

PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DE APIGENINA E APIGENINA 4'-GLICOSÍDEO, PELO MÉTODO LC-Qtof NO MORANGO

VICENTE GOMES WIETH¹; ROSANE LOPES CRIZEL²; TATIANE JÉSSICA SIEBENEICHLER³; PEDRO LOPES REISSER⁴; CESAR VALMOR ROMBALDI⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – vicente.wieth@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – tatianejsiebeneichler@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – cesarvf@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa Duch*) é um pseudofruto muito apreciado em função da aparência, gosto e aroma. O morango pertence ao grupo de frutos não-climatéricos, e o conteúdo nutricional já é amplamente relatado na literatura (ANTUNES et al., 2016; PERIN et al., 2018).

Dentre os compostos relevantes no morango está a apigenina, uma flavona, pertencente ao grupo dos flavonoides, conhecidos pelas capacidades funcionais anti-inflamatórias e antimicrobianas (FOODB, 2021a; WANG et al., 2019). A apigenina também pode ser encontrada na forma glicosilada, como é o caso da apigenina 4'-glicosídeo. O fato de haver uma glicose presente na estrutura garante às moléculas diferentes características físico-químicas e são geralmente encontradas no vacúolo das células (FOODB, 2021b; IWASHINA, 2000).

A identificação e quantificação de tais compostos é realizada utilizando técnicas como a cromatografia líquida (LC), que faz a separação dos compostos, e a espectrometria de massas (MS), que identifica com precisão a massa desses compostos e/ou de seus fragmentos. Nesse processo são utilizados analisadores de massa como o quadrupolo (Q) ou o tempo de voo (tof), podendo ser utilizados dois analisadores de massa em conjunto, modalidade denominada Tandem MS ou MS/MS.

Contudo, dependendo do peso molecular, conformação ou constituição atômica da molécula, além dos parâmetros para realização da técnica, a fragmentação ocorre em regiões diferentes. Nesse trabalho, então, objetivou-se analisar o perfil de fragmentação das moléculas de apigenina e apigenina 4'-glicosídeo em amostras de morango por LC-Qtof.

2. METODOLOGIA

Os morangos da variedade San Andreas foram coletados no estádio de maturação totalmente vermelho (*full red*) em uma propriedade do município de Capão do Leão – RS (31°46'59.6"S, 52°24'53.0"W). Os morangueiros foram cultivados seguindo os princípios da produção orgânica. As amostras foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido, para, logo em seguida, serem liofilizadas no equipamento Liotop K 108 (Liobras®, São Paulo, Brasil).

Os parâmetros para preparo de amostra, separação e análise foram feitos conforme relata Antunes e colaboradores (2019). Para o preparo da amostra foram usados 100 mg de amostra liofilizada que foram misturadas com 1 mL de metanol (75%) acidificado com 0.1% de ácido fórmico, o extrato então passou por *vórtex* e centrifugado a 9900 g por 10 minutos à 25° C, após o sobrenadante foi coletado e o processo foi repetido mais uma vez. A amostra então foi posta em seringa e

filtrada em filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com aberturas na malha de 0,22 μM e então transferidas para *vials*. O processo foi realizado em triplicata.

Para cada *vial*, 10 μL foram injetados no cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC) (Shimadzu®, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução, tipo quadrupolo-tempo de voo Maxis Impact HD (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização por eletropulverização. A eluição dos compostos foi realizada utilizando como fase móvel (A) água acidificada com ácido fórmico 0,1% e (B) acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1%. A coluna de separação Hyperclone ODS C18 (Phenomenex®, CA, USA) foi utilizada um fluxo de 0,2 mL min^{-1} e temperatura de 40° C. A separação teve início com 10% do eluente B, aumentando para 75% em 10 minutos, e aumentando novamente para próximo de 90% em 18 minutos, mantendo por 3 minutos a 90% de eluente B e após, decrescendo a 10% durante 2 minutos e mantendo a 10% por mais 7 minutos. Dando assim um total de 30 minutos de injeção da amostra. Para avaliação de compostos fenólicos, o MS operou no modo de ionização negativa, o espectro de compostos foi mensurado na faixa entre 50-1200 da razão massa/carga (m/z). A voltagem do capilar foi de 3,5, o gás de secagem operou a um fluxo de 8,0 L min^{-1} e temperatura de 180° C na fonte, a pressão do gás de nebulização foi de 2,0 bar, colisão RF foi de 500 Vpp (voltagem pico-a-pico), tempo de transferência 120 μs e armazenamento pré-pulso de 8.0 μs . Usando nitrogênio como gás de colisão as energias foram correspondentemente: 15 eV para m/z 100; 35 eV para m/z 500; e 50 eV para m/z 1000. O equipamento foi calibrado utilizando formiato de sódio na concentração 10 mM.

Os resultados foram analisados com o software *Data Analysis 4.0* (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha), e os valores de m/z dos fragmentos foram comparados com as bases de dados de espectros de massas como *FooDB* (Alberta, Canada) e *MassBank* (Leipzig, Alemanha). A representação visual foi feita com o auxílio dos softwares *ChemDraw12* e *GIMP 2.10*.

Essa atividade se insere na perspectiva de um trabalho de avaliação de compostos fitoquímicos durante a maturação de morangos, buscando, além da identificação e quantificação, descrever cinéticas de acúmulo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apigenina e apigenina 4'-glicosídeo em amostras de morango foram identificadas por espectros de massa no modo de ionização negativa, de acordo com a fragmentação MS / MS. O tempo de retenção, fórmula molecular, massa experimental e teórica, erro e m Sigma estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos compostos de amostras de morango identificados por LC-Qtof.

Composto	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Massa teórica	Massa experimental	Erro (ppm)	m sigma
Apigenina	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	6,3	269,0455	269,0452	1,1	17,9
Apigenina 4'-glicosídeo	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	6,36	431,0984	431,099	-1,4	41,9

A massa teórica corrobora valores encontrados na literatura; contudo, fatores como modelo do equipamento, energia de colisão e outras calibrações trazem um fator de erro que se traduz em uma massa experimental, ou seja, o valor que de fato foi observado na experimentação. De todo modo, a massa obtida

experimentalmente é próxima àquela teórica, resultando num erro muito baixo (1,1 para apigenina; -1,4 para apigenina 4'-glicosídeo).

Usando ferramentas como SmartFormula™, é possível determinar a composição elemental das moléculas, criando uma lista de formas moleculares condizentes com a exata massa e padrão isotópico verdadeiro (*true isotopic pattern* – TIP), com a informação do TIP, podemos fazer comparações mais sofisticadas usando as massas e intensidades dos compostos obtidos na injeção para a mensuração do padrão isotópico experimental na ferramenta SigmaValue™ (GARCÍA-VILLALBA et al., 2010). Quanto menor o valor de mSigma e o erro, melhor será o ajuste; portanto, um erro de 5 ppm e um valor de mSigma abaixo de 50 são geralmente considerados apropriados.

A apigenina foi identificada no modo $[M-H]^-$ com uma razão m/z 269.0440 e foi caracterizada pelo fragmento m/z 151.0015 (Figura 1A), enquanto que a apigenina 4'-glicosídeo foi identificada pelos fragmentos (A) m/z 269.0435, (B) m/z 268,0371 e (C) m/z 241,0488 (Figura 1B).

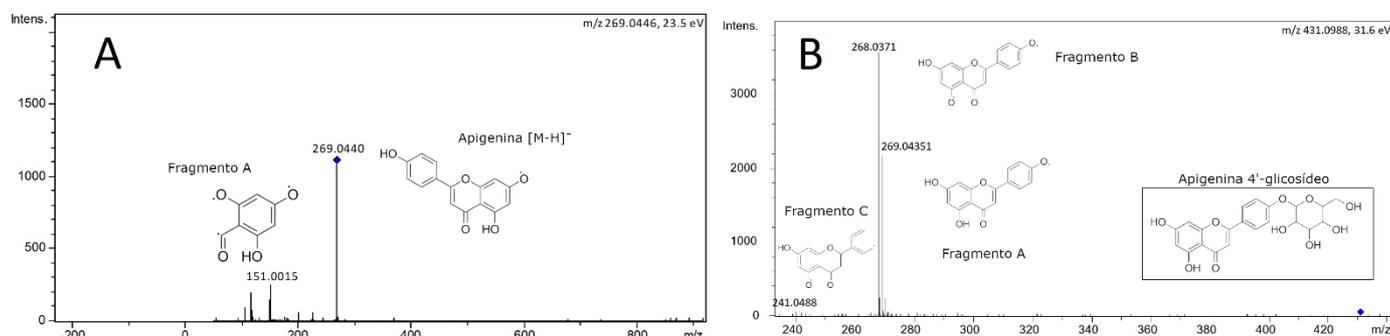


Figura 1. Fragmentação dos compostos apigenina (A) e apigenina 4'-glicosídeo (B).

Perin e colaboradores (2019) avaliaram o conteúdo de minerais e compostos antioxidantes em morangos submetidos ao stress hídrico. Os pesquisadores observaram incremento no teor de compostos fenólicos presentes no morango submetido ao stress, associando essa presença com a maior expressão do gene que origina a enzima PAL (*phenylalanine ammonia lyase*), uma enzima chave na rota da fenilalanina que abre precedente para sua bioconversão em flavonoides e outros compostos fenólicos.

Na literatura é relatada a utilização de outras técnicas de espectrometria para a identificação de flavonas, como é o caso de pesquisadores que utilizaram cromatografia Raman e cromatografia Raman de superfície avançada para identificação de crisina, apigenina e luteolina (CORREDOR et al., 2009). No perfil de fragmentação de sálvia (*Salvia plebeia R. Br.*) por LC-Qtof em modo de íon positivo foi observada a presença de apigenina e apigenina 7-glicosídeo, sendo esse segundo de mesma massa e composição molecular ($C_{21}H_{20}O_{10}$) que o composto investigado no presente estudo, sendo também uma identificação putativa dos compostos (LEE et al., 2018).

A necessidade da identificação putativa por fragmentação se dá pelo fato que muitas moléculas não possuem o padrão analítico para ser comercialmente adquirido, com é o caso das moléculas de apigenina acompanhadas de uma ramificação glicosídica (PANIGHEL et al., 2015).

4. CONCLUSÕES

A fragmentação das moléculas de apigenina e apigenina 4'-glicosídeo em amostras de morango por LC-Qtof, aliada ao *screening* desses compostos permitiu a identificação com elevado grau de identidade.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da SCTI-RS (financiadora dos equipamentos do Lacem).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. C. et al. Untargeted metabolomics of strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') fruit from plants grown under osmotic stress conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 15, p. 6973–6980, dez. 2019.

ANTUNES, L. E. C. et al. **Morangueiro**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

FOODB. **Showing Compound Apigenin (FDB002798) - FooDB**. Disponível em: <<https://foodb.ca/compounds/FDB002798>>. Acesso em: 27 jul. 2021a.

FOODB. **Showing Compound Apigenin 4'-glucoside (FDB021700) - FooDB**. Disponível em: <<https://foodb.ca/compounds/FDB021700>>. Acesso em: 27 jul. 2021b.

GARCÍA-VILLALBA, R. et al. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 416–429, jan. 2010.

IWASHINA, T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 3, p. 287–299, set. 2000.

LEE, S.-H. et al. Phenolic profiling and quantitative determination of common sage (*Salvia plebeia* R. Br.) by UPLC-DAD-QTOF/MS. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 9, p. 1637–1646, set. 2018.

PANIGHEL, A. et al. Putative identification of new *p*-coumaroyl glycoside flavonoids in grape by ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry: Putative identification of new grape flavonoids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 4, p. 357–366, 28 fev. 2015.

PERIN, E. C. et al. Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 2547–2552, set. 2018.

WANG, M. et al. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–18, 16 out. 2019.