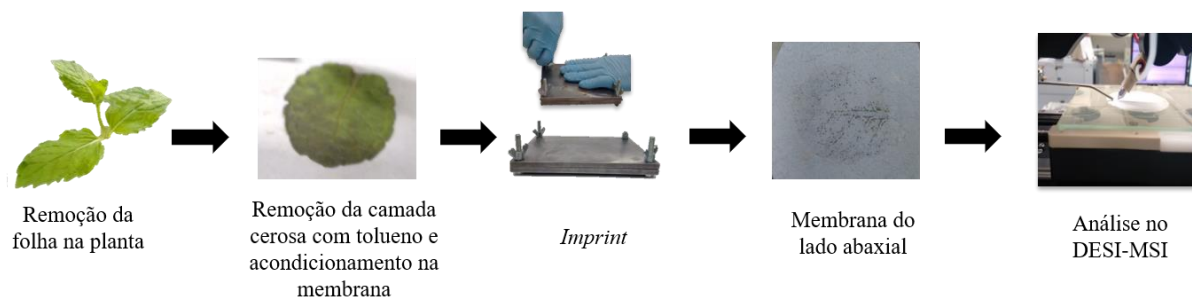
Para as análises por DESI-MSI foram utilizados os solventes metanol e tolueno, ambos grau HPLC, e adquiridos da empresa Tedia. No preparo de amostra da folha utilizou-se uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com tamanho de poro de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro (Allcrom). Um arbusto de hortelã (*Mentha \times piperita* L.) foi adquirido num mercado local e, para a confirmação de sua identidade, uma caracterização morfológica foi realizada. Os resultados obtidos com uma folha madura de 38 mm são aqui mostrados, muito embora duas outras folhas tenham também sido submetidas à análise por DESI-MSI. Os resultados gerados para as três folhas foram muito similares entre si, o que confirma as conclusões gerais obtidas.

4.3.2 Preparo de amostra (*imprint*)

Embora a técnica DESI-MSI exija pouco ou nenhum preparo de amostra, a folha de hortelã não possui uma superfície totalmente plana. Deste modo, foi necessário realizar o procedimento de *imprint* no qual os analitos presentes na folha são transferidos para uma membrana (superfície plana) através da aplicação de pressão.

Para realizar o procedimento de *imprint*, primeiramente lavou-se a folha com tolueno no intuito de remover a camada protetora de cera e a cutícula da superfície da folha e melhorar a perfusão dos analitos. Após a evaporação do tolueno, a folha foi disposta entre duas membranas de politetrafluoretileno (PTFE), na seguinte ordem: membrana-folha-membrana. Esse conjunto foi colocado em uma prensa manual, constituída de duas placas planas de aço inox, justapostas uma em cima da outra. A união destas placas é realizada por quatro parafusos que são apertados, fornecendo uma pressão sobre as amostras. O tempo em que as amostras foram mantidas sob pressão foi de 60 segundos. Um esquema do procedimento está apresentado na FIGURA 4.2. A seleção do solvente, a membrana e o tempo da prensa foram otimizados para o experimento.

FIGURA 4.2 Esquema do preparo de amostra das folhas de hortelã para análise por DESI-MSI.



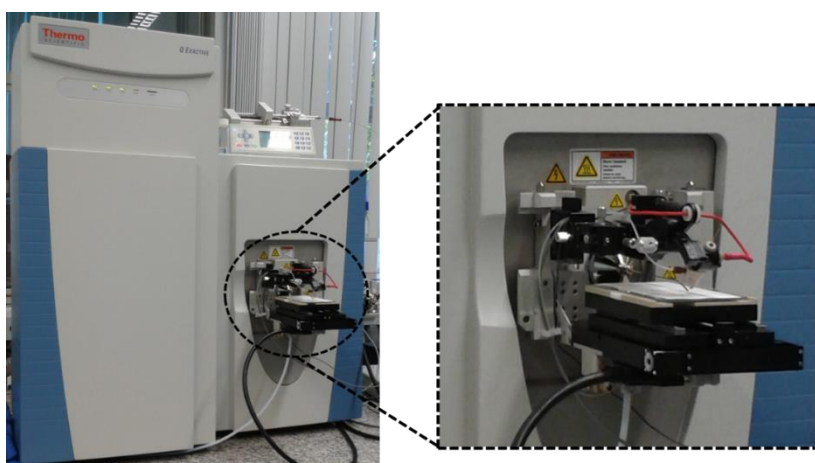
Após o *imprint*, a membrana referente ao lado abaxial da folha (o lado de baixo), por possuir menor resistência na transferência dos fotoassimilados (compostos orgânicos) da folha, foi escolhida e utilizada para a análise por DESI-MSI.

4.3.3 DESI-MSI

O espectrômetro de massas utilizado foi o *Q Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific - Alemanha) (FIGURA 4.3), instalado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Este espectrômetro de massas combina dois analisadores que associa a alta performance do quadrupolo com a alta resolução e precisão de massas do *orbitrap*. O instrumento apresenta um poder de resolução de 140.000 FWHM e um erro na precisão de massa de no máximo 3 ppm.

Utilizou-se a fonte de ionização DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201 da empresa Prosolia, EUA) (FIGURA 4.3). Trata-se de uma plataforma capaz de executar movimentos em duas dimensões, os quais são passíveis de controle por *software*.

FIGURA 4.3 Espectrômetro de massas (modelo *Q Exactive*) acoplado a uma plataforma móvel DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201).



Os parâmetros utilizados na operação do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram: voltagem do capilar de 5,0 kV, temperatura do capilar de 300°C, resolução de 70.000; o solvente utilizado para o *spray* foi o metanol com o fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, a faixa de massa analisada foi m/z 100 a 1000 no modo de ionização negativo, pois é o modo de ionização capaz de detectar os flavonoides. Para a plataforma móvel, determinou-se o tamanho do passo de 200 μm , tamanho do pixel de 200 μm x 200 μm e taxa de varredura de 740 $\mu\text{m sec}^{-1}$. As condições apresentadas, inclusive a geometria da fonte, foram resultantes de uma otimização do método para a obtenção da melhor resposta dos sinais e consequente resolução de imagem.

Os espectros de massas foram processados pelo *software* Qual Browser Xcalibur, as imagens foram convertidas utilizando o *software* Firefly (versão 2.1.05) e visualizadas pelo *software* BioMAP (versão 3.8.04).

4.3.4 Infusão direta: análise por DI-ESI-MS

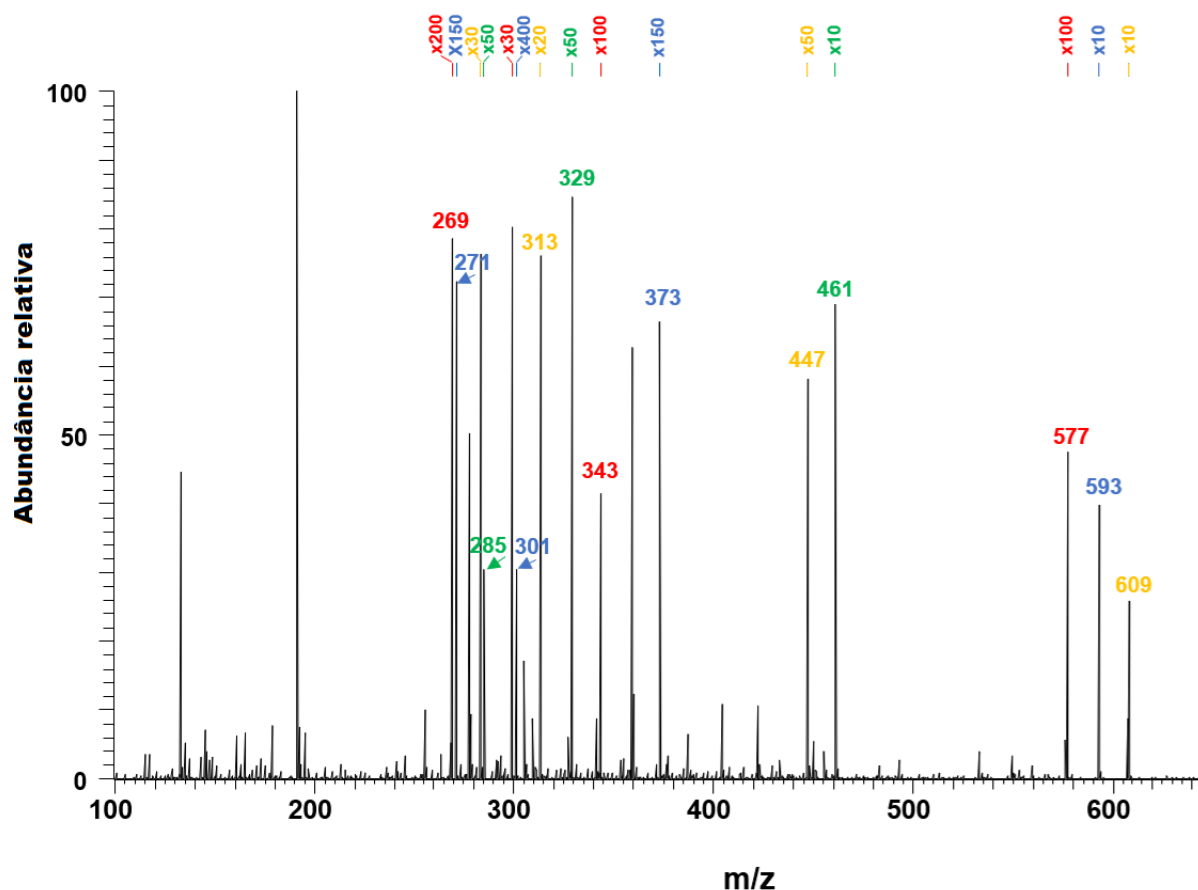
Foi realizado a avaliação entres solventes de diferentes polaridades (acetona, acetato de etila, acetonitrila, metanol) afim de se determinar o melhor solvente para a extração dos flavonoides, o melhor solvente analisado foi o metanol. Sendo assim o extrato metanólico foi preparado pesando-se 60 mg de folhas de hortelã e macerando em 2 mL de metanol. O extrato foi analisado usando o espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) utilizando a fonte de ionização *electrospray* (ESI). Os parâmetros instrumentais foram os seguintes: voltagem do capilar 5,0 kV, temperatura do capilar 300°C, solvente metanol, fluxo de injeção 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo de ionização, numa faixa de m/z 100 a 1000. Os íons relativos aos flavonoides foram selecionados e fragmentados por HCD (*High Energy Collisional Dissociation*) com a finalidade de comprovar sua fórmula estrutural. Os espectros de massas foram processados utilizando o *software* *Qual Browser Xcalibur*.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Identificação de flavonoides

Um espectro de massas obtido via DESI-MSI do *imprint* da folha de hortelã é apresentado na FIGURA 4.4. Como os íons de interesse (flavonoides em suas formas desprotonadas) estão em intensidades muito baixas, foi aplicado um zoom nos sinais de interesse, no fator de multiplicação que variou de 10 a 400 em cada sinal destes íons, para uma melhor visualização dos sinais no espectro de massas.

FIGURA 4.4 Exemplo de um espectro de massas no modo negativo obtido via DESI-MSI do *imprint* da folha de hortelã. Para uma melhor visualização, os íons de interesse (flavonoides desprotonados) estão multiplicados por fatores variando de 10 a 400.



Os flavonoides desorvidos do *imprint* da folha de hortelã foram detectados pelo espectrômetro de massas sob a forma de íons desprotonados (modo negativo). A TABELA 4.1 apresenta a relação de todos os flavonoides detectados, juntamente com suas respectivas fórmulas moleculares, massas experimentais, massas teóricas e o erro entre elas, em parte por

milhão (ppm), gerado pelo software. Todos estes flavonoides já foram previamente identificados na *Mentha x piperita*, ou em plantas da mesma família, como apresentado nas referências da TABELA 4.1.

As fórmulas moleculares de todos os compostos foram propostas com base nas massas exatas dos íons e pelos perfis de distribuição isotópica. As estruturas foram propostas pelos respectivos padrões de fragmentação, os quais foram obtidos a partir dos íons detectados no espectro de massas do extrato metanólico (item 4.4.6 deste capítulo), e confirmados a partir da comparação com perfis de dados disponíveis na literatura [21-26]. Observa-se que os erros entre a massa teórica e a massa experimental de cada fórmula molecular foram menores que ± 1 ppm.

A literatura aponta a naringenina, eriodictiol, hesperedina, apigenina, luteolina e seus derivados (alguns citados na TABELA 4.1) como os principais metabólitos secundários encontrados nas folhas de hortelã [6, 9, 10, 15, 17, 27-29]. Alguns desses metabólitos apresentam uma relação isomérica entre si, isto é, possuem a mesma fórmula molecular e a mesma massa exata. Considerando que a MS não é capaz de distinguí-los, sugeriu-se a ocorrência desses isômeros na folha de hortelã tendo como base relatos da literatura e na observação dos respectivos derivados metabólicos. Para enfatizar esse fenômeno, os metabólitos isoméricos foram agrupados na mesma linha na TABELA 4.1. Apesar de possuírem as mesmas imagens, a intensidade obtida é, portanto, uma soma da intensidade de todos os isômeros. Neste estudo os isômeros detectados foram: (a) acacetina/ gencavanina; (b) timusina/ pilosina; (c) xantomicrol/ pedunculina/ nevadensina; (d) apigenina-7-O-gentiobiosídeo/ luteolina-7-O-neohesperidosídeo.

TABELA 4.1 Flavonoides detectados no imprint da folha de hortelã a partir de uma análise por DESI-MSI no modo negativo.

Flavonóide	Fórmula Molecular	Massa Exata ^a		Erro (ppm)	Ref. ^b
		Teórica	Experimental		
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.04445	269.04566	0.421	[14, 28-30]
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.06010	271.06126	0.233	[9, 27]
Acacetina Gencavanina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.06010	283.06065	0.047	[6, 14, 28, 29]
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.03936	285.04054	0.276	[6, 14, 27-29]
Sakuranetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	285.07575	285.07686	0.046	
Crisoeriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.05501	299.05611	-0.004	
Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301.07066	301.07174	-0.071	[14]
Ladaneína	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.07066	313.07162	-0.452	[6, 28, 29]
Timusina Pilosina	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.06558	329.06613	-0.383	[6, 20, 28, 29]
Xantomicol Pedunculina Nevadensina	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.08123	343.08222	-0.309	[6, 28, 29, 32] [14]
Pebrelina	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.09179	373.09279	-0.270	[6, 15, 20, 28, 29]
Luteolina-7-O-D-glucosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09219	447.09329	0.012	[6, 15]
Luteolina-7-O-D-glucuronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.07145	461.07238	-0.356	[6]
Apigenina-7-O-neohesperidosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.15518	577.15633	0.089	[14, 15]
Apigenina-7-O-gentiobiosídeo Luteolina-7-O-neohesperidosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.15010	593.15121	0.028	[6, 14]
Hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.18140	609.18195	-1.617	[6, 9, 27]

^a Forma desprotonada; ^b Referências onde foram mencionadas a ocorrência dos respectivos flavonoides na *Mentha x piperita*.

4.4.2 Imagens químicas por DESI-MSI

A avaliação das imagens químicas dos flavonoides na superfície das folhas revela um mapa da distribuição destes compostos. A cor da escala varia de branco até verde escuro, indicando as regiões de ausência e de máxima intensidade do íon, respectivamente. As FIGURAS 4.5a e 4.5b mostram as imagens ópticas (fotografias) da folha de hortelã analisada

e o *imprint* resultante. A FIGURA 4.5c mostra a distribuição espacial do flavonoide crisoeriol na folha analisada, onde se observa nitidamente a escala de cor estabelecida. O crisoeriol foi identificado em sua forma desprotonada (m/z 299.05611), como mostrado na Tabela 4.1.

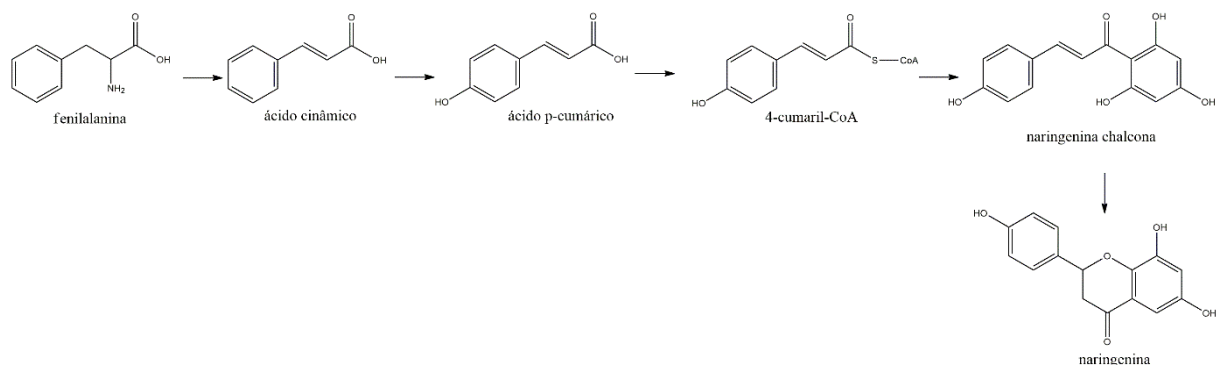
FIGURA 4.5 Imagens ópticas da folha de hortelã (a) e do *imprint* resultante (b). Distribuição espacial do flavonoide crisoeriol pela folha de hortelã (c).



Nas plantas são conhecidas várias rotas biossintéticas para a produção dos flavonoides. Com os resultados das análises obtidos via DESI-MSI foi possível obter as imagens químicas para os principais flavonoides que compõem as principais rotas biossintéticas conhecidas nas plantas, conforme será mostrado e discutido nos tópicos a seguir do presente documento. Tais dados permitem o acesso a uma informação inédita, qual seja a distribuição e intensidade relativa dos flavonoides presentes nas folhas de hortelã. De acordo com informações obtidas no banco de dados MetaCyc, ^[33] agrupou-se os flavonoides nas seguintes rotas: naringenina, luteolina e apigenina. As imagens obtidas dos principais flavonoides dentro de cada rota estão apresentadas nas FIGURAS 4.8, 4.10 e 4.12.

A biossíntese dos flavonoides se inicia pela via denominada fenilpropanoide. Esta via começa com a conversão enzimática da fenilalanina em ácido cinâmico. O ácido cinâmico é então hidroxilado para produzir ácido *p*-cumárico, que é convertido em 4-comaroil-CoA pela coenzima-A. Posteriormente, a 4-cumaril-CoA é transformada na naringenina chalcona, a qual produz, em sequência, a naringenina (FIGURA 4.6) ^[2, 3, 34]. A naringenina, uma flavanona previamente identificada em folhas de hortelã ^[9, 27], é o precursor de todos os outros flavonoides biossintetizados, cujas imagens serão apresentadas neste trabalho.

FIGURA 4.6 Produção da flavanona naringenina através da via fenilpropanoide.

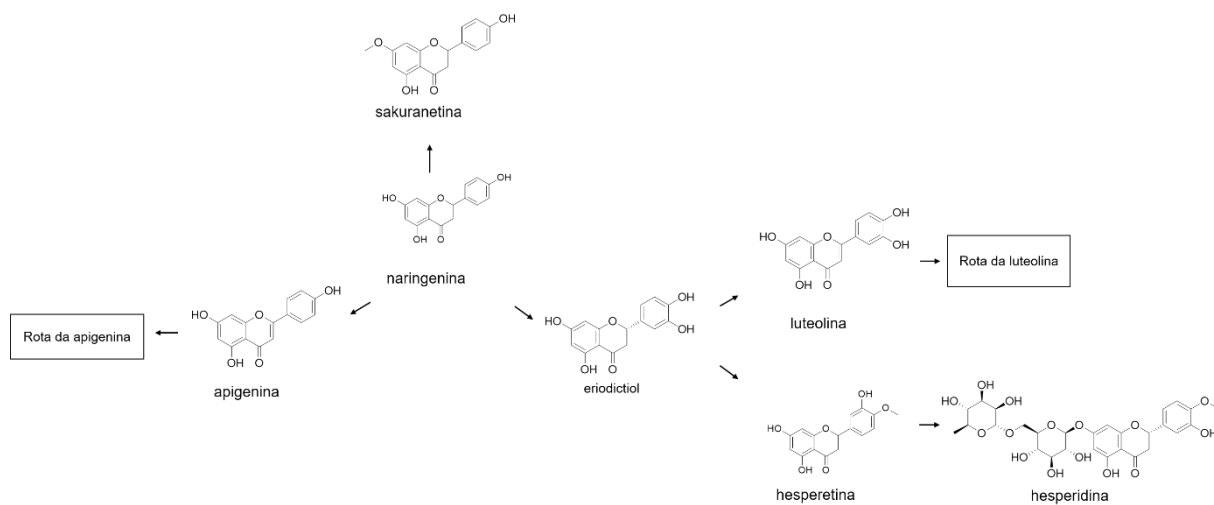


Fonte: MetaCyc [33].

4.4.3 Rota da naringenina

A naringenina é um metabólito chave, a partir do qual são gerados todos os demais flavonoides. A FIGURA 4.7 apresenta a rota metabólica da naringenina.

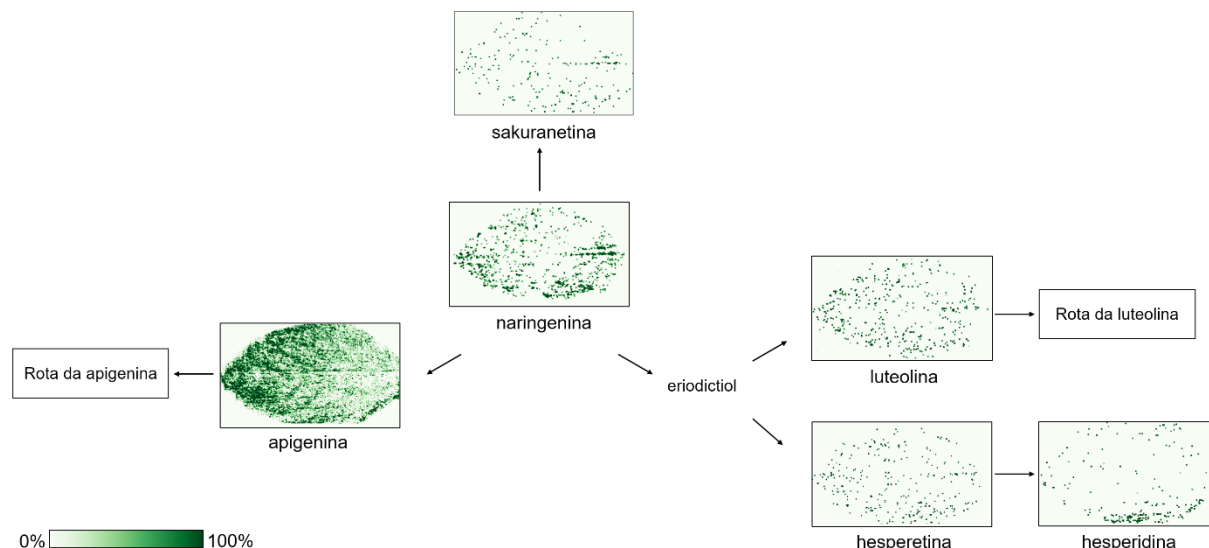
FIGURA 4.7 Rota metabólica da naringenina.



A rota da naringenina, com as imagens químicas dos respectivos flavonoides, está apresentada na FIGURA 4.8. A imagem química da naringenina revela que este flavonoide está distribuído por toda a folha, embora com uma intensidade menor na porção central (FIGURA 4.8). A naringenina tem algumas funções essenciais, tais como estimulação da colonização das raízes do trigo por algumas espécies de bactérias [35] e a promoção do crescimento de lignina em grama [36]. Em humanos, a naringenina apresenta um efeito neuroprotetor e antiteratogênico

[37]. Pela rota sintética apresentada (FIGURA 4.7), a naringenina dá origem a três outros flavonoides: sakuranetina, eriodictiol (que origina hesperetina e hesperidina) e apigenina.

FIGURA 4.8 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da naringenina.



A flavanona sakuranetina foi detectada em baixas intensidades e está dispersa por toda a folha (FIGURA 4.8). Nas plantas, a sakuranetina atua como um agente de defesa e sua concentração aumenta como resultado de um ataque externo, por exemplo de herbívoros [35-38]. Embora esta flavanona tenha sido encontrada em plantas da família Lamiaceae [35-38] e em extratos de partes aéreas de *Mentha pulegium* [21], sua presença nas folhas de *Mentha x piperita* ainda não tinha sido relatada.

A presença da flavanona eriodictiol, outro metabólito biossintetizados por meio da rota da naringenina (FIGURA 4.7), tem sido frequentemente relatada em folhas de *Mentha x piperita* [6, 10, 14, 17, 18]. Não foi obtida uma imagem química para este metabólito, entretanto sua presença foi comprovada na análise do extrato metanólico, como será mostrado posteriormente neste capítulo (item 4.4.6). Em contrapartida, foram obtidas imagens químicas para dois de seus derivados: hesperetina e a hesperidina. A imagem química da hesperetina (FIGURA 4.8) indica que esta flavanona é encontrada em pontos isolados ao longo da folha. A hesperetina liga-se a um rutinosídeo formando a hesperidina, sendo que este metabólito já foi relatado em folhas de hortelã [14, 17-19, 27, 39]. As imagens químicas revelam que ambos metabólitos se encontram dispersos pela folha, mas a hesperetina está mais intensa nas bordas (FIGURA 4.8).

4.4.4 Rota da luteolina

A luteolina (flavona) é o principal flavonoide encontrado nas folhas de hortelã [6, 10, 17, 18, 27, 29, 39, 40], sendo derivada diretamente do eriodictiol. Este flavonoide dá origem a rota metabólica da luteolina, cujos passos estão apresentados na FIGURA 4.9. As imagens químicas de todos os metabólitos desta rota são mostradas na FIGURA 4.10.

FIGURA 4.9 Rota metabólica da luteolina.

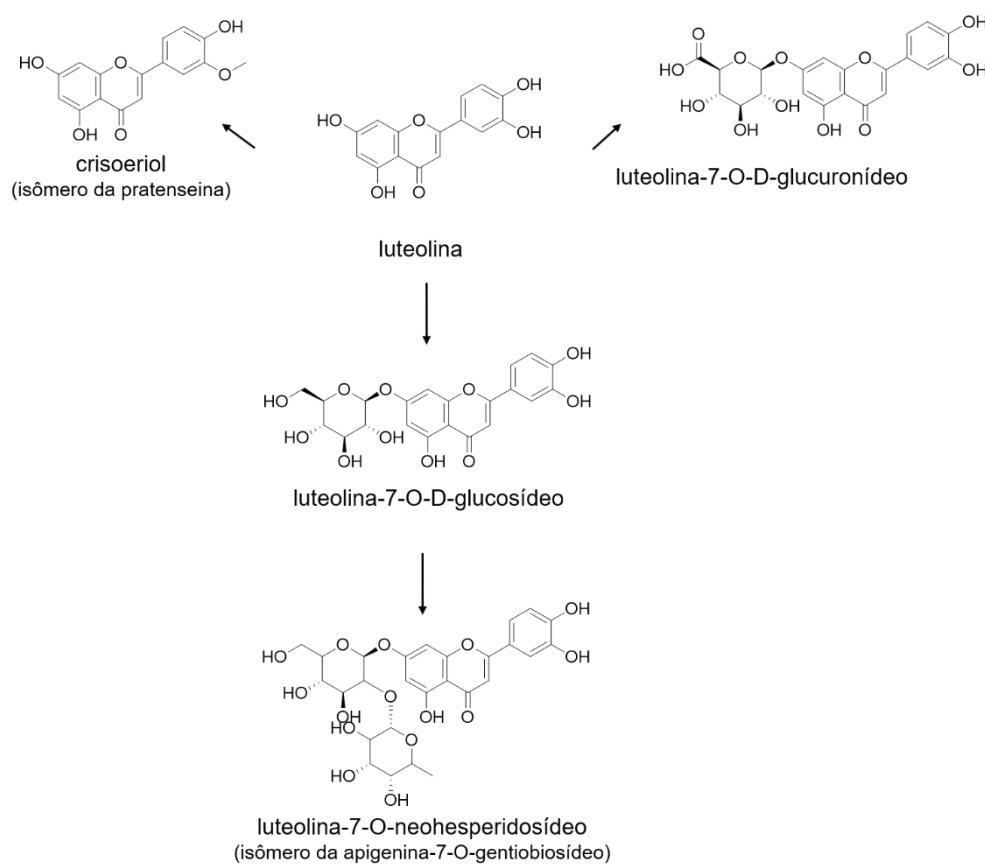
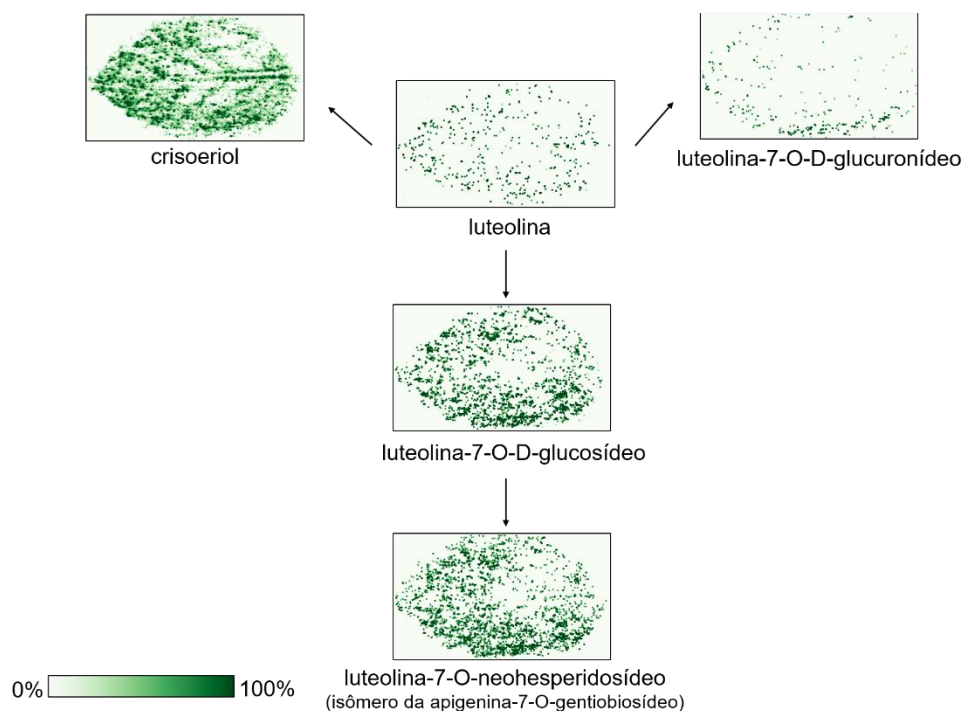


FIGURA 4.10 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da luteolina.



Enquanto que nas plantas a luteolina é um agente ativo contra a radiação UV ^[3], em humanos possui propriedades antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antiviral ^[2, 13]. A luteolina sofre metilação e forma a flavona crisoeriol, cuja presença em extratos de *Mentha spicata* foi previamente descrita ^[41]. Tem sido relatado que o crisoeriol possui atividades antimicrobiana ^[41] e anti-inflamatória ^[42]. A luteolina pode-se ligar a glicosídeos para produzir dois derivados: luteolina-7-O-D-glicuronídeo e luteolina-7-O-D-glicosídeo ^[10, 17, 39]. Estes metabolitos desempenham um papel importante ao também proteger as plantas contra a radiação UV ^[5]. Em sequência, a luteolina-7-O-D-glicosídeo é enzimaticamente convertida em luteolina-7-O-neohesperidosídeo ^[40]. Por meio das imagens químicas (FIGURA 4.10) observa-se que a luteolina está distribuída homogêneamente por toda a folha e sua intensidade é menor que aquelas dos demais metabólitos. Por outro lado, o crisoeriol é encontrado em altas intensidades na nervura central, nas nervuras laterais e nas bordas da folha. O flavonoide luteolina-7-O-D-glicuronídeo localiza-se em poucos pontos distribuídos ao longo da folha, mais intenso principalmente nas bordas. Finalmente, as imagens químicas dos flavonoides luteolina-7-O-D-glicosídeo e luteolina-7-O-neohesperidosídeo indicam que estes metabólitos estão ausentes nas nervuras e presentes estritamente na lâmina da folha.

4.4.5 Rota da apigenina

A apigenina, uma flavona derivada diretamente da naringenina (FIGURA 4.11), é um dos principais flavonoides presentes nas folhas de hortelã [14, 17, 18, 20, 28, 29]. Nas plantas, a apigenina atua na regulação do crescimento e proteção contra herbívoros [2, 5]. Em humanos, a apigenina alivia os sintomas causados por doenças hepáticas e também atua como um agente antibacteriano, anti-inflamatório e antiviral [2]. A apigenina origina muitos outros flavonoides formando uma extensa via biosintética chamada rota da apigenina, como apresentado na FIGURA 4.11. As imagens químicas de todos os metabólitos desta rota são mostradas na FIGURA 4.12.

FIGURA 4.11 Rota metabólica da apigenina.

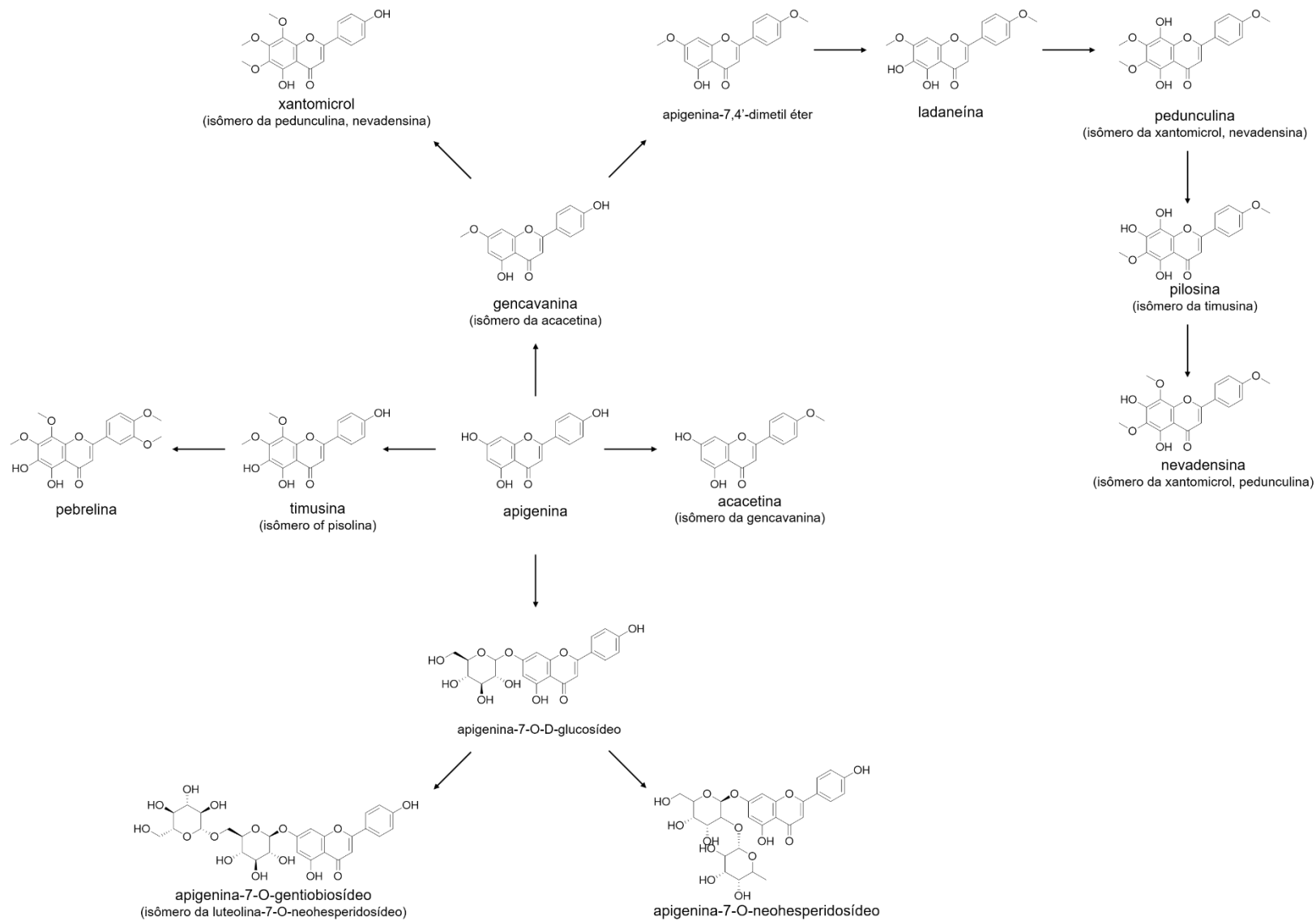
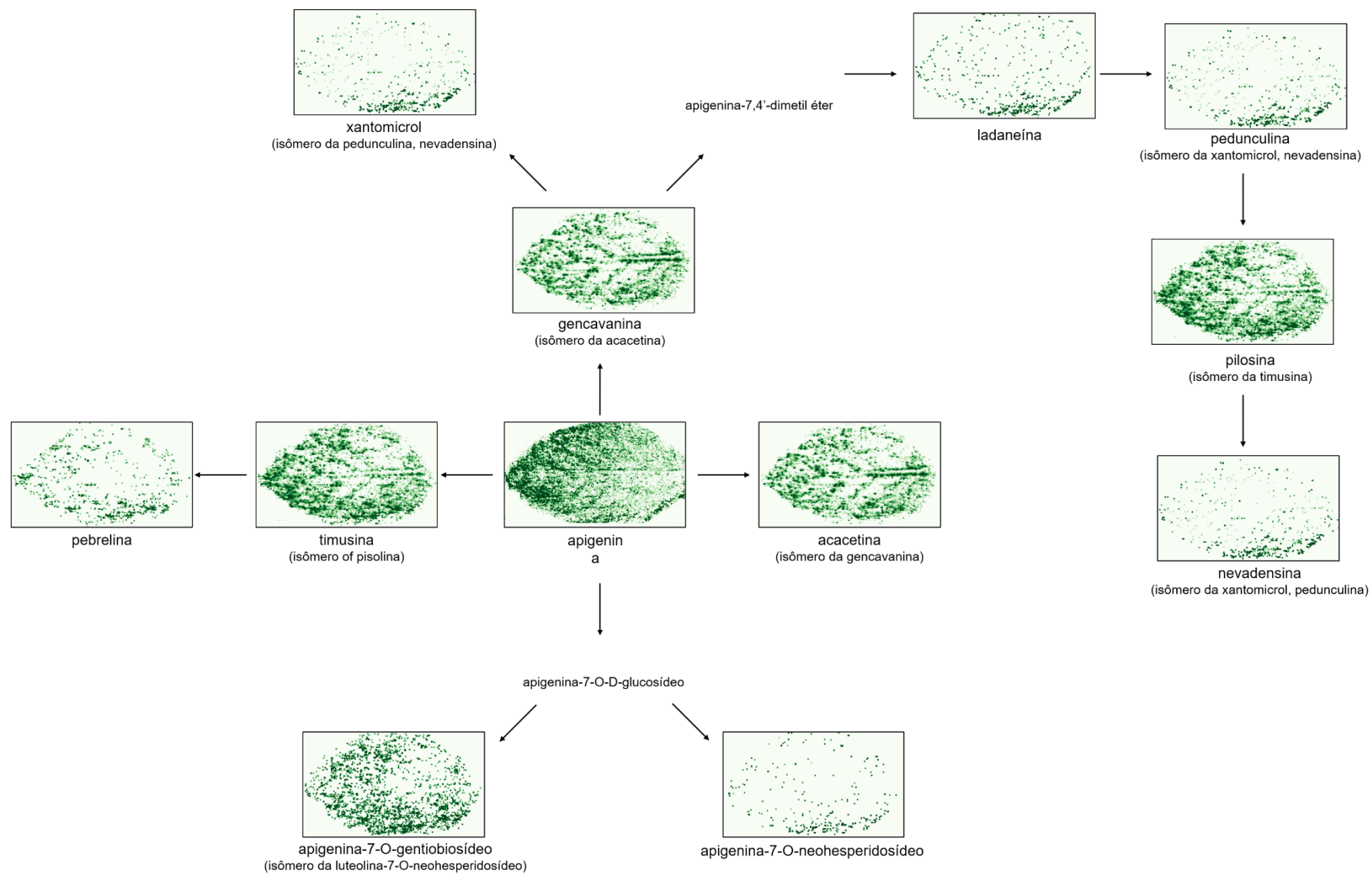


FIGURA 4.12 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais flavonoides que compõem a rota da apigenina.



A imagem química revela que a apigenina está presente em toda a superfície da folha, sendo possível discernir as nervuras laterais e uma maior intensidade na ponta em relação à base da folha (FIGURA 4.12). Em sequência, a apigenina se liga a um açúcar originando a apigenina-7-O-D-glicosídeo, cuja presença foi detectada exclusivamente no extrato metanólico (item 4.4.6 deste capítulo). Em contrapartida, seus derivados glicosilados, apigenina-7-O-neohesperidosídeo e apigenina-7-O-gentiobiosídeo, que são metabólitos de proteção contra radiação UV ^[5], geraram imagens químicas bem definidas (FIGURA 4.12). A apigenina-7-O-gentiobiosídeo encontra-se presente na lâmina da folha em alta intensidade e ausente nas nervuras. A apigenina-7-O-neohesperidosídeo está presente em alguns pontos isolados mas como será apresentado adiante (item 4.4.6 deste capítulo), sua intensidade é quase três vezes maior que da apigenina-7-O-gentiobiosídeo (FIGURA 4.13).

A apigenina também origina a flavona timusina ^[43] a qual, em sequência, produz a flavona pebreлина. A presença destas duas flavonas nas folhas de *Mentha x piperita* L. foi relatada anteriormente ^[6, 14, 28, 29]. As imagens químicas de ambas as flavonas indicam que enquanto a timusina é distribuída por toda a superfície, concentrando-se na nervura lateral e na nervura central, a pebreлина está localizada principalmente na lâmina e, em menor proporção, na parte central da folha.

A gencavanina, derivada da apigenina, produz dois metabólitos distintos, o xantomicro ^[43] e a apigenina-7,4'-dimetil éter, ambos anteriormente relatados em folhas de hortelã ^[28, 29]. Nas plantas, o xantomicro possui ação protetora contra a radiação UV ^[43], enquanto que em humanos ele tem sido usado no tratamento de alguns tipos de câncer ^[43]. A apigenina-7,4'-dimetil éter, um intermediário cuja presença não foi detectada mesmo no extrato metanólico (item 4.4.6 deste capítulo), gera a ladaneína ^[33]. As imagens químicas de ambos flavonoides (xantomicro e ladaneína) mostram que eles estão dispersos por toda a folha, mas concentrados em pontos isolados (FIGURA 4.12). A ladaneína gera a pedunculina, um metabólito isomérico do xantomicro, o qual, em sequência, origina a pilosina, isômero da timusina. Finalmente, a pilosina produz a nevadensina, que é um metabólito isomérico da pedunculina e do xantomicro.

4.4.6 DESI-MSI versus DI-ESI-MS

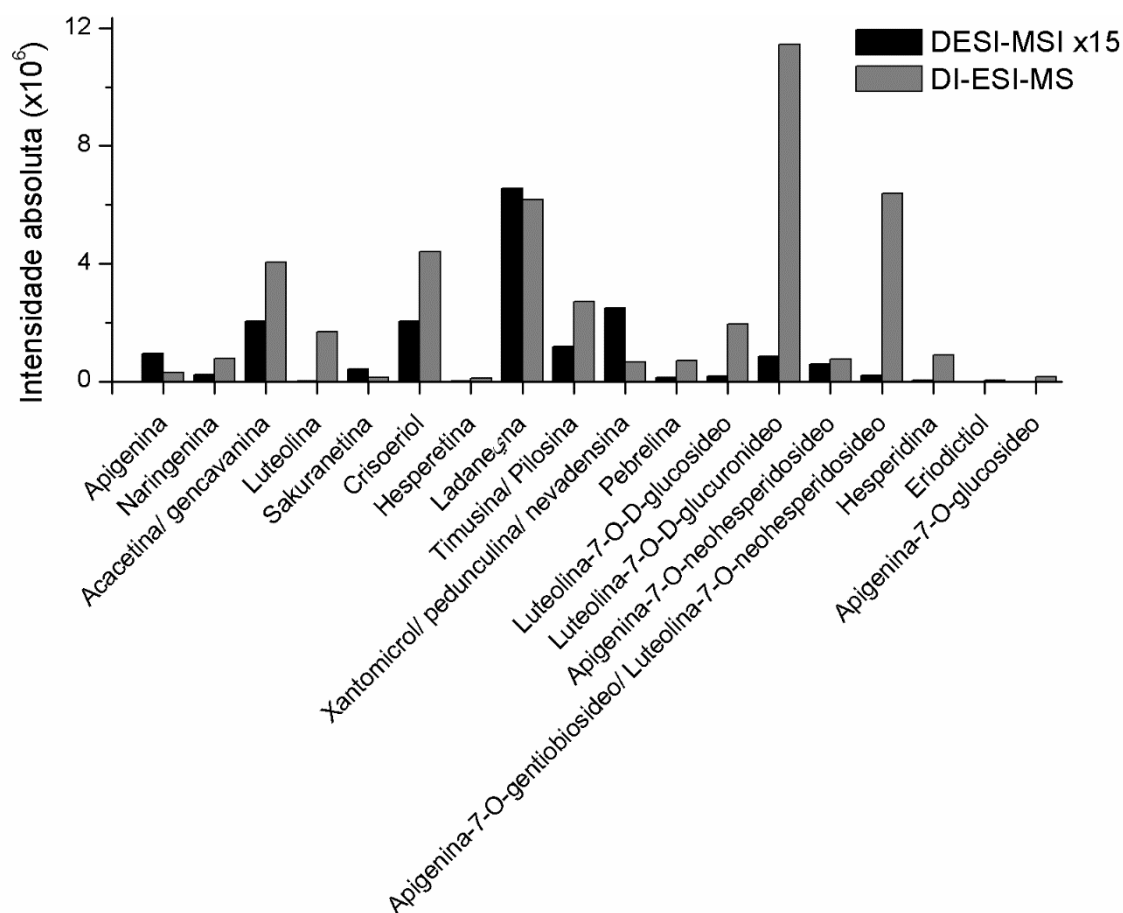
Para confirmar a presença dos flavonoides detectados via DESI-MSI, preparou-se um extrato metanólico com as folhas de hortelã, o qual foi analisado via DI-ESI-MS (para maiores detalhes experimentais veja o item 4.3.4 deste capítulo). Observou-se que as intensidades

absolutas dos flavonoides nos espectros de massas via DESI-MSI são inferiores às das respectivas flavonoides obtidas a partir do extrato metanólico utilizando DI-ESI-MS.

A diferença entre as intensidades certamente é consequência do modo como as fontes de ionização ionizam e enviam os íons para o espectrômetro de massa. A fonte de ionização electrospray, o analito de interesse contido na fase móvel, passa através pelo capilar de metal na pressão atmosférica e sob alta tensão. Na saída do capilar são formados aerossóis de microgotas carregadas, que são dessolvatadas por um fluxo contínuo de gás seco. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido e a densidade de carga da superfície da molécula aumenta até o momento em que as forças repulsivas de Coulomb, entre as cargas superficiais, exceder as tensões superficiais, levando às divisões consecutivas das microgotas iniciais ^[44]. Enquanto isso na DESI um *spray* de gotículas carregadas atinge a amostra, promovendo a dessorção dos analitos da superfície e a ionização dos mesmos por transferência de carga. Consequentemente, espera-se obter um maior número de íons e mais analitos disponíveis quando se utiliza um extrato ionizado, do que quando se dessorve a amostra e posteriormente se ioniza.

Deste modo, sabendo-se que o resultado para ESI possui maior intensidade, para que seja possível a comparação quanto à proporcionalidade do analito entre as técnicas, multiplicou-se as intensidades absolutas dos flavonoides obtidas pela técnica DESI-MSI por um fator de 15 vezes. O gráfico comparando as intensidades absolutas de cada flavonoide em função da técnica utilizada é apresentado na FIGURA 4.13.

FIGURA 4.13 Comparação das intensidades absolutas dos flavonoides obtidas pelas técnicas DESI-MSI multiplicado por um fator de 15 vezes e DI-ESI-MS.



Observa-se que para os flavonoides de massa baixa (m/z 100 a 350), a saber apigenina, naringenina, acacetina, gencavanina, luteolina, sakuranetina, crisoeriol, hesperetina, ladaneína, timusina, pilosina, xantomicrol, pedunculina e nevadensina, possuem o padrão de respostas semelhantes entre as técnicas. Esse padrão não é observado para os demais flavonoides estudados, por possuírem massa alta (m/z 350 a 1000), neste caso, a técnica DI-ESI-MS produz sinais mais intensos.

Infer-se dessa diferença que na técnica DESI-MSI, à medida que a massa aumenta, a desorção dos analitos e sua transferência para a fase gasosa fica prejudicada, algo que não ocorre na técnica DI-ESI-MS. Note que apesar de possuírem massas baixas (m/z 287.05556), o metabólito eriodictiol não gerou imagem química pela técnica DESI-MSI. Suas presenças, no entanto, foram verificadas, ainda que em baixas intensidades, no espectro de massas do extrato metanólico obtido via DI-ESI-MS.

4.5 Conclusão

Os flavonoides são importantes metabólitos secundários nas plantas e são intensamente estudados. O presente estudo fornece informações inéditas sobre os sítios preferenciais de localização dos principais flavonoides nas folhas de hortelã (*Mentha x piperita* L.), os quais pertencem a uma das seguintes rotas biossintéticas: naringenina, luteolina e apigenina.

O uso do DESI-MSI para avaliar a distribuição espacial e a intensidade relativa desses flavonoides em folhas de ervas medicinais apresenta várias vantagens sobre as técnicas tradicionais, como simplicidade, velocidade, sensibilidade e precisão. Este tipo de análise é importante pois permite determinar os principais sítios onde metabólitos específicos estão localizados nos vários tecidos das plantas.

Referências Bibliográficas

1. Kim, B.-G., et al., *Plant Flavonoid O-methyltransferases: Substrate Specificity and Application*. J Plant Biol, 2010. **53**(5): p. 321-329.
2. Kumar, S.; Pandey, A. K., *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. Sci World J, 2013. **2013**: p. 162750.
3. Falcone-Ferreyra, M. L., et al., Casati, *Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications*. Front Plant Sci, 2012. **3**: p. 222.
4. Simões, C.M.O. et al., *Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento*. 2017.editora Artmed.
5. Mierziak, J., et al., *Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment*. Molecules, 2014. **19**(10): p. 16240-65.
6. Riachi, L. G.; Maria C. A., *Peppermint antioxidants revisited*. Food Chem, 2015. **176**: p. 72-81.
7. Nguyen, T. K., et al., *Phenylpropanoid profiling reveals a class of hydroxycinnamoyl glucuric acid conjugates in Isatis tinctoria leaves*. Phytochemistry, 2017. **144**: p. 127-140.
8. Colombo, P. S., et al., *Phytochemistry of European Primula species*. Phytochemistry, 2017. **143**: p. 132-144.
9. Figueroa-Perez, M. G., et al., *Effect of chemical elicitors on peppermint (Mentha piperita) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions*. Food Chem, 2014. **156**: p. 273-8.
10. Dorman, H. J. D., et al., *Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from Mentha Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars*. J Agr Food Chem, 2003. **51**(16): p. 4563-4569.
11. Uribe, E., et al., *Assessment of vacuum-dried peppermint (Mentha piperita L.) as a source of natural antioxidants*. Food Chem, 2016. **190**: p. 559-65.
12. Santoro, M. V., et al., *Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (Mentha piperita) Micropropagated in Vitro*. American J Plant Sci, 2013. **04**(05): p. 49-55.
13. McKay, D. L.; Blumberg, J. B., *A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (Mentha piperita L.)*. Phytother Res, 2006. **20**(8): p. 619-33.
14. Mimica-Dukic, N.; Bozin, B., *Mentha L. Species (Lamiaceae) as Promising Sources of Bioactive Secondary Metabolites*. Curr Pharm Design, 2008. **14**(29): p. 10.

15. Areias, F. M., et al., *Phenolic fingerprint of peppermint leaves*. Food Chem, 2001. **73**(3): p. 307-311.
16. Duband, F., et al., *[Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, Mentha x piperita L.]*. Ann pharm fr, 1992. **50**(3): p. 146-155.
17. Fecka, I. e Turek, S., *Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage*. J Agr Food Chem, 2007. **55**(26): p. 10908-10917.
18. Koşar, M., et al., *Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of Mentha Samples Using a Postcolumn Derivatization Method*. J Agr Food Chem, 2004. **52**(16): p. 5004-5010.
19. Guedon, D. J.; Pasquier, B. P., *Analysis and Distribution of Flavonoid Glycosides and Rosmarinic Acid in 40 Mentha x piperita Clones*. J Agr Food Chem, 1994. **42**(3): p. 679-684.
20. Voirin, B., et al., *Free flavonoid aglycones as markers of parentage in Mentha aquatica, M. citrata, M. spicata and M. x piperita*. Phytochemistry, 1999. **50**(7): p. 1189-1193.
21. Taamalli, A., et al., *LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species Mentha pulegium and Origanum majorana*. Phytochem Anal, 2015. **26**(5): p. 320-30.
22. Chernonosov, A. A., et al., *Identification of phenolic compounds in Myricaria bracteata leaves by high-performance liquid chromatography with a diode array detector and liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Rev Bras Farmacogn, 2017. **27**(5): p. 576-579.
23. Brito, A., et al., *HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile*. Molecules, 2014. **19**(11): p. 17400-21.
24. Fabre, N., et al., *Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry*. J Am Soc Mass Spectr, 2001. **12**: p. 9.
25. Peter, S. R., et al., *The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation*. J Environ Sci Health B, 2015. **50**(11): p. 819-26.
26. Yin, R., et al., *UFLC-MS/MS method for simultaneous determination of luteolin-7-O-gentiobioside, luteolin-7-O-β-d-glucoside and luteolin-7-O-β-d-glucuronide in beagle dog*

- plasma and its application to a pharmacokinetic study after administration of traditional Chinese medicinal preparation: Kudiezi injection.* J Pharmaceut Biomed, 2013. **72**: p. 127-133.
27. Figueroa-Perez, M. G., et al., *Metabolite profile, antioxidant capacity, and inhibition of digestive enzymes in infusions of peppermint (Mentha piperita) grown under drought stress.* J Agric Food Chem, 2014. **62**(49): p. 12027-33.
28. Voirin, B.; Bayet, C., *Developmental variations in leaf flavonoid aglycones of Mentha x piperita.* Phytochemistry, 1992. **31**(7): p. 2299-2304.
29. Voirin, B., et al., *Free flavonoid aglycones from Mentha X piperita: developmental, chemotaxonomical and physiological aspects.* 1994. **v. 22**.
30. Zaidi, F., et al., *Free flavonoid aglycones from leaves of Mentha pulegium and mentha suaveolens (labiatae).* Phytochemistry, 1998. **48**(6): p. 991-994.
31. Murata, K., et al., *Inhibitory activity of peppermint (leaf of Mentha piperita) against xanthine oxidase.* J Tradit Medicines, 2013. **30**(3): p. 140-144.
32. Jullien, F., et al., *Highly oxygenated flavones from Mentha piperita.* Phytochemistry, 1984. **23**(12): p. 2972-2973.
33. Caspi, R., et al., *The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(D1): p. D459-D471.
34. Forkmann, G.; S. Martens, *Metabolic engineering and applications of flavonoids.* Curr Opin Biotech, 2001. **12**(2): p. 155-160.
35. Treutter, D., *Significance of flavonoids in plant resistance: a review.* Environ Chem Lett, 2006. **4**(3): p. 147-157.
36. Deng, F. N. A. R. C., et al., *Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramineous plants.* 2004. **v. 4**.
37. Trivellini, A., et al., *Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress".* Ind Crop Prod, 2016. **83**: p. 241-254.
38. Kodama, O., et al., *Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves.* Phytochemistry, 1992. **31**(11): p. 3807-3809.
39. Inoue, T., et al., *Antiallergic Effect of Flavonoid Glycosides Obtained from Mentha piperita L.* Biol Pharm Bull, 2002. **25**(2): p. 256-259.
40. Gao, B., et al., *Differentiating organic from conventional peppermints using chromatographic and flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints.* J Agric Food Chem, 2012. **60**(48): p. 11987-94.

41. Padmini, E., et al., *Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of Mentha spicata and Camellia sinensis.pdf*>. Asian J. Exp. Biol. Sci., 2010. **1**(4): p. 10.
42. Williams, C.A., et al., *The flavonoids of Tanacetum parthenium and T. vulgare and their anti-inflammatory properties*. Phytochemistry, 1999. **51**(3): p. 417-423.
43. Mohammad, F., et al., *Xanthomicrol: A Comprehensive Review of Its Chemistry, Distribution, Biosynthesis and Pharmacological Activity*. Mini-Rev Med Chem, 2014. **14**(9): p. 725-733.
44. Hoffman, E.d.; V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3^o ed. 2007, England: John Wiley & Sons Ltd. 489.

CAPÍTULO 5 – Fisiologia Vegetal: Relação fonte-dreno no transporte de aminoácidos e carboidratos em folhas de hortelã

5.1 Introdução

As plantas são organismos autotróficos, ou seja, sintetizam seu próprio alimento. A planta é capaz de transformar a energia luminosa em energia química. A energia química atua na reação de conversão do dióxido de carbono e água em oxigênio, água e glicose, processo conhecido como fotossíntese. Do solo, as plantas retiram água, íons minerais (por exemplo, Ca^+ , Mg^+ , PO_4^{3-}) e compostos nitrogenados inorgânicos (por exemplo, nitrato), esses compostos são absorvidos pelas raízes que os transformam em compostos nitrogenados orgânicos. E assim, as plantas são capazes de obter todo seu arsenal metabólico, que inclui mecanismos de crescimento, reprodução e defesa [1, 2].

Os nutrientes produzidos são transportados pelos tecidos especializados na condução de nutrientes: o xilema e o floema. Basicamente, o xilema transporta água e nutrientes inorgânicos das raízes para as partes aéreas (fotossintetizantes), enquanto que o floema exporta os nutrientes produzido (compostos fotoassimilados) das partes aéreas para tecidos não fotossintetizantes [1].

Os fotoassimilados são carboidratos que contribuem com 90% da biomassa da planta. Eles são utilizados tanto como fonte de energia para o crescimento e desenvolvimento, quanto como precursores na biossíntese de uma ampla variedade de moléculas, incluindo lipídeos, polissacarídeos e, junto com os compostos nitrogenados, na síntese de aminoácidos e proteínas [1-3].

Os compostos nitrogenados, aminoácidos e ureídeos, cumprem um importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas. A incorporação de nitrogênio nas plantas pode ser realizada por fixação do nitrogênio molecular do ar (baixa contribuição) e pela assimilação de nitrato ou amônia pelas raízes. Na raiz, o nitrato é convertido em cátion amônio (NH_4^+), o qual é usado, principalmente, para a síntese dos aminoácidos glutamina, glutamato e asparagina. Estes dois aminoácidos são transportados via xilema para as folhas onde são utilizados para a síntese de outros aminoácidos [4].

Sabe-se que as folhas jovens possuem de dois a quatro vezes mais teor de nitrogênio que as folhas maduras, fato este justificado por estarem em crescimento e alta atividade metabólica, necessitando de compostos nitrogenados para produzir proteínas e construir suas

estruturas. O teor dos compostos nitrogenados diminui gradativamente com o desenvolvimento da folha ^[5].

Durante o desenvolvimento foliar (ontogênese) várias transformações metabólicas, fisiológicas e estruturais acontecem. Na fase inicial da folha (folha jovem) o maquinário fotossintético está incompleto e, por isso, não há síntese de carboidratos em quantidades suficientes para manter as atividades biossintéticas. As folhas maduras possuem todo o maquinário fotossintético desenvolvido e produzem fotoassimilados em abundância, sendo que o excedente é exportado (via floema) às folhas jovens e outros órgãos não fotossintetizantes. Sendo assim, as folhas maduras se comportam como fonte e as folhas jovens como dreno, o que origina a relação denominada fonte-dreno (FIGURA 5.1) ^[1-3, 6-8]. A folha em expansão, um estágio intermediário entre as fases dreno e fonte, cessa de importar e começa a exportar carboidratos. Esta transição ocorre quando a área foliar atinge entre 30% a 60% da área foliar máxima, podendo variar de espécie para espécie ^[1, 9-11].

FIGURA 5.1 Representação esquemática da relação fonte-dreno em plantas e o transporte de aminoácidos e carboidratos através dos vasos condutores.



A mobilidade de carbono e nitrogênio nas plantas é estudada há décadas ^[1, 12]. Os estudos objetivam identificar qual carboidrato é transportado ^[7, 13-16], qual é armazenado ^[17, 18] e em qual estágio na ontogênese um carboidrato pode ser mais produzido ^[6, 8, 14, 19, 20]. Quanto ao transporte de nitrogênio, há vários estudos relacionados à síntese ^[5] e, principalmente, ao armazenamento de aminoácidos ^[8, 21]. Várias pesquisas sobre a fixação do nitrogênio pelas

plantas e modificações genéticas para melhorar essa fixação e armazenamento tem sido conduzidas ^[22].

Para a análise desses compostos (carboidratos, aminoácidos e ureídeos) são utilizadas numerosas técnicas de microscopia (microscopia eletrônica, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de fluorescência, microscopia de varredura a laser), corantes fluorescentes, ressonância magnética nuclear, detecção por radiação gama, técnicas de imagem com base em tomografia por emissão de prótons e rotulagem radioativa ^[23]. Entretanto, essas técnicas demandam preparo de amostra complexo, longas análises e muitas vezes não fornecem informações químicas e espaciais com precisão, sensibilidade e resolução. Além disso, estas técnicas não permitem a identificação individual dos compostos presentes no tecido.

Por esses motivos a técnica DESI-MSI por se tornar uma nova plataforma analítica para verificar o transporte de nutrientes e a relação fonte-dreno nas plantas. As vantagens dessa técnica são: rapidez (comparada com outras técnicas), facilidade de preparo de amostra, custo baixo, além de identificar, numa única análise, analitos distintos, proporcionando, assim, uma visão completa sobre muitos metabólitos presentes na amostra.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo utilizar a técnica DESI-MSI como uma nova plataforma analítica para verificar o transporte de nutrientes (carboidratos e aminoácidos/ ureídeos) e a relação fonte-dreno em folhas de *Mentha x piperita* L. em diferentes estádios de crescimento (jovem, em expansão e madura).

5.2.2 Objetivos específicos

- Identificação dos aminoácidos e carboidratos livres presentes das folhas de hortelã;
- Comparação da distribuição e intensidade dos aminoácidos e carboidratos livres nos diferentes estádios de crescimento da hortelã.

5.3 Materiais e Métodos

Para as análises de DESI-MSI foram utilizados os solventes metanol e tolueno, ambos grau HPLC e adquiridos da empresa Tedia (São Paulo, Brasil). No preparo de amostra utilizou-se uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com tamanho de poro de 0.45 μm e 47 mm de diâmetro (Allcrom).

Um exemplar da planta hortelã (*Mentha × piperita* L.) foi adquirido em um mercado local. Realizou-se a confirmação de sua identidade por meio da caracterização morfológica. Três folhas consecutivas, orientadas na posição ortotrópica e com crescimento vertical foram escolhidas de um único ramo para representar os três principais estádios de crescimento: (a) jovem, com 17 mm de comprimento; (b) em expansão, com 21 mm de comprimento; (c) madura, com 38 mm de comprimento e completamente desenvolvida. A FIGURA 5.12 mostra as imagens ópticas (fotografias) das três folhas selecionadas para o estudo.

O preparo de amostra (*imprint*) foi realizado seguindo o mesmo procedimento descrito no Capítulo 4, item 4.3.2. A instrumentação e a análise por DESI-MSI também seguem o procedimento descrito no Capítulo 4, item 4.3.3. Entretanto, deve-se destacar que as análises foram conduzidas nos modos de ionização positivo para detecção dos carboidratos e negativo para a detecção dos compostos nitrogenados.

5.4 Resultados e Discussão

O estudo da relação fonte-dreno nas folhas de hortelã foi realizado avaliando-se os carboidratos solúveis e os aminoácidos/ureídeos livres, pois são metabólitos fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Os metabólitos foram identificados e suas estruturas químicas propostas através de suas massas exatas, avaliação do erro entre as massas teórica e experimental e uma confirmação por meio das distribuições isotópicas. Essa identificação foi possível pois o analisador de massas utilizado nesse estudo foi de alta resolução (*orbitrap*), o qual fornece a massa e a provável fórmula molecular com erros mínimos (no presente trabalho erros variando entre -1,432 e 5,769 parte por milhão (ppm) foram obtidos. A TABELA 5.1 apresenta a relação dos metabólitos detectados (carboidratos, aminoácidos e ureídeos), juntamente com sua respectiva fórmula molecular, massa exata teórica e experimental e o erro entre as massas em ppm obtido pelo *software*.

TABELA 5.1 Fórmula molecular e provável identificação dos metabólitos detectados no imprint das folhas de hortelã.

Espécie Iônica	Símbolo	Fórmula	Massa Exata		Erro (ppm)
			Teórica	Experimental	
[fenilalanina – H] ⁻	phe	C ₉ H ₁₀ NO ₂	164.07061	164.07074	0.822
[triptofano – H] ⁻	trp	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	203.08150	203.08194	2.146
[leucina – H] ⁻	leu	C ₆ H ₁₂ NO ₂	130.08626	130.08617	-0.655
[histidina – H] ⁻	his	C ₆ H ₈ N ₃ O ₂	154.06110	154.06116	0.370
[aspartato – H] ⁻	asp	C ₄ H ₆ NO ₄	132.02913	132.02907	-0.486
[asparagina – H] ⁻	asn	C ₄ H ₇ N ₂ O ₃	131.04512	131.04504	-0.6
[tirosina – H] ⁻	tyr	C ₉ H ₁₀ NO ₃	180.06552	180.06575	1.279
[glutamato – H] ⁻	glu	C ₅ H ₈ NO ₄	146.04478	146.04478	-0.029
[ácido alantóico – H] ⁻	all	C ₄ H ₇ N ₄ O ₄	175.04618	175.04644	1.478
[hexose + K] ⁺	hex	C ₆ H ₁₂ O ₆ K	219.02655	219.02781	5.769
[sacarose + K] ⁺	suc	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ K	381.07937	381.08152	5.642
[manitol + K] ⁺	man	C ₆ H ₁₄ O ₆ K	221.04220	221.04188	-1.432
[sorbitol + K] ⁺					

Cada íon apresentado na Tabela 5.1 gerou imagens químicas nos três estádios de maturação das folhas (jovem, em expansão e madura). A discussão da relação fonte-dreno entre as folhas se baseia na comparação das três imagens obtidas de cada íon, as quais compartilham a mesma escala de cor, que varia de preto a vermelho, em que o preto significa ausência do metabólito e vermelho significa sua maior intensidade relativa. Deve-se frisar, no entanto, que outros oligossacarídeos comumente presentes no floema, como a rafinose e a estaquiase, não foram detectados nas análises por DESI-MSI.

5.4.1 Transporte de nitrogênio

Os aminoácidos e o ureídeo detectados nas folhas de hortelã estão listados na TABELA 5.1. Tais metabólitos foram identificados na sua forma desprotonada e, portanto, detectados no modo negativo de ionização. A FIGURA 5.2 apresenta as imagens químicas de cada aminoácido (fenilalanina, triptofano, leucina, histidina, aspartato, asparagina, tirosina e glutamato) e ureídeo (ácido alantóico) identificados, as quais foram geradas a partir do *imprint* das folhas jovem, em expansão e madura. Observa-se que há diferenças marcantes entre as imagens químicas geradas para as três folhas. Tais diferenças estão relacionadas tanto à distribuição de cada metabólito na superfície da folha quanto as respectivas intensidades relativas.

Os aminoácidos e o ureídeo, em geral, se apresentam em maior intensidade na folha jovem em relação às folhas em expansão e madura, exceto para a fenilalanina e o glutamato que possuem a mesma intensidade nos três estádios de maturação. É possível visualizar que, nas folhas jovens, estes aminoácidos se localizam em maior intensidade na base da folha, confirmando que tais metabólitos alcançam as folhas jovens através do floema. Essas observações corroboram com o que a literatura diz pois, durante a ontogêneses, as folhas jovens são os principais drenos de nitrogênio por possuírem maior atividade metabólica e demandarem maior quantidade de proteínas para o crescimento ^[5, 21].

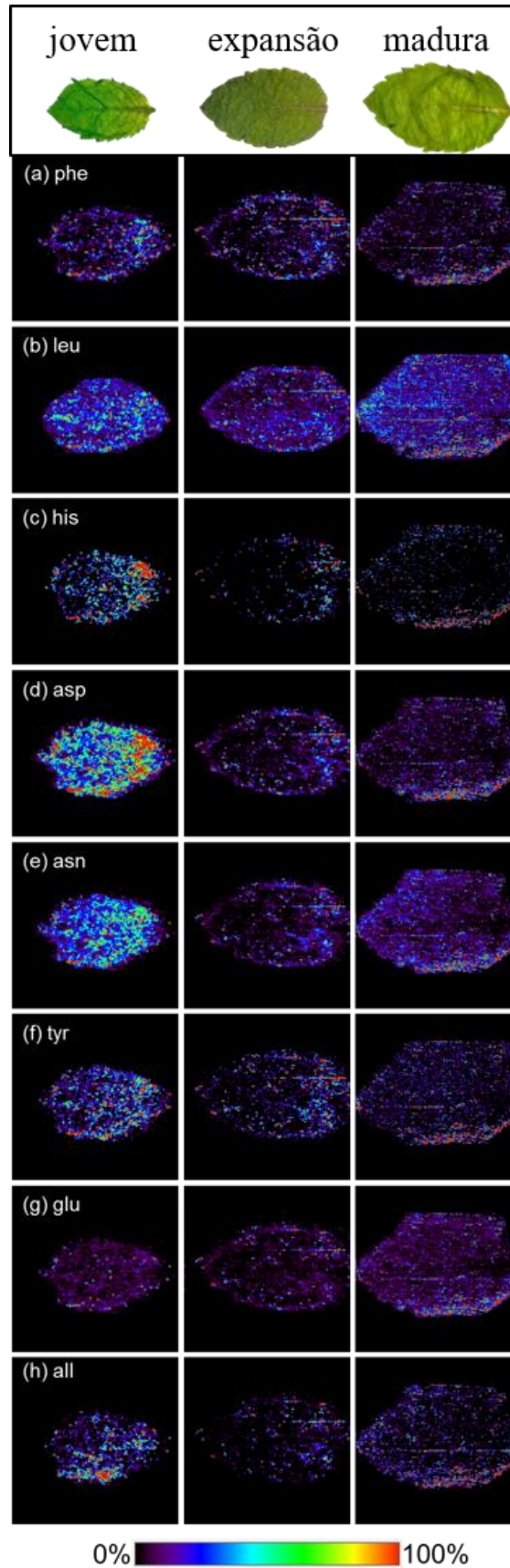
Nota-se que as intensidades dos íons referentes aos aminoácidos histidina (FIGURA 5.2c), aspartato (FIGURA 5.2d), asparagina (FIGURA 5.2e) e tirosina (FIGURA 5.2f) reduzem drasticamente com o desenvolvimento da folha. Percebe-se que na folha em expansão estes aminoácidos estão presentes intensamente na base da folha, o que revela a transição da fase dreno para a fase fonte em que a folha se encontra.

Este fenômeno já era prenunciado para o aspartato e para a asparagina devido suas funções biológicas. O aspartato é um aminoácido metabolicamente reativo, usado como doador de nitrogênio em várias reações de aminotransferase e transportado tanto pelo floema como pelo xilema, sendo essencial para a folha jovem que está em intenso metabolismo^[16]. Já a asparagina é um aminoácido de transporte e armazenamento de nitrogênio nas folhas, sendo transferida diretamente das raízes e das folhas maduras para as folhas jovens através do floema e xilema, respectivamente ^[21]. Devido à localização da asparagina na folha madura, induz-se que o sítio de armazenamento seja na borda da folha.

A imagem química do glutamato apresentada na FIGURA 5.2g, exhibe este aminoácido homogeneamente distribuído e em baixa intensidade entre os três estádios de maturação, sem evidência de predomínio em nenhum deles, resultado este concordante com a literatura ^[12]. Sabe-se que o glutamato é pouco absorvido pela parte aérea da planta, sendo transportado pelo xilema para as folhas maduras, onde é metabolizado ou transferido para o floema para ser transportado para as folhas jovens ou outros tecidos vegetais mais distantes ^[12].

O ácido alantóico é um ureídeo que possui um importante papel no transporte e armazenamento do nitrogênio em várias espécies de plantas. Estudos anteriores demonstram que este composto é produzido pelas raízes e transportado para as outras partes da planta, onde é metabolizado e reassimilado em outro aminoácido ^[16]. A imagem química deste metabólito (Figura 5.2h) indica que o mesmo está presente em maior proporção na folha jovem, estando concentrado principalmente na borda desta folha.

FIGURA 5.2 Imagens químicas dos aminoácidos e ureídeo livres detectados nas folhas da *M. piperita* em três estádios de crescimento (jovem, em expansão e adulta): (a) fenilalanina - phe, (b) leucina - leu, (c) histidina - his, (d) aspartato - asp, (e) asparagina - asn, (f) tirosina - tyr, (g) glutamina - glu, (h) ácido alantóico - all.

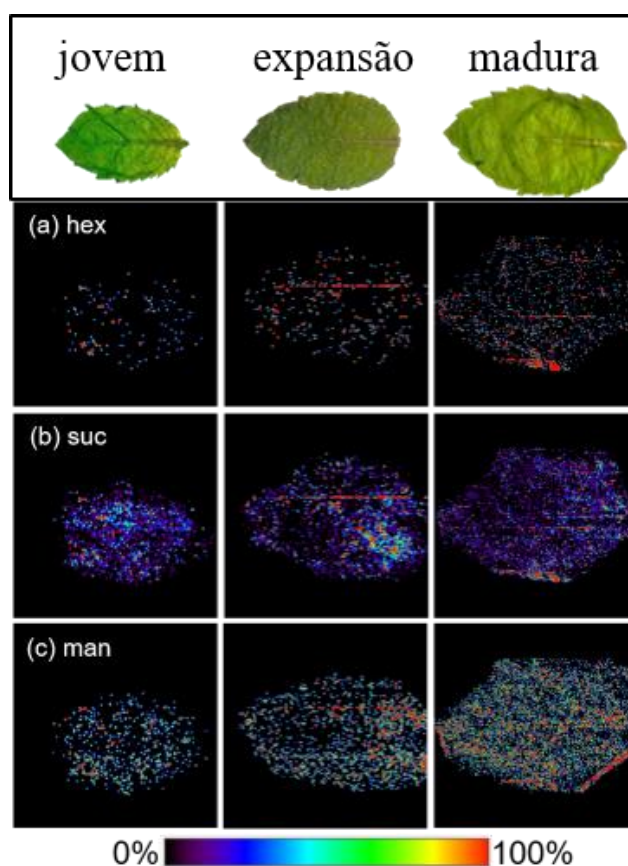


5.4.2 Transporte de carboidratos

Nas folhas da *Mentha x piperita* L. foram detectados (no modo positivo) os carboidratos hexose, sacarose e manitol/sorbitol (TABELA 5.1) sob a forma de adutos de potássio. A detecção dos carboidratos como adutos de potássio é bastante comum em espectrometria de massas. A formação de tais adutos se deve, provavelmente, à grande concentração de potássio no floema ^[1]. As imagens químicas obtidas por DESI-MSI estão apresentadas na FIGURA 5.3.

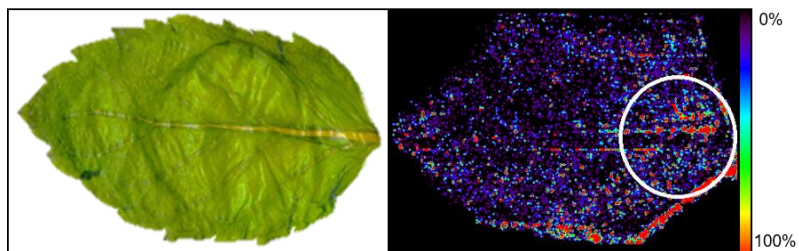
A FIGURA 5.3a apresenta as imagens geradas pelas hexoses isoméricas, ou seja, glicose, frutose, galactose e manose, indistinguíveis pela MS por apresentarem a mesma massa exata. Essas imagens revelam as diferenças em intensidade e distribuição desses carboidratos na superfície das folhas de hortelã de acordo com o estágio de maturação. Na folha jovem as hexoses se apresentam distribuídas por poucos pontos na superfície da folha. Já na folha em expansão, observa-se que houve um aumento na quantidade de pontos referentes às hexoses e, também, em maiores intensidades. Na folha madura as hexoses se apresentam de forma homogênea distribuída por toda a superfície da folha com vários pontos de alta intensidade. Estes resultados estão de acordo com a mudança metabólica que ocorre na ontogênese das folhas. As folhas maduras, as quais estão em alta produção de carboidrato com taxa fotossintética máxima, produzem grandes quantidades de hexoses, enquanto as folhas jovens, que não possuem o maquinário fotossintético eficiente e/ou completo, produz pequenas quantidades desses metabólitos ^[2, 19, 20, 24].

FIGURA 5.3 Imagens químicas dos carboidratos solúveis detectados nas folhas da *Mentha x piperita* L. em três estádios de maturação jovem, em expansão e madura: (a) hexoses - hex, (b) sacarose - sac, (c) manitol/sorbitol-man.



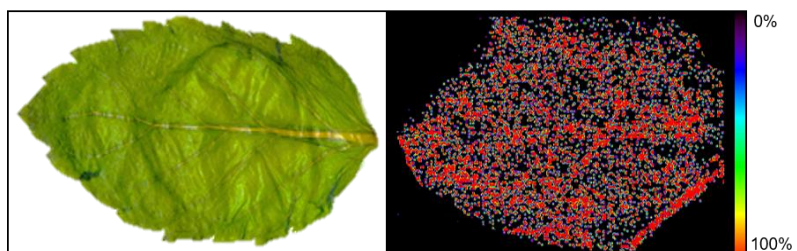
A FIGURA 5.3b apresenta a distribuição espacial da sacarose nas três folhas, onde se observa que há uma homogeneidade deste metabólito no decorrer da maturação. Isto ocorre, pois, a sacarose é produzida pelas folhas maduras e exportada para as folhas jovens, onde é armazenada e metabolizada para produzir energia para seu crescimento. Ressalta-se a localização desse metabólito na folha madura na imagem ampliada da sacarose (FIGURA 5.4) a presença deste carboidrato é mais intensa na nervura principal da folha, provavelmente por ser o sítio de exportação desse metabólito [1, 9-11, 18, 24].

FIGURA 5.4 Imagem química ampliada para a sacarose na folha de hortelã madura. O círculo branco mostra a nervura principal onde a sacarose está concentrada.



Os isômeros manitol e sorbitol possuem, como função fisiológica, o armazenamento de carbono na forma reduzida, além de transporte de carbono via floema [14, 25]. As imagens químicas obtidas estão apresentadas na FIGURA 5.3c, onde se nota que estes metabólitos estão em maior intensidade nas folhas em expansão e madura. Esse resultado corrobora com estudos anteriores sobre fisiologia das plantas, pois sabe-se que o sorbitol e o manitol são sintetizados exclusivamente em folhas maduras devido à falta de enzimas capazes de converter esses açúcares nas folhas jovens [14, 18]. A presença desses metabólitos nas folhas jovens provavelmente é originária das folhas maduras vindas através da relação fonte-dreno. A imagem ampliada da folha madura (FIGURA 5.5) mostra que estes metabólitos isoméricos estão localizados em maior intensidade nas nervuras principal e laterais.

FIGURA 5.5 Imagem química ampliada para o manitol/sorbitol na folha de hortelã madura. Os pontos vermelhos indicam claramente as áreas das nervuras principal e laterais.



5.5 Conclusão

Processos fisiológicos mudam continuamente desde o início até a maturidade das folhas. A alta atividade metabólica nas folhas jovens requer grandes concentrações de carbono e nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento. Técnicas tradicionais, como a fluorescência, marcador radioativo ou isotópico, normalmente usadas para visualizar o transporte e armazenamento de nutrientes, são incapazes de fornecer informações específicas sobre os metabólitos presentes em um dado tecido. A técnica DESI-MSI provou, portanto, ser uma abordagem importante para acessar a distribuição espacial de metabólitos em folhas e certamente em outros tecidos vegetais. Os resultados aqui relatados representam a primeira aplicação do DESI-MSI para evidenciar a translocação da fonte-dreno nas folhas das plantas. A metodologia também tem o potencial de fornecer informações abrangentes sobre o transporte nutricional de tecidos vegetais distintos e acessar informações importantes sobre outros processos bioquímicos dentro das células vegetais.

Referências Bibliográficas

1. Lalonde, S., et al., *Phloem loading and unloading of sugars and amino acids*. Plant Cell Environ, 2003. **26**: p. 20.
2. Turgeon, R., *Phloem Loading: How Leaves Gain Their Independence*. BioScience, 2006. **56**(1): p. 10.
3. Turgeon, R.; Wolf, S., *Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking*. Ann Rev Plant Biol, 2009. **60**: p. 207-21.
4. Heldt, H. W.; Heldt, F., *Plant Biochemistry*. third edition ed. 2004, San Diego, California - USA: Elsevier Academic Press. 656.
5. Kursar, T. A.; Coley, P. D., *Nitrogen Content and expansion rate of young leaves of rain forest species: implications for herbivory*. Biotropica, 1991. **23**(2): p. 11.
6. Lin, Z. F.; Ehleringer, J., *Effects of leaf age on photosynthesis and water use efficiency of papaya*. Photosynthetica, 1982. **16**(4): p. 6.
7. Wolf, S., *Effect of leaf age on photosynthesis, carbon transport and carbon allocation in potato plants*. Potato Res, 1993. **36**: p. 10.
8. Amiard, V., et al., *Carbohydrate and amino acid composition in phloem sap of *Lolium perenne* L. before and after defoliation*. Can J Botany, 2004. **82**(11): p. 1594-1601.
9. Turgeon, R.; Webb, J.A., *Leaf Development and Phloem Transport in *Curcubita pepo*: Maturation of the Minor Veins*. Planta, 1976. **129**: p. 5.
10. Voirin, B.; Bayet, C., *Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha x piperita* leaves from individual peltate trichomes*. Phytochemistry, 1996. **43**(3): p. 8.
11. Turgeon, R., *The sink-source transition in leaves*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1989. **40**: p. 20.
12. Dickson, R. E., *Carbon and nitrogen allocation in trees*. Ann sci forest, 1989. **46**(Supplement): p. 17.
13. van Bel, A. J.; Hess, P. H., *Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma?* J Exp Bot, 2008. **59**(2): p. 261-72.
14. Loescher, W. H., *Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants*. Physiol Plantarum, 1987. **70**(3): p. 553-557.
15. Noiraud, N., et al., *Transport of polyols in higher plants*. Plant Physiol. Biochem., 2001. **39**: p. 12.

16. Tegeder, M., *Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement*. J Exp Bot, 2014. **65**(7): p. 1865-78.
17. Bachmann, M., et al., *Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of Ajuga reptans*. Plant Physiol., 1994. **105**: p. 11.
18. Loescher, W. H., et al., *Sorbitol Metabolism and Sink-Source Interconversions in Developing Apple Leaves*. Plant Physiol., 1982. **70**: p. 5.
19. Kriedemann, P. E., et al., *Leaf age and photosynthesis in Vitis vinifera L.* Vitis, 1970. **9**: p. 8.
20. Dantas, B. F., et al., *Teor de açúcares solúveis e insolúveis em folhas de videiras, cv. syrah, em diferentes posições no ramo e épocas do ano*. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, 2007. **29**(1): p. 6.
21. Bauer, A., et al., *Amino Acid Metabolism of Pea Leaves diurnal changes and amino acid synthesis from 15N-Nitrate*. Plant Physiol, 1977. **59**: p. 5.
22. Starker, C. G., et al., *Nitrogen Fixation Mutants of Medicago truncatula Fail to Support Plant and Bacterial Symbiotic Gene Expression*. Plant Physiol, 2006. **140**(2): p. 671-680.
23. Truernit, E., *Phloem imaging*. J Exp Bot, 2014. **65**(7): p. 1681-8.
24. Maffei, M.; Scannerini, S., *Fatty acid variability in some Mentha species*. Biochem Syst Ecol, 1992. **20**(6): p. 573-582.
25. Nadwodnik, J.; Lohaus, G., *Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in Plantago major, Plantago maritima, Prunus persica, and Apium graveolens*. Planta, 2008. **227**(5): p. 1079-89.

CAPÍTULO 6 – AVALIAÇÃO DE TRANSGÊNIAS: GRÃOS E FOLHAS DE SOJA

6.1 Introdução

A soja, nome científico *Glycine max* (L.) Merrill, é uma planta pertencente à família Fabaceae, também conhecida como família das leguminosas, por englobar plantas como o feijão, a lentilha e a ervilha ^[1].

A soja possui grande importância econômica mundial. Dados do ano de 2017 revelam que foi produzido 350,8 milhões de toneladas de grãos no mundo. O Brasil é o segundo maior produtor de soja mundial, tendo produzido em 2017 114,1 milhões de toneladas do grão, perdendo apenas para os EUA (produção de 116,9 milhões de toneladas). Dessa produção, o Brasil exportou pouco mais de 63 milhões de toneladas, o que gerou uma receita de US\$ 24,8 bilhões, conquistando o primeiro lugar na escala de exportação mundial ^[2,3].

A soja possui um alto valor nutricional, sendo que, em média, seu grão possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (glicose, frutose e sacarose), fibras e os oligossacarídeos, como rafinose e estaquiose. Por esta razão é amplamente utilizada na alimentação humana, consumida na forma de grão e derivados como queijo tofu, óleo, molho, leite e proteína de soja. Além da alimentação humana, a soja também é utilizada na alimentação animal, mais especificamente no preparo de rações ^[4]. A indústria também utiliza os grãos de soja para a fabricação, por exemplo, de óleo, adesivos, biodiesel, tintas de impressão e materiais estruturais ^[1].

Os altos valores de produção e rendimento das plantações estão intimamente ligados à biotecnologia, principalmente ao melhoramento genético e à resistência aos herbicidas através de organismos geneticamente modificados. Nos três maiores produtores mundiais de soja, EUA, Brasil e Argentina, cerca de 70 a 90% da soja produzida é composta por variedades transgênicas ^[5].

Organismos geneticamente modificados (OGM) são definidos como toda entidade biológica cujo material genético (DNA/RNA) foi alterado por meio de qualquer técnica de engenharia genética, de uma maneira que não ocorreria naturalmente. Quando um OGM é submetido à técnica específica de inserção de um trecho de DNA de outra espécie é considerado

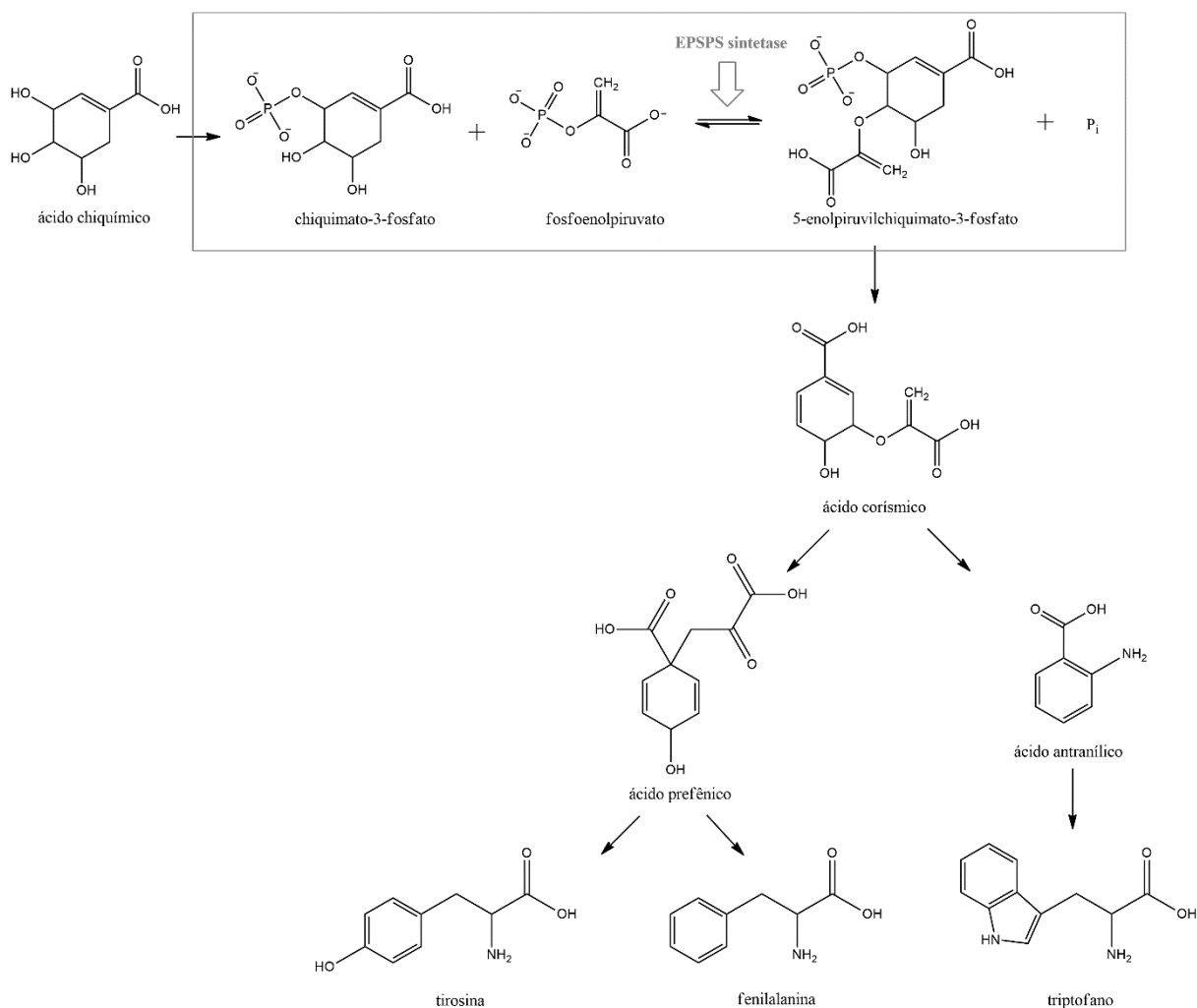
um transgênico. Sendo assim, todo transgênico é um OGM, porém nem todo OGM é um organismo transgênico ^[6].

Existem três razões principais para se desenvolver plantas transgênicas. A primeira razão é melhorar o valor econômico da lavoura, como por exemplo, menor gasto com inseticidas, menor perda por ataque de herbívoros e melhor produtividade. A segunda razão é que plantas transgênicas podem atuar como biorreatores para produção de proteínas ou metabólitos e possuem baixo custo de produção na fabricação de vacinas, por exemplo. A terceira razão é que plantas transgênicas fornecem um meio poderoso para estudar as ações de genes durante o desenvolvimento e outros processos biológicos ^[7].

A história de OGM no Brasil é relativamente nova. A lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, criou a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). A CTNBio é uma instância colegiada multidisciplinar norteadora do desenvolvimento da moderna biotecnologia no Brasil ^[8]. Até outubro de 2017 a CTNBio emitiu parecer técnico favorável à liberação de 14 eventos transgênicos de soja no Brasil. Estes eventos promovem à soja tolerância a diversos herbicidas e/ou resistência a insetos ^[9].

Todas as plantas e micro-organismos possuem a família de enzimas 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Estas enzimas atuam em uma etapa crítica na via metabólica do ácido chiquímico, sendo responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e de muitos metabólitos secundários, tais como o tetrahydrofolato, ubiquinona e a vitamina K. A EPSPS catalisa a reação entre o fosfoenolpiruvato e o chiquimato-3-fosfato, produzindo o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico (FIGURA 6.1) ^[10-12].

FIGURA 6.1 Via do ácido chiquímico e ação da enzima EPSPS sintetase.



O glifosato (N-fosfometil glicina) é um herbicida sistêmico, não seletivo e de largo espectro de ação, capaz de eliminar as plantas invasoras que crescem nas plantações, o qual foi desenvolvido pela indústria Monsanto. O glifosato atua inibindo a síntese da enzima EPSPS, sem a qual não ocorre a reação entre o fosfoenolpiruvato e o chiquimato-3-fosfato e, conseqüentemente, não há produção dos aminoácidos, resultando na morte da planta [10-12].

Tendo em vista que a enzima EPSPS está presente em todas as plantas, o glifosato, além de eliminar as pragas, também elimina a plantação, sem distinção. Para que o uso deste herbicida fosse oportuno, a Monsanto desenvolveu plantas geneticamente modificadas resistentes ou com uma sensibilidade menor a esse herbicida. A soja foi uma destas plantas modificadas, hoje mundialmente comercializada como soja *Roundup Ready*[®] (RR), sendo uma das mais importantes transgenias desenvolvidas para a soja [10-12].

A resistência ao glifosato na soja RR é conferida pela introdução do gene que codifica a enzima CP4-EPSPS, isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4. A enzima

CP4-EPSPS difere da enzima naturalmente presente nas plantas apenas na conformação estrutural, sendo assim, as duas enzimas são funcionalmente equivalentes. No entanto, a CP4-EPSPS apresenta uma afinidade reduzida para o glifosato devido à mudança conformacional, o que confere uma resistência da planta ao herbicida ^[10-12].

A inserção de novos genes em um organismo gera modificações no perfil metabólico da planta, causando dois efeitos. O primeiro são os efeitos intencionais, os quais estão relacionados à característica do gene introduzido, por exemplo, o gene que confere resistência a herbicidas ou o que confere proteção contra insetos. O segundo são os efeitos pleiotrópicos (efeitos não intencionais), os quais são decorrentes da inserção ou da manipulação genética conduzida. Este efeito, que pode ser previsível ou não, acontece quando um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas. ^[10, 11, 13, 14].

Apesar de terem sido realizados estudos anteriores à liberação da soja RR que comprovam a equivalência substancial do OGM, a literatura científica aponta diferenças entre a composição química de plantas transgênicas e seus isogênicos convencionais. Há relatos que na soja transgênica há um aumento no conteúdo de lignina ^[10] e dos metais Cu, Fe, Mn, S e Zn quando comparadas às sojas convencionais ^[15]. Outro estudo aponta a redução nos níveis de fitoestrógenos (genisteína e daidzeína) nas variedades de soja transgênica ^[16]. Diferenças que ocorrem após aplicação de glifosato na soja transgênica também foram avaliadas, sendo observado que há altos teores de glifosato e de seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) nos grãos ^[17], aumento no teor de proteínas e ácido oléico e diminuição do teor de ácido linolênico ^[18].

Os efeitos pleiotrópicos que ocorrem em OGMs devem ser extensamente estudados, tendo em vista que OGMs são cultivados em 185 milhões de hectares ao redor do mundo, principalmente soja, milho e algodão. De toda a soja produzida no Brasil, 96% é transgênica ^[19, 20]. Portanto, cada vez mais os OGMs são introduzidos e expandidos na cadeia alimentar dos animais e humanos e ainda pouco se sabe sobre seus efeitos.

6.2 Objetivos

6.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste capítulo é realizar uma comparação das imagens químicas obtidas via DESI-MSI de grãos e folhas de soja *Roundup Ready*[®] e seu isogênico não modificado geneticamente.

6.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar possíveis efeitos resultantes da modificação genética na síntese e distribuição de metabólitos;
- Avaliar as mudanças metabólicas que ocorrem nas folhas de soja convencional e transgênica, em função do tempo, quando sobre elas é aplicado o herbicida glifosato.

6.3 Divisão do estudo

Para melhor apresentação e compreensão dos dados, este capítulo está dividido em três partes. A primeira parte (item 6.4) mostra a comparação entre as imagens químicas obtidas para as folhas de soja de organismos transgênicos e convencionais. A segunda parte (item 6.5) apresenta a comparação entre as imagens químicas obtidas para os grãos de soja de organismos transgênicos e convencionais. Finalmente, a terceira parte (item 6.6) ilustra o estudo da mudança metabólica nas folhas de soja transgênica e convencional após a aplicação do herbicida glifosato. Em cada parte, será apresentado a metodologia utilizada, bem como os resultados e as discussões pertinentes.

6.4 Avaliação das diferenças metabólicas das folhas de soja transgênica e convencional empregando a técnica DESI-MSI

6.4.1 Materiais e Métodos

6.4.1.1 Materiais

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz e Feijão (EMBRAPA) e o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias (CTPA), ambos localizados em Goiânia-GO, forneceram os grãos de soja para a realização desta pesquisa. As duas cultivares estudadas foram a cultivar geneticamente modificada, Luziânia RR e sua isogênica não modificada, Luziânia. Estes grãos foram plantados em vasos individuais sob as mesmas condições de solo, luz, temperatura, irrigação e fatores externos. O experimento foi realizado após atingir 20 dias do cultivo, quando a folha estava no estágio V3. Para as análises por DI-ESI-MS e DESI-MSI foi utilizado o solvente metanol grau HPLC (Tedia).

6.4.1.2 Análise por DI-ESI-MS e tratamento quimiométrico

A metodologia foi desenvolvida pelo grupo, para este estudo a mesma foi otimizada para se obter melhores resultados. Para tanto, os extratos metanólicos das folhas de soja foram preparados pesando-se 10 mg de folhas e macerando em 500 μL de metanol sob ultrassom por 10 minutos. O extrato foi analisado usando o espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) utilizando a fonte de ionização *electrospray* (ESI). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: voltagem do capilar 3,5 kV, temperatura do capilar 320°C, solvente metanol, fluxo de injeção 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo de ionização com faixa de m/z 100 a 1000. Os espectros de massas foram processados utilizando o software *Qual Browser Xcalibur*. Os espectros de massas geradas para os extratos metanólicos foram submetidos à análise quimiométrica. A análise de componentes principais (PCA) foi executada utilizando o *software* MATLAB 7.9.0.529 (Natick, Massachusetts, EUA), com adição de um pacote de métodos quimiométricos pela instalação do PLS Toolbox 5.2.2 (Manson, Washington, EUA).

6.4.1.3 Análise por DESI-MSI

A metodologia foi desenvolvida pelo grupo, para este estudo a mesma foi otimizada para se obter melhores resultados. A análise do DESI-MSI foi realizada através do *imprint* das folhas em uma placa de sílica gel HPTLC. Três folhas de cada cultivar foram escolhidas e dispostas lado a lado em cima de uma placa de sílica gel HPTLC sendo que, posteriormente, uma segunda placa foi colocada sob as folhas para se gerar o *imprint*. Em seguida, foi feita uma pressão manual com um rolo de vidro para que os analitos fossem transferidos das folhas para placa. O tempo em que as amostras foram mantidas sob pressão foi de 60 segundos. Após o *imprint*, a placa referente ao lado abaxial da folha (o lado de baixo) foi escolhida e utilizada para a análise por DESI-MSI por possuir menor resistência na transferência da seiva da folha.

A análise por DESI-MSI foi conduzida no espectrômetro de massas *Q Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific - Alemanha), instalado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. A fonte de ionização utilizada foi a DESI (Omni Spray Ion Source 2-D, modelo OS-3201, Prosolia, EUA).

Os parâmetros utilizados na operação do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram: voltagem do capilar de 1,5 kV, temperatura do capilar de 250°C, resolução de 70.000; o solvente utilizado para o spray foi o metanol com o fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; a faixa de massa analisada foi m/z 100 a 1000 no modo de ionização positivo. Para a plataforma móvel determinou-se o tamanho do passo de 200 μm , tamanho do pixel de 200 μm x 200 μm e taxa de varredura de 740 $\mu\text{m sec}^{-1}$. As condições apresentadas, inclusive a geometria da fonte, foram resultantes de um procedimento de otimização visando a obtenção da melhor resposta dos sinais e consequente resolução de imagem. Os espectros de massas foram processados pelo *software* Qual Browser Xcalibur, as imagens convertidas utilizando o *software* Firefly (versão 2.1.05) e visualizadas pelo *software* BioMAP (versão 3.8.04).

6.4.2 Resultados e Discussão

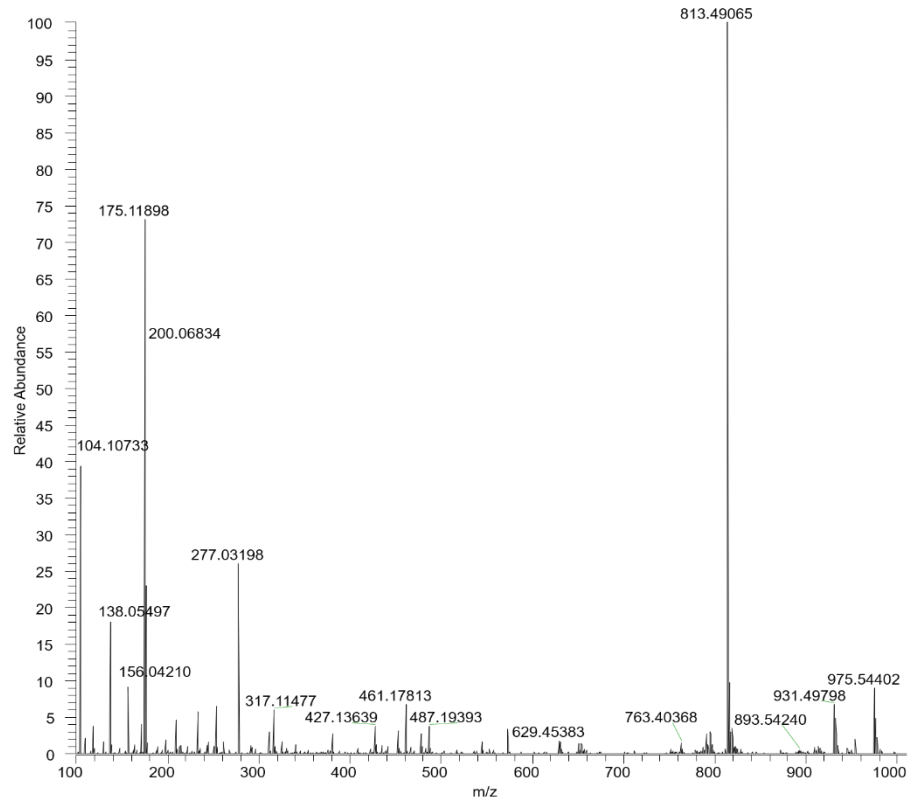
6.4.2.1 Análise por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos das folhas de soja transgênica e convencional. Aplicação de quimiometria aos dados gerados

O perfil metabolômico foi estudado selecionando uma cultivar de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato, cultivar Luziânia RR, e sua isogênica convencional, Luziânia. Ambas foram cultivadas sob as mesmas condições (solo, temperatura, incidência solar e irrigação). Portanto, as diferenças encontradas no perfil metabólico são resultantes apenas da modificação genética.

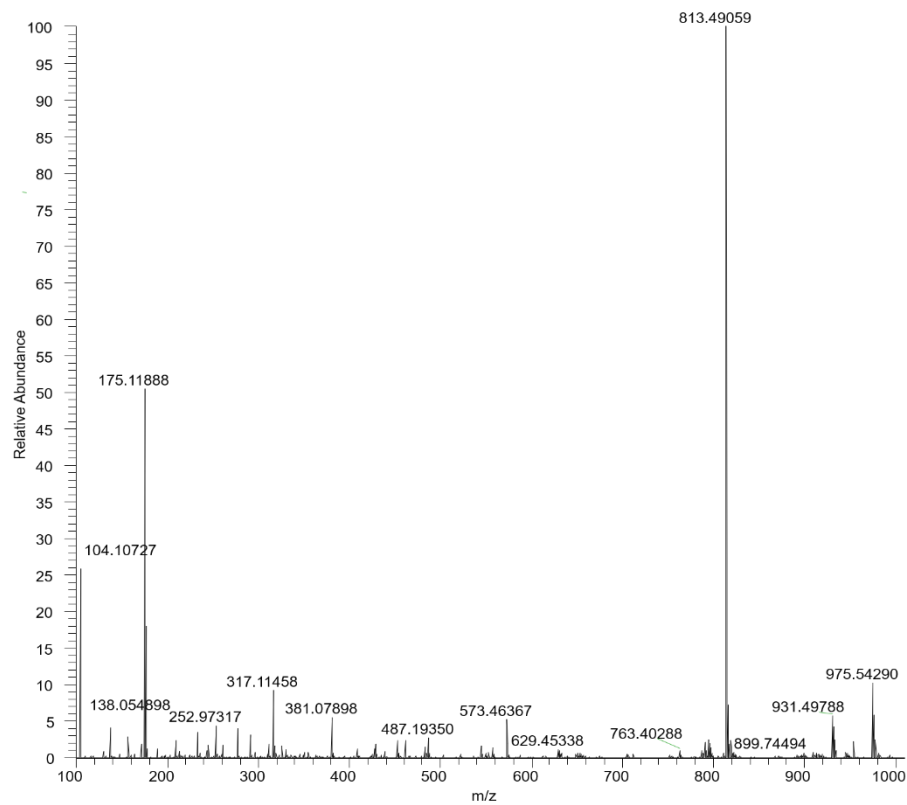
A análise por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos das folhas de soja transgênica e convencional gerou os *fingerprints* de cada amostra, isto é, espectros de massas que mostram o perfil dos metabólitos que estão presentes nos dois tipos de folhas (transgênica e convencional). Estes espectros de massas são apresentados nas FIGURA 6.2a e FIGURA 6.2b para as folhas de soja transgênica e convencional, respectivamente.

FIGURA 6.2 Espectro de massas do extrato metanólico das folhas de soja obtidos no modo de ionização positivo: (a) transgênica e (b) convencional.

a) Transgênica



b) Convencional

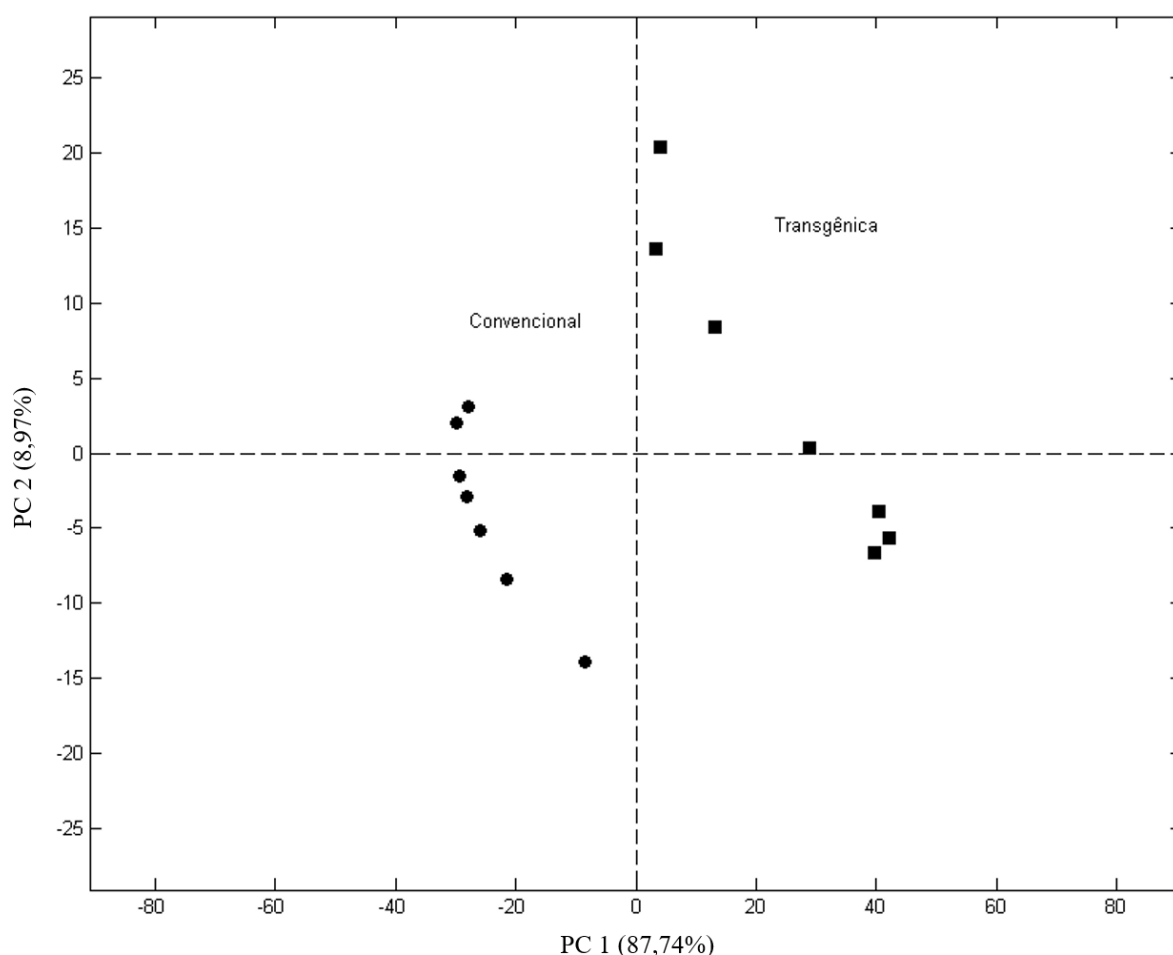


Analisando-se os dois espectros de massas, observa-se que há diferenças nas intensidades relativas de alguns íons, tais como os íons de m/z 104, m/z 138, m/z 156, m/z 175, m/z 277, m/z 461, os quais estão em maior intensidade na folha da soja transgênica em relação à folha de soja convencional.

A análise quimiométrica foi realizada para verificar se há alguma tendência ou agrupamento nesses dados. Escolheu-se o método PCA (análise de componentes principais), um método não supervisionado de análise exploratória de dados, capaz de projetar os dados multivariados, obtidos pela MS, em uma dimensão reduzida [21].

A FIGURA 6.3 apresenta o gráfico dos *escores* de PC1 *versus* PC2, o qual condensou mais de 96% da informação obtida nos espectros de massas.

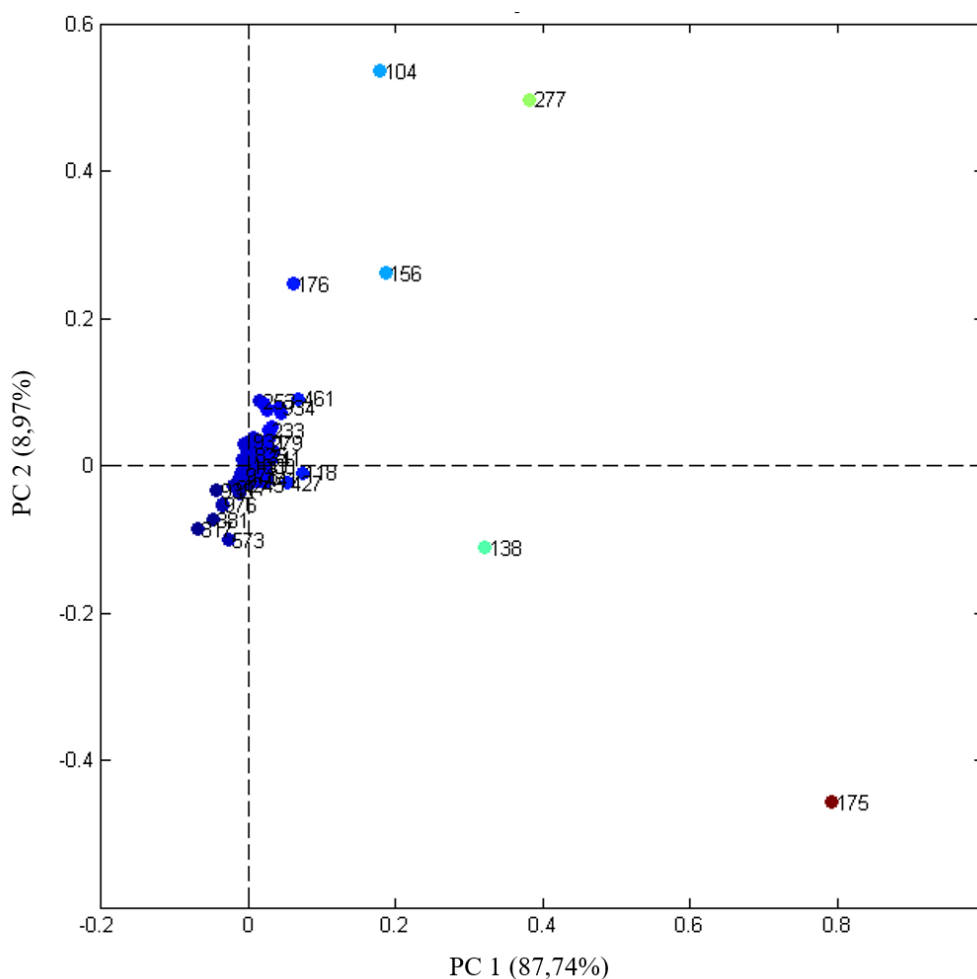
FIGURA 6.3 Gráfico dos *escores* de PC1 *versus* PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja.



A FIGURA 6.3 mostra que a primeira componente principal (PC1), com 87% de variância, separou completamente as amostras convencionais das transgênicas, mostrando que os dois grupos são distintos entre si.

As informações sobre as variáveis responsáveis pelo agrupamento das amostras estão apresentadas no gráfico dos pesos, FIGURA 6.4.

FIGURA 6.4 Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja.



O gráfico dos pesos apresenta os íons que promoveram a discriminação entre as folhas de soja transgênica e convencional (FIGURA 6.4). Nota-se que grande parte dos íons estão aglomerados no centro do gráfico, significando que são comuns aos dois grupos de amostras e não foram responsáveis pela separação. Por outro lado, os seguintes íons promoveram a separação das amostras em dois grupos distintos: m/z 104, m/z 138, m/z 156, m/z 175, m/z 176 e m/z 277. Tais íons discriminaram a folha de soja transgênica, enquanto que a discriminação

da folha de soja convencional se deu por poucos íons, os quais apresentaram uma pequena influência.

Utilizando as massas exatas, as respectivas razões isotópicas, os baixos erros entre as massas experimentais e teóricas e a literatura científica, foi possível identificar alguns destes íons discriminantes, os quais são apresentados na TABELA 6.1.

TABELA 6.1 Metabólitos que possuem maior influência na separação entre as amostras de soja transgênica e convencional.

Massa Exata	Espécie iônica	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Metabólito proposto
104,10729	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₃ NO	2,876	colina
138,05496	[M+H] ⁺	C ₇ H ₈ NO ₂	0,036	trigonelina
156,04210	[M+K] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-0,237	valina
175,11898	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	0,158	arginina
176,01078	[M+K] ⁺	C ₇ H ₈ NO ₂	-0,323	trigonelina
277,03198	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ O ₁₀ P	0,254	ácido 6-fosfogluconico

O íon de m/z 104 refere-se ao metabólito colina, uma vitamina do complexo B, uma vitamina encontrada na soja [22]. Os íons de m/z 138 e m/z 176 referem-se à trigonelina protonada e seu aduto de potássio, respectivamente. Este metabólito é um alcaloide que está presente nas sementes, folhas, raízes, caules e vagens da soja [23-25]. O íon de m/z 156 refere-se ao aduto de potássio do metabólito valina, um aminoácido encontrado em altas concentrações na soja [26]. Outro aminoácido identificado foi a arginina, íon de m/z 175, cuja rota biossintética em soja já foi previamente estudada [27]. O íon de m/z 277, corresponde, provavelmente, ao ácido 6-fosfogluconico que é um intermediário na via das pentoses-fosfato, um caminho alternativo para se de oxidar a glicose [28]. Observa-se que a soja transgênica possui maior intensidade desses íons quando comparada à soja convencional.

Estes resultados revelam que os perfis metabólicos das sojas transgênica e convencional são semelhantes, sendo que a principal diferença está na intensidade dos metabólitos-diagnóstico expostos na TABELA 6.1. Também se observou que não há a ocorrência de metabólitos presentes exclusivamente em uma das amostras. Tais resultados indicam, portanto, que as rotas biossintéticas presentes nas amostras de soja transgênica e convencional são semelhantes já que levam à obtenção dos mesmos metabólitos. A única diferença entre estas

amostras, provavelmente, refere-se ao maior conteúdo de tais metabólitos-diagnóstico nas amostras transgênicas.

6.4.2.2 Imagens químicas obtidas via DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nas folhas de soja transgênica e convencional

A partir de uma única análise por DESI-MSI, foram obtidas várias imagens referentes a diversos metabólitos encontrados nas folhas das sojas transgênica e convencional. Todas as imagens obtidas foram avaliadas, entretanto, devido à grande quantidade de informação gerada, selecionou-se apenas onze imagens para a apresentação. Tais imagens referem-se aos metabólitos discriminantes entre os dois tipos de amostra. Como explicado anteriormente, a identificação de cada um destes metabólitos foi feita utilizando as massas exatas dos íons, as respectivas razões isotópicas, a avaliação dos erros entre as massas experimentais e teóricas e através de pesquisa na literatura científica. A fórmula molecular, massa exata, erro gerado pelo *software* e o nome do metabólito proposto estão apresentados na TABELA 6.2.

TABELA 6.2 Principais metabólitos detectados no imprint das folhas de soja transgênica e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.

Massa Exata	Espécie iônica	Erro (ppm)	Metabólito
160,03687	$[C_7H_7NO_2 + Na]^+$	-0,186	Trigonelina
176,01085	$[C_7H_7NO_2 + K]^+$	0,074	Trigonelina
138,05496	$[C_7H_7NO_2 + H]^+$	0,036	Trigonelina
118,08636	$[C_5H_{11}NO_2 + H]^+$	0,888	Valina/Betaina
132,10199	$[C_6H_{14}NO_2 + H]^+$	0,642	Leucina
155,04270	$[C_4H_8N_2O_3 + Na]^+$	-0,086	Asparagina
140,06819	$[C_5H_{11}NO_2 + Na]^+$	-0,070	Valin/Betaina
156,04211	$[C_5H_{11}ON_2 + K]^+$	-0,173	Valina/Betaina
217,06805	$[C_7H_{14}O_6 + Na]^+$	-0,964	Metil-inositol
411,16275	$[C_{18}H_{28}O_9 + Na]^+$	0,478	Glicosídeo do ácido tuberônico
445,20436	$[C_{19}H_{34}O_{10} + Na]^+$	-0,131	Primeverosídeo 1-octen-3-il

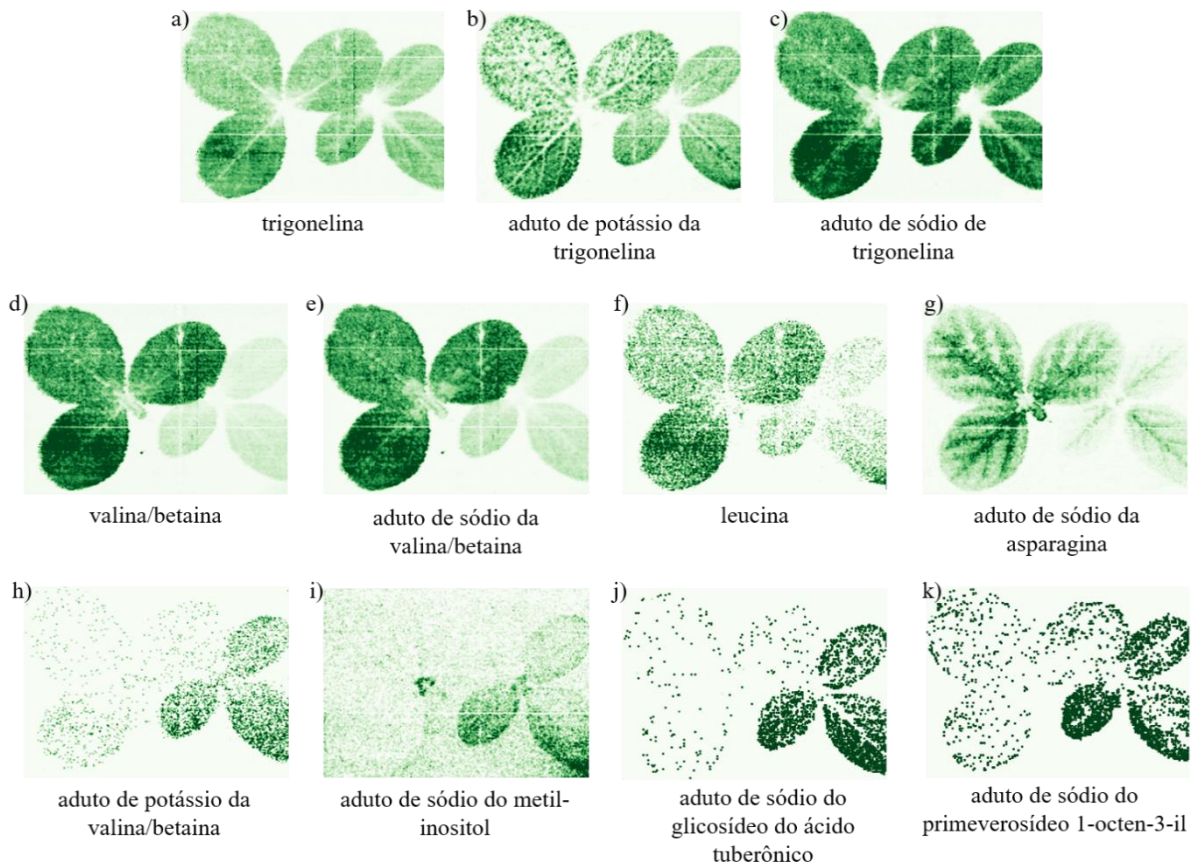
A avaliação das imagens químicas dos metabólitos detectados na superfície das folhas de soja transgênica e convencional revela um mapa da distribuição destes compostos. A cor da

escala varia de branco até verde escuro, o que codifica as regiões de ausência e de máxima concentração do metabólito, respectivamente, como mostrado na FIGURA 6.5. As imagens químicas dos metabólitos discriminantes selecionados neste estudo (TABELA 6.2) são apresentadas na FIGURA 6.6.

FIGURA 6.5 Imagens ópticas das folhas de soja transgênica e convencional (a.) e do imprint resultante (b). Distribuição espacial do metabólito trigonelina pelas folhas de soja (c).



FIGURA 6.6 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nas folhas de soja transgênica e convencional. a- c: apresentam a trigonelina igualmente presente nas duas plantas; d-g: apresenta metabólitos mais intensos nas folhas convencional; h-k: apresenta metabólitos mais intensos nas folhas transgênica.



As FIGURAS 6.5a e 6.5b mostram as imagens ópticas (fotografias) das folhas de soja analisadas e o *imprint* resultante. A FIGURA 6.5c mostra a distribuição espacial do metabólito trigonelina pelas folhas transgênica e convencional, onde se observa nitidamente a escala de cor estabelecida. A trigonelina foi identificada em sua forma protonada (m/z 138,05496), como mostrado na TABELA 6.2.

As imagens químicas apresentadas na FIGURA 6.6a-c referem-se aos íons que são comuns aos dois cultivares e que geraram imagens químicas com intensidades semelhantes entre a folha convencional e transgênica, mostrando que a análise foi procedida de forma correta e que não houve favorecimento entre as cultivares. Estas três imagens pertencem a um único metabólito, a trigonelina, o qual foi detectado em sua forma protonada (m/z 138,05496) e como adutos de potássio (m/z 176,01085) e de sódio (m/z 160,036877).

As imagens químicas mostradas na FIGURA 6.6d-g referem-se aos metabólitos que estão presentes nas duas cultivares de soja, porém em maior intensidade nas folhas de soja convencional em relação à transgênica. Os íons de m/z 118,08636 e m/z 140,06819 são, provavelmente, referentes aos aminoácidos isoméricos valina/betaina em suas formas protonadas e como aduto de sódio, respectivamente. Os íons de m/z 132,10199 e m/z 155,04270 referem-se às formas protonadas dos aminoácidos leucina e asparagina, respectivamente. Observa-se que a valina/betaina e a leucina estão espalhadas por todo o limbo da folha, ao contrário da asparagina, cuja maior concentração é verificada nas nervuras.

As imagens químicas das FIGURA 6.6h-k referem-se aos metabólitos que estão presentes em maior intensidade nas folhas de soja transgênica em relação à convencional. O íon de m/z 156,04211 refere-se ao aduto de potássio dos aminoácidos isoméricos valina/betaina, o qual ocorre em menor intensidade na soja convencional. O íon de m/z 217,06805 refere-se à forma protonada do metil-inositol e seus isômeros, bornesitol, ononitol e pinitol. Tais metabólitos estão presentes por toda a folha da soja transgênica e apenas no pecíolo das folhas convencionais. O íon de m/z 411,16275 está relacionado à forma protonada do glicosídeo do ácido tuberônico, um precursor do ácido jasmônico. Por outro lado, o íon de m/z 445,20436 provavelmente refere-se à forma protonada do metabólito primeverosídeo 1-octen-3-il, o qual pertence à classe dos acil-glicosídeos graxos de mono- e dissacarídeos. Observa-se que tanto o glicosídeo do ácido tuberônico quanto o primeverosídeo 1-octen-3-il estão presentes em grande intensidade apenas no limbo das folhas transgênicas. Vale ressaltar que tais metabólitos, principalmente o metil-inositol e seus isômeros bornesitol, ononitol e pinitol, os aminoácidos valina/betaina e glicosídeo do ácido tuberônico, são detectáveis em altas intensidades nas folhas

de soja transgênica, mas são quase imperceptíveis nas folhas de soja convencional. Deste modo, tais resultados parecem indicar que apesar de serem naturais da planta, a biossíntese de tais metabólitos é intensificada pela transgenia.

Concluindo, estes resultados corroboram com os dados apresentados no gráfico de PCA dos extratos metanólicos das folhas de soja transgênica e convencional (FIGURA 6.3). As duas cultivares apresentam perfis metabólicos semelhantes, mas a grande diferença está relacionada à intensidade diferenciada de metabólitos específicos em cada cultivar.

6.5 Avaliação das diferenças metabólicas de grãos de soja transgênico e convencional empregando a técnica DESI-MSI e DI-ESI-MS

6.5.1 Materiais e Métodos

6.5.1.1 Materiais

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Arroz e Feijão (EMBRAPA) e o Centro Tecnológico para Pesquisas Agropecuárias (CTPA), ambos localizados em Goiânia-GO, forneceram os grãos de soja para a realização desta pesquisa. As duas cultivares estudadas foram a cultivar geneticamente modificada, Luziânia RR, e sua isogênica não modificada, Luziânia. Para as análises de DI-ESI-MS e DESI-MSI foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Tedia).

6.5.1.2 Análise por DI-ESI-MS e tratamento quimiométrico

A metodologia foi desenvolvida pelo grupo e otimizada para este estudo com o intuito de se obter melhores resultados. Os extratos metanólicos dos grãos de soja foram preparados pesando-se 2 mg dos grãos de soja, moídos com o auxílio de um gral e pistilo. Posteriormente foram macerados em 5 mL de metanol sob ultrassom por 10 minutos. O extrato foi analisado usando o espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) com fonte de ionização *electrospray* (ESI). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: voltagem do capilar 3,5 kV, temperatura do capilar 320°C, solvente metanol, fluxo de injeção 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização, numa faixa de massa de m/z 100 a 1000 e avaliados utilizando o *software Qual Browser Xcalibur*.

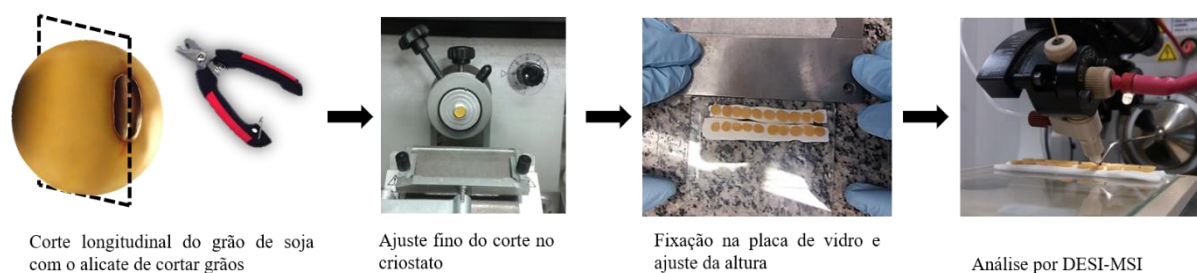
Os resultados obtidos do extrato metanólico dos grãos de soja foram submetidos à análise quimiométrica. A análise de componentes principais (PCA) foi executada utilizando o *software* MATLAB 7.9.0.529 (Natick, Massachusetts, EUA) com adição de um pacote de métodos quimiométricos pela instalação do *software* PLS Toolbox 5.2.2 (Manson, Washington, EUA).

6.5.1.3 Análise por DESI-MSI

A metodologia foi desenvolvida pelo grupo e otimizada para obter melhores resultados. Os grãos foram mergulhados em uma solução de hipoclorito de sódio 10% m/V por 1 minuto e, em seguida, foram lavados com água corrente e secos naturalmente. A superfície de interesse utilizada nas análises por DESI-MSI foi o centro do grão. Para expor essa superfície, retirou-se a casca dos grãos e cortou-se os mesmos longitudinalmente utilizando um alicate para cortar grãos. Como o método exige uma superfície plana, realizou-se ajustes finos no corte com um criostato (Leica CM1850) localizado no Laboratório de Estudos da Dor (LED) na UNICAMP. Para tanto, os grãos de soja cortados foram fixados no disco para amostras usando um polímero (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek). Em seguida, aplicou-se a lâmina de corte do criostato para se gerar uma superfície totalmente plana, como mostra a FIGURA 6.7.

Cinco grãos de soja transgênica e quatro grãos da soja convencional cortados e com a superfície plana foram fixados em uma placa de vidro. Para que os grãos fossem fixados na mesma altura, foi necessário desenvolver um procedimento para a fixação. Inicialmente, foi colocado uma tira de massa de modelagem em uma placa de vidro (aproximadamente 0,5 cm) e, em seguida, colocou-se os grãos dispostos em sequência em cima da massa. Para igualar a altura, utilizou-se uma outra placa de vidro e um suporte (para garantir que a placa não pendesse e formasse um ângulo) e pressionou-se até que as alturas dos grãos se iguallassem, como mostra a FIGURA 6.7.

FIGURA 6.7 Preparo dos grãos de soja para as análises por DESI-MSI.



A análise por DESI-MSI foi realizada com o mesmo equipamento e parâmetros descritos anteriormente no item 6.2.1.3 (análise das folhas de soja).

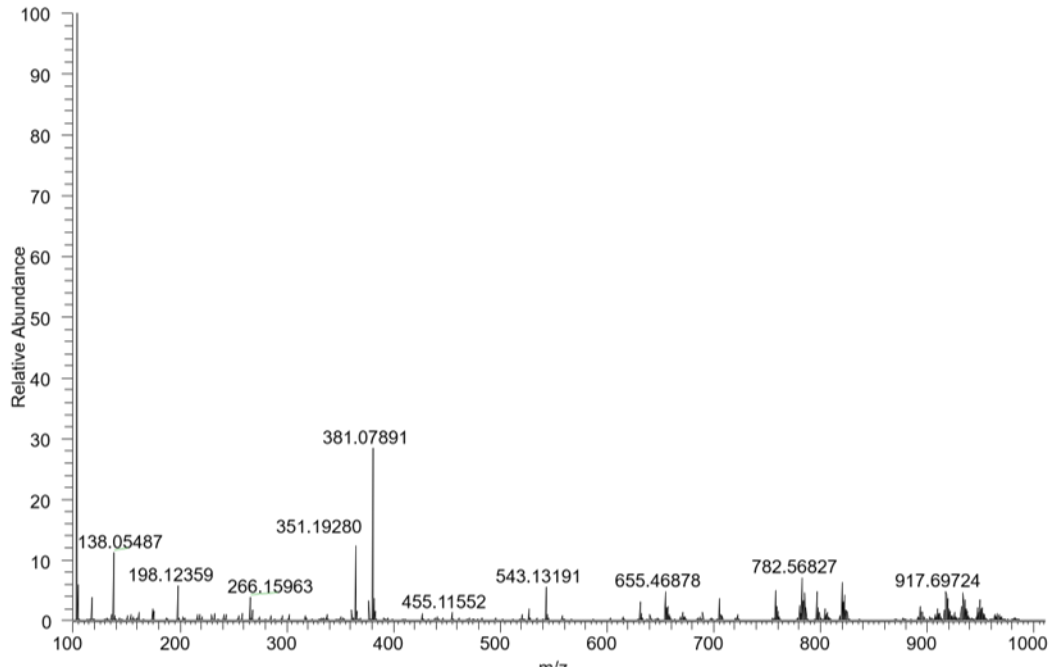
6.5.2 Resultados e Discussão

6.5.2.1 Análise por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos dos grãos de soja transgênico e convencional. Aplicação de quimiometria aos dados gerados

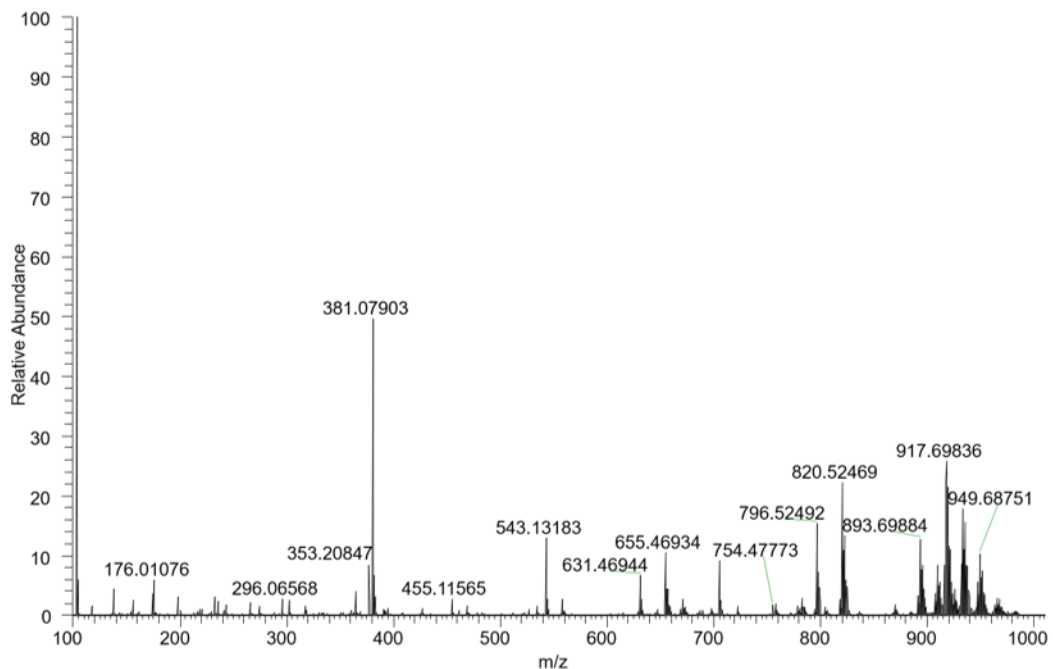
O perfil metabolômico do grão de soja foi estudado selecionando-se uma cultivar de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato, cultivar Luziânia RR, e sua isogênica convencional, Luziânia. Estes grãos são da safra 2015/2016, pertencentes ao banco germoplasma da EMBRAPA Arroz e Feijão em parceria com o CTPA. A análise por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos dos grãos de soja transgênico e convencional gerou os *fingerprints* de cada amostra, isto é, espectros de massas que mostram o perfil dos metabólitos que estão presentes nos dois tipos de grãos (transgênico e convencional). Estes espectros de massas são apresentados nas FIGURA 6.8a FIGURA 6.8b, para os grãos de soja transgênico e convencional, respectivamente.

FIGURA 6.8 Espectro de massas do extrato metanólico dos grãos de soja obtidos no modo de ionização positivo: (a) transgênico e (b) convencional.

a) Transgênica



b) Convencional

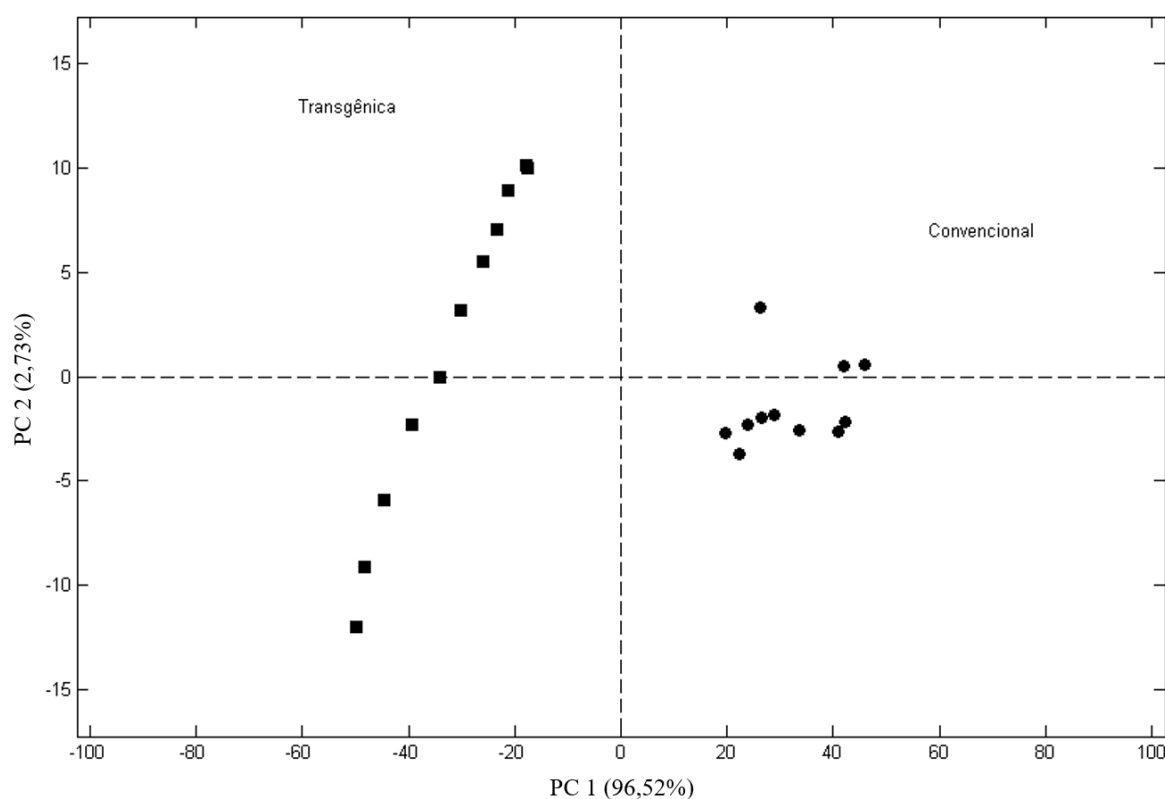


Observa-se que há diferenças, principalmente na intensidade dos íons, nos espectros de massas dos extratos metanólicos dos grãos transgênico e convencional. O espectro de massas do grão transgênico apresenta maior intensidade para os seguintes íons: m/z 138,05487,

m/z 198,12359, m/z 266,15963, m/z 351,19280. Por outro lado, o espectro de massas do grão convencional mostra os seguintes íons mais intensos: m/z 176,01076, m/z 353,20847, m/z 381,07903, m/z 543,13183, m/z 631,4694, m/z 655,46934, m/z 796,52492, m/z 754,47773, m/z 820,52469 e m/z 917,69836, m/z 949,68751.

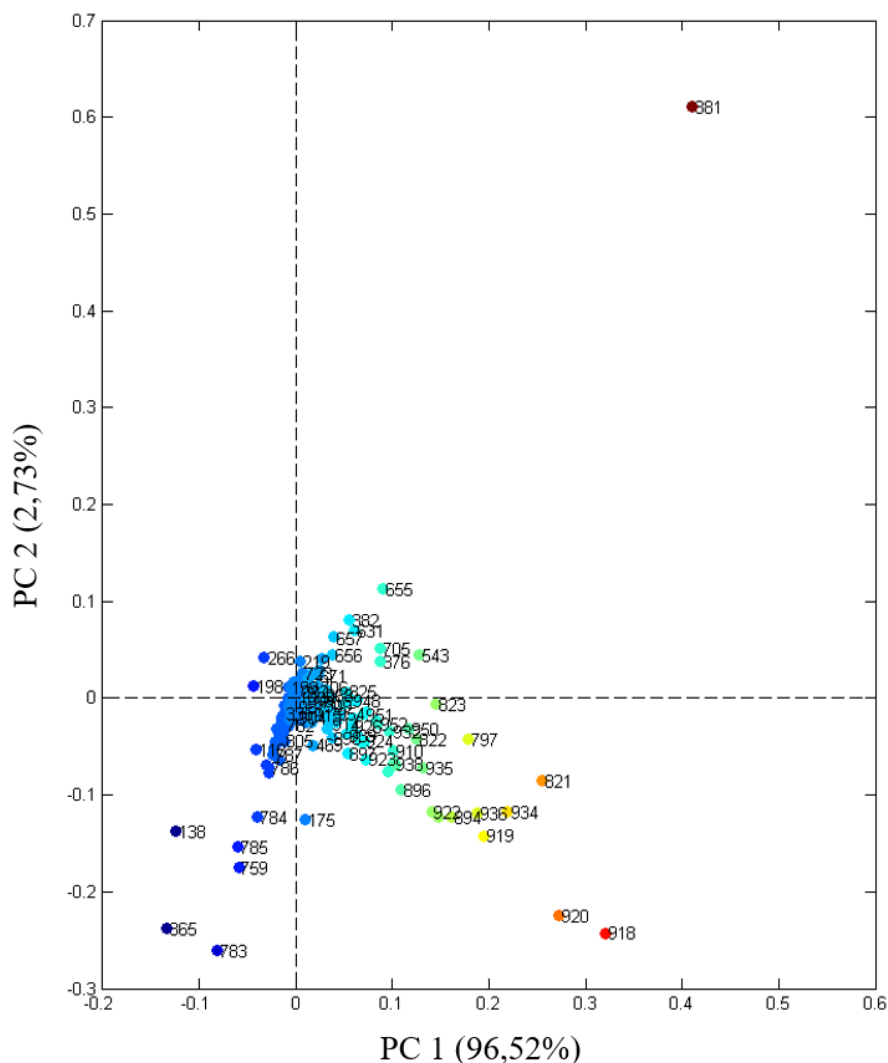
Com os dados oriundos dos espectros de massas, obteve-se o gráfico de PCA para verificar se as amostras transgênicas e convencionais poderiam se formar dois grupos distintos. A FIGURA 6.9 apresenta o gráfico dos *escores* de PC1 *versus* PC2, no qual concentra mais de 99% da informação obtida nos espectros de massas.

FIGURA 6.9 Gráfico dos *escores* de PC1 *versus* PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos dos grãos de soja.



Pelo gráfico PCA observa-se que as duas cultivares de soja foram agrupadas em dois conjuntos distintos, sendo que a PC1 (com 96 % de variância explicada) foi responsável por essa separação. As informações sobre as variáveis que mais influenciaram na distinção entre os dois grupos de amostra são apresentadas no gráfico dos pesos, FIGURA 6.10.

FIGURA 6.10 Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos dos grãos de soja.



Pelo gráfico dos pesos (FIGURA 6.10) observa-se que vários íons são os responsáveis pela distinção entre as cultivares. Os íons que mais influenciaram na separação da soja transgênica são: m/z 138, m/z 175, m/z 198, m/z 266, m/z 665, m/z 759, m/z 783, m/z 784, m/z 785. Os íons que mais influenciam na separação da soja convencional são: m/z 376, m/z 382, m/z 543, m/z 655, m/z 705, m/z 797, m/z 821, m/z 881, m/z 918, m/z 919, m/z 920, m/z 922, m/z 934. Os resultados obtidos com o gráfico de PCA corroboram com a inspeção visual dos espectros de massas das duas amostras, apresentando informações adicionais, as quais não eram possíveis de serem visualizadas na FIGURA 6.8. No entanto, deve-se enfatizar que com os dados disponíveis (massas exatas, distribuições isotópicas e comparação com a literatura) não foi possível propor-se estruturas coerentes para os metabólitos diagnósticos de cada cultivar.

6.5.2.2 Imagens químicas obtidas via DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nos grãos de soja transgênica e convencional

Dezenas de imagens químicas que revelavam diferenças entre os metabólitos presentes nos grãos de soja transgênico e convencional foram obtidas. Entretanto, devido ao grande volume de dados, foram selecionadas apenas nove imagens químicas para serem apresentadas neste estudo.

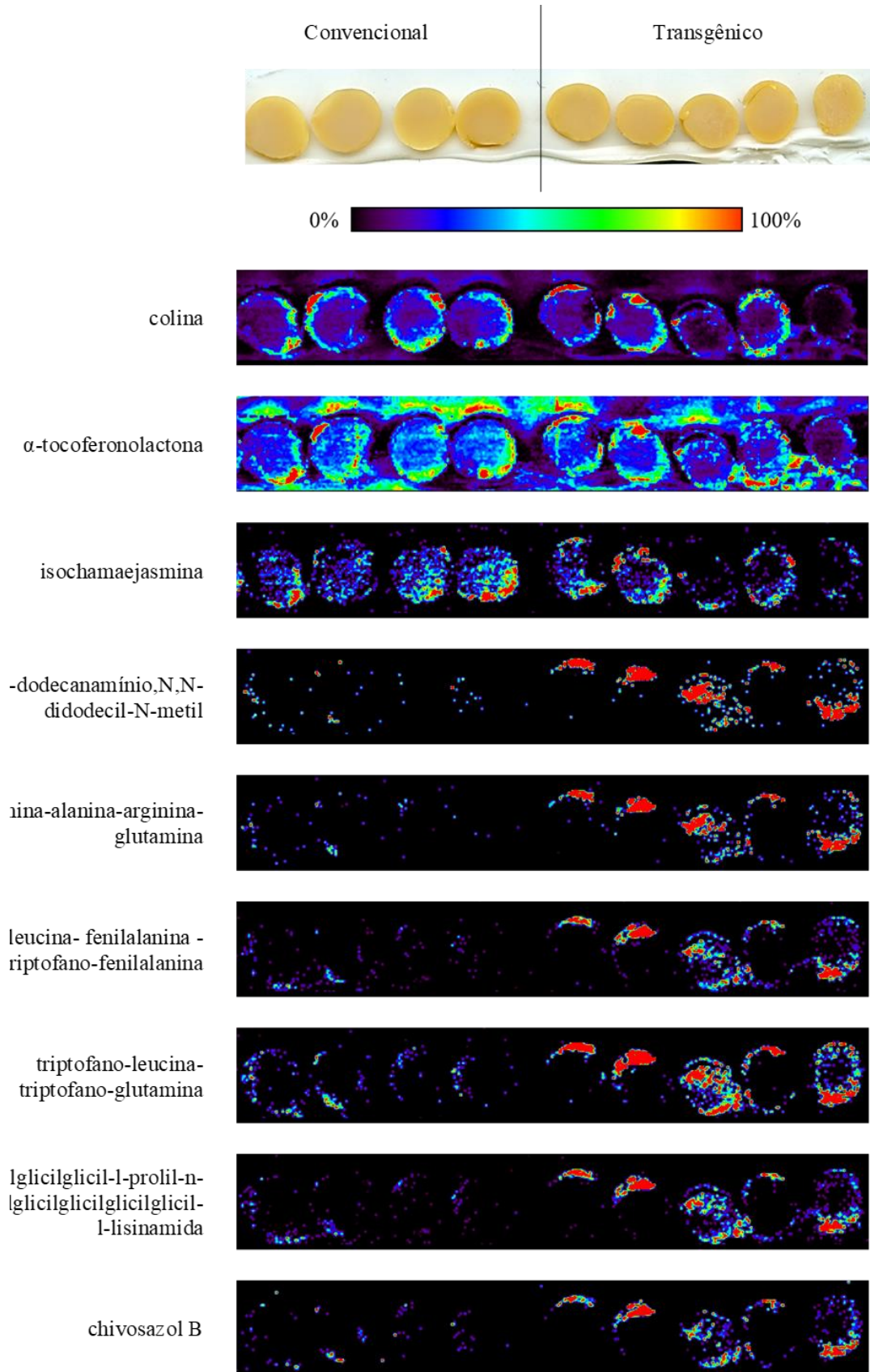
A identificação foi feita utilizando as massas exatas dos íons, suas respectivas razões isotópicas, os erros entre as massas teórica e experimental, e a busca em bancos de dados como Metlin [29], Lipidmaps [30], PubChem [31] dentre outros, finalizando com a confirmação na literatura. A fórmula elementar, as massas exatas, os respectivos erros gerados pelo *software* e o nome de cada metabólito proposto são apresentados na TABELA 6.3.

TABELA 6.3 Principais metabólitos detectados nos grãos de soja transgênico e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.

Massa Exata	Espécie Iônica	Erro (ppm)	Metabólito Proposto
104,10727	$[C_5H_{13}NO + H]^+$	2,684	Colina
279,15885	$[C_{16}H_{22}O_4 + H]^+$	-0,844	α -tocoferonolactona
543,13159	$[C_{30}H_{22}O_{10} + H]^+$	5,554	Isochamaejasmina
537,62122	$[C_{37}H_{78}N + H]^+$	0,962	1-dodecanamínio,N,N-didodecil-N-metil
552,29771	$[C_{20}H_{39}N_{11}O_6 + Na]^+$	0,02	Arginina-Alanina-Arginina-Glutamina
612,31854	$[C_{35}H_{41}N_5O_5 + H]^+$	0,807	Leucina- Fenilalanina -Triptofano- Fenilalanina
632,31744	$[C_{33}H_{42}O_6N_7 + H]^+$	-2,639	Triptofano-Leucina-Triptofano-Glutamina
656,34688	$[C_{26}H_{45}N_{11}O_9 + H]^+$	-0,866	Glicilglicilglicil-L-prolil-N- metilglicilglicilglicil-L-lisinamida
852,49010	$[C_{48}H_{69}NO_{12} + H]^+$	0,994	Chivosazol B

As imagens químicas referentes aos íons escolhidos para o estudo estão apresentadas na FIGURA 6.11.

FIGURA 6.11 Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos principais metabólitos detectados nos grãos de soja transgênico e convencional.



A avaliação das imagens químicas dos metabólitos nos grãos transgênico e convencional revela um mapa da distribuição destes compostos. A FIGURA 6.11 apresenta, na sua primeira parte, a imagem óptica dos grãos de soja analisados, os quais estão divididos em quatro grãos convencionais e cinco transgênicos. Em seguida, é apresentada a escala de cor que foi utilizada para a apresentação das imagens químicas, a qual varia da cor preto até vermelho, indicando as regiões de ausência e de máxima concentração do metabólito, respectivamente. Posteriormente, são apresentadas as imagens químicas obtidas para cada íon descrito na TABELA 6.3.

As três primeiras imagens químicas, referentes aos metabólitos colina (m/z 104,10727), α -tocoferonolactona (m/z 279,15885) e isochamaejasmina (m/z 543,13159), foram apresentadas para demonstrar que o experimento foi conduzido corretamente, pois estes metabólitos estão presentes em todos os grãos de soja e com intensidades elevadas. Sendo assim, quaisquer diferenças nas intensidades das outras imagens são intrínsecas aos grãos.

Observa-se nas próximas imagens (m/z 537,62122, m/z 552,29771, m/z 612,31854, m/z 632,31744, m/z 656,34688 e m/z 852,49010) que todos estes metabólitos estão presentes em maiores intensidades nos grãos de soja transgênica. A presença desses metabólitos nos grãos de soja convencional é ínfima e quase ausente. Uma possível identificação para tais metabólitos é apresentada na TABELA 6.3. As razões que explicam a predominância marcante destes metabólitos nas amostras transgênicas em relação às amostras convencionais são desconhecidas.

Nestes resultados, nota-se um outro cenário, diferente daquele obtido por DI-ESI-MS e revelado pelo gráfico PCA (FIGURA 6.9). Estes resultados distintos, mas não contraditórios, podem ter sido resultantes das diferenças entre as matrizes analisadas. O gráfico PCA foi gerado a partir da análise por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos, enquanto as imagens foram obtidas *in situ* nos grãos de soja pela técnica DESI-MSI. Tais matrizes e metodologias muito distintas provavelmente são responsáveis pelas diferenças observadas nos resultados para os íons marcadores.

Ambos os resultados (DI-ESI-MS e DESI-MSI) mostram que há diferenças entre as amostras de soja, sendo possível a diferenciação entre elas pelos dois métodos. Tais diferenças, assim como aquelas observadas no estudo das folhas de soja, se deram majoritariamente pela intensidade dos metabólitos presentes nas amostras. Sendo assim, pode-se inferir que existe diferenças entre a metaboloma das sojas transgênica e convencional, mas estas diferenças restringem-se à quantidade de alguns metabólitos biossintetizados, embora todos existam naturalmente na amostra convencional.

6.6 Análise do perfil metabolômico das folhas de soja transgênica e convencional sob a exposição ao herbicida glifosato em função do tempo

6.6.1 Materiais e Métodos

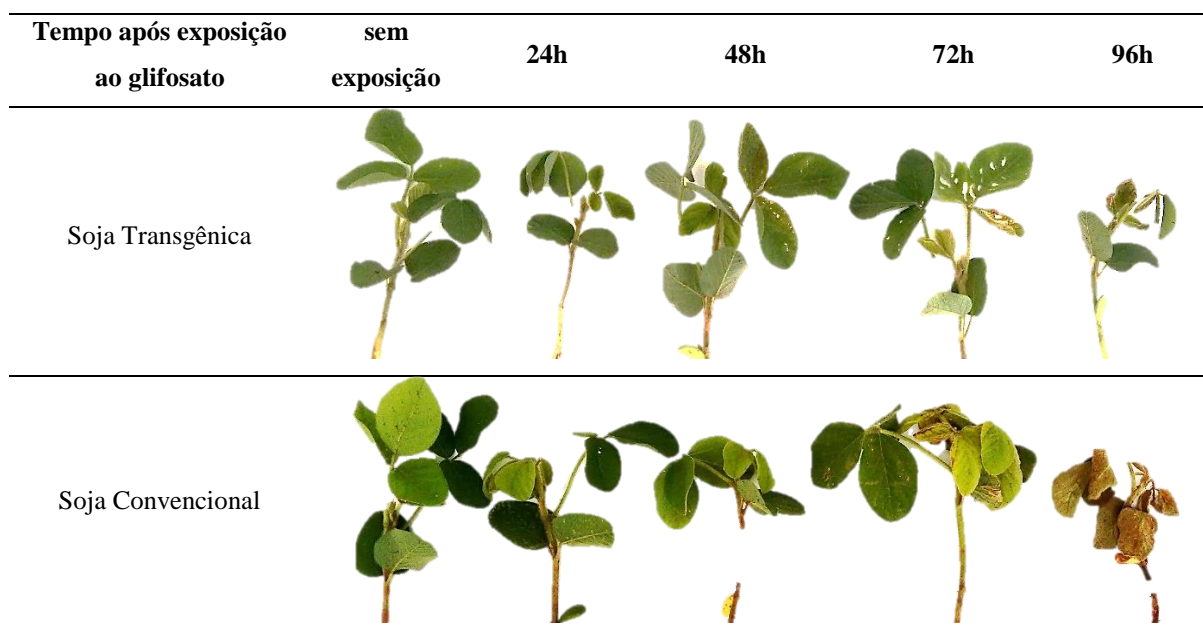
Este estudo foi realizado na fazenda da EMBRAPA Arroz e Feijão, localizada em Goiânia-GO. Duas variedades de soja, uma convencional, BRSGO 7960, e uma transgênica, BRS 7470 IPRO (tolerância ao glifosato e controle de um grupo de lagartas), ambas no estádio V3, foram utilizadas.

Para avaliar as alterações provocadas no metabolismo da soja após uma única exposição ao glifosato em função do tempo. Foi necessário obter cinco amostras de soja convencional e cinco amostras de soja transgênica, cada uma com o tempo de exposição ao glifosato diferente (sem exposição, 24, 48, 72, 96 horas) e que fossem coletadas e analisadas conjuntamente. Assim seguiu-se o seguinte protocolo:

- 1º dia de experimento: pulverizar a solução de glifosato 1% em uma soja convencional e outra transgênica. Coletar após 96 horas. Essas serão as amostras de 96 horas;
- 2º dia de experimento: pulverizar a solução de glifosato 1% em uma soja convencional e outra transgênica. Coletar após 72 horas. Essas serão as amostras de 72 horas;
- 3º dia de experimento: pulverizar a solução de glifosato 1% em uma soja convencional e outra transgênica. Coletar após 48 horas. Essas serão as amostras de 48 horas;
- 4º dia de experimento: pulverizar a solução de glifosato 1% em uma soja convencional e outra transgênica. Coletar após 24 horas. Essas serão as amostras de 24 horas;
- 5º dia de experimento: Coletar todas as amostras pulverizadas com solução de glifosato dos dias anteriores e coletar uma soja convencional e outra transgênica que não foram pulverizadas com solução de glifosato para ser o branco do experimento, ou seja, o tempo zero.

A FIGURA 6.12 apresentada as amostras de soja que foram analisadas neste estudo para cada tempo de exposição do glifosato.

FIGURA 6.12 Plantas de soja transgênica e convencional com 0, 24, 48, 72, 96 h após a exposição ao glifosato.



Os extratos metanólicos de cada amostra foram preparados pesando-se 60 mg de folhas e macerando em 2 mL de metanol e, em seguida, diluídos por 10 vezes.

As análises por DI-ESI-MS dos extratos metanólicos foram conduzidas no espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Os parâmetros instrumentais foram: voltagem do capilar 4,5 kV, temperatura do capilar 300°C, solvente metanol, fluxo de injeção 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo de ionização, na faixa de massa de m/z 100 a 1000. Os espectros de massas foram processados utilizando o *software Qual Browser Xcalibur*.

Os espectros de massas obtidos pelas análises por DI-ESI-MS foram submetidos a análises quimiométricas. A análise de componentes principais (PCA) foi executada no *software* MATLAB 7.9.0.529 (Natick, Massachusetts, EUA) com adição de um pacote de métodos quimiométricos pela instalação do *software* PLS Toolbox 5.2.2 (Manson, Washington, EUA).

6.6.2 Resultados e Discussão

Foi avaliado as alterações nos perfis metabólicos das sojas convencional e transgênica (tolerante ao herbicida glifosato) após exposição ao herbicida glifosato em função do tempo.

As FIGURA 6.13 e FIGURA 6.14 apresentam, respectivamente, a mudança do perfil metabólico das sojas transgênica e convencional antes da aplicação do glifosato (branco) e após a aplicação do glifosato com 24, 48, 72 e 96 horas após a aspersão.

FIGURA 6.13 Espectros de massas do extrato metanólico das folhas de soja transgênica, antes e após exposição ao herbicida glifosato. Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização positivo.

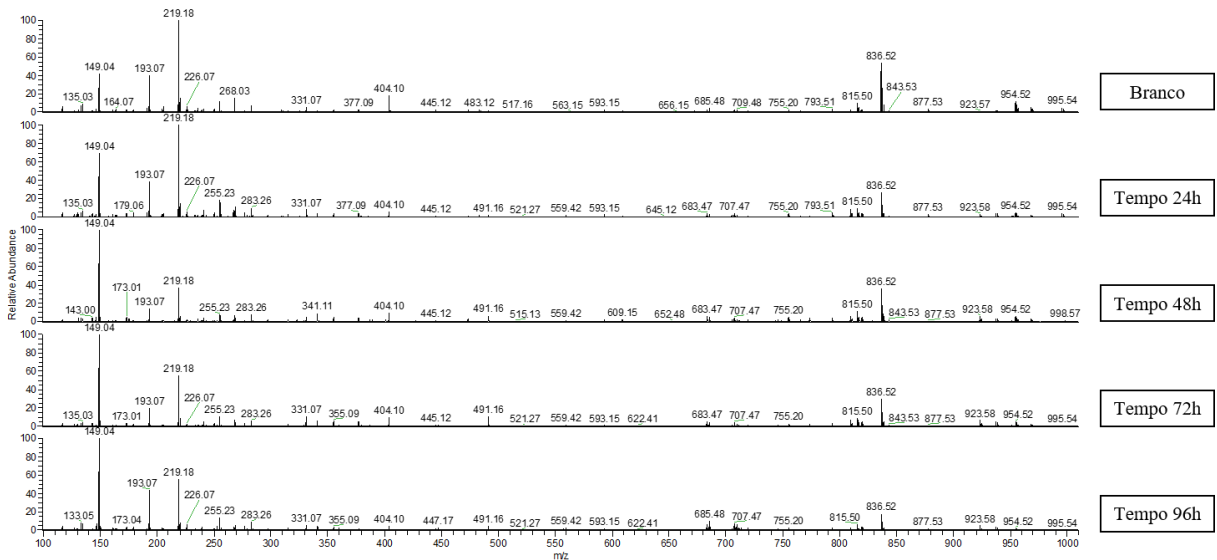
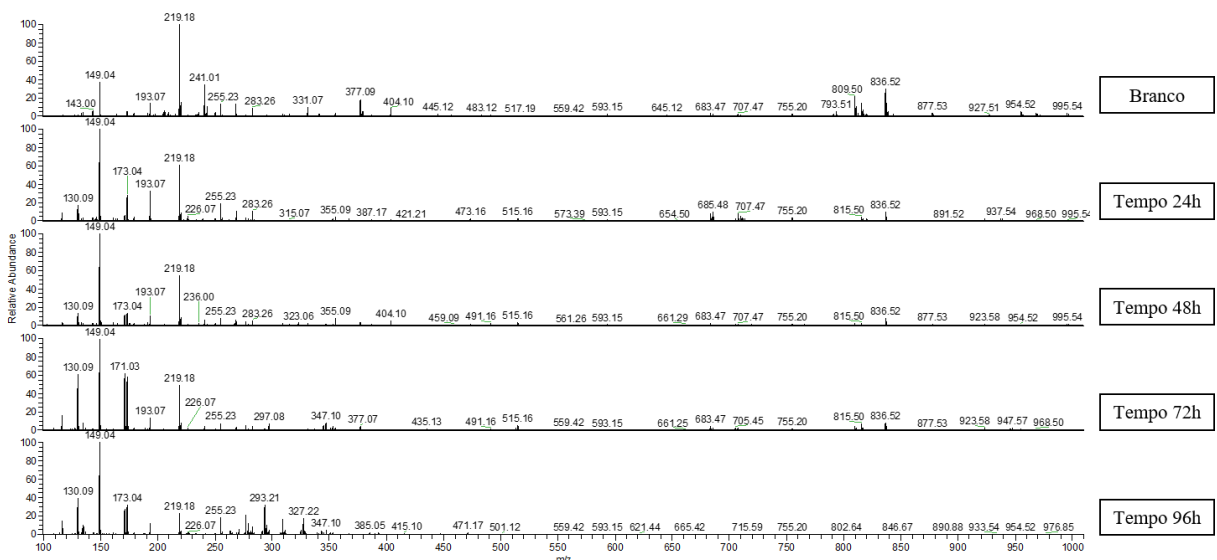


FIGURA 6.14 Espectros de massas do extrato metanólico das folhas de soja convencional, antes e após exposição ao herbicida glifosato. Os espectros de massas foram obtidos no modo de ionização positivo.

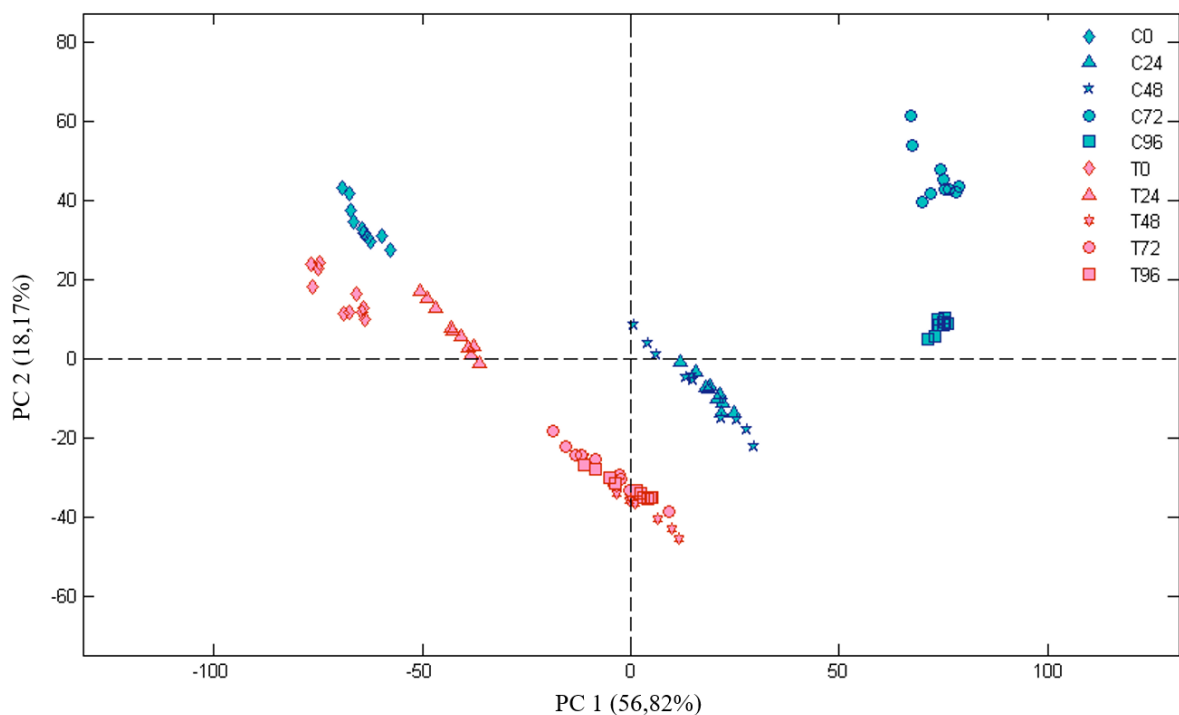


Analisando-se a FIGURA 6.13, observa-se que houve pouca alteração no perfil metabólico da soja transgênica após a aplicação do glifosato. Não se pode dizer o mesmo

para o perfil metabolômico da soja convencional (FIGURA 6.14), já que nos espectros de massas observa-se a formação e o desaparecimento de diversos íons em função do tempo.

Para melhor análise dos dados, gerou-se um gráfico PCA com os dados oriundos dos espectros de massas de ambos tipos de amostras e o resultado está apresentado na FIGURA 6.15.

FIGURA 6.15 Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 dos extratos metanólicos das folhas de soja transgênica e convencional, antes e após a aplicação do glifosato. Símbolos em azul se referem à soja convencional (C) e aqueles em vermelho se referem à soja transgênica (T). Também são indicados os tempos de exposição ao glifosato: ◆ branco (0), ▲ após 24 h (24), * após 48 h (48), ● após 72 h (72) e ■ após 96 h (96).

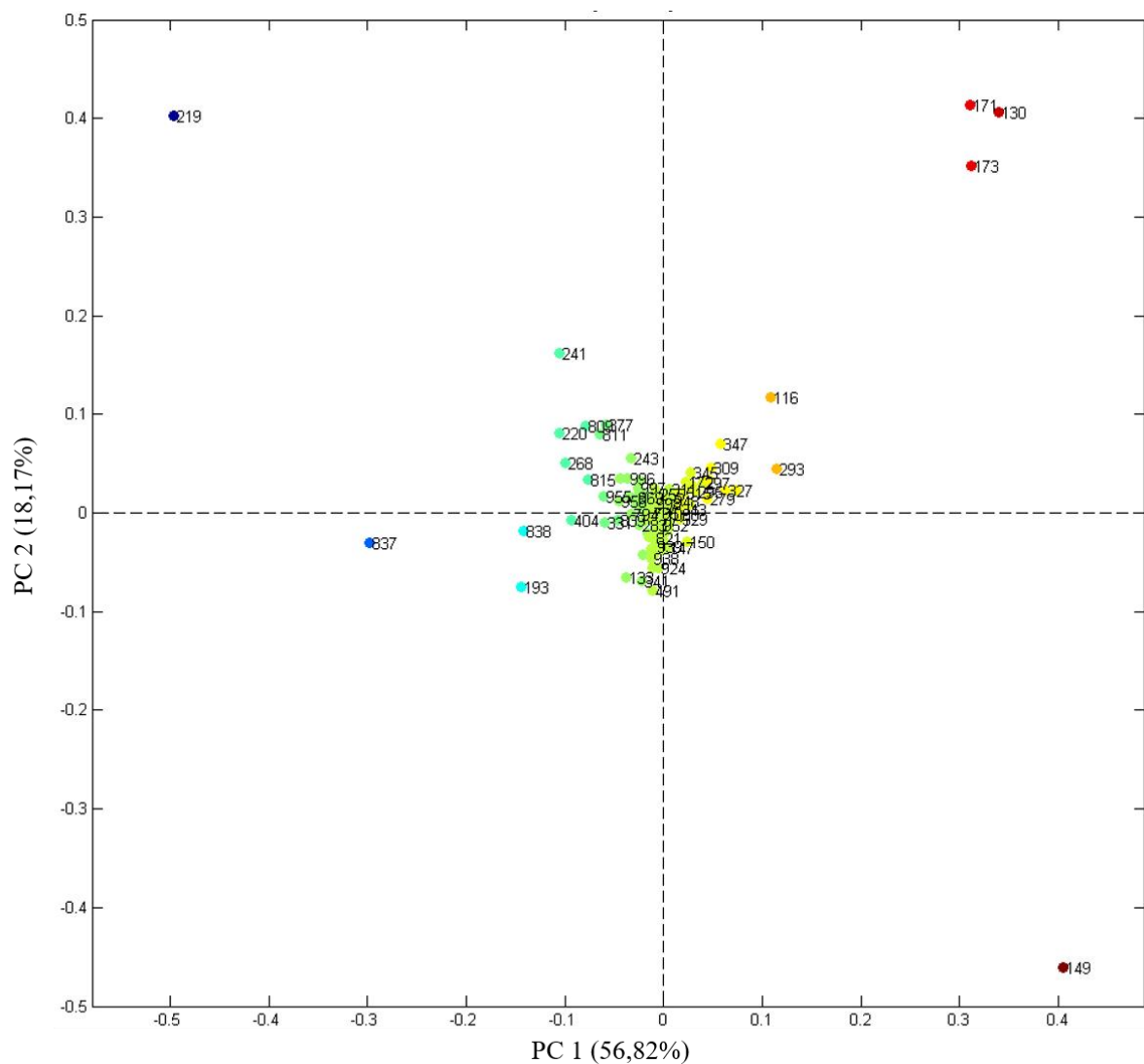


No gráfico de PCA é possível ter-se uma melhor visão sobre as alterações que ocorrem nos perfis metabolômicos das sojas transgênica e convencional em função do tempo de exposição ao glifosato. No primeiro instante, sem aplicação do glifosato, as sojas convencionais (C0) e transgênicas (T0) apresentam perfis semelhantes e aparecem próximas no gráfico de PCA, mas com ligeiras diferenças suficientes para separar os dois grupos de amostras. Após a aplicação do glifosato, o perfil da soja convencional (C0, C24, C48, C72 e C96) sofre alterações muito mais notáveis em comparação com aquelas observadas para a soja transgênica (T0, T24, T48, T72 e T96). Observa-se no gráfico de PCA que a aplicação do glifosato modifica o perfil da planta o suficiente para separar T0 e T24, mas a mudança é sutil, visto que estão na mesma PCA. Com o decorrer do tempo, as amostras T48, T72 e T96 são indistinguíveis entre si, mas

se diferem dos tempos iniciais, inclusive são separados pela PC2. Por outro lado, o perfil metabólico entre o C0 e C24 da soja convencional é bastante diferente, sendo que o C0 se encontra na PC1 e os demais tempos na PC2. Não é possível distinguir entre o C24 e C48, mas nota-se um grande distanciamento do tempo inicial (T0) e dos tempos T72 e T96. Diferentemente do que ocorre na soja transgênica, o perfil metabólico da soja convencional continua sofrendo mudanças com o decorrer do tempo, nota-se que ocorreram mudanças entre os tempos T48 e T72, observado pelo distanciamento desses tempos e, também, mudanças entre os tempos T72 e T96, em que o T96 ficou afastado de todos os outros tempos.

Os principais íons que indicam uma mudança nos perfis metabólicos em função do tempo foram determinados a partir do gráfico dos pesos, FIGURA 6.16.

FIGURA 6.16 Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 gerado a partir dos dados dos espectros de massas dos extratos metanólicos das folhas de soja submetidas ao herbicida glifosato por diferentes tempos.



Utilizando as massas exatas, as respectivas distribuições isotópicas, os erros entre as massas teórica e experimental e comparação com dados obtidos na literatura, foi possível identificar a maioria dos metabólitos que sofrem as maiores alterações após a aplicação do glifosato nas folhas convencionais (TABELA 6.4).

TABELA 6.4 Metabólitos que sofrem as maiores alterações após a aplicação do glifosato nas folhas de soja convencionais.

Massa exata	Espécie iônica	Erro (ppm)	Metabólito Proposto
116,07071	[C ₅ H ₁₁ NO ₂ - H] ⁻	-8,718	Valina / Betaina
130,08638	[C ₆ H ₁₃ NO ₂ - H] ⁻	-7,549	Leucina
149,04468	[C ₅ H ₁₀ O ₅ - H] ⁻	-5,614	Pentose
173,04482	[C ₇ H ₁₀ O ₅ - H] ⁻	-4,142	Ácido chiquímico
277,21743	[C ₁₈ H ₃₀ O ₂ - H] ⁻	0,529	Ácido linolênico
293,21259	[C ₁₈ H ₃₀ O ₃ - H] ⁻	1,234	Ácido colneleico / Ácido heleninólico
327,21813	[C ₁₈ H ₃₂ O ₅ - H] ⁻	0,956	Ácido trihidroxilinoico / Auxina A
347,09862	[C ₁₄ H ₂₀ O ₁₀ - H] ⁻	0,980	2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopirranose
193,07122	[C ₇ H ₁₄ O ₆ - H] ⁻	-2,701	Bornesitol / Ononitol / Pinitol
219,17517	[C ₁₅ H ₂₄ O - H] ⁻	-1,408	Isoprenóides
220,17842	[C ₁₅ H ₂₄ O - H] ⁻	-	Isótopo do íon C ₁₅ H ₂₄ O
241,01211	[C ₆ H ₁₁ O ₈ P - H] ⁻	-0,386	Fosfato-D-mio-inositol-1,2-cíclico
404,10476	[C ₁₂ H ₂₃ NO ₁₄ - H] ⁻	0,724	Não identificado

De todas as alterações observadas e de todos os íons apresentados, o principal metabólito que promove a diferenciação entre as sojas transgênica e convencional é o íon de m/z 173,04482, relacionado ao ácido chiquímico.

A FIGURA 6.1 mostra a via do ácido chiquímico e como é a ação da enzima EPSPS na soja transgênica e na soja convencional. Resumidamente, o glifosato se liga na enzima EPSP e impede sua função e, conseqüentemente, todos os metabólitos subsequentes a essa enzima não são sintetizados e a planta morre. A modificação genética promovida nas sojas tolerantes ao glifosato causa uma alteração da conformação dessa enzima, de tal modo que o glifosato não interfere na rota biossintética natural desta planta.

Os resultados aqui descritos são consistentes com este panorama já que quando o glifosato se liga à enzima EPSPS da soja convencional, a rota biossintética é bloqueada. Deste modo há um acúmulo do precursor dessa rota, ou seja, o ácido chiquímico. Avaliando os gráficos PCA (FIGURA 6.15) e de pesos (FIGURA 6.16), percebe-se que o ácido chiquímico na sua forma protonada é o íon que diferencia a C96 de todas as outras amostras, justamente pela planta ter maior acúmulo deste metabólito.

Conclui-se com este estudo que a soja transgênica tolerante ao glifosato sofre alterações metabólicas bem menos acentuadas do que a soja convencional após aplicação do herbicida. Trata-se de um resultado inédito que mostra de maneira inequívoca a maior resistência da planta transgênica ao herbicida glifosato.

6.7 Conclusão

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo que quase 96% de toda a produção brasileira é referente à soja geneticamente modificada. Muitos produtos consumidos no Brasil são derivados dessa produção. Embora se saiba quais genes foram inseridos durante a transgenia, as alterações metabólicas decorrentes desta inserção, os chamados efeitos pleiotrópicos, são poucos estudados. Este trabalho, portanto, vem para acrescentar um pouco mais de conhecimento sobre a transgenia e suas possíveis consequências na metabolômica.

Os três estudos apresentados mostraram que as sojas transgênica e convencional possuem perfis metabólicos semelhantes, mas há diferenças notáveis nas intensidades de alguns metabólitos. Enquanto que o uso da técnica DI-ESI-MS permitiu a obtenção dos perfis metabólicos de folhas e grãos de sojas transgênicas e convencionais, a técnica DESI-MSI permitiu o acesso a distribuição espacial de metabólitos em grãos e folhas destas amostras. Trata-se de resultados totalmente inéditos, os quais serão, certamente, de muita relevância tanto para a agricultura brasileira quanto para os cidadãos que consomem produtos derivados desta atividade econômica.

Referências Bibliográficas

1. Jervis, J., et al., *Metabolite Profiling of Soybean Seed Extracts from Near-Isogenic Low and Normal Phytate Lines Using Orthogonal Separation Strategies*. *J Agric Food Chem*, 2015. **63**(44): p. 9879-87.
2. USDA, U. S. D. O. A., *World Agricultural Supply and Demand Estimates*, A.M. Service, Editor. 2018. p. 40.
3. Ministério da Agricultura, *Soja em grãos bate recorde de volume exportado em novembro*. 2017; Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/soja-em-graos-bate-recorde-em-volume-exportado-para-os-meses-de-novembro>.
4. Ministério da Agricultura, *Soja na alimentação*. 03 de maio de 2018; Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=1.
5. Thoenes, P., *Soybean International Commodity Profile*. Competitive Commercial Agriculture in Sub-Saharan Africa (CCAA) Study: p. 40.
6. Embrapa, *Transgenia: quebrando barreiras em prol da agropecuária brasileira*. 03 de maio de 2018; Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-transgenicos/sobre-o-tema>.
7. Glick, B.R., et al., *Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4^o edition ed. 2010, Washington, DC: ASM Press
8. Ministério da Ciência, T., Inovações e Comunicações. *CTNBio*. 03 de maio de 2018; Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/a-ctnbio>.
9. Moraes, M. G. D. *Quantos produtos transgênicos estão aprovados hoje no País?* 2017; Disponível em: <http://cib.org.br/faq/quantos-produtos-transgenicos-estao-aprovados-hoje-no-pais/>.
10. Lajolo, F. M. e Nutti, M.R., *Transgênicos: Bases Científicas de sua Segurança*. 2011. 200.
11. Ocana, M. F., et al., *Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize*. *Rapid Commun Mass Sp*, 2007. **21**(3): p. 319-28.
12. Wu, H., et al., *Presence of CP4-EPSPS component in roundup ready soybean-derived food products*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(2): p. 1919-32.
13. Simons, R., et al., *Identification of prenylated pterocarpanes and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray ionisation mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Sp*, 2011. **25**(1): p. 55-65.

14. Duke, S. O., et al., *Isoflavone, Glyphosate, and Aminomethylphosphonic Acid Levels in Seeds of Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean*. J Agr Food Chem, 2003. **51**(1): p. 340-344.
15. Mataveli, L. R. V., et al., *A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds*. Metallomics, 2010. **2**(12): p. 800.
16. Lappé, M. A., et al., *Alterations in Clinically Important Phytoestrogens in Genetically Modified, Herbicide-Tolerant Soybeans*. J Med Food, 1998. **1**(4).
17. Bøhn, T., et al., *Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans*. Food Chem, 2014. **153**: p. 207-215.
18. Bellaloui, N., et al., *Nitrogen Metabolism and Seed Composition As Influenced by Glyphosate Application in Glyphosate-Resistant Soybean*. J Agr Food Chem, 2008. **56**(8): p. 2765-2772.
19. Aldemita, R. R.; Hautea, R. A., *Biotech crop planting resumes high adoption in 2016*. GM Crops & Food, 2018. **9**(1): p. 1-12.
20. Colli, W. *20 anos de transgênicos no Brasil*. 2018; Disponível em: <http://cib.org.br/20-anos-de-transgenicos-no-brasil/>.
21. Ferreira, M. M. C., *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*. 2015, Campinas: Editora Unicamp. 496.
22. Menten, J. F., et al., *A new method for determining the availability of choline in soybean meal*. Poultry Sci, 1997. **76**(9): p. 1292-1297.
23. Evans, L. S.; Tramontano, W. A., *Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes*. Phytochemistry, 1984. **23**(9): p. 1837-1840.
24. Cho, Y., et al., *Trigonelline concentrations in salt stressed leaves of cultivated Glycine max*. Phytochemistry, 1999. **52**(7): p. 1235-1238.
25. Tramontano, W. A., et al., *A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the dicotyledoneae*. Environ Exp Bot, 1986. **26**(3): p. 197-205.
26. Holleman, J. M. e Key, J. L., *Inactive and Protein Precursor Pools of Amino Acids in the Soybean Hypocotyl*. Plant Physiol, 1967. **42**(1): p. 29.
27. Micallef, B.J. e Shelp, B. J., *Arginine Metabolism in Developing Soybean Cotyledons : II. Biosynthesis*. Plant Physiol, 1989. **90**(2): p. 631-634.
28. Wakao, S. e Benning, C., *Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in Arabidopsis*. Plant J, 2004. **41**(2): p. 243-256.
29. METLIN. 03 de maio de 2018. Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/>

30. LIPIDMAPS, *Lipidomics Gateway*. 03 de maio de 2018. Disponível em: <http://lipidmaps.org>.
31. PubChem. 03 de maio de 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

CAPÍTULO 7 – AVALIAÇÃO DA TRANSGENIA: GRÃOS DE MILHO

7.1 Introdução

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae (gramíneas) e acredita-se que é originário do México. O milho é um dos cereais mais importantes, cultivado em várias partes do mundo devido ao seu baixo custo e alto teor nutritivo e ampla utilização na alimentação humana e animal. Além disso, o grão pode ser transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais ^[1].

Em 2017 o mundo produziu 1,07 bilhões de toneladas de milho. O Brasil foi responsável pela produção de 98,5 milhões de toneladas, o terceiro maior produtor mundial, somente atrás dos EUA e da China ^[2].

Com os avanços da biotecnologia, foi desenvolvido o milho geneticamente modificado que confere ação inseticida contra espécies da ordem lepidóptera como, por exemplo, a lagarta-do-cartucho-do-milho, a broca-do-colmo, a lagarta-da-espiga e a lagarta-elasma. Assim, há melhor controle de todos os insetos que atacam as espigas ^[3]. Novas gerações de milho, além da ação inseticida, apresentam tolerância a herbicidas ^[4].

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), encontrada no solo de várias regiões do Brasil, tem sido usada como inseticida biológico (não tóxica para o homem) desde a década de 60, por meio da pulverização dos esporos sobre a lavoura. Após vários estudos e testes, foram introduzidos no milho genes específicos, chamados Cry, desta bactéria. Estes genes codificam a formação de uma proteína de cristal, chamada δ -endotoxina, que é tóxica para pragas do milho, como os insetos lepidópteros. As toxinas Cry são produzidas constitutivamente pela planta durante toda a sua antogenia e apresentam predominância em determinadas partes, como as folhas. As toxinas são altamente específicas, resultando em alta seletividade na sua atividade, pois agem apenas nas espécies-alvo, sendo assim não são tóxicas ao homem. Para liberar o gene inseticida, é necessário que a proteína seja ingerida e quebrada (em meio alcalino) e, assim, liberar seu núcleo ativo, concebendo uma defesa constitutiva da planta ^[5-9].

Diferentes genes Bt têm sido isolados e incorporados ao milho. Dentre eles, Cry1Ab, Cry1F e Cry1Ac, que produzem proteínas capazes de controlar a população de lagartas, especialmente a lagarta-do-cartucho, a mais destrutiva praga do milho. Outros genes Bt, como o Cry34Ab1, Cry35Ab1 e Cry3Bb1, produzem proteínas que controlam larvas, como a larva-

alfinete, que ataca as raízes ^[8]. Até outubro de 2017 a CTNBio emitiu parecer técnico favorável à liberação de 40 eventos transgênicos de milho no Brasil ^[10].

O milho-Bt é a planta transgênica mais cultivada no mundo, ocupando 15% da área global cultivada com transgênicos em países como EUA, Canadá, Argentina, África do Sul, Espanha e França ^[11]. No Brasil, 78% das plantações de milho são transgênicas ^[12].

As vantagens de se produzir milho transgênico é o aumento de até 25% na produtividade e 29% menos micotoxinas quando comparado ao milho não modificado ^[13]. Consequentemente, há um menor custo da lavoura, diminuição do número de aplicações de agroquímicos e maior qualidade do produto ^[5, 8].

7.2 Objetivos

7.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste capítulo é realizar uma comparação das imagens químicas obtidas via DESI-MSI de grãos de milho transgênicos e seu isogênico não modificado, avaliando possíveis efeitos resultantes da modificação genética na síntese e distribuição de metabólitos.

7.2.2 Objetivos específicos

- Identificar os metabólitos presentes nos grãos de milho transgênico e convencional;
- Comparar os metabólitos e selecionar os metabólitos que diferem entre os dois grãos.

7.3 Materiais e Métodos

7.3.1 Materiais

Para as análises de DESI-MSI foram utilizados os solventes metanol e tolueno, ambos grau HPLC e adquiridos da empresa Tedia, São Paulo. Selecionou-se o milho híbrido Bt 30F35Hx, que possui o gene Cry1F, e seu isogênico Pioneer 30F35.

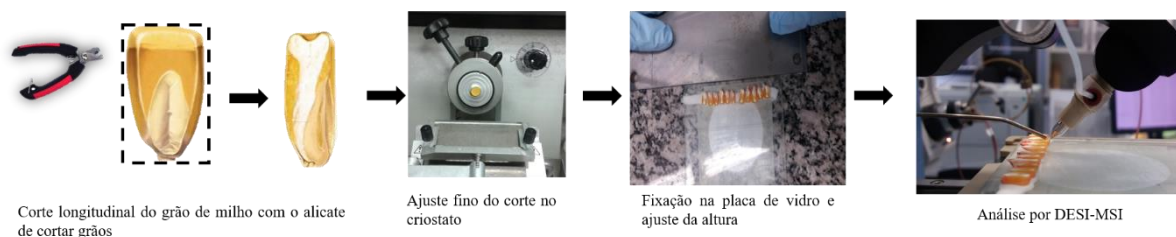
7.3.2 Preparo de amostra

A metodologia foi desenvolvida pelo grupo, para este estudo a mesma foi otimizada para se obter melhores resultados. Os grãos de milho foram mergulhados em uma solução de água:tolueno (1:1) e colocados em banho de ultrassom por 10 minutos, metodologia desenvolvida pelo grupo, a qual visa a remoção do tratamento industrial da semente com inseticidas e polímeros que envolvem o grão. Após esta etapa, os grãos foram lavados em água milli-Q, secos ao ar e, em seguida, lavados em metanol e novamente secos ao ar.

Os grãos de milho foram cortados longitudinalmente utilizando um alicate para cortar grãos. Como o método exige uma superfície plana, realizou-se ajustes finos no corte com um criostato (Leica CM1850) localizado no Laboratório de Estudos da Dor (LED) na UNICAMP. Para tanto, os grãos cortados foram fixados no disco para amostras usando polímero (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek). Em seguida, aplicou-se a lâmina de corte do criostato para se gerar uma superfície totalmente plana, como mostra a FIGURA 7.1.

Quatro grãos de milho transgênico e cinco de grãos de milho convencional cortados e com a superfície plana foram fixados em uma placa de vidro. Para que as superfícies dos grãos estivessem na mesma altura, foi necessário desenvolver um procedimento para a fixação: inicialmente, foi colocado uma fita de massa de modelagem em uma placa de vidro (aproximadamente 0,5 cm) e, em seguida, colocou-se os grãos dispostos em sequência em cima da massa. Para igualar a altura, utilizou-se uma outra placa de vidro e um suporte (para garantir que a placa não pendesse e formasse um ângulo) e pressionou-se até que as alturas dos grãos se igualassem, como mostra a FIGURA 7.1.

FIGURA 7.1 Preparo dos grãos de milho para as análises por DESI-MSI.



7.3.3 Análise por DESI-MSI

A análise por DESI-MSI foi conduzida no espectrômetro de massas *Q Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific - Alemanha), instalado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. A fonte de ionização utilizada foi a DESI (*Omni Spray Ion Source 2-D*, modelo OS-3201, Prosolia, EUA).

Os parâmetros utilizados na operação do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram: voltagem do capilar de 1,5 kV, temperatura do capilar de 250°C, resolução de 70.000; o solvente utilizado para o *spray* foi o metanol com o fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, a faixa de massa analisada foi m/z 100 a 1000 no modo de ionização negativo. Para a plataforma móvel determinou-se o tamanho do passo de 200 μm , tamanho do pixel de 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ e taxa de varredura 740 $\mu\text{m}.\text{sec}^{-1}$. As condições apresentadas, inclusive a geometria da fonte, foram resultantes de uma otimização do método para a obtenção da melhor resposta dos sinais e consequente resolução de imagem.

Os espectros de massas foram processados pelo *software Qual Browser Xcalibur*, as imagens convertidas utilizando o *software Firefly* (versão 2.1.05) e visualizadas pelo *software BioMAP software* (versão 3.8.04).

7.4 Resultados e Discussão

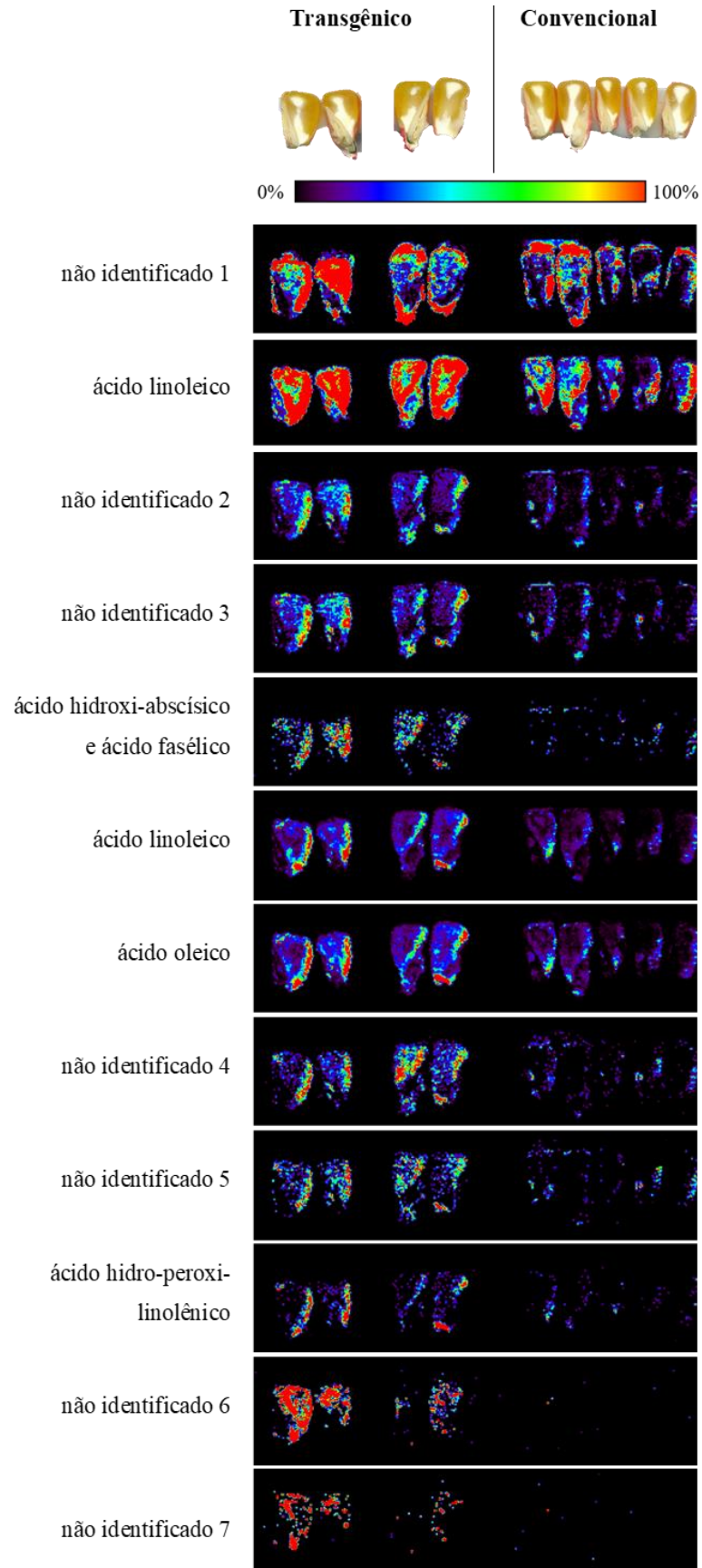
O estudo de transgenia nos grãos de milho foi realizado pela seleção dos metabólitos que geraram imagens químicas notadamente diferenciadas para as amostras transgênicas e convencionais. Em sequência, os metabólitos foram identificados através das massas exatas, erro entre as massas teórica e experimental, distribuições isotópicas, busca em banco de dados como Metlin^[14], Lipidmaps^[15], PubChem^[16] dentre outros, finalizando por confirmação com dados na literatura. Entretanto, nem todos os íons selecionados foram identificados devido ao

fato de que, em muitos casos, não foi possível determinar uma fórmula molecular com baixos erros e com elementos químicos presentes em uma planta. Usando estes critérios, onze íons foram selecionados, os quais estão apresentados na TABELA 7.1. As imagens químicas referentes aos íons selecionados estão apresentadas na FIGURA 7.1.

TABELA 7.1 Principais metabólitos detectados nos grãos de milho transgênico e convencional a partir de uma análise por DESI-MSI no modo negativo.

Massa Exata	Espécie Iônica	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Metabólito Proposto
247,03234	[M-H] ⁻	Não identificado 1		
279,23309	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.489	Ácido linoleico
143,03378	[M-H] ⁻	Não identificado 2		
157,12254	[M-H] ⁻	Não identificado 3		
279,12365	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	-0.527	Ácido hidroxi-abscísico e ácido fasélico
281,24825	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-1.257	Ácido oleico
293,17877	[M-H] ⁻	Não identificado 4		
309,17343	[M-H] ⁻	Não identificado 5		
309,20712	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	-0.041	Ácido Hidro-peroxi-linolênico
666,05951	[M-H] ⁻	Não identificado 6		
726,10373	[M-H] ⁻	Não identificado 7		

FIGURA 7.2 *Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos metabólitos selecionados nos grãos de milho transgênicos e convencionais.*



A FIGURA 7.2 apresenta, na sua primeira parte, a imagem óptica (fotografia) dos grãos de milho analisados, os quais estão divididos em transgênicos (4 unidades) e convencionais (5 unidades). Em seguida é apresentada a escala de cor que foi utilizada para a apresentação das imagens químicas. A escala varia da cor preto até vermelho, indicando as regiões de ausência e de máxima concentração de um determinado metabólito, respectivamente. Posteriormente, são apresentadas as imagens químicas obtidas para todos os íons mencionados na TABELA 7.1.

As imagens químicas referentes aos íons de m/z 247,03234, o qual não foi possível identificar, e m/z 279,23309, que se refere ao ácido linoleico, foram apresentadas para demonstrar que o experimento foi conduzido corretamente, pois estes metabólitos estão presentes em todos os grãos de milho e com intensidades elevadas. Sendo assim, quaisquer diferenças nas intensidades das outras imagens são intrínsecas aos grãos.

As imagens químicas dos íons de m/z 143,03378 e m/z 157,12254 (não foram passíveis de identificação), apresentam diferenças nítidas entre as intensidades para os grãos de milho transgênico e convencional. Observa-se que estes íons, nas quatro amostras transgênicas, estão mais intensas e presentes por toda a superfície do grão, apresentando pontos em vermelho em algumas áreas. Já nos grãos convencionais estes íons se apresentam com pouca intensidade ou mesmo ausentes.

Os metabólitos isoméricos ácido fasélico e o ácido hidroxí-abscísico são derivados do ácido abscísico. Este último é um hormônio que atua nas respostas ao estresse hídrico, na germinação e maturação de sementes, promove o acúmulo de reservas e a tolerância à dessecação nas sementes^[17]. O ácido fasélico e o ácido hidroxí-abscísico já foram identificados e estudados em grãos de milho^[18]. As imagens químicas para estes metabólitos (m/z 279,12365) mostra que eles estão distribuídos por todo o grão e presentes em intensidade muito maior nos grãos de milho transgênico que nos grãos de milho convencional. Nestes últimos, tais metabólitos quase não são perceptíveis.

As imagens químicas referentes ao ácido linoleico (m/z 279,23309) indicam que este metabólito está presente nos dois tipos de grãos de milho. Porém, nota-se que áreas em vermelho são encontradas nos grãos transgênicos, enquanto que nos grãos convencionais as intensidades são muito menores. Deste modo, é possível concluir que o milho transgênico produz muito mais ácido linoleico que o milho convencional. O mesmo acontece para o ácido oleico (m/z 281,24825) que se apresenta nos grãos de milho transgênicos em maior intensidade quando comparado aos grãos convencionais.

As imagens químicas referentes aos íons de m/z 293,17877 e m/z 309,17343 (FIGURA 7.2), os quais não foram identificados, mostram que estes dois metabólitos estão presentes em intensidades apreciáveis nos grãos de milho transgênico, mas são quase que imperceptíveis nos grãos convencionais.

O ácido hidro-peroxi-linolênico (m/z 309,20712), detectado no presente estudo, já foi identificado anteriormente em amostras de milho ^[19]. As imagens químicas revelam que este ácido graxo está presente em intensidades maiores nos grãos de milho transgênico que nos grãos convencionais. Interessante notar que este metabólito se concentra na borda do grão transgênico, fato que não se observa no grão convencional.

Os íons de m/z 666,05951 e m/z 726,10373, embora não tenham sido identificados, são os dois íons mais importantes deste estudo, pois podem ser considerados biomarcadores da transgenia Bt. Isto pode ser comprovado pelas imagens químicas, as quais revelam a presença destes metabólitos, e em alta intensidade, exclusivamente nos grãos de milho transgênico.

Após a apresentação dessas imagens (FIGURA 7.2) é possível notar que há diferenças marcantes quando se compara os perfis metabólicos dos grãos de milho transgênico e convencional. Contudo, apenas com estes resultados não é possível afirmar que a transgenia causa malefícios à planta ou à saúde humana e animal. Pelo contrário, este estudo aponta que o grão de milho transgênico apresenta maior concentração de ácidos graxos que são fundamentais para a dieta animal, o que pode mudar a visão da comunidade científica quanto aos organismos transgênicos. Tais resultados também podem auxiliar a biotecnologia, permitindo que se obtenha um produto, através de melhoramento genético, que produza uma maior quantidade destas substâncias.

7.5 Conclusão

O milho transgênico é um dos principais OGM's cultivados no mundo, no Brasil há 40 eventos de milho sendo comercializados. A resistência dos OGM's frente a ataque de herbívoros, herbicidas e outros agentes, aumenta a produtividade e o valor econômico para as plantações. A avaliação do que uma planta transgênica traz consigo, além do objetivo da alteração genética, é fundamental para promover ou reduzir o uso destes alimentos.

O uso da técnica DESI-MSI foi fundamental para a avaliação da metabolômica e apresentação da distribuição destes metabólicos nos grãos. Esta técnica apresenta vantagens que outras técnicas não possuem, como visualização espacial do íon na amostra, análise *in situ*, alta sensibilidade acompanhada de alta precisão. Este conjunto de vantagens permite vislumbrar que a técnica DESI-MSI poderá se converter numa ferramenta importante para o estudo de metaboloma de plantas. Finalmente, assim como verificado nos estudos envolvendo as amostras de soja, os resultados apresentados no presente capítulo são totalmente inéditos, os quais poderão contribuir para o desenvolvimento de novos cultivares de milho transgênico permitindo um aperfeiçoamento contínuo de sementes para a agricultura brasileira.

Referências Bibliográficas

1. Lopez, M. C., et al., *Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(43): p. 7222-8.
2. USDA, U. S. D. O. A., *World Agricultural Supply and Demand Estimates*, A.M. Service, Editor. 2018. p. 40.
3. Cruz, J. C., et al., *Manejo de Milho Transgênico*, in *Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde*, E.I. Tecnológica, Editor. 2011, Embrapa Milho e Sorgo: Brasília. p. 13.
4. *Guia de Sementes*, Morgan, Editor. 2014.
5. Wu, F., *Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts*. Transgenic Res, 2006. **15**(3): p. 277-89.
6. Manetti, C., et al., *A metabonomic study of transgenic maize (Zea mays) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids*. J Exp Bot, 2006. **57**(11): p. 2613-25.
7. Albrecht, L. P.; Missio, R. F., *Manejo de Cultivos Transgênicos*. 2013, Palotina: Universidade Federal do Paraná. 139.
8. Lerayer, A., *Guia do milho tecnologia do campo à mesa*, CID, Editor. 2006. p. 16.
9. Paulo, P. D., *Defesa direta induzida pelo ácaro-rajado Tetranychus urticae em milho bt*, in *Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias*. 2015, Universidade Federal de São João Del Rei: Sete Lagoas/MG. p. 80.
10. Moraes, M. G. *Quantos produtos transgênicos estão aprovados hoje no País?* 2017; Disponível em: <http://cib.org.br/faq/quantos-produtos-transgenicos-estao-aprovados-hoje-no-pais/>.
11. Fiúza, L. M.; Pinto, L. M. N., *Plantas transgênicas que sintetizam toxinas de Bacillus Thuringiensis e outras*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2009/2010. **38**: p. 6.
12. Colli, W. *20 anos de transgênicos no Brasil*. 2018; Disponível em: <http://cib.org.br/20-anos-de-transgenicos-no-brasil/>.
13. Pellegrino, E., et al., *Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3113.
14. METLIN. 03 de maior de 2018. Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/>
15. LIPIDMAPS, *Lipidomics Gateway*. 03 de maior de 2018. Disponível em: <http://lipidmaps.org>.

16. PubChem. 03 de maio de 2018. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Taiz, L., et al., *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 6ª ed. 2016: artmed.
18. Balsevich, J. J., et al., *Response of Cultured Maize Cells to (+)-Abscisic Acid, (-)-Abscisic Acid, and Their Metabolites*. *Plant Physiology*, 1994. **106**(1): p. 135.
19. Hamberg, M., *Fatty acid allene oxides II. Formation of two macrolactones from 12,13(S)-epoxy-9(Z),11-octadecadienoic acid*. *Chem Phys Lipids*, 1988. **46**(4): p. 235-243.

CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de DESI-MSI em metabolômica vegetal tem experimentado um desenvolvimento notável nesta última década, embora poucos artigos científicos tenham sido publicados sobre este tema. A distribuição de metabólitos em partes distintas de uma planta pode ser uma informação para estudos conduzidos nas áreas de genética, farmacognosia e identificação de princípios ativos, além de outras áreas fora do meio acadêmico.

Neste trabalho, foi demonstrado que a técnica DESI-MSI permite visualizar a distribuição espacial de metabólitos em tecidos vegetais com simplicidade, rapidez, sensibilidade e precisão, características que as técnicas tradicionais são incapazes de fornecer. Deste modo, aplicou-se a técnica DESI-MSI para acessar a distribuição espacial dos principais flavonoides presentes na folha de hortelã, dados estes que representam uma nova forma de se avaliar as principais rotas metabólicas existentes em vegetais. Outro estudo realizado foi a avaliação da relação fonte-dreno em folhas de hortelã de diferentes estádios de maturação. Observou-se uma maior concentração de compostos nitrogenados e açúcares nas folhas jovens, devido à alta atividade metabólica, em comparação com as folhas mais velhas.

Numa outra investigação, avaliou-se a diferença metabólica decorrente da inserção de genes em vegetais geneticamente modificados, sendo realizado um mapeamento de diversos metabólitos nas folhas e grãos de soja e grãos de milho transgênicos e convencionais. O estudo mostrou que há diferenças notáveis nos perfis metabólicos das amostras convencionais e transgênicas, indicando que a produção de metabólitos segue caminhos distintos em ambos tipos de amostras. Também observou-se o comportamento de sojas transgênica e convencional frente à ação do herbicida glifosato e os resultados confirmaram que a modificação genética protege a planta contra modificações metabólicas drásticas após a aplicação do herbicida.

Todos os estudos realizados neste trabalho são totalmente inéditos e certamente possuem alta relevância científica. Um aspecto importante a ser mencionado é que os resultados obtidos podem contribuir para uma melhor compreensão quanto às diferenças nas rotas metabólicas nos organismos convencionais e transgênicos, possibilitando uma melhor compreensão sobre as consequências da alteração genética. Pode-se antever, também, que o presente estudo abrirá portas e oportunidades para que outros estudos sobre metabolômica vegetal em plantas modificadas geneticamente venham a ser realizados.

Finalmente, ressalta-se que os estudos desenvolvidos neste trabalho são de caráter multidisciplinar, o que amplia ainda mais as possibilidades futuras de aplicação. Neste rol de novas possibilidades inclui-se a aplicação de DESI-MSI não apenas em metabolômica vegetal, mas em outras áreas de grande relevância para a sociedade.