

Metabolômica e RMN de ^1H em diagnóstico de doenças: estudo de caso de *Huanglongbing* (HLB)

João Guilherme de Moraes Pontes*¹ (PG), Ana Paula D. M. Espindola¹ (PQ), Jaqueline Sanitá¹ (IC), William Yutaka Ohashi¹ (IC), Helvécio Della Coletta Filho² (PQ), Ljubica Tasic¹ (PQ).

* joao.pontes@iqm.unicamp.br

¹ Laboratório de Química Biológica, IQ, Universidade Estadual de Campinas.

² Laboratório de Biotecnologia, Instituto Agrônomo de Campinas.

Palavras Chave: *metabolômica, laranjas e patógenos.*

Introdução

A metabolômica é a mais nova plataforma “ômica” aplicada nos estudos de organismos, onde as mudanças metabólicas frente a um estímulo são analisadas de forma bastante abrangente. Através de uma comparação entre os níveis de metabólitos basais do organismo e dos metabólitos gerados após uma infecção, as informações sobre as interações entre hospedeiro e patógeno podem ser obtidas, melhorando significativamente o diagnóstico de doença e a identificação de biomarcadores da dada infecção. Para se analisar o metaboloma, é fundamental utilizar uma ferramenta instrumental rápida e reproduzível e que requeira um método simples de preparo das amostras. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H é uma das técnicas que atende estes pré-requisitos além de que ela permite o monitoramento simultâneo de uma variedade de compostos sem ser destrutiva.

Nosso objetivo principal é estudar a infecção de laranjas provocada pela bactéria Gram-negativa *Candidatus Liberibacter asiaticus* (**Las**). A *Huanglongbing* (HLB) é uma das doenças de alto impacto econômico que afeta a indústria brasileira causando grandes problemas ao nosso país. Essa infecção é dificilmente combatida e não há eficientes tratamentos.

Resultados e Discussão

A forma de obtenção, preparo e análise das amostras foi cuidadosamente planejada e foram comparadas amostras das folhas das laranjas: (i) saudáveis; (ii) com sintomas evidentes da doença e (iii) amostras das plantas infectadas e ainda assintomáticas. Como a doença é transmitida pelo um vetor (inseto), foi preparado um grupo de controle de plantas saudáveis sob influencia de insetos que não continham a bactéria *Liberibacter*. A escolha de mais eficiente método de obtenção de extrato de metabólitos, também, foi cuidadosamente executada e o solvente clorofórmio/metanol (1:1, v/v) foi selecionado. Os espectros de RMN de ^1H , TOCSY $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ e espectros com o filtro de T_2 , foram adquiridos em um Bruker Avance 600 MHz ($\text{DMSO}-d_6$).¹ Usando as ferramentas quimiométricas foram gerados modelos de separação de amostras.

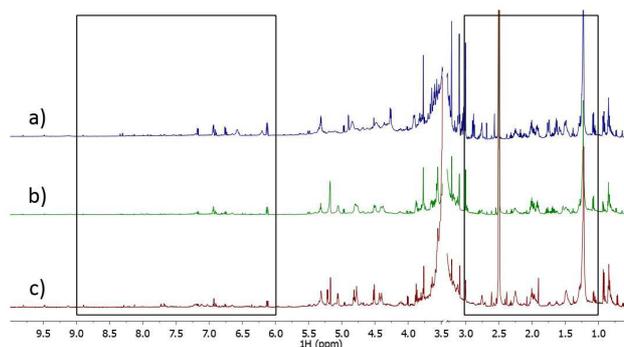


Figura 1. Exemplos dos espectros de RMN de ^1H de folhas saudáveis (a), assintomáticas (b) e sintomáticas (c). As áreas marcadas são as regiões com altos *loadings*, conforme análise por PCA, e que correspondem à presença de lipídios, carboidratos e aminoácidos.

Nossos resultados iniciais permitiram classificar as amostras (105 no total) em saudáveis e sintomáticas, sendo que mais análises continuarão sendo realizadas afim de se obter uma maior significância estatística para classificação das assintomáticas que foram agrupadas junto aos grupos de saudáveis ou doentes.

Conclusões

As maiores mudanças no perfil metabólico após infecção com a **Las** nas folhas de laranja ocorreram nas regiões de 1,0-3,0 e 6,0-9,0 ppm indicativas para lipídios (terpenos), carboidratos e aminoácidos. Estes resultados são similares aos obtidos² onde foi visto que logo após da infecção com a **Las** ocorre uma diminuição na taxa de fotossíntese, diminuição na síntese de proteínas e uma elevação da taxa de síntese de amido na planta. Esperamos que a identificação de biomarcadores da HLB permitirá um novo método de diagnóstico dessa doença no campo.

Agradecimentos

CNPq e IAC Citros Sylvio Moreira.

¹ Sussulini *et al.*, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9755.

² Nwugo *et al.* *BMC Plant Biology* **2013**, *13*, 59.