

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DE CAFEIROS RESISTENTES AO BICHO-MINEIRO POR MEIO DE ¹H RMN

Daniel de Menezes Darbello¹; Oliveira Guerreiro Filho²; Ana Carolina de Mattos Zeri³

¹ Aluno de mestrado do Curso de Pós-graduação do Instituto Agronômico, Campinas, SP. ddarbello@yahoo.com.br

² Pesquisador, D.Sc., Instituto Agronômico, Campinas, SP. Bolsista de Produtividade em Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora do CNPq. oliveiro@iac.sp.gov.br

³ Pesquisadora, D. Sc., Laboratório Nacional de Biociências/ Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron, Campinas, SP. aczeri@lnls.br

RESUMO: O objetivo nesse estudo foi comparar diferentes métodos de preparo de amostras foliares e de obtenção de extratos foliares de cafeeiros resistentes e suscetíveis a *L. coffeella*, quanto à identificação de metabólitos, por meio ¹H RMN, visando à discriminação entre as classes. Cafeeiros adultos, foram previamente classificados quanto ao nível de resistência ao bicho-mineiro, segundo escala de pontos estabelecida por Ramiro et al., (2004). Quinze plantas resistentes e 15 plantas suscetíveis foram selecionadas para obtenção de duas amostras compostas e destinadas à obtenção dos extratos por meio dos diferentes métodos: folhas liofilizadas e extraídas em água; extrato aquoso obtido a partir de folhas secas em forno de microondas, material vegetal fresco extraído em água e material vegetal fresco extraído em ácido perclórico. Os resultados indicam que a extração obtida em água a partir do material vegetal fresco é eficiente na separação das classes resistentes e suscetíveis além de ser uma técnica de fácil execução e pouco onerosa.

Palavras-chave: Extratos foliares, *L. coffeella*, metabólitos, ¹H RMN

STANDARDIZATION OF EXTRACTION TECHNIQUE FOR METABOLITES IDENTIFICATION OF RESISTANT COFFEE TO LEAF MINER THROUGH ¹H NMR

ABSTRACT: The aim of this study was compare different methods of leaf samples preparation and obtain leaf extracts of resistant and susceptible coffee plants to *L. coffeella*, in order to identify metabolites by ¹H RMN to discriminate between classes. Adult plants were previously classified by level of resistance to leaf miner, according to point scale established by Ramiro et al. (2004). Fifteen resistant and 15 susceptible plants were previously selected to obtain two compound samples and intended for obtain extracts by different methods, such as lyophilized leaves and extracted in water, aqueous extract obtained from dried leaves in a microwave oven, fresh plant material extracted in water and fresh plant material extracted in perchloric acid. The results obtained indicate that the extraction in water from the fresh plant material is effective in separating the resistant and susceptible classes in addition to being a simple and inexpensive technique.

Key words: extracts, *L. coffeella*, metabolites, ¹H NMR

INTRODUÇÃO

Genes de resistência a *Leucoptera coffeella*, Guérin-Méneville, 1842 (Lepidoptera-Lyonetiidae), presentes na espécie *C. racemosa*, foram transferidos para *C. arabica* visando ao desenvolvimento de cultivares resistentes ao bicho-mineiro, a mais importante praga da cafeicultura brasileira. Entretanto, por ser o cafeeiro uma espécie perene e de ciclo reprodutivo longo, o tempo e os recursos empregados na seleção de novas cultivares são relativamente consideráveis. Uma das táticas para abreviar o período de seleção e reduzir os custos com a experimentação agrônômica é a realização de seleção precoce de plantas.

Uma poderosa ferramenta para execução de seleção precoce são os biomarcadores que podem ser identificados por meio da metabolômica, técnica que busca identificar e caracterizar metabólitos celulares facilitando o entendimento de como o genótipo de um indivíduo está relacionado com seu fenótipo (Fukasaki e Kobayashi, 2005; Binneck, 2004).

A ressonância magnética nuclear de prótons (¹H RMN) é uma técnica de grande utilidade para a metabolômica, uma vez que, a princípio, qualquer produto constituído por compostos químicos que contenham prótons, emite sinais que podem ser captados pela técnica (Krishnan et al. 2005). Através da ¹H RMN de um material é possível identificar a composição e as semelhanças e, explorar a variabilidade natural deste material (Fiehn, 2002).

Porém, não se tem, até o momento, um protocolo de obtenção de extratos de folhas de cafeeiros para identificação de metabólitos por meio de ¹H RMN. O objetivo deste trabalho se relaciona ao estabelecimento de um método de preparo de amostra de tecidos foliares e de extração de metabólitos de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro visando a definição de um protocolo de fácil execução, menos oneroso e que permita a separação entre as estas classes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cafeeiros adultos foram classificados quanto ao nível de resistência a *L. coffeella*, segundo a escala de pontos estabelecida por Ramiro et al (2004). Após identificação, foram selecionadas 30 plantas, sendo 15 resistentes e 15 suscetíveis, com notas 1 e 4 respectivamente. Retirou-se uma folha de cada planta para obtenção de uma amostra composta das respectivas classes resistentes e suscetíveis.

Diferentes métodos de processamento do material vegetal foram avaliados quanto à qualidade do extrato aquoso (Figura 1). Extratos aquosos foram obtidos por meio da técnica descrita por Gomes-Cadenas et al. (2002), a partir de amostras liofilizadas (L) e desidratadas em forno microondas (M) segundo Marur & Sodek (1995). Extratos obtidos a partir de material vegetal fresco utilizando água como solvente (F) (Gomes-Cadenas et al., 2002) e ácido perclórico (AP) (Kruger et al., 2008), também foram avaliados. Em meio onde foi utilizada a água como solvente diluiu-se tampão fosfato de sódio (pH 7.0), para que se mantivesse uniforme o pH das amostras.

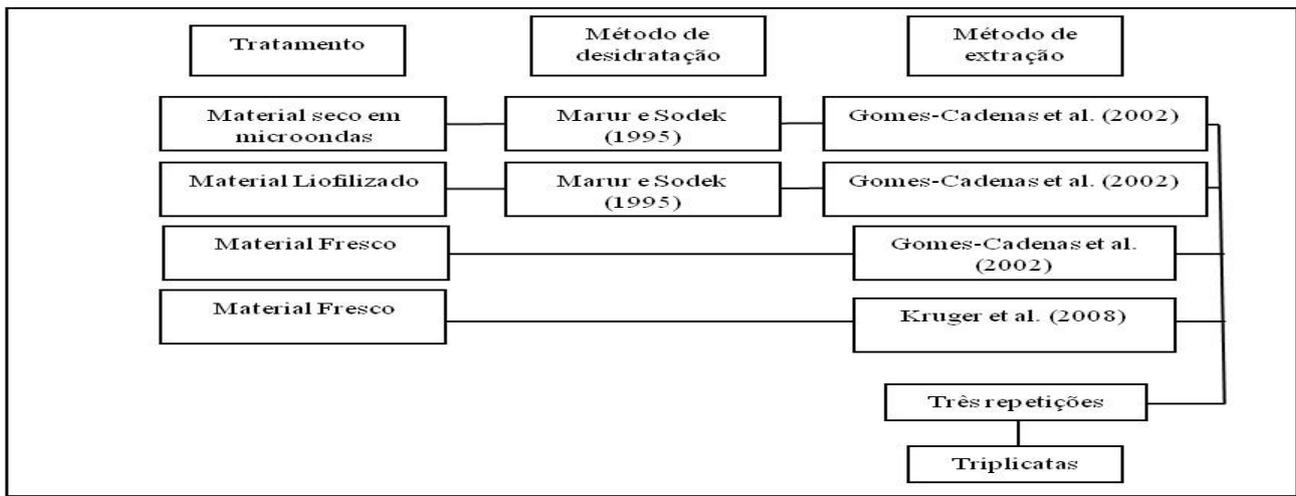


Figura 1. Esquema de obtenção dos tratamentos a partir dos métodos de desidratação e extração.

Nos tratamentos F e M, foram realizadas análises de três repetições lidas em triplicatas. No tratamento L, realizou-se duas repetições com triplicatas e no método AP, tendo em vista a complexidade do método, algumas amostras foram perdidas, sendo lidas apenas uma repetição em triplicata do grupo resistente e duas repetições lidas em duplicatas do grupo suscetível.

Um volume de 500 μ L foi obtido das amostras após a filtragem em dispositivos capazes de reter moléculas de 3kDa e transferido para tubo de RMN para posterior aquisição dos espectros. Utilizou-se como *locking* e referência para concentração, 0,5 mM de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS), concentração final com 10% D_2O .

Para aquisição dos espectros unidimensionais de 1H , foi utilizado o espectrômetro Varian 500MHz do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), através de seqüências de pulsos otimizadas para supressão do sinal da água. O aplicativo *Chemomx* NMR Suite foi utilizado para o tratamento e análise dos dados de RMN com base na tecnologia de *Targeted profiling*.

A eficiência do método foi avaliada a partir da separação obtida entre as classes resistente e suscetível, por meio da análise fatorial discriminante por regressão de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e parâmetros quimiométricos como o erro padrão (SEC - *standard error of calibration*) e coeficiente de correlação para calibração (rCal).

RESULTADOS

Perfis metabólicos diferenciados foram caracterizados nos quatro métodos de extrações realizados, provavelmente, pela particularidade apresentada em cada técnica de processamento das amostras (Tabela 1). Os materiais frescos foram extraídos a partir de solventes diferentes, como água e ácido perclórico, e os materiais desidratados foram expostos a mecanismo distintos de retirada da água, uma vez que a secagem do material vegetal por meio de forno de microondas provoca o aquecimento de seu interior até sua superfície (BARBOZA et al., 2001) e a liofilização que realiza a desidratação das folhas através da sublimação da água nelas contidas (GAVA, 1999).

Tabela 1- Compostos metabólicos identificados a partir de diferentes métodos de obtenção dos extratos vegetais analisados por ¹H RMN.

Metabólito	Material Liofilizado (L)	Material Fresco (F)	Material desidratado por microondas (M)	Material extraído com ácido perclórico (AP)
1,3-Dimetilurato	●	●	●	●
Alanina				X
Aspartato		X		
Epicatequina		X		
Ferulato	●		●	
Frutose	●	●	●	●
Fumarate				X
Gluconato	●	●	●	●
Glucose				X
Malato	●	●	●	●
Fenol			X	
Sacarose	●	●	●	●
Treonine				X
Trigonelina	●	●	●	●
Urocanate	●		●	
X (composto sem identificação)	●	●	●	
II-Metilhistidina	●	●		

X – variável exclusiva do método; ● variável comum a outros tratamentos.

A partir dos resultados das análises fatorial discriminantes (PLS-DA) dos dados experimentais verificou-se que todos os métodos testados para obtenção dos extratos, permitem o agrupamento das amostras dentro das classes resistente e susceptível a partir de leituras efetuadas por ¹H RMN (Figura 2).

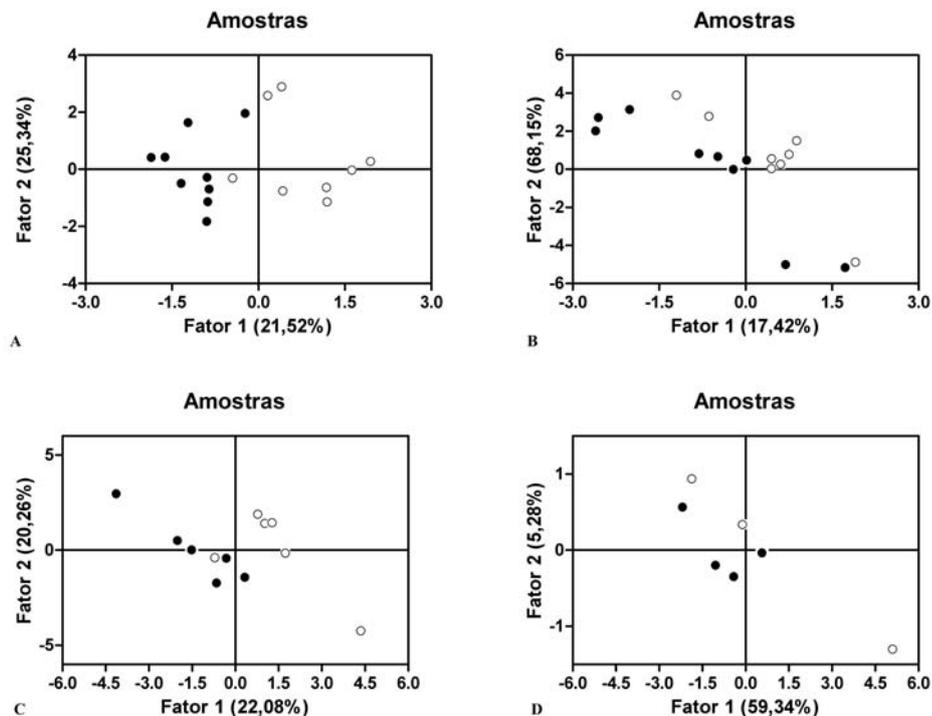


Figura 2. Análise fatorial discriminante (PLS-DA) realizada com metabólitos identificados em plantas resistentes (○) e susceptíveis (●) ao bicho-mineiro após extração em água de folhas frescas (A), extração em água de folhas secadas em forno microondas (B), extração em água de folhas liofilizadas (C) e extração em ácido perclórico de folhas frescas (D).

A eficiência de um modelo PLS-DA esta relacionada com sua “robustez”, ou seja, com a habilidade de previsão das amostras em suas respectivas classes, apresentando um decréscimo nos valores de erro padrão (SEC - *standard error of calibration*) e um aumento nos valores de coeficiente de correlação para calibração (rCal) (Ferrão et al, 2001). Estes parâmetros são obtidos a partir da variância apresentada nas componentes principais (fatores) e são considerados satisfatórios quando possuem valores próximos de 1 para rCal (prevendo amostras com 100% de acerto) e próximos de 0 para SEC (indicando 0% de erro de classificação).

Todos os modelos obtidos a partir das quatro técnicas de extração apresentaram relativos baixos valores de SEC e altos valores de rCal (Tabela 2) e conseqüentemente uma separação dos tratamentos resistente e susceptível (Figura 2).

Tabela 2. Parâmetros quimiométricos dos modelos PLS-DA dos tratamentos F, AP, L e M.

Tratamento	Nº de fatores	Variância (%)	SEC	rCal
Material vegetal fresco (F)	3	71,49	0,27	0,87
Material vegetal extraído por Ácido perclórico (AP)	3	79,07	0,28	0,92
Material vegetal liofilizado (L)	3	50,29	0,28	0,88
Material vegetal desidratado por microondas (M)	3	88,37	0,29	0,85

CONCLUSÕES

O método de extração de metabólitos a partir de folhas frescas usando água como solvente é um protocolo eficiente para classificação dos grupos resistentes e susceptíveis ao bicho-mineiro, permite a separação das classes e apresenta valores satisfatórios de rCal e SEC. É também o método com menor número de etapas e menor custo de execução, comparado aos demais métodos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOZA, A.C.R.N. et al. Aquecimento em forno de microondas/desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v.24, n.6, p.901-904, 2001.
- BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biociência**, v.1, n.32, p.28-37, 2004.
- FERRÃO, M.F. Técnicas de Reflexão no Infravermelho Aplicadas na Análise de Alimentos. **Tecno-Lógica**, v. 5, p. 63-85, 2001.
- FIEHN, O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.155-171, 2002.
- FUKUSAKY, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.4, p.347-354, 2005.
- GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. Ed. Nobel, São Paulo, p. 56-77 1999.
- GOMEZ-CADENAS, A.; POZO, O. J.; GARCIA-AUGUSTIN P.; SANCHO J. V. Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray/tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.228-234, 2002.
- GUERREIRO-FILHO, O. MAZZAFERA P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner, *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p.1447-1464, 2000.
- KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.410, p.255-265, 2005.
- KRUGER, J.N.; TRONCOSO-PONCE, M.A.; RATCLIFFE, R.G. ¹H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. **Nature Protocols**, vol.3, n.6, p. 1001-1012, 2008.
- MARUR, C. J.; SODEK, L. Microwave drying of plant material for biochemical analysis. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, p.111-114, 1995.
- RAMIRO, D. A.; GUERREIRO-FILHO, O.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; MATTHIESEN, S. C. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. **Bragantia**, v.63, p.363-372, 2004.