

# Determinação de múltiplos hormônios em tecidos vegetais utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

**Lázaro Aleixo dos Santos<sup>1</sup>(IC), Camilo Elber Vital<sup>1</sup>(PQ), Humberto Josué de Oliveira Ramos<sup>1\*</sup>(PQ)**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa, Núcleo de Análise de Biomoléculas – NuBioMol, Vila Gianetti, casa 21.

Palavras Chave: Fitohormônios, Espectrometria de massas, Cromatografia Líquida.

## Introdução

Fitohormônios são compostos estruturalmente diversos e importantes para a regulação de vários processos fisiológicos em plantas, incluindo desenvolvimento, reprodução, crescimento e respostas para estresses bióticos e abióticos. Devido à baixa concentração nas plantas ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup>, sua diversidade em estruturas químicas e propriedades físico-químicas, o desenvolvimento de um método único para determinação de hormônios é um desafio. Alguns métodos de identificação necessitam de várias etapas de extração/separação e não possibilitam a análise destes compostos simultaneamente, aumentando o tempo de análise e o risco de perda destes produtos. Duas técnicas importantes, baseadas em métodos cromatográficos acoplados a um espectrometro de massas (LC-MS ou GC-MS), tem sido utilizadas para a determinação dos níveis de fitohormônios. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia eficiente para a extração e quantificação simultânea dos principais hormônios em diferentes plantas e tecidos vegetais.

## Resultados e Discussão

Os hormônios foram extraídos de folhas, caule e raízes de cana-de-açúcar, bem como de folhas de fáfia e soja. Para isso, seguiu-se a metodologia descrita por FORCAT et al<sup>2</sup>(2008) com modificações. Cerca de 110 mg de tecido fresco foi macerado em nitrogênio líquido seguida da adição de 400  $\mu$ l de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1). As amostras foram agitadas em vortex (4 vezes por 20 segundos), sonicadas (5 minutos) e mantidas em banho de gelo (30 minutos). Após centrifugação (13000g, 10 min a 4°C), 350  $\mu$ l do sobrenadante foi coletado para novo tubo. Ao pellet resultante repetiu-se o processo de extração e, em seguida, junto-se os sobrenadantes. Uma última centrifugação (20000g, 5min a 4°C) foi realizada para remoção de restos de tecido em suspensão. 5 $\mu$ l do extrato foram injetados no sistema LC-MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance - modelo 1200 Infinity series - acoplado a Espectrômetro de Massas tipo Quadrupolo Sequencial - modelo 6430 Agilent). A fase móvel consistiu em: (A) ácido fórmico 0,1% em

água e (B) ácido fórmico 0,1% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A análise dos hormônios foi feita no modo MRM (multiple reaction monitoring) e monitorou-se as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas mediante testes de fragmentação de cada molécula: Zeatina(220/136), Etileno-ACC (102,1/56,2), ABA(263/153), AIA(176/130), SA(137/93), GA3(345/142.9),JA (209/59), GA4(331/213; 331/243) e o normalizador interno NAA (185/141). Foi feita uma curva de calibração utilizando os respectivos padrões para a obtenção da quantificação absoluta de cada hormônio. Os dados gerados foram analisados na plataforma MassHunter para obtenção da área dos picos e tempo de retenção de cada hormônio em cada amostra. Os resultados das análises em folhas de cana-de-açúcar mostraram picos definidos para a maioria dos hormônios analisados (exceto GA3). Além do mais, as amostras, quando submetidas a estresse hídrico, variaram o conteúdo dos hormônios exatamente como relatado em estudos fisiológicos. Da mesma forma, ocorreu para os hormônios analisados em caule e raiz mas nem todos hormônios puderam ser detectados. Possivelmente os hormônios não detectados, ou estão ausentes no tecido ou em concentração abaixo do limite de detecção. Os testes realizados em folhas de soja e fáfia confirmaram a eficiência do método em plantas diversas.

## Conclusões

Devido a multiplicidade de funções e da complexa interação entre os hormônios vegetais, quantificá-los abre caminho para um melhor entendimento da fisiologia vegetal. O método otimizado nesse estudo vem de encontro ao objetivo e permite a análise de múltiplos hormônios vegetais em apenas uma injeção de amostra.

## Agradecimentos

FAPEMIG, CNPQ

<sup>1</sup> Müller, M.; Munné-Bosch, S., Plant Methods 2011, 7:37.

<sup>2</sup> Forcat, S.; Bennet, M. H.; Mansfield, J. W. e Grant, M. R., Plant Methods 2008, 4:16.