

Sinalização de Substâncias Utilizadas na Defesa das Plantas

Análise HPLC-MS/MS dos Jasmonatos

Autores

Dr. Tim Iven

Departamento de Bioquímica de Plantas, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais, Universidade Georg-August de Goettingen

Dr. Kirstin Feussner

Departamento de Bioquímica de Plantas, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais, Universidade Georg-August de Goettingen

Dr. Cornelia Herrfurth

Departamento de Bioquímica de Plantas, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais, Universidade Georg-August de Goettingen

Dr. Elmar Herbig

Sartorius Instrumentos de Laboratório GmbH & Co. KG, Goettingen

Introdução

As plantas devem ser capazes de responder a flutuações climáticas, ritmo diurno, oferta disponível de água e nutrientes para o ataque de insetos e infestação. Para garantir tais respostas, elas precisam de uma rede regulamentar de substâncias chamadas fitohormônios.

Estas substâncias ajudam as plantas a responder ambos aos estresses bióticos e abióticos, iniciando uma cascata de ações orquestradas, e desencadeiam processos específicos de desenvolvimento.

Neste artigo, vamos discutir um método analítico altamente sensível para a determinação quantitativa de fitohormônios. Os principais representantes dos hormônios vegetais são o ácido jasmônico (Aj), as citocinas, as auxinas, o ácido abscísico, ácido salicílico, giberelinas e estrigolactonas.

O fitohormônio Aj desempenha um papel fundamental, entre outros, como uma ferida de sinalização da defesa contra insetos mastigadores. Na folha, o mascar ou a presença de insetos sugadores (Figura 1), induzem a ativação da biossíntese da Aj, e assim, a sua acumulação.

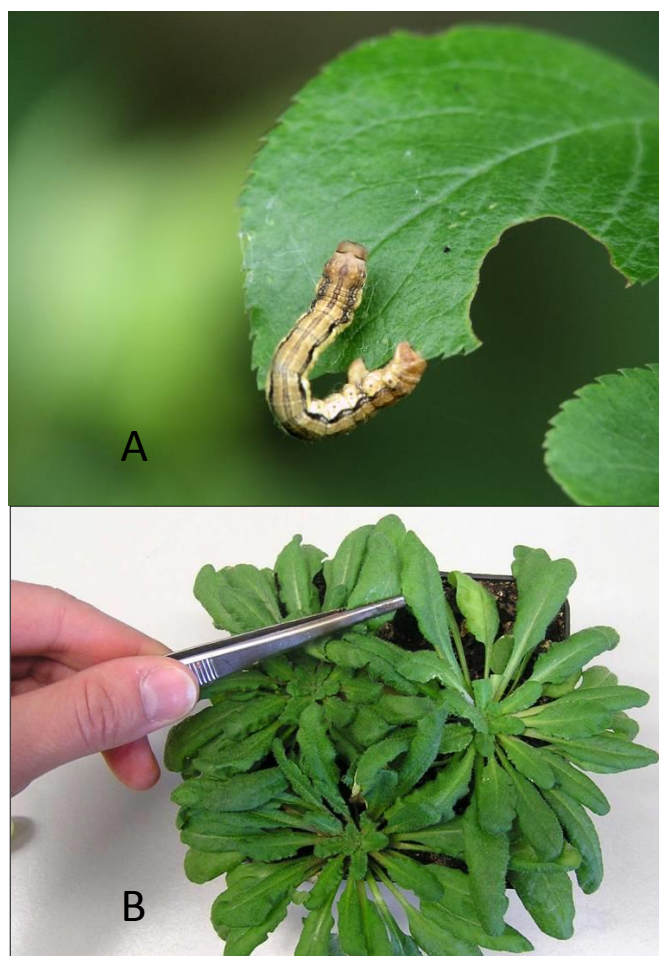


Figura 1. Danos na folha provocada por mastigação ou insetos sugadores (A), desencadeia a síntese do ácido jasmônico. Ferimentos mecânicos das folhas (B) que podem simular insetos herbívoros. Este estímulo do mesmo modo leva a um acúmulo do ácido jasmônico nas folhas.

(Foto A: ©Michael Martini – Fotolia.com, foto B: Departamento de Bioquímica de Plantas, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais da Universidade de Georg-August de Goettingen)

Todos os derivados Aj, produzidos por metilação, glicosilação, hidroxilação ou derivados, produzidos por metilação ou esterificação com aminoácidos estão presentes nos jasmonatos. O derivado do éster do aminoácido da isoleucina, jasmonil-isoleucina (Aj-Ile), desempenha um papel fundamental neste processo.

Aj-Ile representa a forma biologicamente ativa do fitohormônio (Wasternack e Hause, 2014). Isso desencadeia uma série de respostas imunes, como a produção de substâncias tóxicas ou inibidoras de digestão. Após o ataque de insetos, as plantas podem sintetizar inibidores de proteases que prejudicam a atividade das proteínases digestivas no intestino dos insetos (Wasternack e Hause, 2014). Substâncias voláteis, tais como jasmonato de metilo, são emitidas para atrair predadores (predadores mastigadores, insetos predadores) das pragas de plantas (Kessler e Baldwin, 2001). Além disso, os jasmonatos funcionam como

sinais de alarme móveis que colocam as partes de plantas não-infestadas de uma planta infestada em um elevado estado de prontidão defensiva (Glauser et al, 2008).

Para a planta, é importante manter este estado defensivo estritamente limitado ao seu tempo, porque este processo intensivo de energia pode diminuir o crescimento e sua capacidade de adaptação a outras condições de estresse. A acumulação regular local de Aj e da molécula pode ser um sinal de Aj-Ile biologicamente ativo que exige o rigoroso controle da síntese, o transporte e a degradação das substâncias. Assim, a caracterização do substrato e a degradação de produtos do metabolismo de Aj e sua quantificação em plantas feridas, estressadas ou infestadas nos tecidos vegetais é o foco da pesquisa atual.

Análises HPLC-MS/MS

As análises extremamente sensíveis são necessárias para investigar a resposta de ferida. Isso ocorre porque os fitohormônios só estão presentes no tecido da planta em pequenas concentrações (<10 nmol/g de peso fresco). Além disso, a matriz das plantas constitui uma mistura altamente complexa de substâncias que podem sobrecarregar a detecção e quantificação dos analitos pouco abundantes.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) é o método adequado para atender essa tarefa analítica desafiadora. Através da cromatografia, os metabólitos do extrato da folha são separados através de uma coluna de acordo com a sua estrutura química.

No caso da cromatografia de fase reversa usada aqui, as substâncias são ligadas por interações hidrofóbicas para a fase estacionária da coluna e se dilui usando um gradiente crescente de solvente orgânico. Em seguida, os compostos eluídos são detectados por espectrometria de massa. O tempo de retenção específico em que uma substância é eluída e a sua razão de massa-para-carga (m/z) captados pelo espectrômetro de massa é utilizado para identificar um composto.

Um espectrômetro de massa é operado no modo monitorização de reação múltipla (MRM) para esta finalidade. A m/z da molécula intacta desprotonada ($[M-H]^-$) em conjunto com a m/z de um fragmento específico deste íon é utilizada para identificar, inequivocamente, o composto químico.

Em aplicações de HPLC-MS, eluentes ultrapuros (grau LC-MS) ou água ultrapura são materiais indispensáveis uma vez que a sensibilidade e a confiança do método são criticamente dependentes da pureza dos eluentes.

Quantificação de Jasmonatos e Percusores

O material de amostra congelada foi extraído em um sistema de separação de duas fases utilizando uma mistura de éter-metil terc-butílico, metanol e água (Matyash et al., 2008). Para a quantificação, foram adicionadas quantidades definidas e as normas correspondentes para fitohormônios deuterados.

Após a extração, a fase orgânica foi usada para a análise. Esta foi realizada em sistema HPLC/nano ESI-MS/MS, que consiste em um sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) ligado a um espectrômetro de massa aplicada a biosistemas/MDS SCIEX 3200 que caracteriza capacidades híbrido triplo quadro de polo/lineares e armadilha de íon (Ontário, Canadá) (Iven et al., 2012). Durante o processo, a nanoionização por electrospray (nano ESI) foi assegurada por uma fonte de íons à base de chip (TriVersa NanoMate; Advion BioSciences, Ithaca, NY, EUA) (Figura 2).



Figura 2. HPLC/nano sistema ESI-MS/MS para análise de jasmonato. Um Biosistema Aplicado/MDS SCIEX 3200 Trap com capacidades híbridos triplos quadro de polo/íon linear foi usado como espectrômetro de massa. Foi assegurada ionização por nano-electrospray (nano ESI) por TriVersa NanoMate, uma fonte de íons à base de chip (Advion BioSciences). O sistema Agilent HPLC não é mostrado
(Foto: Departamento de Bioquímica de Plantas, Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais da Universidade de Georg-August de Goettingen, Alemanha)

A separação por HPLC de fase reversa foi realizada utilizando uma coluna C18 (EC 50/2 Nucleodure C18 gravidade 1,8 µm; 50 x 2,1 mm, tamanho da partícula 1,8 µm; Macherey und Nagel, Düren, Alemanha) e um gradiente de solvente binário de acetonitrilo (Fisher Scientific, Leics, RU) e água ultrapura do sistema arium® pro VF COT (Sartorius, Goettingen, Alemanha), cada um com adição de 0,1% de ácido acético.

As espécies onde os fitohormônios foram detectados no modo de ionização por electrospray, foram negativas por monitorização em múltiplas reações. Para a quantificação, as curvas de calibração foram representadas graficamente com base nas relações de intensidade (m/z) entre as substâncias não marcadas com as substâncias marcadas com deutério correspondentes *contra* as quantidades molares das substâncias não marcadas.

Produção de Água Ultrapura

O sistema arium® pro VF COT (Sartorius, Goettingen, Alemanha, Figura 3) foi usado para produzir água ultrapura para análise por HPLC/nano ESI-MS/MS. A unidade remove quaisquer impurezas ainda presentes na água potável pré-tratada.

A produção de água ultrapura requer recirculação contínua da água através do sistema. O fluxo de água constante adicionalmente necessário é obtido por um sistema de bomba equipada com uma unidade de controle de pressão. A condutividade da água é medida tanto na entrada de água de alimentação, bem como na saída da água produto.



Figura 3. O sistema de água ultrapura Sartorius arium® pro VF COT (foto Sartorius)

O conteúdo de COT (carbono orgânico total) é monitorado por um monitor COT especial. O sistema arium® pro VF COT utilizado nos experimentos realizados aqui funciona com dois cartuchos diferentes. Eles são preenchidos com resinas especiais adsorventes de carbono ativado e de troca iônica de leito misto, que são capazes de fornecer a água ultrapura com um conteúdo de COT de até <2 ppb.

Além disso, uma lâmpada de UV é integrada na unidade que emite comprimentos de onda de 185 nm e 254 nm para exercer uma ação oxidante e germicida.

Um módulo de ultrafiltração foi adicionalmente instalado no sistema arium® pro VF COT que foi operado como um filtro tangencial. A membrana de ultrafiltração usada retém colóides, micro-organismos, endotoxinas, bem como ARN e ADN. Um filtro final de 0,2 m é instalado na saída de água para remover a matéria em partículas e bactérias da água ultrapura produzida durante os lotes. O processo do dispositivo específico de purificação de água é apresentado na Figura 4.

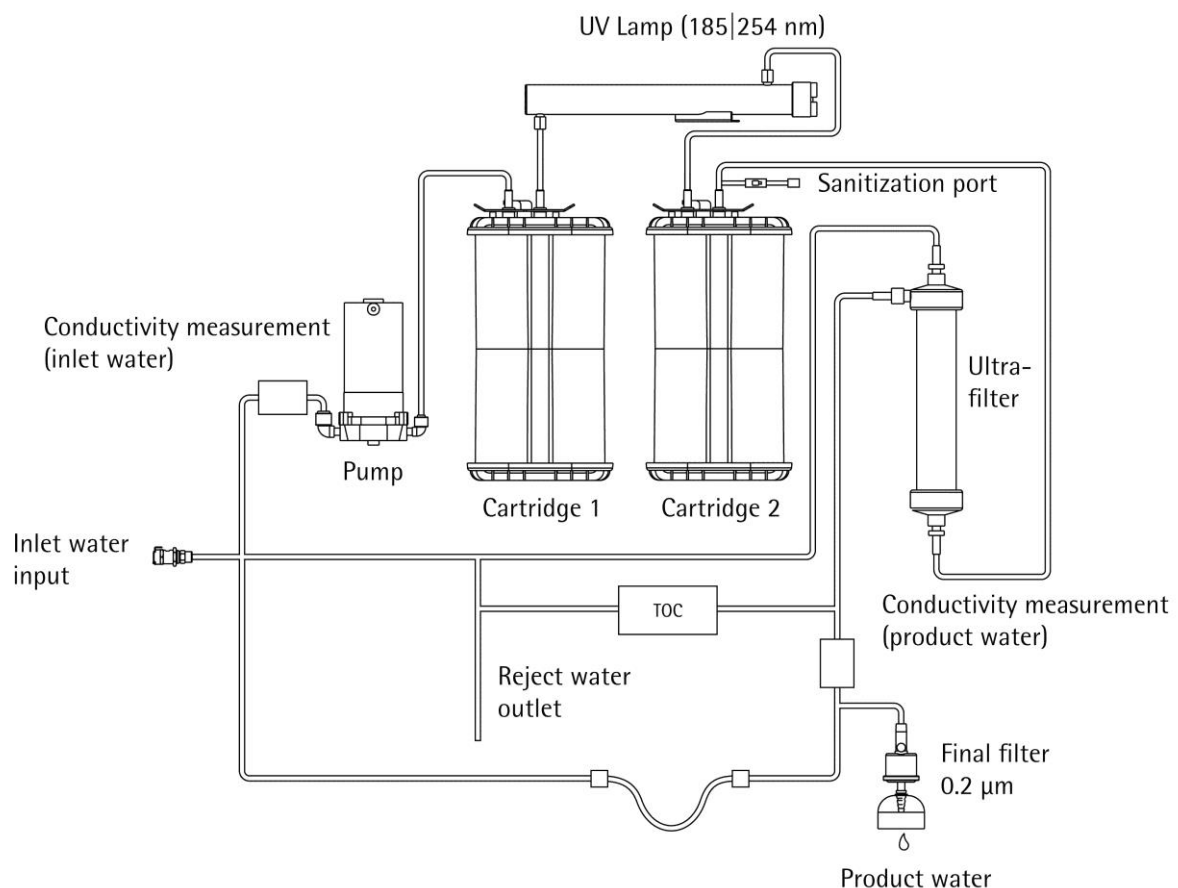


Figura 4. Representação esquemática do sistema arium® pro VF COT água ultrapura. Para maior clareza, as válvulas e os seus comandos não são ilustrados

Tradução da imagem

Lâmpada UV (185/254 nm)	UV Lamp (185/254 nm)
Porta de sanitização	Sanitization port
Medição de condutividade (água de entrada)	Conductivity measurement (inlet water)
Ultrafiltro	Ultrafilter
Bomba	Pump
Cartucho 1	Cartridge 1
Cartucho 2	Cartridge 2
Entrada de água	Inlet water input
Saída de água	Reject water outlet
TOC	TOC
Medição de condutividade (água produto)	Conductivity measurement (product water)
Filtro final 0,2 µm	Final filter 0.2 µm
Água Produto	Product water

Água ultrapura com um teor de COT < 5ppb e uma condutividade de 18,2 MΩ x cm (compensados a 25°C) foi utilizada para análise HPLC/nano ESI-MS/MS.

Resultados

A resposta das feridas das plantas tem sido intensamente investigada em muitas espécies de plantas, como tomate (*Lycopersicum esculentum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e agrião orelha-de-rato (*Arabidopsis thaliana*).

Para nossas análises, foi utilizado o modelo de planta da *A. thaliana*. Rosetas de *Arabidopsis* foram feridas com uma pinça de serra dentada ao longo da nervura central da folha (Figura 1B) e colhida 30 min ou 120 min após o ferimento, respectivamente.

As rosetas de plantas não-feridas serviram como controles. Além de Aj e do derivado de Aj-Ile biologicamente ativo, seus precursores da biossíntese de ácido 12-oxo-fitodienóico (AOFD) e 3-oxo-2- (2-pentenilo) do ácido ciclopentano-1-tetra enóico (OPC-4) foram também incluídos na análise (Figura 5).

A detecção quantitativa destes metabolitos no tecido da planta por meio de análise HPLC/nano ESI-MS/MS requer a adição de uma quantidade definida de substâncias deuteradas uma estrutura química idêntica ou muito semelhante (D₅-OPDA, D₆-JA, D₃-Aj-Ile) como padrões internos.

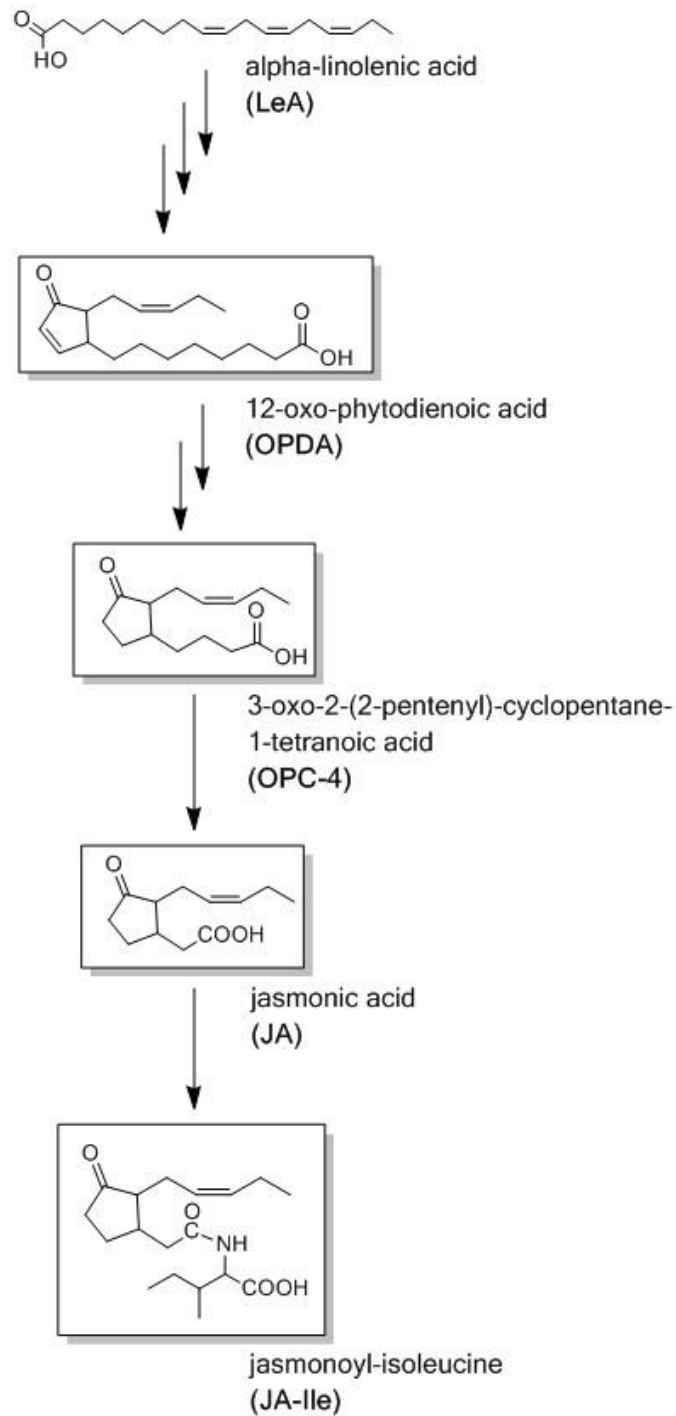


Figura 5. Biossíntese do fitohormônio ácido jasmônico (Aj) e do derivado de jasmonil-isoleucina ativo (Aj-Ile) através dos precursores de ácido alfa-linolênico, ácido 12-oxo-fitodienólico (AOFD) e 3-oxo-2- (2-pentenilo) do ácido ciclopentano-1-tetra enólico (OPC-4)

Tradução da imagem

ácido alfa-linolênico (AAL)	alpha-linolenic acid (LeA)
ácido 12-oxo-fitodienólico (AOFD)	12-oxo-phytodienoic acid (OPDA)
3-oxo-2- (2-pentenilo) do ácido ciclopentano-1-tetra enólico (OPC-4)	3-oxo-2-(2-pentenyl)-cyclopentane-1-tetranoic acid (OPC-4)
ácido jasmônico (Aj)	jasmonic acid (JA)
jamoniil-isoleucina Aj-Ile)	jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile)

Para este efeito, antes de iniciar a extração, as substâncias padrão foram adicionadas em quantidades de 30 n (D₅-AOFD) ou 10 ng (D₆-Aj e D₃-Aj-Ile) a 200 mg de material vegetal.

Os sinais dos analitos (AOFD, OPC-4, Aj, Aj-Ile) detectados por análise HPLC/nano ESI-MS/MS e das substâncias deuteradas correspondentes padrão estão descritos na Figura 6 como cromatogramas iônicos extraídos (EIC). OPC-4, Aj e Aj-Ile não foram detectadas nos controles não feridos. Apenas foram detectados os respectivos padrões deuterados e quantidades menores de AOFD (Figura 6A). Por contraste, os sinais claros de jasmonatos endógenos (Aj e Aj-Ile) e sinais mais fracos dos precursores OPC-4 e AOFD foram medidos nas plantas feridas (2 horas após o ferimento) (Figura 6B).

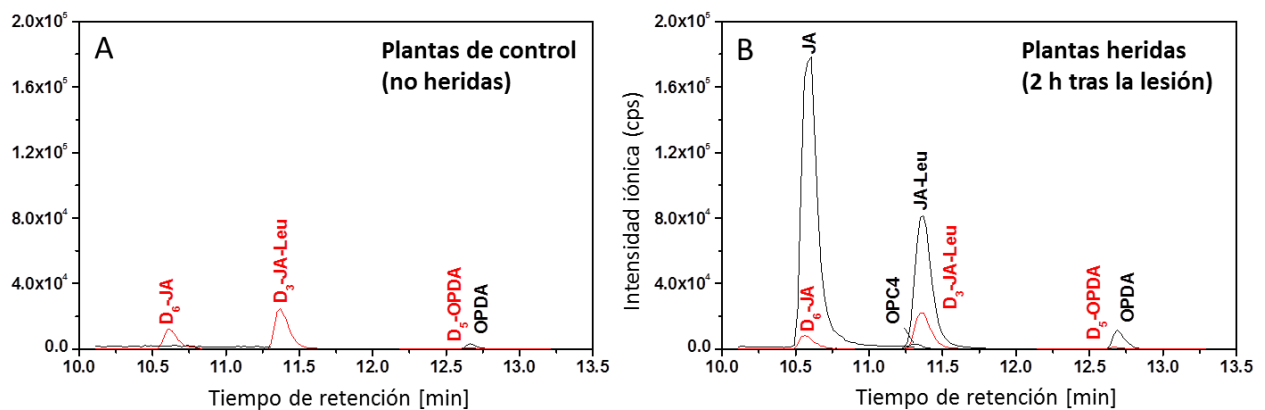


Figura 6. Cromatogramas iônicos extraídos (EIC) para análises HPLC/nano ESI-MS/MS para AOFD, OPC-4, Aj e Aj-Ile e as correspondentes substâncias convencionais deuteradas (D₅-AOFD, D₆-Aj, D₃-Aj-Ile). A) EIC de controles não-feridos. B) EIC de plantas feridas (2 h após o ferimento)

Tradução da imagem

Intensidade do íon (cps)	Intensidad iónica (cps)
Controle das plantas (não feridas)	Plantas de control (no heridas)
Tempo de retenção [min]	Tiempo de retención [min]
Plantas feridas (2 horas após o ferimento)	Plantas heridas (2h tras la lesión)

Análises HPLC/nano ESI-MS/MS permitem a quantificação exata dos jasmonatos e seus precursores nos extratos de folhas por meio do uso dos seus respectivos padrões deuterados. Tendo em conta que um ferimento estimulado em plantas é percebido e processado dentro de minutos (Glauser et al., 2008), os precursores Aj (AOFD e OPC-4), Aj e Aj-Ile tinha acumulado intensamente nas rosetas de Arabidopsis tão cedo quanto 30 min após o ferimento (Figura 7).

Nesta experiência, a concentração de Aj era agora de 2,2 nmol/g de peso fresco. Aj-Ile estava presente em concentrações de 0,8 nmol/g de peso fresco. A concentração destes dois jasmonatos aumentou ao longo dos próximos 90 min de forma insignificante para 2,5 e 1,2 nmol/g de peso fresco, respectivamente.

Os precursores AOFD e OPC-4 também foram acumulados em paralelo a esta curva de tempo (Figura 7). Pelo método de análise HPLC/nano ESI-MS/MS apresentado aqui e utilizando a água ultrapura produzida pelo sistema arium® pro VF COT, o limite de detecção dos jasmonatos e seus precursores no tecido da folha de *A. thaliana* foi 1 pmol/g de peso fresco para AOFD e Aj-Ile, e 15 pmol/g de peso fresco para OPC-4 e Aj.

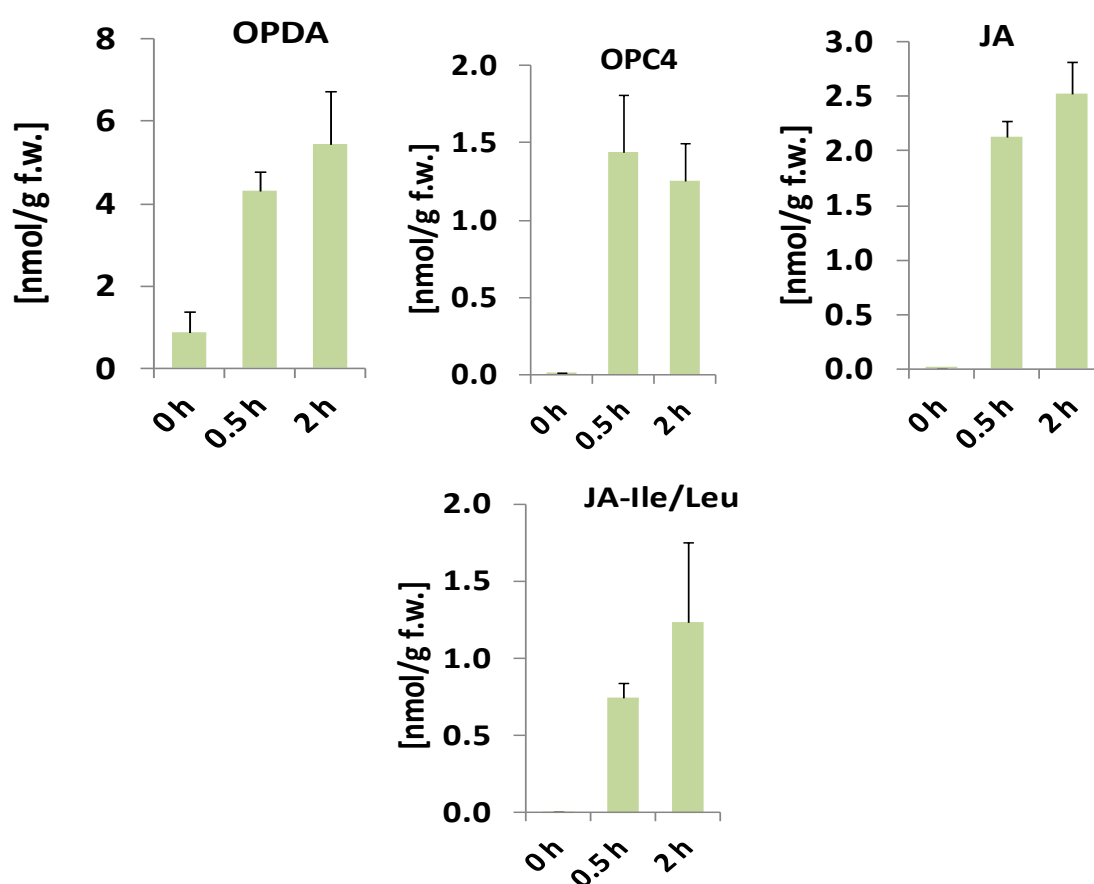


Figura 7. Análise quantitativa do ácido jasmônico (Aj), o derivado do aminoácido ativo jasmonil-isoleucina (Aj-Ile), e os precursores de AOFD e OPC-4 em extratos de folha de plantas feridas e dos correspondentes controles de *Arabidopsis thaliana*. As rosetas das plantas a serem analisadas foram colhidas não-feridas no início da experiência, bem como 30 min e 2 h após o ferimento, respectivamente, e imediatamente choque-congelado em nitrogênio líquido. Após extração, os analitos foram quantificados por análise HPLC/nano ESI-MS/MS. [f.w.=peso fresco]

Discussão

O método de HPLC acoplado a espectrometria de massa em tandem aqui descrito permite a análise quantitativa de fitohormonas no intervalo de concentração pico molar.

A elevada sensibilidade e especificidade requerida do método, também colocam exigências especiais sobre a qualidade dos solventes usados. Durante a separação cromatográfica, o gradiente utilizado, respectivamente, dos solventes é responsável pela eluição, passo a passo, dos analitos na coluna.

Na fonte do espectrômetro de massa, os solventes são em seguida evaporados por um fluxo de gás e os analitos transferido como íons livres para a fase gasosa. No caso de ionização positiva, os analitos são idealmente presentes na forma protonada ($[M+H]^+$), e caso em ionização negativa eles são desprotonados ($[M-H]^-$). No entanto, a absorção de íons estranhos (por exemplo, Na^+ , NH_4^+ , Cl^- , CH_3COO^-) pode também produzir íons quase moleculares durante ionização por eletropulverização.

O campo elétrico pode igualmente transportar estes íons no espectrômetro de massa que, em seguida, gera sinais de detector. Por isso, os problemas surgem quando as impurezas dos íons estão presentes no solvente, o que leva a um número de potenciais aductos de analitos. Em particular, os cátions de sódio desempenham um papel significativo na formação do aducto. Em concorrência com $[M+H]^+$ e/ou $[M-H]^-$ eles formam, entre outros, aductos $[M+Na]^+$ ou $[M+Na+\text{ácido acético}-2H]^-$.

Quando a formação de aducto é intensa, uma redução correspondentemente forte ocorre na quantidade de íons protonados e/ou desprotonados (que são geralmente utilizados para a análise). Esta formação de aducto pode diminuir substancialmente a sensibilidade do método e causar um impacto negativo no limite de detecção do analito. Não importa o quão alto o grau de pureza (por exemplo, grau LC-MS), o armazenamento de água em garrafas de vidro pode causar cátions de sódio serem lançados a partir do vidro. Isto também pode gerar um aumento da formação de aducto durante a análise.

Graças ao uso do sistema arium[®] pro VF COT, este problema foi evitado, porque a água ultrapura disponível foi recentemente tratada continuamente para análise HPLC/nano ESI-MS/MS. Experimentos preliminares mostraram que a água ultrapura arium[®] pro mostrou um teor de 3,82 ppb de COT significativamente menor que a média, que a água (grau LC-MS) de garrafas recentemente abertas de fornecedores comerciais, com média de 45,5 ppb de COT (medições em 23 de abril de 2013). Estes resultados também foram confirmados por análises de Tarun

et al. (2014) que provou que garrafas de água, comercialmente compradas, para análise HPLC tinham níveis mais elevados de impurezas orgânicas, em comparação com água ultrapura recém-processada.

Referências

1. Wasternack C., Hause B.: Jasmonsäure – ein universelles Pflanzenhormon, *Biol. Unserer Zeit*, 3/(2014) (44)
2. Kessler A., Baldwin I.T.: Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* 291, 2141 (2001)
3. Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E. E., Wolfender J.-J.: Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in Arabidopsis in Response to Wounding, *Journal of Biological Chemistry* Volume 283, No. 24, June 13, (2008)
4. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V., Shevchenko A., Schwudke D.: Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49: 1137-1146 (2008)
5. Iven T., König S., Singh S., Braus-Stromeyer S.A., Bischoff M., Tietze L.F., Braus G.H., Lipka V., Feussner I., Dröge-Laser W.: Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in Arabidopsis roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant.* 5(6):1389-1402 (2012) [Information in the supplementary data to this article]
6. Tarun M., Monferran C., Devaux C., Mabic S.: Vor Gebrauch beachten - Wie wichtig ist das Reinstwasser für die HPLC?, *LaborPraxis LP 7/8*, 38th Ann. Vol. August 2014

Reconhecimento

Agradecimentos especiais ao Professor Ivo Feussner, Sabine Freitag, Pia Meyer e Hanno Resemann (Departamento de Bioquímica de Plantas do Instituto Albrecht-von-Haller de Ciências Vegetais da Universidade Georg-August de Goettingen, Alemanha) por seu apoio em nosso trabalho.

Contato: Sartorius do Brasil Ltda.

Fone: 11 4362-8900

Email: leadsbr@sartorius.com