

# Variabilidade espaço-temporal de compostos fenólicos em *Lotus corniculatus*

## Spatiotemporal variability of phenolics in *Lotus corniculatus*

Simone Meredith Scheffer-Basso\*, Silvia Ortiz Chini, Charise Dallazem Bertol e Pedro Alexandre Varella Escosteguy

Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, Brasil

(\*E-mail: sbasso@upf.br)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA18034>

Recebido/received: 2018.02.11

Recebido em versão revista/received in revised form: 2018.02.28

Aceite/accepted: 2018.03.05

### RESUMO

Determinou-se a concentração de catequina, epicatequina, rutina e quercetina, por cromatografia líquida de alta eficiência, em extratos metanólicos elaborados com folhas+caules e flores+frutos de *Lotus corniculatus* colhido nos estádios vegetativo e reprodutivo. O estágio fenológico não afetou a concentração de flavonoides dos extratos de folhas+caules, que apresentaram maior concentração de catequina (2,11 mg.g<sup>-1</sup>) em relação ao extrato de flores+frutos (1,18 mg.g<sup>-1</sup>). As maiores concentrações de epicatequina (11,6 mg.g<sup>-1</sup>), quercetina (1,26 mg.g<sup>-1</sup>) e rutina (2,23 mg.g<sup>-1</sup>) ocorreram no extrato de flores+frutos. A concentração de compostos fenólicos dessa espécie parece estar dependente da alocação da biomassa nos órgãos vegetativos e reprodutivos das plantas.

**Palavras-chave:** cornichão, *Lotus corniculatus*, catequina, quercetina, rutina.

### ABSTRACT

The concentration of catechin, epicatechin, rutin and quercetin was determined by high performance liquid chromatography on methanolic extracts from leaves+stems and flowers+fruits of *Lotus corniculatus* harvested at vegetative and reproductive stages. Phenological stage did not affect the flavonoid concentration of leaves+stems extracts, which presented higher concentration of catechin (2.11 mg.g<sup>-1</sup>) than flowers+fruits extract (1.18 mg.g<sup>-1</sup>). The highest concentrations of epicatechin (11.6 mg.g<sup>-1</sup>), quercetin (1.26 mg.g<sup>-1</sup>) and rutin (2.23 mg.g<sup>-1</sup>) occurred in the flower+ fruit extract. The concentration of phenolics in this species seems to be dependent on the biomass allocation in the vegetative and reproductive organs of the plants.

**Keywords:** birdsfoot trefoil, *Lotus corniculatus*, catechin, quercetin, rutin.

O cornichão (*Lotus corniculatus* L.) é uma das mais importantes leguminosas forrageiras, juntamente com alfafa (*Medicago sativa* L.) e trevo-branco (*Trifolium repens* L.), sobre as quais tem a vantagem de não provocar timpanismo nos animais. Essa característica decorre das espécies de *Lotus* L. possuírem taninos condensados (proantocianidinas), que, ao se complexarem com as proteínas, inibem a formação de espuma no rúmen. Esse gênero de leguminosas é considerado ideal para estudos da biossíntese, variabilidade e regulação

genética das proantocianidinas (Gruber *et al.*, 2008).

As proantocianidinas, representadas pelas procianidinas e prodelfinidinas, são formadas pelos monômeros (epi)catequina e (epi)galocatequina, respectivamente (Hellström & Matilla, 2008). No cornichão, há preponderância de procianidinas (Sivakumaran *et al.*, 2006) em relação às prodelfinidinas. Além dessas substâncias, essa leguminosa apresenta flavonoides, como rutina e quercetina.

Graças às características fenólicas, o cornichão tem sido objeto de estudos farmacológicos, visando, principalmente, a produção de medicamentos fitoterápicos para uso veterinário, já que possui atividade antimicrobiana (Koelzer *et al.*, 2009; Girardi *et al.*, 2014) e anti-helmíntica (Shepley *et al.*, 2015). Contudo, os estudos farmacológicos dos compostos fenólicos seriam facilitados se os pesquisadores tivessem conhecimento da(s) parte(s) da planta em que essas substâncias estão presentes em maior quantidade e em que estágio fenológico isso ocorre. Nessa perspectiva, este estudo teve como objetivo avaliar se o estágio fenológico e o componente funcional da planta influenciam a concentração de procianidinas e flavonóides do cornichão.

O material vegetal foi coletado em uma população de *L. corniculatus* 'São Gabriel', em Passo Fundo (28° 15' S e 53° 24' W), Rio Grande do Sul, Brasil. As plantas foram colhidas em dois estádios fenológicos: vegetativo e reprodutivo. No estágio vegetativo, o material vegetal foi composto por folhas e caules; no estágio reprodutivo, foram separados dois componentes das plantas: folhas+caules e flores+frutos (Figura 1). As amostras de material vegetal foram secas a 30 °C, durante 72 h, moídas, submetidas à extração hidroalcoólica e concentradas em rotaevaporador. Calculou-se o teor de umidade e o percentual de extrato seco mediante a determinação da perda de massa por dessecação. Assim, foram obtidos três extratos, de acordo com a composição do material vegetal e o estágio fenológico das plantas: 1) extrato de folhas+caules/estádio vegetativo; 2) extrato de folhas+caules/estádio reprodutivo; 3) extrato de flores+frutos/estádio reprodutivo.



**Figura 1** - Componentes funcionais de *Lotus corniculatus* 'São Gabriel' usados para elaboração dos extratos de (a) folhas+caules e (b) flores+frutos.

Foram desenvolvidas e validadas metodologias para (1) detecção simultânea de rutina, catequina e epicatequina e (2) de quercetina. As substâncias químicas de referência (SQR), da marca Sigma-Aldrich, catequina (lote BCBC2740), epicatequina (lote BCBC8078V), rutina (lote BCBD8327V) e quercetina (lote S060M1196V), foram preparadas na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, em metanol. Os extratos foram preparados na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol e filtrados em membrana de 0,45 µm. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Flexar LC Perkin Elmer, equipado com bomba binária, detector DAD, auto-amostrador (volume de injeção de 20 µL). Os dados das áreas dos picos foram integrados em Software Chromera. Foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> Brownlee (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel para rutina, catequina e epicatequina foi acetonitrila:água pH 3,0 18:82 v/v; para quercetina, utilizou-se acetonitrila:água pH 3,0 45:55 v/v. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e para o ajuste do pH foi utilizado ácido fosfórico. A validação dos métodos seguiu os parâmetros de linearidade e intervalo, limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), exatidão, precisão, especificidade e robustez (ICH, 2005). Os dados foram submetidos à análise estatística não paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade de erro.

O comprimento de onda de máxima absorção foi de 260 nm para quercetina e de 280 nm para rutina, catequina e epicatequina. O tempo de retenção dos compostos foi: rutina: 8,1 min; catequina: 4,0 min; epicatequina: 5,1 min; e quercetina: 3,85 min. A linearidade dos métodos foi adequada, pois as concentrações foram diretamente proporcionais às áreas das SQR nos cromatogramas, com valores de coeficientes de correlação maiores que 0,99, sem desvio de linearidade nas regressões. O exame dos valores (µg.mL<sup>-1</sup>) de LD (catequina: 1,9; epicatequina: 5,2; rutina: 3,4; quercetina: 25,9) e de LQ (catequina: 6,4; epicatequina: 17,2; rutina: 11,2; quercetina: 37,8) demonstrou a alta sensibilidade dos métodos. Os valores de exatidão e de precisão intradia indicaram adequado percentual de recuperação (próximos a 100%) e o desvio padrão relativo esteve dentro do critério de aceitação de até 5% (ICH, 2005). Os métodos propostos foram considerados robustos, frente às alterações de pH (2,9 e 3,1) e fluxo da fase móvel (0,9 e 1,1 mL.min<sup>-1</sup>), e específicos, pela análise da pureza do pico pelo DAD.

Não houve efeito do estágio fenológico na concentração dos compostos fenólicos dos extratos de folhas+caules, evidenciando que esse componente funcional não sofreu alteração de procianidinas, quercetina e rutina com o desenvolvimento das plantas (Quadro 1). No entanto, como não foram analisadas as folhas em separado não se pode descartar que a idade da planta ou, mesmo, a idade das folhas, não interfira na concentração dessas substâncias nesse órgão. Haring *et al.* (2007) verificaram que a idade das folhas do cornichão interferiu no conteúdo de taninos condensados, ao contrário do caule, que não variou.

No extrato de flores+frutos houve aumento de 89% de epicatequina, de 70% no total de proantocianidinas, de 500% de quercetina e de 223% de rutina, em relação ao extrato de folhas+caules/estádio vegetativo (Quadro 1). Berard *et al.* (2011) também obtiveram maiores concentrações de taninos condensados em plantas de cornichão no estágio reprodutivo. Gruber *et al.* (2008) observaram que as procianidinas foram detectadas em flores, mas não em folhas dessa espécie. Portanto, na prospecção farmacológica de compostos fenólicos em cornichão, o uso de flores+frutos possibilitaria a obtenção de extratos com maior riqueza de epicatequina, quercetina e rutina.

Dentre as proantocianidinas, houve maior quantidade de epicatequina, o que culminou em proporção de epicatequina:catequina de 81:19

(folhas+caules/estádio vegetativo), 76:24 (folhas+caules/estádio reprodutivo) e 91:9 (flores+frutos/estádio reprodutivo) (Quadro 1). A epicatequina foi a unidade constitutiva predominante, em especial, no extrato de flores+frutos; a catequina mostrou comportamento inverso, com maior concentração em folhas+caules. Como a proporção de caules, folhas e frutos varia com o estágio fenológico e a concentração desses compostos varia entre os órgãos, amostras coletadas em diferentes etapas de desenvolvimento das plantas podem diferir na concentração de compostos fenólicos do cornichão.

A análise de flavonóides indicou maior concentração da rutina em relação à concentração de quercetina, independente do tipo de extrato (Quadro 1). Em geral, em extrações hidroalcoólicas, flavonóis na forma heterosídica, como é a rutina, são mais facilmente encontrados em relação às agliconas livres, como a quercetina. Porém, quando o extrato é submetido à hidrólise, o padrão altera, pois a rutina pode ser completamente hidrolisada à quercetina (Manach *et al.*, 2004).

A concentração de catequina, epicatequina, rutina e quercetina em cornichão parece estar dependente da fenologia da planta, pois no estágio reprodutivo há maiores quantidades desses compostos fenólicos. Em pesquisas farmacológicas com essa leguminosa, o uso de flores+frutos permitiria a obtenção de extratos com maior riqueza de epicatequina, quercetina e rutina.

**Quadro 1** - Concentração de compostos fenólicos em extratos de *Lotus corniculatus* elaborados com distintos componentes funcionais de plantas colhidas nos estádios vegetativo (EV) e reprodutivo (ER)

Compostos fenólicos	Extratos		
	Folhas+caules/EV	Folhas+caules/ER	Flores+frutos/ER
<b>Procianidinas (PC)</b>			
Catequina (mg.g <sup>-1</sup> )	1,39 ± 0,08 ab	2,11 ± 0,11 a	1,18 ± 0,07 b
Epicatequina (mg.g <sup>-1</sup> )	6,11 ± 0,09 b	6,77 ± 0,40 ab	11,56 ± 0,01 a
Total de PC (mg.g <sup>-1</sup> )	7,50 ± 0,08 b	8,78 ± 0,25 ab	12,74 ± 0,04 a
Epicatequina:catequina	4,40 ± 0,07 ab	3,15 ± 0,25 b	9,79 ± 0,04 a
<b>Flavonoides</b>			
Quercetina (mg.g <sup>-1</sup> )	0,21 ± 0,02 b	0,34 ± 0,01 ab	1,26 ± 0,01 a
Rutina (mg.g <sup>-1</sup> )	0,69 ± 0,02 b	1,03 ± 0,01 ab	2,23 ± 0,07 a

Médias seguidas por mesma letra, na linha, não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berard, N.C.; Wang, Y.; Wittenberg, K.M.; Krause, D.O.; Coulman, B.E.; McAllister, T.A. & Ominski, K.H. (2011) – Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 91, n. 4, p. 669-675. <https://doi.org/10.4141/cjps10153>
- Girardi, F.; Tonial, F.; Chini, S.O.; Sobottka, A.M.; Scheffer-Basso, S.M. & Bertol, C.D. (2014) – Phytochemical profile and antimicrobial properties of *Lotus* spp. (Fabaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 86, n. 3, p. 1295-1302. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130220>
- Gruber, M.; Skadhauge, B.; Yu, M.; Muir, A. & Richards, K. (2008) – Variation in morphology, plant habit, proanthocyanidins, and flavonoids within a *Lotus* germplasm collection. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 88, p. 121-132.
- Haring, D.A.; Suter, D.; Amrhein, N. & Lüscher, A. (2007) – Biomass allocation is an important determinant of the tannin concentration in growing plants. *Annals of Botany*, vol. 99, n. 1, p. 111-120. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl227>
- Hellström, J.K. & Matilla, P.H. (2008) – HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n. 17, p. 7617-7624. <https://doi.org/10.1021/jf801336s>
- ICH (2005) – *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. EMEA, Genova, pp.13.
- Koelzer, J.; Pereira, D.A.; Dalmarco, J.B.; Pizzolatti, M.G. & Fröde, T.S. (2009) – Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*, vol. 117, n. 3, p. 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.044>
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. & Jiménez, L. (2004) – Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, n. 5, p. 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Shepley, E.; Vasseur, E.; Bergeron, R.; Villeneuve, A. & Lachance, S. (2015) – Short Communication: Birdsfoot trefoil as a preventative treatment for gastrointestinal nematodes in pastured dairy heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 95, n. 4, p. 533-537. <https://doi.org/10.4141/cjas-2014-169>
- Sivakumaran, S.; Rumball, W.; Lane, G.A.; Fraser, K.; Foo, L.Y.; Yu, M. & Meagher, L.P. (2006) – Variation of proanthocyanidins in *Lotus* species. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 32, n. 8, p. 1797-1816. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9110-3>