

## ENRIQUECIMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FOLHAS DE *Inga edulis* POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA: QUANTIFICAÇÃO DE SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Aécio Luís de Sousa Dias, Jesus Nazareno Silva de Souza\* e Hervé Rogez

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Av. Perimetral, s/n, 66095-780 Belém - PA, Brasil

Recebido em 31/10/08; aceito em 2/7/09; publicado na web em 8/12/09

PURIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM *Inga edulis* LEAVES USING SOLID-PHASE EXTRACTION: MAJOR COMPOUNDS QUANTIFICATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY EVALUATION. A phenolic fraction was obtained from of the acetone-water-acetic acid extract of *Inga edulis* leaves, by liquid-liquid partition and SPE-C<sub>18</sub> cartridges. This method provided an increase of 108, 66, 51, 50 and 36% of flavonols, proanthocyanidins, total polyphenols, gallotannins and flavanols, respectively. The major phenolics in purified fraction were procyanidin B2, catechin and myricetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, which achieved increases of 111, 47 and 45%, respectively, after SPE. Acid hydrolysis confirmed the presence of procyanidins, prodelphinidins and glycosylated flavonoids.

Keywords: *Inga edulis*; polyphenols; solid phase extraction.

### INTRODUÇÃO

A biodiversidade amazônica apresenta uma grande fonte de plantas medicinais ricas em compostos fenólicos, cuja exploração racional contribui para o desenvolvimento sustentável da região.<sup>1,2</sup> A árvore *Inga edulis* Martius (Leguminosae-Mimosaceae) produz um fruto comestível e é amplamente distribuída nas florestas secundárias tropicais das Américas Central e do Sul. A espécie foi selecionada a partir de estudos prévios que mostraram elevados valores de capacidade antioxidante e conteúdo fenólico em extratos de suas folhas, em relação a outras plantas amazônicas.<sup>2,3</sup> Em suas folhas foram identificados alguns compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-glucopiranosídeo, quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e miricetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, entretanto estes compostos representaram apenas 10% do total dos compostos fenólicos.<sup>4</sup> Nas raízes foram identificados: 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-metoxiflavona, 6,3',4'-tri-hidroxiarona e 5,7,4'-tri-hidroxi-6,8-dimetilflavonona.<sup>5</sup>

Em trabalhos anteriores foram realizadas otimizações da extração sólido-líquido de compostos fenólicos a partir de suas folhas<sup>6</sup> e da adsorção desses compostos sobre diferentes resinas macroporosas a partir de extratos brutos.<sup>7</sup> Adicionalmente, a extração em fase sólida utilizando-se cartuchos com adsorventes em fase reversa (SPE-C18) é um método muito utilizado para a purificação de extratos fenólicos.<sup>8,9</sup> Por exemplo, flavonoides de folhas de *I. edulis* foram purificados por esse método a partir de soluções metanólicas;<sup>4</sup> e procianidinas de licor de cacau foram purificadas a partir de solução acetônica.<sup>10</sup>

Em estudo de hidrólise de compostos fenólicos promovida por ácido, a produção de flavonoides agliconas tem sido utilizada para sugerir a presença de derivados glicosilados das agliconas.<sup>11</sup> Além disso, a presença de proantocianidinas pode ser constatada a partir da produção de antocianidinas por meio da clivagem oxidativa das ligações interflavânicas catalizada por ácido.<sup>12,13</sup>

Esse trabalho teve como objetivos obter uma fração enriquecida em compostos fenólicos de folhas de *I. edulis* a partir de extrações líquido-líquido e em fase sólida (SPE-C<sub>18</sub>); monitorar esse enrique-

cimento por métodos espectrofotométricos, cromatográficos (CLAE-DAD), identificar e quantificar os compostos fenólicos majoritários e avaliar a elevação da capacidade antioxidante dessa fração.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Equipamentos e reagentes

Foi utilizado um equipamento CLAE que consistiu de um sistema analítico série LC-10vp (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com bomba quaternária AT 10Avvp, autoinjeter SIL-10AF, forno de coluna CTO-10AS, detector a arranjo de fotodiodos SPD-M20A. As análises foram realizadas utilizando-se coluna cromatográfica Gemini C<sub>18</sub>, 3  $\mu$ m 110 A (150 x 4,6 mm) e pré-coluna Gemini C<sub>18</sub> (3,0 x 4,0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA). O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram feitos através do software Class VP chromatography. Foi utilizado o espectrofotômetro mod. Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau CLAE, os demais foram grau analítico. Fora utilizados os reagentes rodanina (Fluka, Steinheim, Alemanha), reagente de Folin-Ciocalteu, *p*-dimetilaminocinamaldefido (DMACA), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-ácido carboxílico (Trolox) e cloreto de alumínio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os padrões utilizados foram procianidinas B1 e B2, cianidina, delphinidina, miricetina, miricetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (Extrasynthèse, Genay, França), ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina (Sigma, Steinheim, Alemanha). Foram utilizados os cartuchos C<sub>18</sub>, Strata, 55  $\mu$ m, 5 g/20 mL, 70 A (Phenomenex, Torrance, CA).

#### Material vegetal

As folhas de *I. edulis* foram coletadas no município de Belém, no mês de maio de 2007. A planta foi identificada no herbário do Museu Botânico Emílio Goeldi (Belém-Pará), por comparação com uma exsicata desta espécie depositada nesse herbário, com o código de registro MG 0153192. As folhas foram lavadas com água, secas em estufa a 40 °C por 4 h, e moídas. Em seguida, foram armazenadas a 4 °C, sob atmosfera de nitrogênio.

\*e-mail: jsouza@ufpa.br

## Obtenção do extrato bruto

Para a extração dos compostos fenólicos das folhas, 1 kg de folhas moídas foi macerado em 5 L de solução contendo acetona:água:ácido acético (70:28:2, v:v:v), por 2 h sob agitação constante, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, repetindo-se por mais 2 vezes após filtração sob vácuo. Ao final, os filtrados foram misturados. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo à baixa pressão a 40 °C até a retirada completa dos solventes orgânicos.

## Fracionamento do extrato fenólico

O extrato bruto foi submetido a uma partição líquido-líquido com hexano. As frações hexânica e aquosa resultantes foram denominadas de Fração I e Fração II, respectivamente. A Fração I foi concentrada à baixa pressão a 40 °C e juntamente com a Fração II foram congeladas e liofilizadas a -81 °C durante 72 h e ao abrigo da luz. As frações liofilizadas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, e armazenadas a -20 °C.

Em seguida a Fração II foi submetida a outro fracionamento, utilizando cartuchos C<sub>18</sub>, acoplados a um suporte *manifold*. 25,05 g da Fração II liofilizada foram dissolvidos em 150 mL de água ultra pura, acidificada com 1% de ácido fórmico. A solução foi acidificada para prevenir a ionização de compostos fenólicos, o que pode reduzir a adsorção desses compostos durante a eluição da fração mais polar, referida a seguir. Foram utilizados 5 mL da solução por cartucho, os quais foram previamente condicionados com metanol (40 mL) e água ultra pura (40 mL) acidificada. Os compostos mais polares foram eluídos com 50 mL de água acidificada, resultando na Fração IIa. Em seguida, eluíram-se compostos de polaridade intermediária com 30 mL de acetona:água:ácido acético (70:28:2, v:v:v), obtendo-se a Fração IIb. Por último foram eluídos os compostos de baixa polaridade com 60 mL de metanol, correspondendo à Fração IIc. As Frações IIb e IIc foram concentradas à baixa pressão a 40 °C, em seguida foram congeladas e liofilizadas a -81 °C durante 72 h e ao abrigo da luz juntamente com a Fração IIa. Todas as frações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, sob atmosfera de nitrogênio, e armazenadas a -20 °C.<sup>9</sup>

## Avaliação do fracionamento por métodos espectrofotométricos

Todas as dosagens espectrofotométricas foram realizadas em triplicata, a partir de soluções estoque das frações liofilizadas, preparadas em metanol (5 mg/mL), as quais foram acondicionadas em tubos Eppendorf de 2 mL, sob atmosfera de nitrogênio, envoltos por papel alumínio, e armazenadas a 4 °C por até 2 dias.

### Determinação de polifenóis totais

A concentração dos polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.<sup>14</sup> O teor de polifenóis totais foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de fração seca (FS); por g de extrato bruto seco (EBS) e por g de Fração II seca (Fração IIS).

### Determinação de flavonóis

O método para a determinação de flavonóis foi baseado na reação com cloreto de alumínio, conforme descrito por Quettier-Deleu e colaboradores.<sup>15</sup> Os resultados foram expressos em mg equivalentes de miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (EMR)/g FS.

### Determinação de flavanóis

Os flavanóis foram determinados utilizando o *p*-dimetilaminocinamalaldeído (DMACA), segundo o protocolo proposto por Delcour e Varebeke.<sup>16</sup> Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (ECA)/g FS.

### Determinação de proantocianidinas e estimação de seus graus de polimerização

A determinação de proantocianidinas foi realizada pelo método do butanol-HCl proposto por Julkunen-Tiitto.<sup>17</sup> Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina (ECI)/g FS. A estimação do grau de polimerização das proantocianidinas foi realizada pela relação entre os teores de polifenóis totais e de flavanóis.<sup>3</sup>

### Determinação de galotaninos

O teor de galotaninos foi estimado utilizando o reagente rodânica, segundo o método descrito por Salminen.<sup>18</sup> Os resultados foram expressos em mg EAG/g FS.

## Avaliação da capacidade antioxidante após fracionamento SPE-C<sub>18</sub>

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método ORAC, utilizando a fluoresceína como prova fluorescente, conforme descrito por Silva e colaboradores<sup>2</sup> que adaptaram para o uso em microplacas, métodos descritos anteriormente.<sup>19,20</sup> O método TEAC foi realizado como descrito por Silva e colaboradores,<sup>2</sup> que consistiu de uma adaptação para o uso em microplacas do método proposto por Re e colaboradores.<sup>21</sup> Ambos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu$ mol equivalentes de Trolox (ET)/g FS.

## Avaliação do fracionamento por CLAE-DAD

### Análise por CLAE-DAD dos compostos fenólicos

A metodologia de análise por CLAE-DAD foi baseada em Souza e colaboradores.<sup>4</sup> A fase móvel foi composta de: (A) água ultra pura com 1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 1% de ácido fórmico. Essas soluções foram filtradas sobre membranas de 0,22  $\mu$ m e seguiram o gradiente de eluição: 8% B por 5 min, 8-20% B em 25 min, 20-30% B em 10 min, 30-50% B em 10 min, 50-80% B em 10 min, 80-100% B em 5 min, 100% B por 5 min, 100-8% B em 3 min e 8% B por 12 min. O volume de amostra injetada foi de 10  $\mu$ L e o fluxo de eluição foi de 0,75 mL/min.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela co-injeção de compostos padrões comerciais com as frações e pela comparação com os tempos de retenção desses padrões. A quantificação foi realizada com curvas de calibração construídas com padrões. Os padrões e as Frações II e IIb foram diluídos em metanol, sendo as duas últimas na concentração de 1 mg/mL, e filtrados sobre unidades filtrantes de 0,45  $\mu$ m antes da injeção em triplicata. As concentrações dos compostos identificados foram expressas em mg de composto/g FS.

### Hidrólise ácida da Fração IIb para determinação dos compostos fenólicos agliconas

A hidrólise foi realizada em tubos de ensaio com tampas rosqueadas revestidas com teflon, a partir de 50 mg de Fração IIb liofilizada, 5 mL de solução ácida (HCl 1,2 M em 50% de metanol aquoso) e 2 mg de ácido ascórbico. A hidrólise ocorreu à temperatura de 80 °C por 2 h e procedeu-se em triplicata, com dois brancos (um sem a amostra e outro sem aquecimento). Após a hidrólise, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e seu volume completado a 10 mL com a mesma solução de hidrólise. Em seguida, o hidrolisado foi sonificado em ultrassom. Esse produto foi analisado por CLAE-DAD.<sup>22</sup>

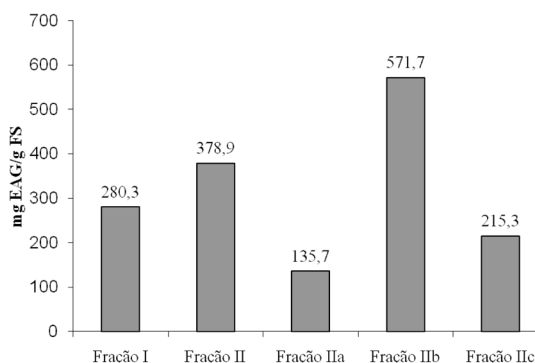
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a partição líquido-líquido do extrato bruto concentrado, foram obtidos 11,6 e 148,1 g das Frações I e II liofilizadas (73,8  $\pm$  0,17 e 96,7  $\pm$  0,21% de matéria seca (MS)), respectivamente. Uma

alíquota de 25,05 g de Fração II liofilizada foi utilizada para o fracionamento em cartuchos SPE-C<sub>18</sub>, que resultou em 6,6; 10,8 e 2,3 g de Frações IIa, IIb e IIc liofilizadas (93,8 ± 0,10; 91,3 ± 0,04 e 94,4 ± 0,34% de MS), respectivamente. Esse fracionamento apresentou uma perda de 21%.

Os teores de polifenóis totais das Frações I e II quando expressos pelo somatório de suas massas secas (considerada como a massa aproximada do EBS) corresponderam a 15,8 e 357,5 mg EAG/g EBS, respectivamente. O somatório desses teores (373,3 mg EAG/g EBS) está abaixo do valor encontrado em um estudo prévio,<sup>4</sup> de 496,5 mg EAG/g EBS, para folhas de *I. edulis* a partir de uma extração sólido líquido em metanol 50%. Considerando que as perdas pela partição líquido-líquido com hexano sejam mínimas, o menor teor em conteúdo fenólico observado pode ter ocorrido em razão das diferentes soluções extratoras utilizadas para cada estudo. Soluções acetônicas (50 e 70%) extraem melhor compostos de baixa polaridade, como proantocianidinas e alguns flavonóis<sup>9,23</sup> em relação a soluções metanólicas (70 e 50%), que extraem melhor compostos mais polares, como flavanóis.<sup>9</sup> Assim, essas classes de menor polaridade, que foram mais objetivadas nos métodos extrativos deste estudo, podem estar em menor concentração nas folhas em relação ao teor de compostos mais polares, como os flavanóis, que podem ter sido melhor extraídos na solução metanólica do estudo citado e, portanto, contribuído consideravelmente para se obter um maior conteúdo em polifenóis.

A Figura 1 apresenta os teores de polifenóis totais das frações. Apesar do teor de polifenóis totais na Fração I (280,3 mg EAG/g FS) ter sido considerável, percebe-se que este valor é muito pequeno quando expresso por EBS devido o baixo rendimento desta fração após extração líquido-líquido.



**Figura 1.** Teores de polifenóis totais das frações fenólicas. As frações foram obtidas por partição líquido-líquido com hexano, a partir do extrato bruto concentrado de folhas de *Inga edulis* (Frações I e II) e por SPE-C<sub>18</sub> a partir da Fração II (Frações IIa, IIb e IIc). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de fração seca (FS). Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata

A Fração IIa, eluída com água acidificada durante o fracionamento SPE-C<sub>18</sub>, apresentou o menor conteúdo de polifenóis totais (135,7 mg EAG/g FS), representada por polifenóis polares, em relação às Frações IIb e IIc (Figura 1). Esse valor representou 34,7 mg EAG/g Fração IIS, correspondendo a uma contribuição teórica de 9% em relação ao teor de polifenóis totais da Fração II de 378,9 mg EAG/g FS, apresentado na Figura 1.

A Fração IIb apresentou um aumento de 51% em relação aos polifenóis totais da Fração II. A Fração IIb correspondeu a 233,1 mg EAG/g Fração IIS, representando uma contribuição teórica de 62% em relação ao teor de polifenóis totais da Fração II.

O teor de polifenóis totais da Fração IIc (Figura 1) correspondeu, quando expresso em função da Fração II, a 19,3 mg EAG/g Fração IIS. Esse valor representou uma contribuição teórica de 5% em relação ao teor de polifenóis totais da Fração II.

A concentração de flavonóis na Fração II (Tabela 1) correspondeu a 14% em relação ao seu valor de polifenóis totais. O teor de flavonóis na Fração IIb (Tabela 1) representou 19% de seus polifenóis totais. Esse teor resultou em um enriquecimento de 108% em flavonóis em relação à Fração II, o maior entre as classes polifenólicas estudadas. Tal enriquecimento pode ter ocorrido em virtude do caráter pouco polar de muitos flavonóis.

O teor de flavanóis para a Fração II (Tabela 1) representou 33% de seu teor em polifenóis totais. Para a Fração IIb, a concentração dos flavanóis (Tabela 1) correspondeu a 29% de sua concentração em polifenóis totais e representou o menor enriquecimento (36%), em relação aos flavanóis da Fração II.

A Fração II apresentou uma concentração em proantocianidinas (Tabela 1) correspondente a 23% de seus polifenóis totais. O teor de proantocianidinas na Fração IIb (Tabela 1) representou 25% de sua concentração em polifenóis totais e um enriquecimento de 66% em relação ao obtido para a Fração II. Counet e colaboradores<sup>10</sup> também enriqueceram proantocianidinas nessa fração, com o mesmo eluente e também utilizando cartuchos SPE-C<sub>18</sub>. O grau de polimerização das proantocianidinas das frações II e IIb foi de 3,0 e 3,4, respectivamente. Estes valores são próximos do grau de polimerização de 4,2 encontrado por Souza<sup>3</sup> para polifenóis de um extrato metanólico de folhas de *I. edulis*, confirmando que esta planta apresenta taninos condensados com poucas unidades monoméricas.

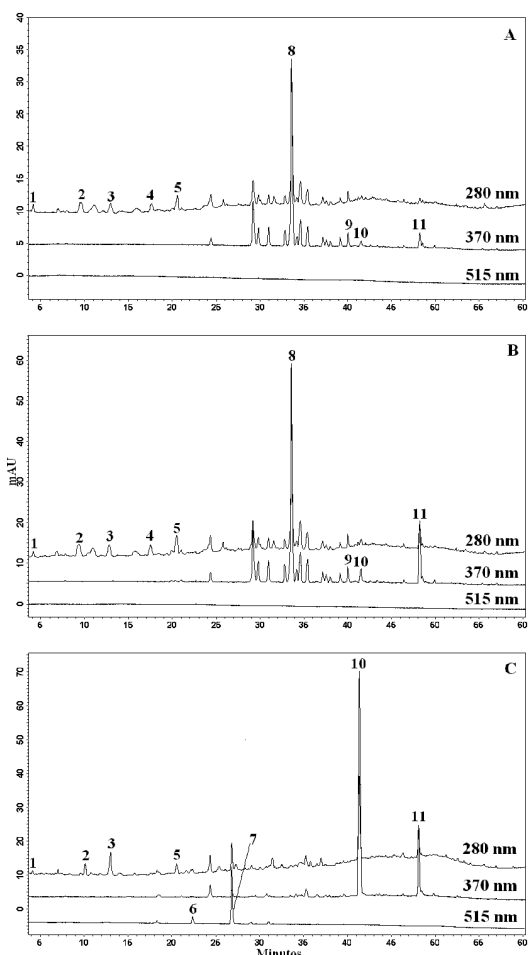
O teor de galotaninos nas Frações II e IIb (Tabela 1) correspondeu a 7% de seus polifenóis totais. Esses foram os menores percentuais entre os outros grupos estudados. O enriquecimento em galotaninos em relação à Fração II foi de 50%.

Os valores ORAC e TEAC para a Fração II foram 8313 ± 511 e 1996 ± 32 μmol ET/g FS, respectivamente. Após o fracionamento os respectivos valores ORAC e TEAC para a Fração IIb (14908 ± 1228 e 3344 ± 250 μmol ET/g FS) corresponderam a um aumento de atividade antioxidante de 79 e 67%, respectivamente, acompanhando o aumento nas concentrações de polifenóis totais. Os valores ORAC e TEAC da Fração IIb corresponderam a 6081 ± 501 e 1364 ± 102

**Tabela 1.** Quantificação de polifenóis totais e classes fenólicas de folhas de *Inga edulis* em frações, antes e após fracionamento por SPE-C<sub>18</sub>

Frações	Polifenóis totais (mg EAG/g FS) <sup>a</sup>	Flavonóis (mg EMR/g FS)	Flavanóis (mg ECA/g FS)	Proantocianidinas (mg ECI/g FS)	Galotaninos (mg EAG/g FS)	Grado de polimerização <sup>b</sup>
II	378,9	52,0	124,3	85,4	26,4	3,0
IIb*	571,4	107,9	168,5	142,1	39,7	3,4
Enriquecimento (%)	51	108	36	66	50	

\*A Fração IIb foi obtida a partir da Fração II, por meio de SPE-C<sub>18</sub>. <sup>a</sup>Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG), de miricetina-3-O-α-L-rhamnopyranosídeo (EMR), de catequina (ECA) e de cianidina (ECI) por g de fração seca (g FS). Os valores correspondem às médias das leituras espectrofotométricas realizadas em triplicata. <sup>b</sup>O grau de polimerização foi calculado pela razão entre o teor de polifenóis totais e o teor de flavanóis.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico das Frações II (A), IIb (B) e IIb hidrolisada (C) obtidas sequencialmente, a partir de extrato bruto de folhas de *Inga edulis*, por meio de partição líquido-líquido, SPE- $C_{18}$  e hidrólise ácida, respectivamente. Os compostos identificados são: 1, ácido gálico; 2, procianidina B1; 3, catequina; 4, procianidina B2; 5, epicatequina; 6, delphinidina; 7, cianidina; 8, miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo; 9, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo; 10, miricetina e 11, quercetina

$\mu\text{mol ET/g}$  Fração IIS, respectivamente. Esses valores representaram uma contribuição teórica de 73 e 68% para os valores ORAC e TEAC da Fração II, respectivamente.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas das Frações II e IIb e da Fração IIb hidrolisada. A detecção foi monitorada de 200 a 600 nm, mas os referidos cromatogramas foram obtidos a 280 nm (todos os compostos fenólicos), 370 nm (flavonóis) e a 515 nm (antocianidinas). Observa-se que os flavonóis apresentaram os maiores tempos de retenção (TR > 23 min).

Alguns compostos fenólicos presentes nas folhas de *I. edulis* foram identificados por Souza e colaboradores<sup>4</sup> e confirmados neste trabalho, aos quais se somaram quatro diferentes compostos, que são comumente encontrados em vegetais: as procianidinas B1 (2) (TR: 9,4 min) e B2 (4) (TR: 17,6 min), miricetina (10) (TR: 41,5 min) e quercetina (11) (TR: 48,2 min) (Figura 2). Picos correspondentes à miricetina e à quercetina não costumam ser encontrados em suas formas agliconas nos vegetais.<sup>24</sup> Eles podem ter sido produzidos por degradação de polifenóis glicosilados durante os processos de fracionamento das amostras, conforme sugerido por Chirinos e colaboradores.<sup>11</sup> As concentrações dos demais compostos identificados na Fração II (Tabela 2) foram maiores que as encontradas na literatura em extrato bruto de folhas de *I. edulis*,<sup>4</sup> à exceção da epicatequina. Os maiores teores podem ser explicados pela partição líquido-líquido com hexano, realizada para se obter a Fração II, que concentrou mais essa fração em polifenóis, em relação ao extrato bruto metanólico referido na literatura. Os compostos identificados de concentrações majoritárias na Fração II foram a miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e a catequina, que apresentaram, respectivamente,  $18,52 \pm 1,35$  e  $13,61 \pm 0,30$  mg/g FS. Os compostos identificados na Fração II corresponderam a 18% da concentração de polifenóis totais obtida por espectrofotometria.

O menor percentual de enriquecimento dos compostos identificados para a Fração IIb, em comparação à Fração II, foi observado para o ácido gálico (8%). Esse composto pode ter se concentrado na Fração IIa, devido à alta afinidade pelo eluente utilizado. Novos estudos poderão observar o perfil cromatográfico desta fração. Os demais percentuais de enriquecimento para a procianidina B2, catequina, miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, epicatequina, procianidina B1, miricetina, quercetina e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo foram de 111, 47, 45, 44, 39, 29, 28 e 17%, respectivamente. Para a

**Tabela 2.** Concentração de compostos fenólicos das folhas de *Inga edulis* em frações, antes e após fracionamento por SPE- $C_{18}$  e após hidrólise ácida

Compostos identificados	Comprimento de onda (nm)	Fração II (mg/g FS)	Fração IIb (mg/g FS)	Fração IIb hidrolisada (mg/g FS)
Ácido gálico	280	$1,86 \pm 0,02^a$	$1,98 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,04$
Catequina	280	$13,61 \pm 0,30$	$19,97 \pm 0,19$	$22,78 \pm 1,10$
Epicatequina	280	$6,32 \pm 0,12$	$9,10 \pm 0,11$	$6,58 \pm 0,24$
Procianidina B1	280	$8,89 \pm 0,51$	$12,36 \pm 0,90$	$5,45 \pm 0,44$
Procianidina B2	280	$9,85 \pm 0,36$	$20,80 \pm 0,77$	$5,65 \pm 0,68$
Miricetina	370	$2,33 \pm 0,16$	$3,01 \pm 0,34$	$48,51 \pm 0,57$
Miric. ram. <sup>b</sup>	370	$18,52 \pm 1,35$	$26,82 \pm 0,98$	n.q.
Quercetina	370	$1,76 \pm 0,18$	$2,26 \pm 0,02$	$7,44 \pm 0,59$
Querc. ram. <sup>c</sup>	370	$5,49 \pm 0,66$	$6,42 \pm 0,05$	n.q.
Delphinidina <sup>d</sup>	515	n.d.	n.d.	$3,69 \pm 0,24$
Cianidina <sup>c</sup>	515	n.d.	n.d.	$4,04 \pm 0,41$

<sup>a</sup>Os desvios padrões representam as variações nas concentrações da análise em triplicata. <sup>b</sup>miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo. <sup>c</sup>quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo. <sup>d</sup>Compostos produzidos a partir da hidrólise ácida de proantocianidinas. n.q., não quantificada; n.d., não detectada



Fração IIB os compostos identificados também representaram 18% da sua concentração de polifenóis totais obtida por espectrofotometria.

A Figura 2C apresenta um cromatograma representativo da Fração IIB hidrolisada. A hidrólise foi realizada para complementar as análises espectrofométricas no estudo de proantocianidinas e flavonóis, que obtiveram as maiores taxas de enriquecimento após fracionamento e, juntos, corresponderam a 44% dos polifenóis totais. Observa-se o aparecimento de picos em 515 nm, entre os quais foram identificados a delphinidina (6) (TR: 22,4 min) e a cianidina (7) (TR: 26,8 min). O aparecimento desses compostos comprova a presença de prodelphinidinas e procianidinas na Fração IIB, conforme relatado na literatura,<sup>11</sup> das quais as procianidinas B1 e B2 foram identificadas neste trabalho. A hidrólise de proantocianidinas também é constatada ao se observar as diminuições nas concentrações das procianidinas B1 e B2 da Fração IIB após hidrólise ácida (Tabela 2). Sugere-se que as concentrações de procianidinas e de prodelphinidinas na Fração IIB sejam semelhantes, uma vez que foram produzidas concentrações semelhantes de delphinidina e cianidina,  $3,69 \pm 0,4$  e  $4,04 \pm 0,4$  mg/g FS, respectivamente. Estudos futuros poderão complementar a identificação das proantocianidinas presentes nas folhas de *I. edulis*.

Após a hidrólise ácida houve um aumento das concentrações de miricetina e quercetina (Tabela 2), devido à presença destes compostos na forma glicosilada como a miricetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo. O aumento na concentração de miricetina foi muito maior que o da quercetina. Assim, pode-se afirmar que a maioria dos picos detectados a 370 nm e não identificados neste trabalho, entre os TR de 28 a 40 min (Figura 3B), também são flavonóis glicosilados baseados principalmente em miricetina, pois esses picos também desapareceram após hidrólise e, portanto, contribuíram para a maior produção de miricetina.

A hidrólise ácida de proantocianidinas com butanol também produz flavanóis, além de antocianidinas.<sup>13</sup> Neste trabalho, observou-se que houve um aumento na concentração de catequina após hidrólise, o que não ocorreu com a epicatequina. Assim, as proantocianidinas presentes na Fração IIB podem ser baseadas em catequinas. Entretanto, sendo baixo este aumento, é provável que tanto as catequinas, quanto as epicatequinas, tenham sido parcialmente degradadas pelas condições físico-químicas da hidrólise ácida. De fato, em processos hidrolíticos os compostos fenólicos podem ser degradados.<sup>9</sup>

## CONCLUSÕES

A partir da utilização de dois processos de extração de folhas de *I. edulis* (líquido-líquido e SPE-C<sub>18</sub>) foi obtida uma fração enriquecida em polifenóis. Análises espectrofométricas e por CLAE-DAD permitiram quantificar este enriquecimento (aumento dos teores de polifenóis totais, flavanóis, flavonóis, proantocianidinas e galotaninos). Uma importante elevação da capacidade antioxidante dessa fração, pelos métodos ORAC e TEAC, confirma a importância dos compostos fenólicos como potentes agentes antioxidantes. A hidrólise ácida da fração enriquecida e posterior análise por CLAE-DAD confirmaram a presença de taninos condensados (prodelphinidinas e procianidinas), além de outros flavonoides glicosilados sendo a miricetina o principal flavonol aglicona. Os compostos majoritários identificados na fração

enriquecida foram: miricetina-3-ramnopiranosídeo, procianidina B2, catequina, procianidina B1 e epicatequina, em ordem decrescente. Estudos futuros são necessários para continuar a identificação dos flavonoides e de proantocianidinas.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa PIC da *Coopération universitaire au développement* (CUD, Bélgica) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Rogez, H.; *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação*, EDUFPA: Belém, 2000.
- Silva, E. M.; Souza, J. N. S.; Rogez, H.; Rees, J. F.; Larondelle, Y.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 1012.
- Souza, J. N. S.; Silva, E. M.; Loir, A.; Rees, J.-F.; Rogez, H.; Larondelle, Y.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 331.
- Souza, J. N. S.; Silva, E. M.; Silva, M. N.; Arruda, M. S. P.; Larondelle, Y.; Rogez, H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1276.
- Correa, S. M. V. C.; Conserva, L. M.; Maia, J. G. S.; *Fitoterapia* **1995**, *66*, 379.
- Silva, E. M.; Rogez, H.; Larondelle, Y.; *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *55*, 387.
- Silva, E. M.; Pompeu, D. R.; Larondelle, Y.; Rogez, H.; *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *53*, 274.
- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1112*, 31.
- Robards, K.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 657.
- Counet, C.; Ouwerx, C.; Rosoux, D.; Collin, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6243.
- Chirinos, R.; Campos, D.; Costa, N.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 1285.
- Porter, L. J.; Hrtich, L. N.; Chan, B. G.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 223.
- Schofield, P.; Mbugua, D. M.; Pell, A. N.; *Anim. Feed Sci. Technol.* **2001**, *91*, 21.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; *Method. Enzymol.* **1999**, *299*, 152.
- Quettier-Deleu, C.; Gressier, B.; Vasseur, J.; Dine, T.; Brunet, C.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J.-C.; Bailleul, F.; Trotin, F.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 35.
- Delcour, J. A.; Varebeke, D. J.; *J. I. Brewing* **1985**, *91*, 37.
- Julkunen-Tiitto, R.; *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 213.
- Salminen, J.-P.; *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 1289.
- Ou, B. X.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619.
- Huang, D. J.; Ou, B. X.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4437.
- Re, R.; Pelligrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. A.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231.
- Nuutila, A. M.; Kammiovirta, K.; Oksman-Caldentey, K.-M.; *Food Chem.* **2002**, *76*, 519.
- Agostini-Costa, T. S.; Lima, A.; Lima, M. V.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 763.
- Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *799*, 101.