

Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fracção Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L.¹

Isabel Maria Evaristo* e Maria Cecília Leitão**

*Assistente de Investigação

Departamento de Silvicultura e Produtos Florestais. Estação Florestal Nacional, Rua do Borja, 2, 1399-051 LISBOA

**Investigador Principal

Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícolas. Instituto de Investigação Científica Tropical. Rua da Junqueira, 47, 1349-051 LISBOA

Sumário. Neste estudo, desenvolveu-se um método analítico para a determinação de compostos fenólicos em folhas de sobreiro (*Quercus suber* L.) dado estas substâncias desempenharem, nas plantas, papel importante nos mecanismos de resistência às doenças e pragas.

Interessámo-nos pelos constituintes da fracção hidrolizada (ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico) que foram separados e identificados por DAD-HPLC², com base nos seus tempos de retenção e dados espectrais. A quantificação foi efectuada utilizando o método de padrão externo.

Palavras-chave: ácido gálico; catequina; ácido cafeico; ácido p-cumárico; ácido ferúlico

Abstract. In this study, an analytical method has been developed for the determination of phenolic compounds since they are related with disease and pests plant resistance mechanisms.

The components of the hydrolysed extract (gallic acid, ellagic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, p-coumaric acid and ferulic acid) have been resolved and identified by DAD-HPLC based on their retention times and spectral data. For quantifications, the external standard method was used.

Key words: gallic acid; catechin; caffeic acid; p-coumaric acid; ferulic acid.

Résumé. Dans la présente étude, on a développé une méthode analytique pour la détermination des composés phénoliques des feuilles de chêne liège (*Quercus suber* L.) car ces substances sont susceptibles d'avoir un rôle important sur les mécanismes de défense des plantes contre les parasites et maladies infectieuses.

Nous nous sommes intéressées à la composition phénolique de la fraction hydrolysée (acide gallique, acide ellagique, catéchine, épicatechine, acide caféique, acide p-coumarique, acide

¹ Este trabalho constitui uma súmula do documento "Identificação e caracterização dos compostos fenólicos" realizado no âmbito do projecto PAMAF 4003 "Contribuição para o melhoramento do sobreiro".

² Abreviaturas: DAD-HPLC, cromatografia líquida de alta pressão com sistema de detecção de fotodiodos ("high performance liquid chromatography with photodiode-array detection"); c.d.o.(comprimento de onda); m.s. (massa seca).

férulique) qui a été séparée et identifiée par CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance avec un détecteur à barrette de photodiodes) en fonction du temps et des données spectrales. La quantification a été effectuée en utilisant des étalons externes.

Mots clés: acide gallique; catéchine; acide caféique; acide p-coumarique; acide férulique

Introdução

Em Portugal, o sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma das mais importantes espécies florestais de origem mediterrânica.

Apesar dos montados de sobreiro representarem extensas áreas de paisagem no País e a sua exploração constituir apreciável fonte de riqueza, o sobreiro é uma espécie ainda pouco estudada.

Situação actual da patologia do sobreiro

Nos últimos anos, os montados de sobreiro têm apresentado, em Portugal, alterações do seu estado vegetativo, sintomatologia que parece enquadrar-se na descrita para o declínio geral das Quercíneas da Europa (MONTROYA, 1988) cujas causas apontam para uma situação de *multistress* em que os agentes nocivos (pragas e doenças) encontram condições para se desenvolverem e, assim, acelerarem o processo de degradação.

Os fungos são, por norma, apontados como indicadores desse declínio e, com maior frequência, como agentes que o aceleram. No sobreiro são referidos cerca de 6 dezenas de populações de fungos (*Clytocibe tabecens* (Scop.) Bres., *Endothiella gyrosa* Sacc., *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.) e *Phytophthora cambivora* (Petri) Buism e *Phytophthora cinamomi* Rands (BRASIER *et al.*, 1992, cit. CABRAL e SANTOS, 1992).

Também os vírus, as bactérias e uma entomofauna bastante rica (FERREIRA e FERREIRA, 1986) vivem na dependência desta árvore.

Polifenóis nas plantas e seu papel como mecanismo de defesa das plantas

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários provenientes da via metabólica do ácido shiquímico.

O estudo dos compostos fenólicos, de um modo genérico, e especificamente dos ácidos fenólicos, considera-se de máximo interesse por se encontrarem ligados à maior parte dos fenómenos biológicos, botânicos, genéticos e taxonómicos.

Devido à grande diversidade de processos metabólicos na formação das substâncias fenólicas, é difícil estimar o seu teor quantitativo nos tecidos das plantas de um modo absoluto.

Normalmente, a cada espécie vegetal está associada uma determinada família de polifenóis como mais importante, cujos teores aumentam com a idade e variam com o desenvolvimento vegetativo da planta.

Estes compostos apresentam diversas funções: actuam como radicais livres, como inibidores de crescimento, como protectores das plantas ao *stress* ambiental (FEUCHT, TREUTTER e CHRIST, 1994) e ainda como mecanismo de defesa a pragas e doenças (HARBONE, 1989). As plantas podem sintetizar e acumular uma vasta gama destes metabolitos secundários em resposta a um *stress* fisiológico (DIXON e PAIVA, 1995). Outros, apresentam uma forte absorção aos raios ultravioletas, funcionando como protectores dos constituintes das células primárias mais vulneráveis (DNA, RNA, etc.).

Contudo, a maior atenção tem sido, ultimamente, dada à investigação do

comportamento dos fenóis no meio ambiente e na interacção que pode ocorrer entre a planta e os seres vivos.

Em muitas interacções hospedeiro-patogene, não são os fenóis já existentes mas os fenóis sintetizados após a infecção que se relacionam com a resistência a doenças.

Até à data, muito pouca informação se encontra disponível, sobre o teor em compostos fenólicos nas folhas de sobreiro. A maioria dos trabalhos reportam-se a estudos sobre proantocianidinas e elagitaninos na cortiça e cerne do sobreiro (KAHN-NADÈGE *et al.*, 1998; CADAHIA *et al.*, 1996) ou a determinações de flavanois em agulhas ou folhas jovens de outras espécies lenhosas que não a *Quercus* (FEUCHT, TREUTTER e CHRIST, 1994).

Parte experimental

Preparação da amostra

No período compreendido entre Março e Junho de 1998 realizou-se a

colheita de material vegetal em 5 árvores adultas seleccionadas e localizadas em duas parcelas (B7 e B10) na Herdade do Monte Fava em Ermidas do Sado. O critério utilizado na selecção das árvores teve como base o seu bom estado vegetativo tendo em conta a percentagem de desfolha/descoloração (Quadro 1). O material colhido por árvore (ramos com folhas jovens) foi transportado para o laboratório e conservado a -70°C até à sua determinação analítica.

Extracção de fenóis totais

Foi utilizado o método relatado por MARIGO (1973) para a extracção e a quantificação dos compostos fenólicos totais. A extracção foi feita com metanol a 70% (v/v) e a determinação com o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando-se a polivinilpirrolidona para a retenção das substâncias não fenólicas dado que este reagente actua sobre as substâncias reductoras fenólicas e não fenólicas.

Quadro 1 - Percentagem de desfolha/descoloração nas árvores estudadas

Parcela/ árvore	Colheita (mês de 1998)	Desfolha/ descoloração (%)	Classe *	Observações Realizadas em Março
B 7/1	Abril	30-35	2	Folhas secas com manchas, líquenes, ramos com pontas secas
B 7/2	Abril	35-40	2	Folhas secas com manchas, líquenes, ramos com pontas secas
B 7/5	Abril	15-20	1	Folhas secas com manchas, líquenes, ramos com pontas secas
B 7/7	Abril	30	2	Ramos com pontas secas
B 7/14	Abril	5	0	Ramos com pontas secas, líquenes
B 10/3	Abril	40-45	2	Alguns líquenes, ramos com pontas secas
B 10/11	Junho	15	1	Poucos líquenes
B 10/12	Maiol	25-30	2	Poucos líquenes, ramos com pontas secas
B 10/19	Junho	5-10	0	Poucos líquenes
B 10/20	Junho	10-15	1	Folhas secas

*Fonte Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 1987: 0 (sem), 1(ligeira), 2 (moderada)

Extracção de compostos fenólicos

Cerca de 3g de amostra de folhas foram maceradas em azoto líquido e submetidas a hidrólise alcalina NaOH 2M (o que permite a identificação das moléculas fenólicas ligadas a ésteres) em atmosfera de azoto durante 4 horas à temperatura ambiente e na ausência de luz (KRYGRER, SOSULSKI e HOGGE, 1982). O extrato, uma vez ajustado a pH 3,5 com HCl, foi centrifugado, extraído com acetato de etilo 3 vezes, com igual volume de cada vez e evaporado sob vácuo, a temperatura inferior a 40°C. O resíduo foi dissolvido em 2 mL metanol/água (50:50) e filtrado por membrana de 0,22 µm.(Millipore).

Separação, identificação e quantificação dos fenóis e compostos fenólicos

Para a separação dos compostos fenólicos por DAD-HPLC foi utilizado o cromatógrafo Beckman-sistema Gold (Fullerton, U.S.A) equipado com uma coluna µBondapack C₁₈ 10 µm (300 mm x 3.9 mm i.d.,Waters Associates), fixando-se o c.d.o. em 280 nm.

A optimização das condições de separação em sistema de gradiente foram obtidas pela aplicação de uma fase móvel que compreendia dois solventes: solvente A (ácido acético a 2%) e solvente B (metanol a 100%) com um fluxo de 1mL min⁻¹ (Quadro 2).

As injecções foram feitas em triplicado (vi=20 µL) e a detecção acompanhada com sistema de fotodiodos entre 230-330 nm, durante 45 minutos.

A partir dos dados espectrais, nomeadamente dos tempos de retenção quando comparados com os de padrões comerciais (SIGMA Chemical Co., St Louis, U.S.A) dos produtos cromatogra-

fados foram identificados os seguintes compostos: a) ácidos fenólicos (C₆-C₁): elágico, gálhico; b) flavanois (C₆-C₃-C₆): catequina e epicatequina; ácidos hidroxicinâmicos (C₆-C₃): cafeico, p-cumárico e ferúlico. A figura 1 é um exemplo típico dos cromatogramas obtidos em que a tracejado se representa o gradiente aplicado da fase móvel.

Quadro 2 - Composição do gradiente da fase móvel

Tempo (min)	A %	B %
0-2	95	5
10	75	25
20	60	40
30	50	50
40	0	100
45	95	5

A água: ácido acético (98:2); B metanol 100%

Para a quantificação dos teores dos compostos fenólicos fraccionados por DAD-HPLC, utilizaram-se as áreas dos picos a 280 nm de cada um deles e estabeleceram-se as respectivas curvas de calibração com as áreas dos picos dos padrões injectados.

Resultados e discussão

As concentrações dos produtos identificados foram calculadas a partir de curvas padrão obtidas com produtos comerciais cromatografados em condições idênticas, apresentando-se nos Quadros 3, 4 e 5 os resultados alcançados referentes às 10 árvores das 2 parcelas.

Estes resultados encontram-se graficamente representados na Figura 2 (para compostos fenólicos) e na Figura 3 (para fenóis totais, fenóis não taninos e taninos)

Figura 1 - Cromatograma DAD-HPLC de um extracto de folhas de *Quercus suber* L. onde se assinalam os produtos identificados: (1) ácido elágico, (2) ácido gálico, (3) catequina, (4) epicatequina, (5) ácido cafeico, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido ferúlico

Quadro 3 - Concentrações dos compostos fenólicos em folhas de *Quercus suber* L. da parcela B7

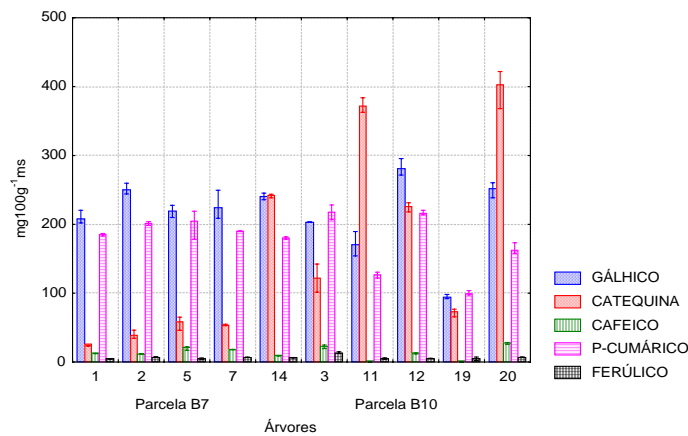
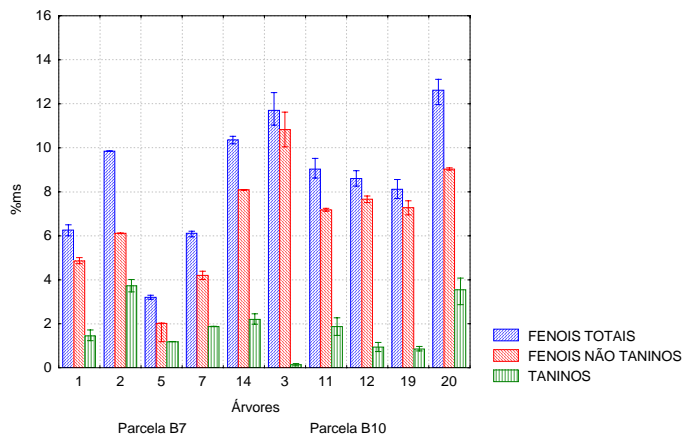
Compostos fenólicos	Árvores				
	1	2	5	7	14
ác. cafeico (mg100g ⁻¹ ms)	12,39	11,83	20,36	18,11	9,09
ác. ferúlico (mg100g ⁻¹ ms)	4,44	7,271	4,98	6,94	6,09
ác. gálico (mg100g ⁻¹ ms)	208,23	250,37	219,39	224,19	239,91
ác. p-cumárico (mg100g ⁻¹ ms)	185,40	201,21	204,13	189,83	180,43
catequina (mg100g ⁻¹ ms)	23,58	38,65	58,45	54,19	241,85
fenóis totais (% ms)	6,26	9,85	3,21	6,12	10,35
fenóis não taninos (% ms)	4,86	6,12	2,02	4,20	8,09
taninos (% ms)	1,48	3,73	1,19	1,88	2,21

Quadro 4 - Concentrações dos compostos fenólicos em folhas de *Quercus suber* L. da parcela B10

Compostos fenólicos	Árvores				
	3	11	12	19	20
ác. cafeico (mg100g ⁻¹ ms)	22,18	0	12,45	0	27,50
ác. ferúlico (mg100g ⁻¹ ms)	13,59	5,01	5,21	4,65	7,21
ác. gálico (mg100g ⁻¹ ms)	203,18	169,95	280,98	94,65	252,09
ác. p-cumárico (mg100g ⁻¹ ms)	217,36	126,41	216,68	99,58	163,19
catequina (mg100g ⁻¹ ms)	121,67	372,00	225,08	72,31	402,93
fenóis totais (% ms)	11,70	9,04	8,61	8,12	12,62
fenóis não taninos (% ms)	10,83	7,17	7,66	7,27	9,03
taninos (% ms)	0,14	1,87	0,94	0,85	3,59

Quadro 5- Compostos fenólicos (mg100g⁻¹ms) e fenois (%) em folhas de *Q. suber* L.

Comp. fenólicos	Médias	Mínimos	Máximos	Desvio padrão
ác. cafeico (mg100g ⁻¹ ms)	13,39	0,00	27,50	8,99
ác. ferúlico (mg100g ⁻¹ ms)	6,54	4,44	13,58	2,70
ác. gálgico (mg100g ⁻¹ ms)	213,61	94,65	280,97	52,03
ác. p-cumárico (mg100g ⁻¹ ms)	178,46	99,57	217,36	38,76
catequina (mg100g ⁻¹ ms)	161,07	23,58	402,93	140,98
fenois totais (% ms)	8,63	3,21	12,62	2,85
fenois não taninos (% ms)	6,72	2,02	10,83	2,53
taninos (% ms)	1,91	0,85	3,73	1,03

**Figura 2** - Teor dos compostos fenólicos/árvore expressos em mg por 100g de massa seca em folhas de *Quercus suber* L.**Figura 3** - Teores dos fenois totais, fenois não taninos e taninos expressos em % de massa seca em folhas de *Quercus suber* L.

Estes resultados demonstram a ocorrência destes compostos em praticamente todas as árvores analisadas das parcelas B7 e B10. A variabilidade quantitativa detectada entre os sobreiros seleccionados na parcela B10 pode ser atribuída, para além de outros factores, à falta de simultaneidade na rebentação das folhas, facto que implicou o desfasamento na época de colheita (árvores 3 e 12-material colhido em Maio; árvores 11, 19 e 20 material colhido em meados de Junho quando as folhas já apresentavam um certo grau de secura a avaliar pelos seus teores de humidade).

A árvore 19, classificada na classe 0, foi a que registou os mais baixos valores, em relação aos compostos fenólicos que foram identificados, excepto no que se refere à catequina.

Conclusão

A metodologia utilizada nos estudos dos compostos fenólicos contidos em folhas de *Quercus suber* permitiu a identificação do ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico. No entanto, a utilização eventual de outras metodologias de detecção poderá contribuir para a identificação de outros compostos, nomeadamente derivados glicosídicos.

Agradecimentos

Ao sector de Química Tecnológica do Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícolas, pela colaboração, disponibilidade, ajuda e amizade manifestadas durante a realização deste trabalho, em particular à Técnica Profissional Especialista de Investigação Maria Domitília Fernandes.

Bibliografia

- CABRAL, M.T., SANTOS, M.N., 1992. Situação sanitária dos montados de sobreiro em Portugal In: *Simpósio Mediterrâneo sobre Regeneración del Monte Alcornocal*, Merida, Sevilla, pp. 196-199.
- CADAHÍA, E., CONDE, E., FÁNDEZ DE SIMÓN B., GARCÍA-VALLEJO M.C., 1996. Proanthocyanidins and ellagitannins in cork of *Quercus suber* L. In: "18th International Conference on Polyphenols", Bourdeaux, France, pp. 215-216.
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L., 1995. Stress - Induced Phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**: 1085-1097.
- FEUCHT, W., TREUTTER, D., CHRIST, E., 1994. Accumulation of flavonols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiol.* **14** : 403-412.
- FERREIRA, M.C., FERREIRA, G.W., 1986. Notas sobre os insectos nocivos ao *Quercus suber* L. em Portugal. In: *Actas do 1º Encontro sobre os montados de sobreiro e de azinho*, SPCF, Évora, pp. 393-403.
- HARBONE, J.B., 1989. *Introduction to ecological biochemistry*. Acad. Press, S. Diego, Ed. 3rd 356 p.
- KAHN-NADÉGE, L., AMMIRATI, L., MIRABEL, M., GLORIES, Y., 1998. Etude de la constitution du bouchon de liège de *Quercus suber*., In : "19th International Conference on Polyphenols", Lille, France, pp. 447-448.
- KRYGER, K., SOSULSKI F., HOGGE L., 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1.Extraction and purification procedure, *J. Agric. Food Chem.* **30**: 330-334.
- MARIGO, G., 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. *Analysis* **2** : 106-110.
- MONTOYA, R., 1988. A morte dos sobreiros e as secas. Relatório ciclostilado.

Submetido para publicação em Abril de 2001

Aceite para publicação em Outubro de 2001