

Metabólitos diferenciais de extrato aquoso de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca* por UPLC-QToF-MS^E

GAMEIRO, D.G.¹; SILVA, D. M.²; COTRIM, G. S.³; HOFFMANN-CAMPO, C. B.³; NUNES, E. O.³; MACHADO, G.D.⁴

¹UTFPR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, danielle_gameiro@hotmail.com; ²UFSC, Florianópolis, SC;

³Pesquisadora, Embrapa Soja; ⁴UTFPR, Londrina, PR.

Introdução

O gênero *Crotalaria* (Fabaceae) possui cerca de 690 espécies relatadas na literatura mundial (Garcia et al., 2013) e as plantas deste gênero podem ser utilizadas como planta de cobertura, no controle de fitonematoides em solos agrícolas, na produção de fibras para a indústria de papel e celulose e uso medicinal por pequenas comunidades para tratar doenças de pele, dentre outras (Silveira; Rava, 2004; Pereira, 2007; Silva-López; Pacheco, 2010; Garcia et al., 2013). No Brasil atualmente o principal uso da crotalaria é como planta de cobertura, para atenuar os problemas de erosão e melhorar os atributos químicos e biológicos relacionados a fertilidade e microbiota do solo, aumentando o aporte de matéria orgânica e promovendo associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio (Pereira, 2007; Andrade et al., 2008). As espécies mais estudadas são *C. juncea*, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis*, que são, também, as que apresentam maior disponibilidade no mercado de sementes (Garcia; Staut, 2018). Além dos usos descritos, muitos compostos de interesse agrônômico têm sido isolados e identificados nas espécies de *Crotalaria* e o seu potencial de usos tem sido promissores (Silva-López; Pacheco, 2010).

O objetivo deste trabalho foi identificar os compostos diferenciais determinados em extratos aquosos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* por meio da análise por cromatografia líquida de ultra resolução (UPLC) acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Materiais e Métodos

Extração e preparo das amostras

Folhas de *C. juncea* (CJ) e *C. ochroleuca* (CO) foram coletadas em casa de vegetação na Embrapa Soja em Londrina, PR. Após limpeza com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA), as folhas foram secas à 40°C em estufa de secagem termostática (SOLAB, SL-100) por 48 h. Na sequência, as folhas secas foram trituradas, utilizando-se um liquidificador industrial de alta velocidade, equipado com copo de inox (Fak, 800 W) sendo 100 g de folhas trituradas de cada espécie transferidas para béqueres de 500 mL. Em seguida, foram adicionados 2 L de água ultrapura e essa mistura foi agitada por 1 hora à 98°C por uma hora. O extrato obtido foi centrifugado (12000 rpm) por 20 min, a 4°C em centrífuga da marca Sorvall, modelo Legend X1R. O sobrenadante foi recolhido e seco em fluxo de nitrogênio (N₂). As amostras secas foram ressolubilizadas com uma solução de acetonitrila (CHROMASOLVTM, LC-MS≥99,9%, Honeywell, Charlotte, USA) a 5% (H₂O: ACN; 95:5 v/v) para se obter uma concentração final de 5 mg mL⁻¹. Essa solução foi filtrada sequencialmente em filtros PVDF de 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro (Merck e Millipore), respectivamente, e transferida para micro tubos de injeção.

Análise cromatográfica por UPLC-QToF-MS^E

Os extratos obtidos foram analisados em UPLC da marca Waters, modelo Acquity acoplado a um espectrômetro de massa Xevo® Quadrupole e Time-of-Flight (Q-TOF) da marca Waters. As análises exploratórias foram realizadas em UPLC (ACQUITY HSS) utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 SB (100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro; com poro de 1,8 µm, da marca Waters mantida à 40°C. A fase móvel consistiu-se de água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (LiChropur®, grau LC-MS, 98%-100%, MERCK) (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). Para eluição dos compostos utilizou-se gradiente: 2-95% B (0-15 min), 100% B (15,1 a 17 min), e equilíbrio com 2% de B (17,1 - 19,1 min) com fluxo de 400,0 µL min⁻¹. O volume de injeção foi 5,0 µL.

A ionização foi realizada utilizando-se uma fonte ionizadora por electrospray, ZSpray™, em modo negativo ESI e a tensão do cone foi de 35 V. O gás de dessolvatação foi o N₂ e a temperatura da fonte foi ajustada em 150°C. A dessolvatação foi executada numa temperatura de 350°C, com fluxo de gás de 500 L.h⁻¹, em cone de extração de 1,5 V e voltagem capilar de 2,6 kV. Os dados MS^E foram obtidos no modo centroide com um intervalo de massa de 100-1100 Da. A função de varredura de baixa energia de colisão foi 6 V e na alta energia variou de 10 - 30 V. Encefalina Leucina foi usada como *Lock mass* (padrão geral de controle) e o equipamento foi controlado pelo software MassLynx 4.1 da marca Waters . As amostras foram injetadas em triplicata.

Análises estatísticas e multivariadas

Os dados brutos obtidos nas análises por UPLC-MS foram processados pelo software Markerynx 4.1 (Waters) e, posteriormente, exportados para o pacote estatístico EzInfo 3.0, também da marca Waters, para análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) foi processada, utilizando a escala de Pareto, e posterior análise de projeção ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA).

Identificação dos metabólitos

A identificação dos metabólitos foi baseada em buscas em bases de dados online, como KNApSAcK *Database*, LMSD (*Lipid Maps Structure Database*), HMDB (*Human Metabolome Database*) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e na literatura quando disponível.

Resultados e Discussão

Pela análise multivariada foi possível identificar os metabólitos que melhor discriminam as duas espécies de crotalaria, com um perfil característico de separação para cada uma das espécies (Figura 1).

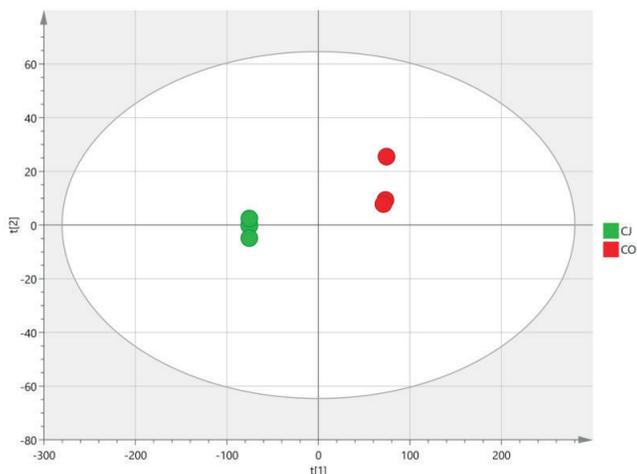


Figura 1. PCA de espectro UPLC-QToF-MS^E de *C. juncea* (CJ) e *C. ochroleuca* (CO).

Após a análise do modelo utilizando OPLS-DA, obteve-se um gráfico S-plot, onde foi possível visualizar os principais metabólitos que representavam as duas variáveis de maior importância em cada um dos grupos, no modelo estatístico. Com base no gráfico de S-plot, selecionou-se quatro potenciais variáveis que correspondem a quatro metabólitos entre o perfil do extrato aquoso de *C. juncea* e de *C. ochroleuca* (Tabela 1). As intensidades médias destes metabólitos estão apresentadas na Figura 2.

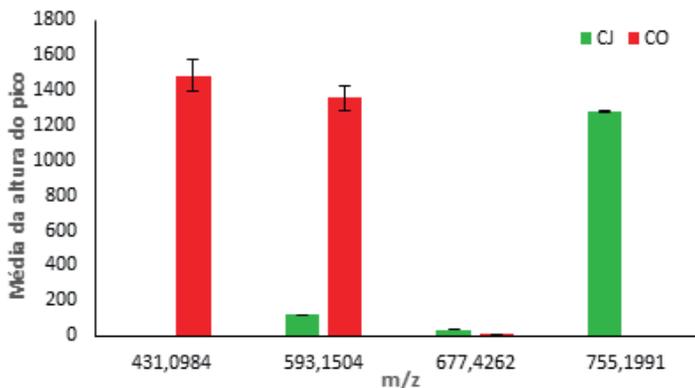


Figura 2. Intensidade média de metabólitos detectados (representados pelas massas-moleculares) em extrato aquoso de *C. juncea* (CJ) e de *C. ochroleuca* (CO).

Tabela 1. Identificação de metabólitos por UPLC-QToF-MS^E para extrato aquoso de *C. juncea* (CJ) e *C. ochroleuca* (CO).

Possível identidade	t _r (min)	m/z	Erro (PPM)	Fórmula molecular	MS/MS	Fator de mudança	Grupo	Referências
Saponina triterpênica	6,30	[M-H] ⁻ 677,4262	-0,4	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₀	229,1478; 211,1369	11,4	CJ CO	Liou; Wu, 2002; Radwan et al., 2004.
Flavona	4,11	[M-H] ⁻ 431,0984	1,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	341,0640; 311,0493; 283,0592	1484,3	CO	Awouafack et al., 2011; Bisby et al., 1994; Mun'im et al., 2003.
Flavona	3,86	[M-H] ⁻ 593,1504	-0,3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	413,0887; 293,0478	11,6	CJ CO	Bisby et al., 1994; Buckingham; Munasinghe, 2015.
Antocianina	2,39	[M-2H] ⁻ 755,2022	-3,1	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	635,1556	1200,8	CJ	Flamini, 2013; Lambert et al., 2015.

O metabólito com m/z 677,4262 foi tentativamente identificado como uma saponina triterpênica, sendo observada em maior quantidade em CJ, mas presente também em CO. Saponinas triterpênicas são abundantes em plantas e possuem atividade antifúngica (Papadopoulou et al., 1999). Esses metabólicos foram também isolados em outras espécies botânicas da família *Crotalaria* (Liou; Wu, 2002; Radwan et al., 2004) que, também, apresentam atividade anti-inflamatória (Anam, 2001).

O metabólito com m/z 431,0984, presente em CO e ausente em CJ, foi identificado como uma flavona, da classe dos flavonoides. Flavonas com mesma massa molecular foram detectados *Crotalaria lachnophora* (Awouafack et al., 2011), *Crotalaria micans* (Bisby et al., 1994), *Crotalaria pallida* (Bisby et al., 1994) e *Crotalaria sessiliflora* (Mun'im et al., 2003). Também foi observada uma flavona, com m/z 593,1504, tanto em CO como em CJ, porém, em quantidade maior, na primeira. Flavonas de mesma massa molecular foram encontradas em duas espécies de *Crotalaria*, sendo elas Apigenina 4',7-diglicosídeo isolada em sementes de *C. juncea* (Bisby et al., 1994; Buckingham; Munasinghe, 2015) e Vitexina 4'-O-galactosídeo para *Crotalaria retusa*, entretanto não foi relatado pelos autores de qual parte da planta o composto foi isolado (Bisby et al., 1994). Os resultados obtidos não surpreendem, considerando-se que os flavonóides são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os responsáveis pela proteção contra radiação ultravioleta, insetos, doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, dentre outras funções (Hoffmann-Campo; Graça, 2019).

O metabólito com m/z 755,2022 foi identificado como uma antocianina e foi observada apenas em CJ. Neste trabalho utilizamos o modo negativo e neste modo não foi obtida fragmentação para a massa identificada, mas com auxílio do modo positivo foi possível identifica-la como uma antocianina, já que as massas encontradas são equivalentes, ou seja, representam a mesma molécula (Flamini, 2013; Lambert et al., 2015). As antocianinas são pigmentos fenólicos solúveis em água encontradas em frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes (Lima et al., 2006) e são uma das classes mais importantes dos flavonoides (Março et al., 2008). A coloração que produzem tem um papel importante em mecanismos reprodutores das plantas, como, por exemplo, a polinização e a dispersão de sementes. Além do efeito de coloração, as antocianinas e suas agliconas, as antocianidinas, apresentam efeitos antioxidante, anti-inflamatório, dentre outros (Lima et al., 2006).

Conclusão

Os resultados obtidos até o momento indicam que dois metabolitos podem discriminar os extratos aquosos de *C. juncea* e *C. ochroleuca*, são eles: uma antocianina ($C_{33}H_{41}O_{20}$) e uma flavona ($C_{21}H_{20}O_{10}$), respectivamente. Nos extratos das duas espécies, foi possível observar uma saponina triperpênica ($C_{38}H_{62}O_{10}$) e uma outra flavona ($C_{27}H_{30}O_{15}$), com diferentes concentrações. Entretanto, pesquisas adicionais relacionadas aos fragmentes obtidos que devem ser realizadas para a completa identificação completa das moléculas detectada.

Estes resultados apresentam grande relevância devido à escassez de informações em relação a identificação e correlação das moléculas específicas dessas espécies. O entendimento da constituição química das crotalarias pode direcionar de forma seletiva suas aplicações nas mais diversas aplicações nos sistemas de produção.

Referências

- ANAM, E. M. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from the aerial parts of *Abrus precatorius* (Fabaceae). **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 24-27, Jan. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304700045?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 Jun. 2019.
- ANDRADE, D. A. V.; ORTOLANI, F. A.; MORO, J. R.; MORO, F. V. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey (Papilionoideae - Fabaceae). **Acta Botanica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 1150-1162, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v22n3/v22n3a03.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- AWOUAFACK, M. D.; SPITELLER, P.; LAMSHÖFT, M.; KUSARI, S.; IVANOVA, B.; TANE, P.; SPITELLER, M. Antimicrobial Isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 2, p. 272-278, 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np1005218>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- BISBY, F. A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. B. **Phytochemical dictionary of the Leguminosae: plants and their constituents**. v. 1. Londres: Chapman and Hall, 1994.
- BUCKINGHAM, J.; MUNASINGHE, V. R. N. **Dictionary of flavonoids with CD-ROM**. Boca Raton: CRC Press, 2015.
- FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **ISRN Spectroscopy**, v. 2013, Article ID 813563, 2013. 45 p. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/813563/>>. Acesso em: 8 jul. 2019.
- GARCIA, J. M.; KAWAKITA, K.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA, M. C. O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalarieae) na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil.

- Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 209-226, Abr./Jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/2361/1198>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- GARCIA, R. A.; STAUT, L. A. **Como inserir crotalária em sistemas de produção de grãos**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2018, 12 p. E-book. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1101109/1/CT44.pdf>>. Acesso em: 06 Jun. 2019.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; GRAÇA, J. P. da. O papel dos metabólitos secundários na resistência de plantas a insetos. In: BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. (Ed.). **Resistência de plantas a insetos: fundamentos e aplicações**. Piracicaba: FEALQ, 2019. p. 99-136.
- LAMBERT, M.; MEUDEC, E.; VERBAERE, A.; MAZEROLLES, G.; WIRTH, J.; MASSON, G.; CHEYNIER, V.; SOMMERER, N. A High-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7890-7914, 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/20/5/7890>>. Acesso em: 8 jul. 2019.
- LIMA, V. L. A. G.; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S.; GOMES, P. B.; GUERRA, N. B. Identificação de antocianidinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 927-935, Dez. 2006.
- LIOU, M. J.; WU, T. S. Triterpenoids from *Rubia yunnanensis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 9, p. 1283-1287, 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np020038k>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. *Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais*. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n5/a51v31n5.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- MUN'IM, A.; ISODA, H.; SEKI, M.; NEGISHI, O.; OZAWA, T. Estrogenic and acetylcholinesterase-enhancement activity of a new isoflavone, 7,2',4'-trihydroxyisoflavone-4'-O-beta-D-glucopyranoside from *Crotalaria sessiliflora*. **Cytotechnology**, v. 43, p. 127-134, Nov. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3449587/>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- PAPADOPOULOU, K.; MELTON, R. E.; LEGGETT, M.; DANIELS, M. J.; OSBOURN, A. E. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, v. 22, p. 12923-12928, Out. 1999. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/96/22/12923.short>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- PEREIRA, A. J. **Caracterização agrônômica de espécies de *Crotalaria* L. em diferentes condições edafoclimáticas e contribuição da adubação verde com *C. juncea* no cultivo orgânico de brássicas em sistema plantio direto**. 2007. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica.
- RADWAN M. M.; EL-SEBAKHY, N. A.; ASAAD, A. M.; TOAIMA, S. M.; KINGSTON, D. G. Kahiricosides II-V, cycloartane glycosides from an Egyptian collection of *Astragalus kahiricus*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2909-2913, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204004182>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

SILVA-LÓPEZ, R. E. S.; PACHECO, J. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, v. 5, n. 03, p. 43-52, 2010. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/122>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

SILVEIRA, P. M. da; RAVA, C. A. **Utilização de crotalária no controle de nematóides da raiz do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 2 p. E-book. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/212992>>. Acesso em: 6 jun. 2019.