

# Determinação de substâncias fenólicas em amostras de atemóia por cromatografia

Francielle Christine Cunha Andrade<sup>1</sup>, Regina Lucia Pelachim Lianda<sup>1</sup>, Vanézia Liane da Silva<sup>1</sup>, Rosane Nora Castro<sup>2</sup>

1. IF Sudeste MG – Câmpus Barbacena; 2. UFRRJ. [regina.lianda@ifsudestemg.edu.br](mailto:regina.lianda@ifsudestemg.edu.br)

## 1. Introdução

### 1.1 A atemóia

A atemóia é um híbrido resultante do cruzamento entre a cherimóia (*Annona cherimola* Mill.) e a fruta do conde (*A. squamosa* L.) Sua produção tem tido interesse crescente no Brasil, mas existem poucos dados disponíveis sobre as características dos frutos produzidos (TOKUNAGA, 2000; NETO et al., 2009). Quando na planta, os frutos de atemóia enegrecem se expostos à incidência direta dos raios solares ou a temperaturas inferiores a 10 °C, e, pelo fato de ser um fruto muito sensível ao frio, seu armazenamento a baixas temperaturas tem como consequências o escurecimento da casca e da polpa e a perda do aroma e do sabor (TOKUNAGA, 2000), o que dificulta o envio dos frutos aos centros consumidores mais distantes.

### 1.2 Chácara da Mantiqueira – Barbacena-MG

Há 7 anos a Chácara da Mantiqueira produz a fruta atemóia, que pode ser encontrada nas cidades próximas. Por se tratar de uma fruta bastante sensível os agricultores utilizam técnicas para inibir o escurecimento e amaciamento do fruto, embalando os mesmos, ainda no pé, com papel manteiga, para proteger do vento, do sol excessivo e também do frio. A colheita deve ser cuidadosa para proteger os frutos de possíveis danos, para não ocorrer perda do valor comercial e vida de prateleira. Devido ao rápido escurecimento do fruto, este deve ser colhido quando a casca adquire a cor verde mais claro e os carpelos mais distantes uns dos outros, com textura firme. Os frutos têm formato diversificado de acordo com a variedade, cordiforme, cônicos ou ovais, lisos ou com protuberâncias; cor verde amarelado, polpa branca, doce, ligeiramente ácida, sucosa, mais saborosa que a pinha, muitos carpelos sem sementes. Seu sabor é agradável, doce, ligeiramente acidulado e aromático (BONAVENTURE, 1999). As plantas produzem atemóia uma vez ao ano e o período de colheita ocorre entre os meses de julho e metade de setembro. A atemóia tem grande atividade metabólica após a colheita, o que justifica a sua maturação em um curto espaço de tempo.

### **1.3 Substâncias fenólicas em alimentos**

Diversas substâncias fenólicas (polifenóis) têm sido identificadas em plantas e muitas delas encontradas em alimentos (mel, frutas, legumes, vegetais etc.). Essas substâncias são metabólitos especiais de plantas e estão, geralmente, envolvidos na defesa contra radiação UV ou agressão por patógenos. Elas podem ser classificadas em diferentes grupos entre ácidos fenólicos, flavonóides e outros. As frutas e as bebidas, tais como chá e os vinhos vermelhos, constituem a principal fonte de polifenóis. Certos polifenóis tais como a quercetina, são encontrados em vários tipos de matrizes (frutas, vegetais, cereais, leguminosas, sucos, chá, vinhos, mel, própolis, pólen etc.), enquanto outros são específicos de um tipo de alimento (flavanonas em frutas cítricas, isoflavonas em soja). Em muitos casos, os alimentos contêm misturas complexas de polifenóis de difícil caracterização. A maçã, por exemplo, contém monômero de flavonol (epicatequina) ou oligômeros (procianidina B2), ácido clorogênico e quantidades pequenas de outros ácidos hidroxicinâmicos, quercetina glicosilada e antocianidinas (LIANDA, 2004). O flavonóide morina, de interessante atividade antioxidante, foi identificado em mel, pela primeira vez, por LIANDA & CASTRO (2008) em amostra brasileira da região da Mata Atlântica. Essas substâncias têm ação suave e benéfica em numerosos processos fisiológicos no corpo e podem beneficiar o coração, veias, fígado, sistema imunológico, rins, musculatura e sistema nervoso. Das várias propriedades terapêuticas podem destacar-se os efeitos antioxidantes (LIANDA et al., 2012), antibacterianos, antialérgicos, antiinflamatórios, anti-hepatotóxicos, antineoplásicos e antivirais.

**Palavras chave:** atemóia; cromatografia; substâncias fenólicas.

**Categoria/Área:** BIC/Ciências Exatas e da Terra.

### **2. Objetivo**

- Determinar o perfil de ácidos fenólicos e flavonóides de extratos de atemóia.

Ressalta-se que há outro objetivo citado no projeto, o qual não pode ser atingido em função da chegada de materiais não conferir com o cronograma.

### **3. Material e métodos**

O trabalho vem sendo realizado em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Dra Rosane Nora Castro, da UFRRJ. As análises dos padrões foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), portanto as condições cromatográficas já foram definidas na UFRRJ, e as

análises das amostras devem ser realizadas no Câmpus Barbacena, após instalação do HPLC. Foram realizados ensaios por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA). Ênfase foi dado àqueles fenólicos já descritos na literatura como possíveis constituintes químicos de frutas, além de suas disponibilidades (padrões comerciais) no Laboratório de Química Orgânica do Núcleo de Química do Câmpus Barbacena.

### **3.1 – Amostras de Atemóia**

As amostras de atemóia avaliadas foram obtidas no município de Barbacena na Chácara da Mantiqueira. Essas amostras estiveram armazenadas em geladeira a 10°C até o momento das extrações. Foram armazenadas cerca de 15 frutas colhidas em setembro/2012, das quais foram avaliadas 5 delas e as restantes deterioraram-se, e cerca de 10 frutas colhidas em outubro/2012, cujo aproveitamento foi nulo; essas últimas frutas foram colhidas após aplicação nas árvores de substâncias específicas destinadas à queda das folhas, para posterior preparo das plantas para a próxima produção, e que, simultaneamente aceleram a maturação das frutas.

### **3.2 – Padrões das Substâncias Fenólicas**

As substâncias fenólicas padrões de interesse são os ácidos gálico, sinápico, siríngico, vanílico, ferúlico, clorogênico, cinâmico, 4-metoxi-benzóico, 4-hidroxi-benzóico, orto-metoxi-cinâmico, 3,4-diidroxibenzóico e 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, e os flavonóides quercetina, canferol, rutina, triacetina, crisina, luteolina, miricetina, hesperetina, isoramnetina, isoquercitrina, naringenina, apigenina e morina.

### **3.3 – Procedimentos Analíticos**

Os procedimentos analíticos referentes às análises cromatográficas por CLAE, bem como aos ensaios posteriores a essas análises, que não foram realizados, conforme citado anteriormente, não serão especificados aqui.

#### **3.3.1 – Preparo dos extratos das amostras para análises cromatográficas**

As substâncias fenólicas foram extraídas da atemóia segundo metodologia descrita previamente na literatura utilizada em matrizes de méis, com algumas adaptações (LIANDA, 2004; LIANDA et al., 2012).

Procedimento: Misturar a amostra de atemóia (cerca de 50 g da polpa) com 300 mL de água destilada, ajustada a pH = 2 com HCl concentrado (água acidificada) e bater no liquidificador, até completa dissolução. Filtrar à vácuo a amostra fluida. Agitar o filtrado juntamente com cerca de 75 g de Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0,3-1,2 mm) e, em seguida, empacotar em uma coluna de vidro (85 x 3,5 cm). Lavar

a coluna, primeiramente com água acidificada (100 mL), e subseqüentemente, com água destilada (150 mL) para remover todos os açúcares e outros constituintes polares da atemóia, enquanto as substâncias fenólicas permanecem na coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna é, então, eluída com metanol (350 mL). Concentrar o extrato metanólico obtido até a secura sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40°C. Após esta etapa, realizar o procedimento de extração no qual são adicionados 15 mL de H<sub>2</sub>O destilada ao extrato, em seguida realiza-se a partição com dois solventes diferentes (cada coluna em um solvente): a) éter e b) acetato de etila. Após cerca de dez extrações, reunir as fases orgânicas, secas sob sulfato de sódio anidro e concentrar até secura em evaporador rotativo a 40 °C.

### 3.3.2 – Análise cromatográfica por CCDA

Essas análises foram realizadas utilizando cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254. O eluente usado como fase móvel para avaliação de ácidos fenólicos e flavonóides livres foi: hexano:acetato de etila:ácido fórmico-15:24:1. A visualização das substâncias foi feita, sob luz UV a 254 e 365 nm e/ou pulverizadas com solução etanólica 1% de AlCl<sub>3</sub> como revelador químico para a avaliação de flavonóides.

## 4. Resultados e discussão

Os códigos dos extratos de atemóias são FAT1A e FAT1B (**F**rancielle-**A**temóia-1<sup>a</sup> fruta-**A**-acetato; **B**-éter), FAT2A e FAT2B (2<sup>a</sup> fruta, etc.), FAT3A e FAT3B, FAT4A, FAT5A e FAT5B. O extrato FAT1A foi preparado em coluna aberta contendo 30 g de fase estacionária (Amberlite XAD-2) apresentando resultados inferiores quando comparados com todos os outros extratos (75 g fase estacionária), tanto quanti (massa aproximadamente 20% menor) quanto qualitativos (sua análise por CCDA apresentou apenas uma mancha, indicando a presença de apenas uma substância fenólica, o que não ocorreu com outros extratos). A 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> frutas foram deteriorando-se durante o processo de preparo das amostras, e suas extrações não foram tão eficientes, apesar de demonstrarem a presença de polifenóis. Há uma substância em todos os extratos, cujo fator de retenção (R<sub>f</sub>) aproxima-se dos ácidos ferúlico, *orto*-cumárico e *para*-cumárico (todos derivados do ácido cinâmico – C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH=CHCOOH, substituídos com uma hidroxila e diferenciam-se na metoxila apresentada pelo ferúlico), porém a coloração elimina a possibilidade de ser o ferúlico, restringindo-se aos ácidos **orto** ou **para-cumárico**. Há uma substância menos polar que esta, acima dela, podendo ser o **ácido benzóico** ou **para-**

**metoxicinâmico**, sendo eliminada pela coloração azulada o ácido cinâmico. Apesar de fraca, há uma mancha abaixo destas, portanto mais polar, cujo  $R_f$  é similar aos ácidos **protocatecuico** e cafeico, vistos a 254 nm, e elimina-se o cafeico a 365 nm pela coloração azulada. Apenas nos extratos obtidos em acetato há presença de uma mancha amarelada vista em ambos os comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, com uma certa polaridade pois encontra-se próximo a origem, que não coincide com nenhum dos padrões comparados. Desperta-se o interesse em isolar esta substância para posterior identificação por RMN- $H^1$  e  $C^{13}$ . Nenhum dos padrões de flavonóides agliconas coincidiram com as substâncias dos extratos das amostras.

## 5. Conclusão

As análises realizadas até o momento demonstram a presença de ácidos fenólicos nas amostras de atemóia (ácidos *orto*-cumárico ou *para*-cumárico, protocatecuico, benzóico ou *para*-metoxicinâmico, e um polifenol bastante polar não identificado). Apesar de resultados preliminares, que devem ser confirmados por CLAE, há a presença de substâncias que apresentam interessantes atividades biológicas, que podem ser avaliadas posteriormente.

## 6. Referências bibliográficas

1. BONAVENTURE, L. A cultura da Cherimóia e seu híbrido, a atemóia, SP, Nobel, 1999.
2. LIANDA, R.L.P. Dissertação de Mestrado. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ, p.142, 2004.
3. LIANDA, R.L.P. & CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. Química Nova, 31(6), 1472-1475, 2008.
4. LIANDA, R.L.P.; SANT'ANA, L.D.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R.N. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-10, 2012.
5. NETO, J.E.B.; NERO, M.D.; KAVATI, R.; PINTO-MAGLIO, C.A.F. Viabilidade e conservação de pólen de três Anonas comerciais. Bragantia, Campinas, 68 (4), 825-837, 2009.
6. TOKUNAGA, T. A cultura da atemóia. Campinas: CATI, (Boletim técnico, n.233), 80p, 2000.

## Agradecimentos

À Chácara da Mantiqueira – Barbacena-MG.

**Apoio financeiro:** IF Sudeste MG – Câmpus Barbacena.