

## ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Capparis flexuosa*

Simone Paes Bastos Franco (1); João Gomes da Costa (2); Alan John Duarte de Freitas (3);  
Julielle dos Santos Martins (4)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – simone\_paes7@hotmail.com;

(2) Centro Universitário Cesmac – joao-gomes.costa@embrapa.br;

(3) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – alan.freitas@ifal.edu.br;

(4) Centro Universitário Cesmac – juliellemartins4@gmail.com.

**Resumo: Introdução:** No decorrer da história da humanidade, as plantas foram vitais na cura de diversas doenças por apresentarem atividades farmacológicas (BURQUE et al, 2013). O Brasil possui uma ampla biodiversidade, contudo, as espécies catalogadas ainda são poucas e são restritamente estudadas quanto ao seu potencial farmacológico, dificultando a utilização destas (RIBEIRO et al, 2014). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente encontrados no reino vegetal responsáveis por apresentarem propriedades farmacológicas (LIMA e CARVALHO, 2013). A *Capparis flexuosa* é conhecida popularmente como feijão bravo e apresenta-se na medicina como contribuinte de diversas enfermidades (BARRETO, 2005). É uma espécie considerada fonte de flavonoides (JUNIOR et al, 2015). **Objetivo:** Diante do que foi exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma análise cromatográfica e quantificar os compostos fenólicos e os flavonoides da *Capparis flexuosa*. **Metodologia:** A determinação e quantificação dos compostos fenólicos realizada utilizando-se da técnica por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) foi feita em um equipamento da marca Shimadzu. Para quantificar o teor de fenóis totais e flavonoides foi utilizado método descrito por Rezende (2010) e Siqueira (2011) respectivamente e realizada uma curva de calibração de ácido gálico e quercetina, respectivamente nas concentrações que variaram de 0,15 a 0,005 mg/mL. Em seguida, as concentrações da amostra foram realizadas em triplicata e, após a obtenção das absorbâncias em espectrofotômetro, os resultados foram interpolados para a curva de calibração obtendo-se a concentração em miligramas equivalentes de ácido gálico (para compostos fenólicos) e quercetina (para flavonóides) por grama do extrato. **Resultados:** A amostra analisada apresentou diversos constituintes em sua composição química através da análise cromatográfica por HPLC. Sendo possível observar a presença e quantificação do ácido gálico (5,02mg/L), catecol (133,54mg/L), ácido clorogênico (17,56mg/L), ácido vanílico (0,34mg/L), ácido cafeico (6,40mg/L), vanilina (5,05mg/L), seringaldeído (13,22mg/L), ácido cumárico (19,05mg/L), cumarina (133,45mg/L), ácido salicílico (8,21mg/L), rutina (946,04mg/L), quercetina (209,81 mg/L) e kaempferol (4,13mg/L). Tais compostos são muito citados na literatura científica por sua ação antioxidante. O teor de fenóis totais que foi quantificado foi de 1.916,9 mg EAG/g de extrato e, o de flavonoides de 84,04 mg EQ/g de extrato da *C. flexuosa* resultado esse superior a outros descritos na literatura que, segundo JUNIOR (2015), apresentou um resultado igual a 595,47mg EQ/g de extrato e 61,31 mg EAG/g de extrato. **Considerações finais:** Tendo em vista o crescimento pela busca de plantas que apresentem potencial terapêutico, fica evidente a necessidade de se estudar as

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

[www.conadis.com.br](http://www.conadis.com.br)

propriedades farmacológicas destas e a correta forma de uso. A espécie *Capparis flexuosa* apresenta-se como uma fonte de compostos bioativos o que valida a necessidade de estudos sobre o potencial farmacológico desta espécie vegetal até então pouco estudada.

**Palavras-chave:** Feijão bravo; HPLC; compostos fenólicos; plantas medicinais.

## INTRODUÇÃO

Há muitos anos as ervas medicinais são utilizadas para fins terapêuticos por apresentarem diversas propriedades farmacológicas. Em função disso, é notória a crescente busca por pesquisas que identifiquem quais substâncias estão atreladas à essas atividades farmacológicas atribuídas aos vegetais (BIANCHETTI; ETHUR; STULP, 2014; SILVA *et al*, 2017).

Esses compostos bioativos, mais conhecidos por compostos fenólicos, estão presentes no metabolismo secundário do vegetal que ocorrem a partir de substratos em seu metabolismo primário. Tais substâncias são produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa e, ao mesmo tempo promovem alguns efeitos benéficos para o organismo humano (DIAS *et al*, 2015; FERRERA, 2016).

Cada vegetal possui sua particularidade e, por isso, as plantas se diferem umas das outras em seu desenvolvimento e, conseqüentemente, os compostos bioativos também serão diferentes em termos de diversidade e quantidade. Assim se torna de essencial importância esse crescente interesse em estudá-las (BIANCHETTI; ETHUR; STULP, 2014).

A *Capparis flexuosa*, conhecida popularmente por Feijão Bravo, é uma planta nativa da Caatinga que pertence à família *Capparaceae*. Pouco se sabe sobre sua composição química, mas alguns estudos destaca essa espécie por seu potencial forrageiro e por se apresentar verde durante o período seco do ano. Assim acredita-se que a mesma pode apresentar uma diversidade e quantidade significativa de compostos fenólicos (GOMES *et al*, 2015; SILVA *et al*, 2016).

Uma das técnicas bastante utilizada para esse tipo de análise é a cromatografia líquida de alta eficiência. Essa técnica permite a separação das substâncias químicas para identificação, além de ter a capacidade de quantificar cada composto presente no vegetal (DUTRA; RIBANI, 2009; LEE, 2000; SAGDIC *et al*, 2011).

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo realizar uma análise cromatográfica para identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes na *Capparis flexuosa*, além de quantificar esses compostos pelo método de Folin-Ciocalteu.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção da amostra**

Foram coletadas as folhas de *Capparis flexuosa* no município de Olho d'água do Casado em Alagoas. O material vegetal foi seco numa estufa a 50°C e submetido a trituração em moinho.

### **Extração assistida por micro-ondas (EAM)**

O extrato etanólico vegetal foi obtido através da extração assistida por micro-ondas. Foi pesado 0,5g da amostra vegetal seca e adicionado 5 mL de etanol P.A com 4 repetições (2g da amostra vegetal seca e moída para um volume de 20 mL de etanol) e submetidos ao micro-ondas programado a 300 W, temperatura de 40°C e um tempo de 2 minutos. O material obtido foi filtrado e submetido a um evaporador rotativo a 40°C para obtenção do extrato bruto seco.

Após a obtenção do extrato foi calculado o R% (Rendimento percentual) pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato bruto}}{\text{Massa do material vegetal}} \times 100$$

### **Determinação do teor de fenóis totais por Folin – Ciocalteu**

O teor de fenóis totais da amostra foi determinado pelo método de Folin – Ciocalteu (SCHERER e GODOY, 2009), com algumas adaptações para realização do teste em microplacas. Em eppendorf (triplicata) foi adicionado 100 µL da solução metanólica da amostra, 500 µL da solução aquosa de Folin1:11 (v/v) e 400 µL da solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%) e foi preparado um branco em triplicata. Em seguida as soluções foram agitadas no vortex por 30 segundos. A partir destas soluções foi transferido 250 µL de cada solução para 3 compartimentos de uma placa de 96 poços, a placa foi mantida ao abrigo da luz por 2 horas e a leitura da absorbância foi a 740 nm, em um espectrofotômetro leitor de placa. Foi construída uma curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 0,1 à 0,005mg/mL. Os resultados foram expressos em mg Equivalente de Ácido Gálico/g extrato seco.

### **Quantificação de flavonoides**

A quantificação do teor de flavonoides nas amostras foi determinado pelo método já descrito por Souza *et al* (2011), com adaptações para realização do teste em microplacas. Foi transferido para cada poço (triplicata) de uma placa de 96 compartimentos, 200  $\mu\text{L}$  da solução metanólica da amostra e 100  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de cloreto de alumínio (2%). A placa foi mantida em ambiente escuro por 30 minutos com leitura da absorbância a 420 nm, em um espectrofotômetro leitor de placa. Foi construída uma curva de calibração de quercetina nas concentrações de 0,03-0,00125 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg EQ/g extrato seco.

### **Quantificação de compostos fenólicos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)**

Para os padrões (ácido gálico, catecol, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico, ácido clorogênico, cumarina, rutina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico) foram preparadas soluções-estoque com concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> em água/álcool a 30%/70%. O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Nesta solução intermediária, todos os padrões encontraram-se na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido fórmico a 1% em água milli-Q (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com um gradiente que inicia em 7% de metanol e vai aumentando até chegar em 85%, totalizando uma corrida de 80 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 290 nm, numa temperatura de 33°C, fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45  $\mu\text{m}$  (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. Cada injeção foi realizada três vezes no sistema CLAE, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Sendo assim, a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra, comparados aos dos padrões.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

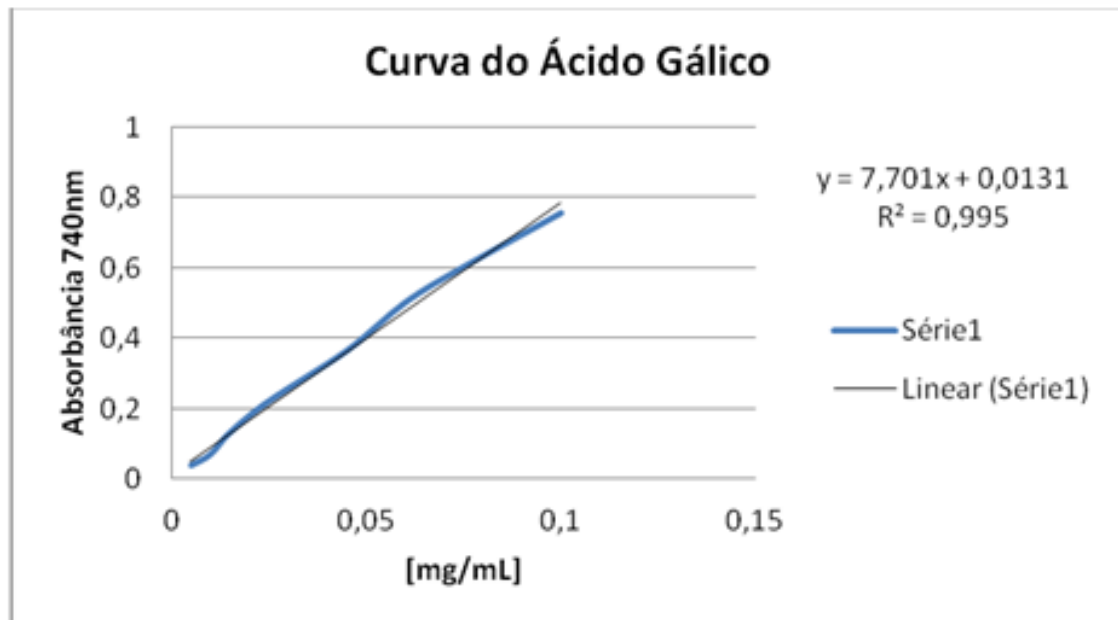
### **Determinação do teor de fenóis totais por Folin – Ciocalteu**

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

[www.conadis.com.br](http://www.conadis.com.br)

A partir do extrato etanólico bruto foram realizadas as análises de quantificação do teor de fenóis totais da amostra. A princípio foi obtido uma curva de calibração do ácido gálico padrão para compostos fenólicos, apresentando uma equação da reta de  $y = 7,701x + 0,0131$  e  $R^2 = 0,995$  (Gráfico 1).



**Gráfico 1-** Curva de Calibração do Ácido Gálico. Fonte: Dados do autor.

Com a equação da reta e a média das absorbâncias da amostra estudada, foram obtidos os resultados de fenóis do feijão bravo que foi equivalente a 1.916,9 mg EAG/g de extrato (Tabela 1).

**Tabela 1-** Teor de fenóis totais da amostra de *Capparis flexuosa*.

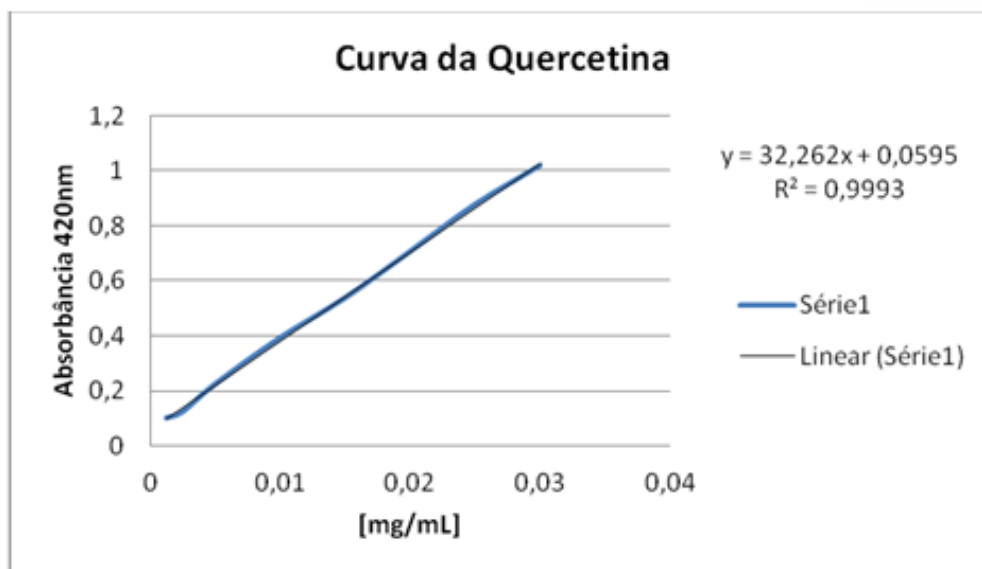
AMOSTRA	Mg EAG/g de extrato
<i>C. flexuosa</i>	1.916,9

Fonte: Dados do autor.

Através da interpolação das absorbâncias da espécie *C. flexuosa* na curva de calibração de ácido gálico, onde a mesma apresentou uma equação da reta equivalente a 0,99, o resultado obtido da quantificação de fenóis totais foi de 1.916,9mg EAG/g de extrato. Esse resultado mostrou-se superior ao resultados obtidos por Junior (2015) que avaliou a mesma espécie.

### Quantificação de flavonóides

Na avaliação do teor de flavonoides do extrato foi obtida a curva de calibração da quercetina padrão para flavonoides, com uma equação da reta de  $y = 32,262x + 0,0595$  com  $R^2 = 0,9993$  (Gráfico 2).



**Gráfico 2-** Curva de Calibração da Quercetina. Fonte: Dados do autor.

Com a equação da reta e a média das absorbâncias da amostra estudada, os resultados de flavonoides apresentados pela amostra foi equivalente a 84,04 mg EQ/g de extrato (Tabela 2).

**Tabela 2-** Teor de flavonoides das amostras de feijão-bravo

AMOSTRA	Mg EQ/g de extrato
<i>C. flexuosa</i>	84,04

Fonte: Dados do autor.

Através da interpolação das absorbâncias da espécie *C. flexuosa* na curva de calibração de quercetina, onde a mesma apresentou uma equação da reta equivalente a 0,99, o resultado obtido da quantificação de flavonóides foi de 84,04mg EQ/g de extrato. Esse resultado mostrou-se superior a duas amostradas da mesma espécie estudada por Junior (2015).

### Quantificação de compostos fenólicos por HPLC

As amostras foram injetadas no HPLC e a partir da comparação do tempo de retenção dos padrões de polifenóis, os compostos foram identificados e quantificados. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 3 que segue.

**Tabela 3-** Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC em feijão bravo

<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Concentração</b>
Ácido Gálico	5,02mg/L
Catecol	133,54mg/L
Ácido Clorogênico	17,56mg/L
Ácido Vanílico	0,34mg/L
Ácido Cafeico	6,40mg/L
Vanilina	5,05mg/L
Seringaldeído	13,22mg/L
Ácido Cumárico	19,05mg/L
Cumarina	133,45mg/L
Ácido Salicílico	8,21mg/L
Rutina	946,04mg/L
Quercetina	209,81mg/L
Kaempferol	4,13mg/L

Fonte: Dados do autor.

Tais compostos são citados na literatura como os de Assis; Oliveira (2014) que realizaram a identificação e quantificação dos compostos fenólicos ácido clorogênico, rutina, ácido cafeico, quercetina em diferentes tipos de gradientes e obtiveram um resultado que variou entre 0,3% e 18,9% na área destes. Esse resultado é inferior aos resultados encontrados em *Capparis flexuosa*. Mas vale ressaltar que apesar da técnica ter sido a mesma, a espécie analisada foi diferente.

Isso mostra, que a planta avaliada nesse estudo, apresenta uma diversidade de compostos fenólicos com quantificações significativas.

## CONCLUSÃO

Tendo em vista o crescimento pela busca de plantas que apresentem potencial terapêutico, fica evidente a necessidade de se estudar as propriedades farmacológicas destas e a correta forma de uso. A espécie *Capparis flexuosa* apresenta-se como uma fonte de compostos bioativos o que valida a necessidade de estudos sobre o potencial farmacológico desta espécie vegetal até então pouco estudada.



## REFERÊNCIAS

- ASSIS, M. L. V.; OLIVEIRA, D. B. **Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. Campos dos Goytacazes, 2014, 139 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- BARRETO, G.P. Utilização do feno de feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) em dietas para ovinos Santa Inês. Areia-PB, 2005.
- BIANCHETTI, P.; ETHUR, E. M.; STULP, S. **Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos de plantas da família *Myrtaceae* frente ao micro-organismo *Escherichia coli***. Lajeado, 2014, 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro Universitário Univates.
- BURQUE, R. K; *et al.* Determinação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Lafoensia pacari* (LYTHRACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Porto Alegre, vol. XII, n. 1, p. 1-10, 2015.
- DIAS, T.; MELO, H. C.; ALVES, F. R. R.; CARVALHO, R. F.; CARNEIRO, K. S.; SOUSA, C. M. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogênicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.5, p.782-787, 2015.
- DUTRA, F. L. G.; RIBANI, R. H. Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2009.
- FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; DOS SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-de-são-paulo sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 2, p.588-596, 2016.
- GOMES, T. C. A., *et al.* Espécies Nativas do Semiárido Alagoano com Potencial para Integração Lavoura-pecuária-floresta em Planossolos Háplicos. **Comunicado Técnico On Line, Embrapa 158**, Aracaju, Dez, 2015.
- JUNIOR, J.C.C; *et al.* Fenóis e flavonoides totais em feijão bravo (*Capparis flexuosa*) e mororó (*Bauhinia cheilantha*) em Planossolos Háplicos do semiárido alagoano. 2015. Disponível acesso em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137034/1/5FENOIS.pdf>> . Acessado em 24 de set. 2016.
- LEE, H. S. HPLC Analysis of Phenolic Compounds. **Food Analysis by HPLC**. NOLLET, L. M. L. (Ed.). 2a edição. Nova York: CRC Press, 2000.
- LIMA, F. O; CARVALHO, L. M. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. Santa Maria, 2013. 145 f. Tese de Doutorado (Área de concentração em química analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química/Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: < <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4268/LIMA%20%20FERNANDA%20OLIVEIRA.pdf?sesequen=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 23/Out/2018.

RIBEIRO, D.A; *et al.* Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

SAGDIC, O., OZTURKA, I., OZKANB, G. YETIMA, H., EKICIA, L., YILMAZC, M. T. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1749-1758, 2011.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, p.654-658, 2009.

SILVA, N. L.; ARAÚJO, I. P. C.; BATISTA, M. R. F.; SANTOS, T. B. A.; FERNANDO, W. L.; AMARAL, F. R. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam obtidos por decocção. **Conexão Ci.**, Formiga, v. 12, n. 1, p. 46 – 53, 2017.

SILVA, G. J. A. M., *et al.* Plantas Forrageiras da Caatinga. **Revista Centauro**, Rio Grande do Norte, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2016.

SOUZA, L. B., et al. Quantificação de flavonóides nas raízes de *Urera baccifera* gaudich (*URTICACEAE*). **Revista Contexto & Saúde**, Ijuí, v. 10, n. 20, p. 1287-1290, Jan./Jun. 2011.