

Análise da fração aquosa do extrato das folhas de *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) por UHPLC-ESI(-)-HRMS/MS

Analysis of the aqueous fraction of *Pereskia grandifolia* Haw. leaf extract (Cactaceae) by UHPLC-ESI(-)-HRMS/MS

RESUMO

Marcos Vinicio Rodrigues
marcosvinirodrigues@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil

Rafaela Takako Ribeiro de Almeida
rafaela.takako@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

Eduardo Jorge Pilau
ejpilau@uem.br
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

Antonio Laverde Junior
aljuni@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil

A espécie *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae), conhecida como ora-pro-nobis, é considerada uma planta alimentícia não convencional. Esta espécie tem despertado o interesse da indústria alimentícia, devido à presença de nutrientes importantes em sua constituição, como proteínas, mucilagens, fibras e minerais. O principal objetivo deste trabalho foi a identificação da composição química da fração aquosa do extrato bruto das folhas de *P. grandifolia* (PGAq). A fração PGAq foi analisada por HPLC-ESI(-)-HRMS/MS. A análise de íons moleculares monoisotópicos teóricos e de seus fragmentos, seguida da comparação destes com espectros de alta resolução de bancos de dados internacionais levou a identificação de 10 compostos: três isômeros do dihidroxibenzaldeído, quatro ácidos hidroxibenzoicos (ácidos vanílico e *o*-, *m*- e *p*-hidroxibenzoico), dois ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico e *O*-glucosilcafeico) e um alcaloide (abrina). Todos os compostos fenólicos identificados podem contribuir como agentes com capacidade antioxidante, mais uma evidência do caráter nutraceutico de *P. grandifolia*. Todos os compostos identificados nesse trabalho estão sendo relatado pela primeira vez em *P. grandifolia*.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos fenólicos. Ora-pro-nobis. Alcaloides. Antioxidante

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



The *Pereskia grandifolia* Haw. species (Cactaceae), known as ora-pro-nobis, is considered an unconventional food plant. This species has aroused the interest of the food industry, due to the presence of important nutrients in its constitution, such as proteins, mucilages, fibers, and minerals. The main objective of this work was to identify the chemical composition of the aqueous fraction of the crude extract of the leaves of *P. grandifolia* (PGAq). The PGAq fraction was analyzed by HPLC-ESI(-)-HRMS/MS. The analysis of theoretical monoisotopic molecular ions and their fragments, followed by their comparison with high resolution spectra from international databases led to the identification of 10 compounds: three isomers of dihydroxybenzaldehyde, four hydroxybenzoic acids (vanilic and *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acids), two hydroxycinnamic acids (*p*-cumaric and *O*-glucosylcaffeic acids) and an alkaloid (abrine). All identified phenolic compounds can contribute as agents with antioxidant capacity, further evidence of the nutraceutical character of *P. grandifolia*. All compounds identified in this work are being reported for the first time in *P. grandifolia*.

KEYWORDS: Phenolic compounds. Ora-pro-nobis. Alkaloids. Antioxidant



INTRODUÇÃO

A espécie *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) é conhecida popularmente como ora-pro-nobis ou cacto rosa. Tradicionalmente, é reconhecida pelo uso alimentar, medicinal e ornamental (LORENZI e SOUZA, 2001). *P. grandifolia* é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC) e tem despertado o interesse da indústria alimentícia, devido à presença de nutrientes importantes em sua constituição, como proteínas, mucilagens, fibras e minerais, como ferro e cálcio (ALMEIDA e CORRÊA, 2012, p. 751). As folhas desta espécie são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de câncer, hipertensão, diabetes e doenças associadas com reumatismo e inflamação (HARLEV et al., 2012, p. 713).

Estudos mostraram que *P. grandifolia* possui efeitos citotóxicos em várias linhagens de células cancerosas e ausência de citotoxicidade contra linhagens de células normais (SRI NURESTRI et al., 2009, p. 488), elucidando assim a segurança no uso popular desta planta. Kazama et al. (2012, p. 86) evidenciaram que os componentes ativos presentes na fração mais polar do extrato hidroetanólico das folhas de *P. grandifolia* são eficazes em induzir ações diuréticas e hipotensoras, com envolvimento direto do sistema arginina-vasopressina.

Estudos químicos realizados com *P. grandifolia* revelaram presença de uma saponina do ácido oleanólico (SAHU et al., 1974, p. 529) e dos compostos beta-sitosterol, vitamina E, fitona, 2,4-di-tert-butilfenol e uma mistura constituída de palmitato de metila, oleato de metila, estearato de metila e 2.4-di-tert-butilfenol, isolados e identificados, a partir do extrato acetato de etila (SRI NURESTRI et al., 2009, p. 488). Um “screening” cromatográfico com algumas espécies de *Pereskia* revelou a presença de beta-fenetilamina, mescalina, beta-hidroxi-mescalina, tiramina, 3-metoxi-tiramina, 3,4-dimetoxi-beta-fenetilamina, p-metoxi-beta-hidroxi-beta-fenetilamina em *P. grandifolia* (DOETSCH et al., 1980, p. 79).

Considerando o papel da fração mais polar do extrato de *P. grandifolia* sobre as propriedades diuréticas e hipotensoras, o principal objetivo deste trabalho consistiu na identificação de componentes químicos desta fração. Para alcançar tal objetivo, foi realizada a análise da mesma por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência hifenada com espectrometria de massa de alta resolução (UHPLC-HRMS/MS).

METODOLOGIA

A análise da fração aquosa do extrato de *P. grandifolia* preparada anteriormente por Rodrigues (2018) e caracterizada por UHPLC-HRMS/MS (*Ultra High Performance Liquid Chromatography at tandem High Resolution Mass Spectrometry*), realizada no Complexo Central de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM. Cerca de 100mg da fração aquosa foi solubilizada em acetonitrila, ultrassonicada e centrifugada. Uma pequena alíquota do sobrenadante foi analisada em um cromatógrafo líquido de ultra alta performance acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução do tipo Q-TOF (sistema híbrido quadrupolo com tempo de vôle) equipado com fonte de ionização tipo eletrospray (ESI).

Os espectros de fragmentação obtidos foram comparados com a literatura e analisados com auxílio de bancos de dados de espectros massas de acesso livre,

como Massbank (HORAI et al., 2010, p. 703), Metlin (SMITH et al., 2005, p. 747) e Human Metabolome Database (WISHART, D. S. et al., 2013, p. D801).

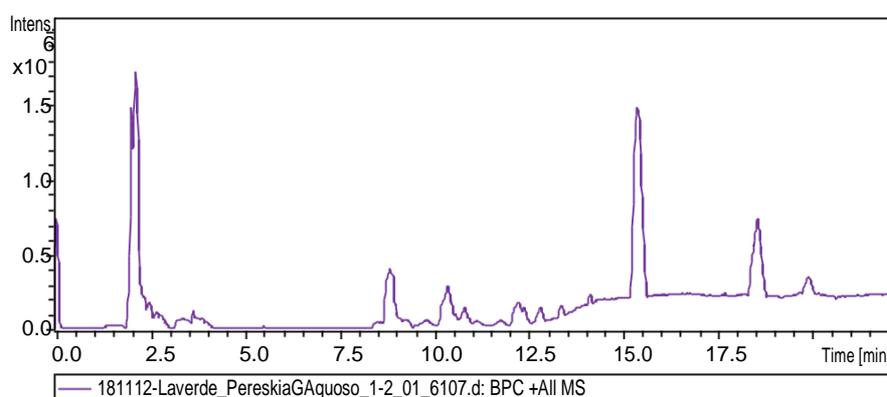
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fração aquosa do extrato das folhas de *P. grandifolia* foi avaliada por UHPLC-ESI-HRMS/MS, por se tratar de uma amostra complexa com ampla diversidade de componentes químicos. A fração foi analisada sob dois tipos de ionização distintos: modos positivo (ESI(+)) gerando sinais de massa [M+H] e modos negativo (ESI(-)) gerando sinais de massa [M-H]. De acordo com a literatura, os compostos que apresentam agrupamentos básicos, como aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisados em modo positivo, dada a relativa facilidade dos mesmos serem protonados. Sob outra perspectiva, as substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas, e devido a isso, são analisadas em modo negativo (CROTTI et al., 2006, p. 287).

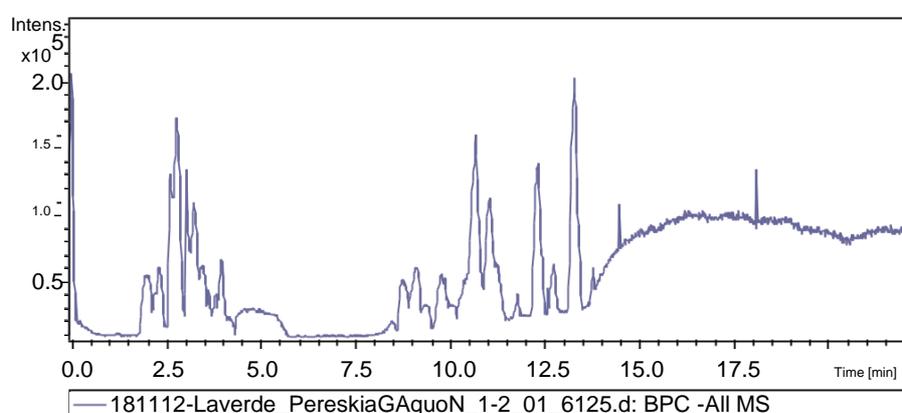
Os cromatogramas obtidos da fração aquosa sob os modos positivo e negativo de ionização são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Cromatogramas de íons totais da fração aquosa do extrato das folhas de *P. grandifolia* obtidos em modo positivo (A) - UHPLC-ESI(+)-HRMS/MS e modo negativo (B) - UHPLC-ESI(-)-HRMS/MS de ionização.

(A)



(B)



Fonte: Autoria própria (2020)

Ambos apresentaram perfis cromatográficos diferentes, demonstrando que esta fração apresenta ampla diversidade de metabólitos. Para analisar estes cromatogramas, os espectros de massa correspondentes à região de cada pico foram processados. Em seguida, a massa molecular monoisotópica de cada espectro foi comparada com um conjunto de dados de massas monoisotópicas calculadas ([M+H] e [M-H]) para metabólitos conhecidos (identificados em espécies da Família Cactaceae), conforme levantamento bibliográfico realizado anteriormente (RODRIGUES et al., 2018). Esta investigação foi seguida da análise dos picos resultantes da fragmentação (EM/EM) e da comparação dos espectros de alta resolução com espectros de alta resolução de bancos de dados internacionais (Massbank e Human Metabolome Database - HMDB).

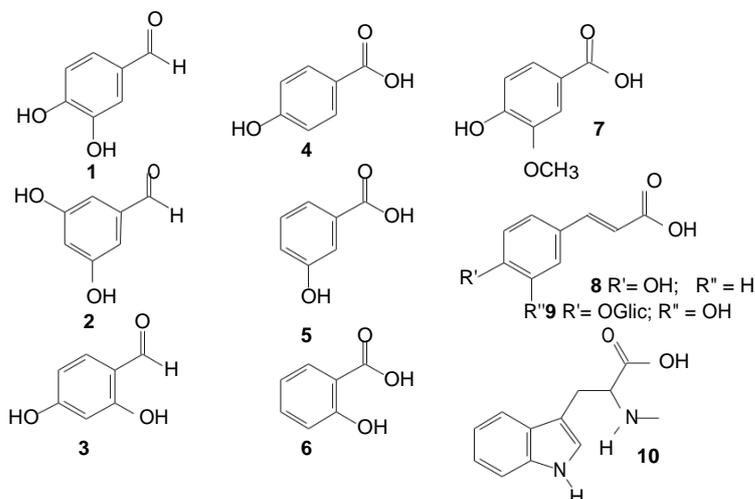
A análise do cromatograma adquirido em modo negativo da fração aquosa resultou na identificação de dez metabólitos secundários. Os valores de massa monoisotópica dos compostos apresentados e o erro de massa calculado (ppm) foram propostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Identificação, Fórmula molecular, massa monoisotópica, erro de massa, da fração aquosa do extrato das folhas de *P. grandifolia* obtidos por UHPLC-ESI(-) HRMS/MS.

Nome	Fórmula molecular	Massa monoisotópica	m/z [M – H]	Erro (ppm)	Bancos de dados
3 Isômeros do diidroxibenzaldeído (1-3)	C ₇ H ₆ O ₃	138,0311	137,0233	--	MassBank, HMDB
3 Isômeros do ácido hidroxibenzoico (4-6)	C ₇ H ₆ O ₃	138,0311	137,0233	--	MassBank, HMDB
Ácido <i>p</i> -cumárico (8)	C ₉ H ₈ O ₃	164,0467	163,0389	-2,45	MassBank, HMDB
Ácido vanílico (7)	C ₈ H ₈ O ₄	168,0417	167,0339	-1,19	HMDB
Abrina (10)	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218,1050	217,0971	-4,15	MassBank
Ácido 4-O-glucosídeo cafeico (Linocafein) (9)	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,0945	341,0867	-4.98	HMDB

Fonte: Autoria própria (2020)

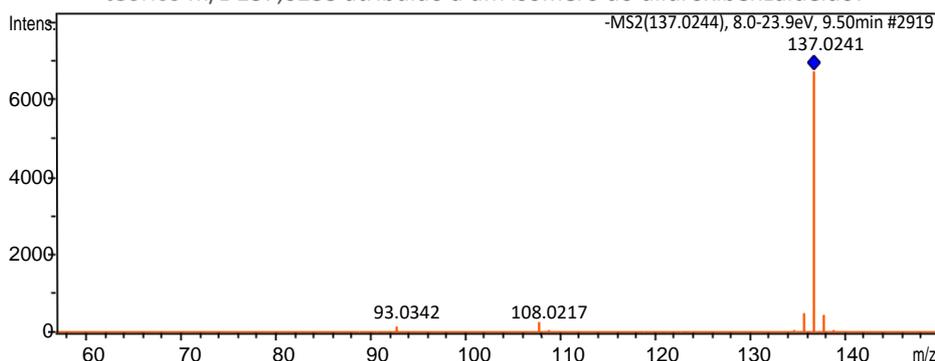
Figura 2 – Figuras dos compostos identificados na fração aquosa do extrato das folhas de *P. grandifolia* por UHPLC-ESI(-) HRMS/MS.



Fonte: Autoria própria (2020)

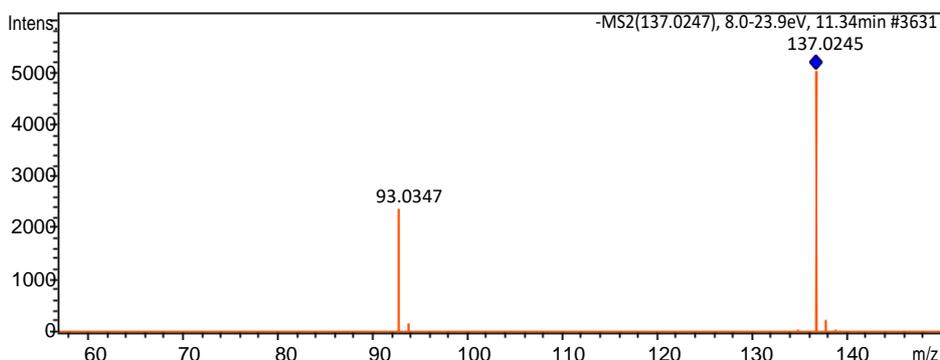
Durante a análise do cromatograma da fração aquosa (Figura 1B), foram observados seis espectros EM/EM de íon molecular teórico m/z $137,0233 \pm 0,0012$ $[M - H]^+$, correspondente à fórmula molecular $C_7H_6O_3$, em faixas de tempo de retenção diferentes (9,19-9,21min; 9,50-9,56min; 11,02-11,03min; 11,21-11,34min; 11,42-11,46min; 11,68-11,71min). Esta fórmula molecular corresponde aos metabólitos do aldeído protocatecuico ou 3,4-dihidroxibenzaldeído (**1**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**) e ácido salicílico (**6**), todos já identificados em outras espécies de Cactaceae. Curiosamente, o fragmento m/z 108,022 $[C_6H_5O_2]^+$ apareceu apenas nos espectros de três faixas de tempo de retenção (9,19-9,21min; 9,50-9,56min; 11,02-11,03min), o qual foi interpretado como o fragmento resultante da perda do grupo aldeído $[CHO]^+$ e, conseqüentemente, como o aldeído protocatecuico (**1**) e outros dois isômeros do dihidroxibenzaldeído (**2,3**) (Figura 3). Os demais espectros encontrados nas demais faixas de tempo de retenção foram interpretados como sendo os seguintes isômeros: ácidos *o*-hidroxibenzoico (ác. salicílico) (**6**), *m*-hidroxibenzoico (**5**) e *p*-hidroxibenzoico (**4**) (Figura 4).

Figura 3 – Espectro de fragmentação UHPLC-ESI(-)HRMS/MS do íon monoisotópico teórico m/z 137,0233 atribuído a um isômero do dihidroxibenzaldeído.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 4 – Espectro de fragmentação UHPLC-ESI(-)HRMS/MS do íon monoisotópico teórico m/z 137,0233 atribuído a um isômero do ácido hidroxibenzoico.



Fonte: Autoria própria (2020)

O espectro EM/EM do íon molecular teórico m/z 167,0339 $[M - H]^+$, mostrou alguns fragmentos característicos do ácido vanílico (**7**) quando comparado com espectros de alta resolução de bancos de dados. O ácido vanílico e os três isômeros

do ácido hidroxibenzoico (**4-6**) são classificados como ácidos fenólicos. Eles são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes em forma livre nos vegetais consumidos pelos humanos (MANACH et al., 2004, p.727).

O espectro de íon molecular teórico m/z 163,0389 $[M - H]^+$ foi identificado como sendo do ácido *p*-cumárico (**8**) quando comparado com espectros de alta resolução de bancos de dados.

O espectro de massa do íon molecular teórico m/z 217,0971 $[M - H]^+$, foi analisado e comparado com espectro de banco de dados. Ao final, foi interpretado como sendo alcaloide abrina (**10**). Este composto já foi identificado anteriormente na espécie *P. aculeata* (PINTO et al., 2015, p. 1715). Trata-se de um alcaloide biossintetizado a partir do aminoácido L-(+)-triptofano.

O íon molecular teórico m/z 341,0867 $[M - H]^+$ foi interpretado como sendo o composto ácido 4-O-glucosilcafeico (**9**), também conhecido como linocafein. Este metabólito também já foi identificado em espécies de Cactaceae.

Com exceção da abrina, os demais compostos identificados na fração aquosa são classificados como compostos fenólicos, os quais são abundantes em frutas e vegetais e, frequentemente, estão associados à atividade antioxidante, que por sua vez, está relacionada com a redução no risco doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas.

Outros íons monoisotópicos estão sob análise, porém, ainda não foram interpretados de forma conclusiva. O cromatograma adquirido em modo positivo ainda não foi analisado. Paralelamente, a fração aquosa vem sendo fracionada em coluna cromatográfica com sephadex, na tentativa de isolar outros compostos para futuras análises de RMN e espectrometria de massa.

CONCLUSÃO

A análise da fração aquosa do extrato bruto das folhas de *P. grandifolia* por UHPLC-ESI(-)-HRMS/MS levaram a identificação de dez metabólitos secundários sendo três isômeros do diidroxibenzaldeído, quatro ácidos hidroxibenzoicos (ácidos *o*-, *m*- e *p*- hidroxibenzoico, e vanílico), dois ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico e O-glucosilcafeico) e um alcaloide (abrina). Todos os compostos fenólicos identificados podem contribuir como agentes com capacidade antioxidante, mais uma evidência do caráter nutracêutico da *P. grandifolia*. Todos os compostos identificados nesse trabalho estão sendo relatado pela primeira vez em *P. grandifolia*.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Laboratório de espectrometria de massa do Complexo Central de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM e aos parceiros do LaBioMass do DQI – UEM. M. V. Rodrigues agradece ao programa PIVICT/UTFPR.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.E.F.; CORRÊA, A.D. **Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais.** *Ciencia Rural*, v. 42, n. 4,

p. 751-756, 2012. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/cr/v42n4/a11112cr5075>. Acesso em: 27 jul. 2020.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. **Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”**: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quimica Nova*, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006. Disponível em:
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>. Acesso em: 17 ago. 2020.

DOETSCH, P.W.; CASSADY, J.M.; MCLAUGHLIN, J.L. Cactus alkaloids: XL. **Identification of mescaline and other -phenethylamines in *Pereskia*, *Pereskopsis* and *Islaya* by use of fluorescamine conjugates.** *Journal of Chromatography A*, v. 189, n. 1, p. 79-85, 1980. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82285-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82285-2). Acesso em: 27 jul. 2020.

HARLEV E, NEVO E, SOLOWEY E, BISHAYEE A. **Cancer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review.** *Planta Medica*, 2013;79(9):713-22. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328632>. Acesso em: 29 jul. 2020.

HORAI, H. et al. **MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences.** *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jms.1777>. Acesso em: 16 ago. 2020.

KAZAMA, C. C.; UCHIDA, D. T; CANZI, K. N.; SOUZA, P.; CRESTANI, S.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; LAVERDE JUNIOR., A. **Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae).** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, p. 86-93, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.034>. Acesso em: 17 jul. 2020.

LORENZI, H., SOUZA, H.M., 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**, 2 ed., Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, Brazil.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 727-747, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727> Acesso em: 10 ago. 2020.

RODRIGUES, M. V.; MOREIRA, B. O.; LAVERDE JUNIOR, A. **Metabólitos secundários da subfamília Pereskioideae (Cactaceae).** Anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, Apucarana, 2018. Disponível em: <https://eventos.utfpr.edu.br//sicite/sicite2018>.

SAHU, N. P.; BANERJI, N.; CHAKRAVA, R. N. **New saponin of oleanolic acid from *Pereskia grandifolia*. *Phytochemistry*, v. 13, p. 529-553, 1974.** Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91257-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91257-3). Acesso em: 14 jul. 2020.

SMITH, C. A. et al. **METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 27, n. 6, p. 747-751, 2005.** Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>. Acesso em: 17 ago. 2020.

SRI NURESTRI, A.M.; SIM, K.S.; NORHANOM, A.W. **Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw (Cactaceae) leaves. *Journal of Biological Sciences*, v. 9, n. 5, p. 488-493, 2009.** Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2009.488.493>. Acesso em: 12 jul. 2020.

WISHART, D. S. et al. **HMDB 3.0 - The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D801-D807, 2013.** Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>. Acesso em: 17 ago. 2020.