

# Análise quantitativa dos metabólitos produzidos por levedura na via de fermentação da xilose utilizando UHPLC-MS/MS

Christiane G. Campos<sup>1,2</sup> (PG), José Antônio A. Ribeiro<sup>1</sup> (TC), Patrícia P. K. G. Costa<sup>1</sup> (TC), Katiúscia A. Pereira<sup>1,3</sup> (IC), Henrique C. Veras<sup>1,3</sup> (PG), João Ricardo M. Almeida<sup>1,3</sup> (PQ), Clenilson M. Rodrigues<sup>1</sup> (PQ), Patrícia V. Abdelnur<sup>1,2,3</sup> (PQ)\*.

<sup>1</sup>Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil

<sup>3</sup>Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil

\*patricia.abdelnur@embrapa.br

Palavras Chave: espectrometria de massas, UHPLC-MS, metabolômica.

## Abstract

Quantitative analysis of metabolites produced by yeast in the xylose fermentation pathway using UHPLC-MS/MS. Some validation parameters were established and applied during the quantification step of metabolites in xylose pathway.

## Introdução

A metabolômica é uma ferramenta capaz de identificar e quantificar metabólitos presentes em um sistema biológico<sup>1</sup>. A quantificação de metabólitos é uma etapa essencial na identificação de alvos moleculares em vias metabólicas. Neste trabalho, a via de fermentação da xilose é investigada visando melhorar o rendimento do processo de etanol de segunda geração. Para tanto, a seletividade, sensibilidade, linearidade, LOD e LOQ foram determinados para 19 metabólitos utilizando UHPLC-MS/MS. Por fim, os metabólitos da levedura *Spathaspora arborariae* foram quantificados utilizando o método desenvolvido.

## Resultados e Discussão

A cromatografia por pareamento iônico (IPC) e a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) garantiram a seletividade das análises e foram utilizadas para a separação dos metabólitos 1-14 e 15-19, descritos na Tabela 1. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para cada metabólito foram determinados segundo a resolução da ANVISA<sup>2</sup>. A curva de calibração foi construída com seis níveis de concentração, plotando-se a área do pico em função da concentração, dada em µg/mL. A partir do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) pode-se inferir que o método apresentou resposta linear na faixa de trabalho pretendida. Para a análise em modo HILIC foi necessário diluir a amostra 100 vezes, devido à alta concentração de xilose e xilitol. A alta concentração de xilose na amostra deve-se ao fato deste composto atuar como substrato para a célula. O excesso de xilitol, no entanto, indica uma baixa conversão do xilitol a xilulose. A Tabela 1 apresenta os valores obtidos para os parâmetros analisados, utilizando padrões comerciais e amostra real.

**Tabela 1.** Linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e concentração dos metabólitos em amostra de *S. arborariae* obtidos por UPLC-MS/MS.

| Metabólito | Linearidade   |                | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) | Amostra <i>S.arb</i> (µg/mL) |       |
|------------|---------------|----------------|-------------|-------------|------------------------------|-------|
|            | Range (µg/ml) | R <sup>2</sup> |             |             |                              |       |
| 1          | Accoa         | 7.4-80         | 0.9912      | 2.35        | 7.12                         | 16,11 |
| 2          | AKG           | 3.5-50         | 0.9807      | 0.92        | 3.08                         | ND    |
| 3          | L-MAL         | 0.2-50         | 0.9981      | 0.03        | 0.11                         | 48,52 |
| 4          | G3P           | 3.5-50         | 0.9917      | 0.09        | 0.29                         | 5,29  |
| 5          | G6P           | 1.5-50         | 0.9924      | 0.43        | 1.43                         | 9,48  |
| 6          | F6P           | 3.5-50         | 0.9939      | 0.96        | 3.19                         | 4,52  |
| 7          | DHAP          | 2.0-50         | 0.9976      | 0.59        | 1.99                         | 2,25  |
| 8          | GAP           | 3.5-50         | 0.9977      | 0.92        | 3.06                         | ND    |
| 9          | R5P           | 2.0-50         | 0.9903      | 0.65        | 1.99                         | 2,85  |
| 10         | Ru5P          | 2.5-50         | 0.9955      | 0.61        | 2.04                         | ND    |
| 11         | E4P           | 1.0-50         | 0.9987      | 0.29        | 0.98                         | ND    |
| 12         | S7P           | 1.4-30         | 0.9928      | 0.38        | 1.27                         | 37,89 |
| 13         | PEP           | 2.5-50         | 0.9891      | 0.66        | 2.21                         | 11,94 |
| 14         | PYR           | 0.5-50         | 0.9922      | 0.14        | 0.43                         | 2,24  |
| 15         | Xilose        | 0.5-75         | 0.9977      | 0.25        | 0.5                          | 4057  |
| 16         | Xilulose      | 0.5-50         | 0.9996      | 0.25        | 0.5                          | ND    |
| 17         | Glicose       | 0.5-50         | 0.9973      | 0.25        | 0.5                          | ND    |
| 18         | Glicerol      | 0.5-50         | 0.9945      | 0.1         | 0.25                         | ND    |
| 19         | Xilitol       | 0.5-75         | 0.9987      | 0.1         | 0.25                         | 1027  |

ND = não detectado.

## Conclusões

Os parâmetros de UHPLC-MS/MS para a quantificação de 19 metabólitos da via de fermentação de xilose foram determinados no presente trabalho. A sensibilidade e seletividade obtidas na análise mostraram ser suficientes para quantificar os metabólitos em *S. arborariae*, podendo assim ser aplicado para outras leveduras fermentadoras de xilose.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Agroenergia, a Universidade Federal de Goiás e a CAPES pelo apoio institucional e suporte financeiro.

<sup>1</sup>Carnicer, M.; Canelas, B. A.; Pierick, A.; Zeng, Z.; Dam, van J.; Albiol, J.; Ferrer, P.; Heijnen, J. J.; Gulik, van W. *Metabolomics* 2012, 8, 284-298.

<sup>2</sup>Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.