

A ESPECTROMETRIA DE MASSA COMO TÉCNICA ANALÍTICA DE EXCELÊNCIA EM METABOLÓMICA DE PLANTAS

Carla António

Plant Metabolomics Laboratory, ITQB NOVA, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Avenida da República, 2780-157 Oeiras, Portugal

antonio@itqb.unl.pt

Mass Spectrometry as Analytical Technique of Excellence in Plant Metabolomics Research – *Global climate change and population growth are two major challenges of the 21st century. Crop losses due to climate-related stresses have worsened over the past decades, and current climate models predict an increased occurrence of droughts, floods and extreme temperatures. This scenario together with the growth in food demand is expected to pose a real threat to global food security. It is therefore imperative to develop strategies to improve food availability in variable environments, and ultimately, transfer this knowledge to farmers in the time frame needed. Although much progress has been done over the past years in the area of abiotic stress in plants, the mechanisms defining plant resilience to such adverse conditions are still not completely understood. One approach to improve our knowledge of plant tolerance to environmental stress is to reveal the underlying central metabolic pathways that might play an important role in supporting cellular homeostasis to ensure plant survival in adverse conditions. Metabolomics is therefore aiming to find an increasing number of applications to investigate interesting biological questions related to plant environment and agriculture, particularly, when coupled to highly sensitive mass spectrometry (MS)-dedicated analytical techniques.*

As alterações climáticas e o crescimento da população são dois grandes desafios do século XXI. Nas últimas décadas, perdas na colheita de produtos agrícolas devido a padrões ambientais instáveis têm vindo a aumentar, e modelos climáticos preveem um aumento da ocorrência de secas, inundações, e temperaturas extremas. Este cenário representa uma ameaça para a segurança alimentar global. É, portanto, crucial desenvolver estratégias para melhorar a disponibilidade de alimentos em climas variáveis, e transferir esse conhecimento aos agricultores a curto prazo. Embora nos últimos anos se tenham vindo a observar rápidos avanços na área da tolerância das plantas ao stresse abiótico, os mecanismos que definem a resiliência da planta a condições adversas são ainda largamente desconhecidos. Uma abordagem para melhorar o nosso conhecimento da tolerância da planta ao stresse é revelar as vias metabólicas centrais que podem desempenhar um papel importante no auxílio da homeostase celular, para garantir o crescimento e desenvolvimento da planta em condições adversas assegurando, assim, a sua sobrevivência. Neste sentido, a metabolómica associada a técnicas analíticas altamente sensíveis baseadas na espectrometria de massa (MS) tem vindo a aumentar o número de aplicações para investigar questões biológicas relacionadas com o meio ambiente e agricultura.

1. O CLIMA ESTÁ A MUDAR

Nos últimos anos, o aumento significativo de padrões ambientais instáveis associados a alterações climáticas tem provocado enormes perdas de produtividade agrícola a nível mundial. Modelos climáticos atuais preveem um aumento da incidência de secas, inundações, e temperaturas extremas para os próximos anos [1-4]. Esta situação, juntamente com o aumento global da população, representa uma ameaça real para a segurança alimentar [5,6]. É, portanto, imperativo desenvolver estratégias para melhorar substancialmente a disponibilidade de alimentos em ambientes variáveis e transferir esse conhecimento aos agricultores no período de tempo necessário. Estas estratégias têm sido progressivamente realizadas através de programas de melhoramento genético [7] e de biotecnologia [8] que usam métodos inovadores para desenvolver plantas com tolerância reforçada a stresse abiótico. Embora nos últimos anos se tenham realizado enormes avanços nesta área, os mecanismos que definem a resiliência da planta a condições adversas são ainda largamente desconhecidos. Uma abordagem para melhorar o nosso conhecimento da tolerância da planta ao stresse ambiental é revelar as vias metabólicas

centrais que podem desempenhar um papel importante na modulação do seu crescimento e desenvolvimento em resposta a essa determinada condição ambiental adversa que, em ambiente natural, é sempre uma combinação de vários factores [9,10]. Neste sentido, a metabolómica associada a técnicas analíticas baseadas na espectrometria de massa (MS) tem encontrado um número crescente de aplicações para investigar questões biológicas relacionadas com o meio ambiente e agricultura.

2. METABOLÓMICA DE PLANTAS

As plantas são organismos sésseis e, como tal, não podem escapar a condições ambientais adversas que afetam negativamente o seu crescimento e desenvolvimento. A sua sobrevivência depende, assim, de encontrar respostas adaptativas complexas que envolvem não só a deteção do stresse e a transdução de sinal, como também a ativação de um certo número de genes e metabolitos relacionados com o stresse [9,10]. A metabolómica é uma tecnologia “omics” emergente centrada na identificação e quantificação de moléculas de baixo peso molecular (metabolitos) que compõem o metaboloma de um dado organismo, órgão, tecido ou célula.

la, num dado estágio de desenvolvimento ou em condições ambientais particulares [11]. Ao contrário de genes e proteínas, cujas funções estão sujeitas a regulação epigenética e modificação pós-traducional, respetivamente, os metabolitos funcionam como assinaturas diretas da atividade bioquímica e, portanto, são mais fáceis de correlacionar com o fenótipo [12]. Estudos do metaboloma de plantas incluem a análise de uma grande variedade de espécies químicas com propriedades físico-químicas distintas, desde compostos inorgânicos iónicos, derivados de hidratos de carbono hidrofílicos, ácidos orgânicos e aminoácidos, a uma série de compostos lipídicos hidrofóbicos. Por outro lado, o metaboloma da planta estende-se ao longo de uma vasta gama dinâmica de concentrações *in vivo* que pode variar de femtomolar a milimolar [13]. Para aumentar esta complexidade, estima-se que existam mais de 200 mil metabolitos diferentes no reino vegetal [14,15]. Esta complexidade traz enormes desafios para as tecnologias analíticas aplicadas nos programas atuais de investigação na área da metabolómica das plantas. Em resultado disso, frequentemente são utilizadas diversas técnicas de extração e combinações de métodos analíticos na tentativa de atingir uma cobertura metabólica adequada [13-16]. No entanto, e em contraste com a transcriptómica e a proteómica, a metabolómica tem a vantagem de não ser dependente da disponibilidade da informação do genoma específico do organismo para a análise de dados [16].

3. A ESPECTROMETRIA DE MASSA EM METABOLÓMICA DE PLANTAS

Devido à sua elevada sensibilidade, a espectrometria de massa (MS) é atualmente a técnica analítica de excelência em estudos de metabolómica de plantas para abordar questões relacionadas com o meio ambiente e agricultura e, quando acoplada a técnicas cromatográficas, tais como, a cromatografia líquida (LC-MS) ou a cromatografia em fase gasosa (GC-MS), permite a separação, caracterização, e quantificação de um elevado número de metabolitos presentes no metaboloma da planta (Figura 1) [16-19].

Metodologias baseadas em LC-MS são particularmente adequadas para a caracterização de um pequeno conjunto de metabolitos conhecidos do metaboloma da planta (*target metabolite analysis*) e também para a caracterização do metaboloma da planta em larga escala (*untarget metabolite analysis*). Geralmente, em aplicações de LC-MS, o méto-

do de ionização mais utilizado é o *electrospray* (ESI), uma técnica de ionização suave que introduz pouca energia interna, e como tal, gera pouca informação sobre a estrutura da molécula porque apenas alguns fragmentos são obtidos [20]. Dentro da vasta gama de instrumentos MS disponíveis atualmente no mercado para aplicações de metabolómica de plantas com base em LC-MS (por exemplo, triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo *ion trap* (QIT), quadrupolo de tempo de voo (QTOF), quadrupolo *Orbitrap*), métodos LC-QqQ-MS são desejáveis em abordagens quantitativas. Espectrómetros de massa do tipo triplo quadrupolo (QqQ-MS) permitem a realização de ensaios de monitorização de reações múltiplas (MRM) (do inglês *multiple reaction monitoring*) que são ensaios altamente específicos e sensíveis e, daí, particularmente importantes para a quantificação absoluta de metabolitos presentes em baixa concentração *in vivo* (fito-hormonas e açúcares fosforilados, por exemplo) [18].

A GC-MS é considerada uma técnica analítica de eleição em estudos de metabolómica de plantas [11,13,15,16, 20-24], incluindo estudos de stresse abiótico [17,18]. Métodos de GC-MS têm vantagem sobre os métodos de LC-MS porque são capazes de analisar uma grande variedade de metabolitos com diferentes propriedades físico-químicas (por exemplo, hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgânicos, poliaminas) num único extrato de planta. Além disso, GC-MS é uma técnica mais reprodutível do que LC-MS devido ao método de ionização por ionização eletrónica (EI), em que as moléculas em fase gasosa interagem com eletrões cineticamente ativados com uma energia média padrão de 70 eV. Os espectros de massa GC-EI-MS são por isso altamente reprodutíveis em equipamentos semelhantes, facilitando assim a construção de bibliotecas de espectros de massa de padrões de referência [20-22]. No entanto, a GC-MS é apenas capaz de analisar metabolitos voláteis e termicamente estáveis e requer um passo de derivatização para modificar quimicamente compostos não-voláteis (a maioria dos metabolitos primários) para produzir derivados voláteis. O protocolo de derivatização para estudos de metabolómica baseados em GC-MS está bem estabelecido e inclui duas reações químicas (i) metoxiamação seguida de (ii) sililação [18,21-23]. Alguns metabolitos termolábeis (açúcares fosforilados, por exemplo), bem como metabolitos que não se volatilizam mesmo após derivatização (oligossacáridos de ordem superior ao trissacárido rafinose, por exemplo) não são passíveis de ser analisados por GC-MS, e assim, abordagens baseadas



Figura 1 – Típico *workflow* utilizado em metabolómica de plantas: do desenho experimental e preparação da amostra à análise de metabolitos com base em técnicas de espectrometria de massa.

em LC-MS são a melhor escolha para a sua identificação e quantificação [18,24,25]. GC-Q-MS permite uma análise sensível e confiável com um custo acessível; no entanto, apresenta uma reduzida precisão na massa medida. Por outro lado, GC-TOF-MS oferece precisão na massa medida e tempos de aquisição rápidos. Além disso, permite deconvolução precisa dos picos sobrepostos tipicamente encontrados em matrizes biológicas complexas como os extratos de plantas. Em abordagens de GC-MS, os metabolitos são frequentemente quantificados utilizando quantificação relativa calculada usando a área do pico do metabolito dividida pela área do pico do padrão interno (ribitol, por exemplo) e o peso fresco/seco da amostra. A quantificação absoluta pode ser obtida se forem incluídas na análise de GC-MS curvas de calibração de metabolitos específicos [17,22].

4. CONCLUSÕES & PERSPETIVAS

Conforme descrito acima, devido à sua elevada sensibilidade, MS é a técnica analítica de excelência em estudos de metabolómica de plantas. A determinação dos perfis metabólicos por GC-MS tem a vantagem de permitir uma cobertura relativamente ampla de classes de compostos, e o interesse da sua aplicação no campo das respostas metabólicas das plantas a perturbações genéticas e/ou ambientais (fatores abióticos/bióticos) continuará a crescer. No entanto, são necessários avanços rápidos nas tecnologias de MS aplicadas à metabolómica, de forma a aumentar não só a cobertura de metabolitos existente no metaboloma da planta mas também aumentar a resolução espacial e temporal da análise do metaboloma. É importante referir que melhorias na sensibilidade dos espectrómetros de massa serão sempre de grande interesse, uma vez que a sensibilidade determina o limite de deteção, o qual é particularmente importante para quantificar metabolitos presentes em baixa concentração *in vivo*. Por outro lado, são também necessárias melhorias no desenvolvimento de plataformas de bioinformática para uma anotação mais precisa dos metabolitos. Por último, mas não menos importante, a investigação em metabolómica exige investimentos substanciais (ao nível instrumental) pela maioria das universidades e unidades de I&D. Ao apoiar uma ampla gama de estudos na área da metabolómica, desde a fisiologia vegetal à investigação biomédica, muitos cientistas e colaboradores podem aceder não só a um conhecimento científico de ponta mas também a um conjunto sofisticado de ferramentas de análise estatística desenvolvidas para facilitar a análise de dados e interpretação biológica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através do Programa Investigador iFCT (IF/00376/2012/CP0165/CT0003) e pela unidade de inves-

tigação ITQB NOVA Green-it 'Biorecursos para a Sustentabilidade' (UID/Multi/04551/2013), Portugal.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Bailey-Serres, S.C. Lee, E. Brinton, *Plant Physiol.* **160** (2012) 1698–1709.
- [2] C.E. Bitra, T. Gerats, *Front. Plant Sci.* **4** (2013) 273.
- [3] J.M. Craine, T.W. Ocheltree, J.B. Nippert, E.G. Towne, A.M. Skibbe, S.W. Kembel, J.E. Fargione, *Nature Clim. Change* **3** (2013) 63–67.
- [4] Y. Hirabayashi, R. Mahendran, S. Koirala, *Nature Clim. Change* **3** (2013) 816–821.
- [5] T. Iizumi, H. Sakuma, M. Yokozawa, *Nature Clim. Change* **3** (2013) 904–908.
- [6] C. Rosenzweig, J. Elliott, D. Deryng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (2014) 3268–3273.
- [7] M.V. Mickelbart, P.M. Hasegawa, J. Bailey-Serres, *Nat. Rev. Genet.* **16** (2015) 237–251.
- [8] M. Reguera, Z. Peleg, E. Blumwald, *Biochim. Biophys. Acta* **1819** (2012) 186–194.
- [9] R. Mittler, *Trends Plant Sci.* **11** (2006) 15–19.
- [10] K. Saito, F. Matsuda, *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** (2010) 463–489.
- [11] O. Fiehn, J. Kopka, P. Dormann, T. Iltmann, R.N. Trethewey, L. Willmitzer, *Nature Biotechnol.* **18** (2000) 1157–1161.
- [12] O. Fiehn, *Plant Mol. Biol.* **48** (2002) 155–171.
- [13] A. Fernie, *Funct. Plant Biol.* **30** (2003) 111–120.
- [14] A.R. Fernie, *Phytochem.* **68** (2007) 2861–880.
- [15] K. Saito, F. Matsuda, *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** (2010) 463–489.
- [16] J. Kopka, A. Fernie, W. Weckwerth, Y. Gibon, M. Stitt, *Genome Biol.* **5** (2004) 109.1–109.9.
- [17] T. Obata, A.R. Fernie, *Cell. Mol. LifeSci.* **69** (2012) 3225–3243.
- [18] T.F. Jorge, J.A. Rodrigues, C. Caldana, R. Schmidt, J.T. van Dongen, J. Thomas-Oates, C. António, *Mass Spectrom. Rev.* **35** (2016) 620–649.
- [19] T. Hirayama, K. Shinozaki, *Plant J.* **61** (2010) 1041–1052.
- [20] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 4451–4459.
- [21] U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R.N. Trethewey, L. Willmitzer, *Plant J.* **23** (2000) 131–142.
- [22] J. Kopka, *J. Biotechnol.* **124** (2006) 312–322.
- [23] J. Lisec, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer, A.R. Fernie, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 387–396.
- [24] W. Weckwerth, *Annu. Rev. Plant Biol.* **5** (2003) 669–689.
- [25] Z. Lei, D.V. Huhman, L.W. Sumner, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 25435–25442.

