

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**FLAVONÓIDES: IDENTIFICAÇÃO DE FONTES
BRASILEIRAS E INVESTIGAÇÃO DOS FATORES
RESPONSÁVEIS PELAS VARIAÇÕES NA
COMPOSIÇÃO**

Lísia Senger Huber
Farmacêutica Bioquímica

Profa. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

**Campinas – SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

H862f Huber, Lísia Senger
Flavonóides: identificação de fontes brasileiras e investigação dos
fatores responsáveis pelas variações na composição / Lísia Senger
Huber. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Delia B. Rodriguez-Amaya
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Flavonóides. 2. Flavonóis. 3. Flavonas. 4. Hortaliças. 5.
CLAE-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Rodriguez-
Amaya, Delia B. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Flavonoids: identification of brazilian food sources and investigation of factors
responsible for compositional variation

Palavras-chave em inglês (Keywords): Flavonoids, Flavonols, Flavones, Vegetables, HPLC-High
Performance Liquid Chromatography

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Delia B. Rodriguez-Amaya
Cristiane Hess de Azevedo-Meleiro
Helena Teixeira Godoy
Mieko Kimura
Myrna Sabino
Rosemary Hoffmann Ribani

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Dra. Cristiane Hess de Azevedo-Meleiro

Dra. Helena Teixeira Godoy

Dra. Mieko Kimura

Dra. Myrna Sabino

Dra. Rosemary Hoffmann Ribani

“Pros erros há perdão; pros fracassos, chance;
pros amores impossíveis, tempo. De nada adianta
cercar um coração vazio ou economizar alma. O
romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é
romance. Não deixe que a saudade sufoque, que
a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste
mais horas realizando que sonhando, fazendo
que planejando, vivendo que esperando, porque
embora quem quase morre esteja vivo, quem
quase vive, já morreu.”

Luis Fernando Veríssimo

Aos meus amados pais, **Erlon e Rozi**, e
aos meus irmãos **Lucas e Mateus**, por
todo amor, carinho, exemplo, dedicação,
incentivo, alegrias e tão somente alegrias.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, presença constante, pela vida e por todas as possibilidades deste dom. E por sua infinita bondade, colocando em minha vida, pessoas tão especiais.

Aos meus pais, **Erlon e Rozi**, e meu irmãos, **Lucas e Mateus**, meus grandes incentivadores e exemplos, por estarem sempre ao meu lado, me mostrando que tudo é possível. Vocês são minha fortaleza e tornam cada momento único e especial. O meu agradecimento transcende as palavras e alcança todo infinito.

Ao meu **Mô**, amigo e companheiro de todas as horas, sejam elas de alegrias, tristezas, decisão ou luta! Por me mostrar o sentido do amor, a beleza da vida e tornar cada momento inesquecível. Você é mais que especial, você é único!

À Profa. **Delia**, grande exemplo a ser seguido, pela oportunidade em compartilhar de seu conhecimento, confiança, convivência, apoio, e por mostrar-me que sempre é possível melhorar.

Às Professoras **Cristiane Hess de Azevedo-Meleiro, Helena Godoy, Mieko Kimura, Myrna Sabino e Rosemary Ribani**, membros da banca examinadora, pela atenção e sugestões a este trabalho.

À **CAPES** pela bolsa concedida para realização desta pesquisa.

Aos meus **avôs, tios(as) e primos(as)**, que sempre me incentivaram, dando-me forças para que conseguisse suportar as dificuldades e a distância. Todos vocês são muito especiais na minha vida.

À minha **família mineira**, pelo apoio e momentos alegres compartilhados.

À grande amiga e mãezona **Rose**, que me acompanhou desde os primeiros passos deste trabalho até sua conclusão, por seu apoio, amizade, carinho, conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar.

À minha super “amiga-cunhada”, **Darielli**, por seu exemplo de garra e determinação, e principalmente pela linda amizade. Te adoro muito! Mesmo longe, sei que estás sempre torcendo por mim!

À **Cíntia**, minha grande e eterna amiga, por seu exemplo de dedicação, determinação e amizade, e por ser meu ombro amigo em todas as horas. Ah, não poderia esquecer de agradecer às “caronas” principalmente quando precisava comprar praticamente uma horta inteira no supermercado!

Aos grandes amigos **Camila, Elizete, Ju, Sil, Roger, Cd, Cristiano e Fabi**, minha família em Campinas, por serem tão diferentes e tão especiais, que tudo se tornou mais alegre com vocês. Obrigada por tudo!

Às queridas amigas **Gi, Mi, Aline, Natz, Márcia** e ao amigo **Emilson**, meus grandes companheiros de laboratório, que tornaram minha rotina muito mais agradável e cheia de boas risadas!

Aos amigos **Cibola, Mário, Cláudia, Dani, Fabi e Elede**, pela amizade e parceria nos momentos de descontração.

À **Débora**, por estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. **Maria Isabel Rodrigues**, pelo carinho e valiosa contribuição com os delineamentos estatísticos!!!

Ao **Departamento de Ciência de Alimentos** pela oportunidade de realizar o Doutorado na UNICAMP. Agradeço a todos os professores e funcionários.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para que esta etapa fosse cumprida.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	xvi

CAPÍTULO 1: Flavonóides: Efeitos benéficos à saúde, análise e composição, fatores que influenciam a composição em alimentos 1

RESUMO	2
SUMMARY	3
1 – INTRODUÇÃO	4
2 – EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE	7
3 – ASPECTOS ANALÍTICOS	9
4 – COMPOSIÇÃO DE FLAVONÓIDES EM ALIMENTOS E FATORES QUE AFETAM SEUS TEORES	12
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
6 – AGRADECIMENTOS	28

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças 29

RESUMO	30
SUMMARY	31
1 – INTRODUÇÃO	32
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 – Amostras	34
2.2 - Reagentes e padrões	34
2.3 – Equipamento e condições cromatográficas	35
2.4 – Extração e hidrólise dos flavonóides	36
2.5 – Planejamento experimental e Análise de Superfície de Resposta	37
2.6 – Validação da extração e método cromatográfico	39
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 – Condições cromatográficas	40
3.2 – Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas	41
3.3 – Avaliação da metodologia analítica	47
4 – CONCLUSÕES	49
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
6 – AGRADECIMENTOS	53

CAPÍTULO 3: Efeitos sazonais nos teores de flavonóides em hortaliças 54

RESUMO	55
SUMMARY	56
1 – INTRODUÇÃO	56
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	58

2.1 – Amostras	58
2.2 - Reagentes e padrões.....	59
2.3 – Análise dos flavonóides.....	59
2.4 – Avaliação do método.....	61
2.5 – Análise dos Dados	61
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4 – CONCLUSÕES.....	68
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
6 – AGRADECIMENTOS.....	71
CAPÍTULO 4: Flavonóides em alimentos processados	72
RESUMO	73
SUMMARY	74
1 – INTRODUÇÃO.....	75
2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
2.1 – Amostras	76
2.2 - Reagentes e padrões.....	76
2.3 – Extração e hidrólise dos flavonóides.....	77
2.4 – Análise cromatográfica.....	78
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4 – LITERATURA CITADA	85
5 – AGRADECIMENTOS.....	87
CAPÍTULO 5: Comportamento de flavonóis em couve, espinafre e rúcula minimamente processados durante a estocagem	88
RESUMO	89
SUMMARY	90
1 – INTRODUÇÃO.....	91
2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
2.1 – Reagentes e padrões.....	93
2.2 – Processamento mínimo.....	93
2.3 – Armazenamento.....	94
2.4 – Avaliação da qualidade sensorial.....	94
2.5 – Determinação de flavonóis.....	95
2.6 – Análise dos Dados	97
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1 – Comportamento de flavonóis em couve minimamente processada	97
3.2 – Comportamento de flavonóis em espinafre minimamente processado ...	100
3.3 – Comportamento de flavonóis em rúcula minimamente processada	102
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
5 – AGRADECIMENTOS.....	110
CONCLUSÕES GERAIS	111

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2	29
Tabela 1. Fatores e níveis testados (valores codificados estão entre parênteses) para o Delineamento Composto Central Rotacional.....	37
Tabela 2. Condições experimentais do delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonóides analisados nas hortaliças.....	38
Tabela 3. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático e significância (p-valor), para a resposta dos teores de flavonóides agliconas nas hortaliças analisadas.	43
Tabela 4. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (X_1) e tempo de hidrólise (X_2) presentes nas hortaliças estudadas.	44
Tabela 5. Propriedades das curvas analíticas	48
Tabela 6. Teores de flavonóides nas amostras e seus respectivos coeficientes de variação	48
Tabela 7. Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados	49
CAPÍTULO 3	54
Tabela 1. Teores de flavonóides em hortaliças analisadas durante o inverno e verão.....	67
CAPÍTULO 4	72
Tabela 1. Teor de flavonóides em alimentos processados	79

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	1
Figura 1. (A) Estrutura básica dos flavonóides e (B) Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4.....	5
Figura 2. Principais classes dos flavonóides.	6
CAPÍTULO 2	29
Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de alface crespa, couve, espinafre, cebola roxa, rúcula e salsa, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.	41
Figura 2. Superfícies de resposta na determinação das agliconas quercetina, kaempferol e apigenina nas amostras analisadas.	45
Figura 3. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina e K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de espinafre, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) com HCl 0,15M por 6 horas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas e (C) com HCl 1,0 M por 10,23 horas, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.	47
CAPÍTULO 3	54
Figura 1. Cromatograma dos padrões de flavonóides M=miricetina, Q=quercetina, L=luteolina, K=kaempferol e A=apigenina, com correspondentes espectros de absorção, injetados na mesma concentração, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.	62
Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina e K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de alface, couve, espinafre e rúcula, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.	63
Figura 3. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de cebola e salsa, para coluna Nova-Pak	

C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.....	64
CAPÍTULO 4.....	72
Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas M = miricetina, Q = quercetina, K = kaempferol, dos extratos hidrolisados de polpa de caju, polpa de acerola e polpa de pitanga, coluna Symmetry C18, 3,5µm, 2,1x150mm, fase móvel 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, mantido até o final da corrida, sempre em gradiente linear.	81
Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de cebola e salsa desidratadas (coluna Nova-Pak C18, 3,9x150mm, 4µm, fase móvel, iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear).	82
CAPÍTULO 5.....	88
Figura 1. Qualidade sensorial de couve minimamente processada, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) qualidade geral das folhas; (B) descoloração; (C) murchamento; (D) deterioração e (E) odor.....	98
Figura 2. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em couve minimamente processada durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 11°C na ausência e presença de luz.	99
Figura 3. Qualidade sensorial de espinafre minimamente processado, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) qualidade geral das folhas; (B) descoloração; (C) murchamento; (D) deterioração e (E) odor.....	101
Figura 4. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em espinafre minimamente processado durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 9°C na ausência e presença de luz.	102
Figura 5. Qualidade sensorial de rúcula minimamente processada, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) aparência geral do produto; (B) qualidade geral das folhas; (C) murchamento e (D) deterioração.....	103
Figura 6. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em rúcula minimamente processada durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 9°C na ausência e presença de luz.	104

RESUMO GERAL

Devido a crescente importância atribuída aos flavonóides nos últimos anos, decorrente de suas ações relacionadas à prevenção de doenças degenerativas, e aliada à carência de dados destes compostos em alimentos brasileiros, este estudo teve como objetivo determinar os teores de flavonóis e flavonas em alimentos consumidos no Brasil e avaliar alguns fatores que influenciam seus níveis nestes alimentos.

Uma revisão bibliográfica é apresentada no Capítulo 1, na qual são descritos os principais efeitos benéficos à saúde, aspectos analíticos e fatores que influenciam os teores de flavonóides em alimentos. Estes compostos com ação benéfica à saúde, atuam como antioxidantes, inibidores da proliferação celular, antiestrogênicos e mediadores intracelulares, exercendo proteção principalmente contra câncer e doenças cardiovasculares. A determinação desses compostos normalmente é feita utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Os níveis de flavonóides em alimentos podem ser influenciados por vários fatores, como estação do ano, preparo e processamento de alimentos.

O Capítulo 2 descreve o desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em hortaliças. Utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional, obtiveram-se as melhores condições para extração e hidrólise dos flavonóides encontrados na natureza na forma glicosídica, a suas respectivas agliconas. Essas condições foram: 1,0M de HCl por 6 horas para espinafre e couve, 1,6M de HCl por 5 horas para rúcula, 1,2M de HCl por 2 horas para alface, 1,7M de HCl por 4,3 horas para salsa e 0,8M de HCl por 2,5 horas para cebola. As condições cromatográficas utilizadas foram coluna Nova-Pak C18 (4 μ m, 3,9x150mm), e fase móvel constituída de metanol e água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear.

Utilizando a metodologia analítica validada no Capítulo 2, no Capítulo 3 foram identificados e quantificados os flavonóides de alface lisa (6,73-9,77µg/g de quercetina), alface crespa (7,18-30,8µg/g de quercetina), cebola branca (323-362µg/g de quercetina), cebola roxa (390-423µg/g de quercetina), couve (256-399µg/g de quercetina e 333-339µg/g de kaempferol), espinafre (52,8-62,3µg/g de quercetina e 145-170µg/g de kaempferol), rúcula (137-143µg/g de quercetina e 402-501µg/g de kaempferol) e salsa (1521-1636µg/g de apigenina). Também foi avaliado o efeito sazonal nos teores destes compostos, sendo que estes tenderam a ser maiores no verão que no inverno, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

No Capítulo 4, foram determinados os teores de flavonóides em sucos prontos para o consumo, sucos concentrados e polpas de caju, acerola e pitanga, e em amostras de cebola e salsa desidratadas. Os resultados indicaram perdas de flavonóides durante o processamento destes alimentos. Os teores nas amostras processadas foram nitidamente menores aos obtidos previamente nas amostras *in natura*. Os derivados de frutas apresentaram teores decrescentes na seguinte ordem: polpas, suco concentrado, suco pronto para consumo. Os teores de quercetina nas amostras de cebola desidratada foram bastante variados, indicando diferenças de variedades utilizadas como matéria-prima ou nas condições de processamento empregadas. Os resultados sugerem que estudos de monitoramento das perdas de flavonóides, da matéria-prima ao produto final, são altamente requeridos.

O comportamento de flavonóis em couve, espinafre e rúcula minimamente processados, estocados em atmosfera modificada, em diferentes temperaturas, na presença e ausência de luz, foi avaliado e discutido no Capítulo 5. A qualidade sensorial dessas amostras também foi avaliada, para verificar a vida-de-prateleira. No geral, a vida útil foi negativamente influenciada pelo aumento na temperatura de estocagem na presença de luz. Não ocorreram perdas pronunciadas nos teores

destes compostos durante a estocagem das três folhas minimamente processadas, podendo inclusive aumentar em certos períodos do armazenamento.

INTRODUÇÃO GERAL

A conscientização da população em promover a saúde através de uma alimentação saudável vem crescendo nos últimos anos.

O consumo de frutas e hortaliças vem sendo incentivado devido a estudos que apontam uma relação inversa desta ingestão com o risco de doenças degenerativas, principalmente câncer e doenças cardiovasculares. Esta proteção tem sido atribuída a compostos bioativos destes alimentos, dentre eles, os flavonóides.

Dados confiáveis dos teores de flavonóides em alimentos encontram-se atualmente limitados, mesmo a nível mundial, sendo que o Brasil possui pouquíssimos estudos. Estes dados são necessários nas tentativas de incrementar os teores de flavonóides nos alimentos, seja a partir da maior produção de fontes ricas nestes compostos, quanto a partir da otimização do processamento e estocagem de alimentos a fim de se evitar a degradação.

Este trabalho, portanto, teve como objetivos: (a) desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em hortaliças; (b) determinar os teores de flavonóis e flavonas e verificar o efeito sazonal nestes teores em hortaliças de grande consumo no Brasil; (c) quantificar flavonóis e flavonas em produtos processados de fontes ricas nestes compostos; (d) avaliar os efeitos do processamento mínimo e estocagem em atmosfera modificada sob diferentes condições de temperatura e luz, nos teores de flavonóis em couve, espinafre e rúcula.

CAPÍTULO 1

Flavonóides: Efeitos benéficos à saúde, análise e composição, fatores que influenciam a composição em alimentos

LÍSIA SENGER HUBER
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à Revista Alimentos e Nutrição

Flavonóides: Efeitos benéficos à saúde, análise e composição, fatores que influenciam a composição em alimentos

Lísia S. HUBER¹ e Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

RESUMO

Os flavonóides são compostos fenólicos sintetizados pelas plantas e compreendem seis classes principais de compostos: flavonóis, flavonas, flavanóis (catequinas), antocianidinas, flavononas e isoflavonas. Com exceção dos flavanóis, estes compostos são encontrados nos alimentos principalmente na forma glicosilada, isto é, ligados a moléculas de açúcar. As principais fontes na dieta são as frutas, hortaliças, verduras, chás e vinhos. O interesse em pesquisar os flavonóides se deve a estudos que indicam uma ação benéfica à saúde, principalmente na prevenção de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares. O esclarecimento do modo de ação destes compostos tem sido objeto de muitas pesquisas, e acredita-se que atuem como antioxidantes, inibidores da proliferação celular, antiestrogênicos e mediadores na transdução dos sinais intracelulares. A identificação e quantificação dos flavonóides em alimentos são realizadas principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, após extração e hidrólise dos glicosídeos a suas formas agliconas. Os teores nos alimentos são determinados geneticamente, porém, são influenciados também por fatores como estação do ano, clima, composição do solo, estágio de maturação, preparo, processamento e estocagem dos alimentos. Dados confiáveis das concentrações de flavonóides em alimentos frescos e também processados são necessários para entender os mecanismos de degradação e para otimizar as condições de processamento e

estocagem, a fim de manter ou incrementar seus teores nos alimentos, para promoção da saúde.

Palavras-chave: flavonóides, aspectos analíticos, aspectos químicos, efeitos biológicos

SUMMARY

Flavonoids are phenolic compounds synthesized by plants, comprising six principal classes: flavonols, flavones, flavanols (catechins), anthocyanidins, flavonones and isoflavones. With the exception of flavanols, these compounds are found in foods principally in the glycosylated form, i.e., linked to molecules of sugar. The principal sources in the diet are fruits, vegetables, teas and wines. The interest in researching flavonoids is due to studies that indicate a beneficial action on health, especially the prevention of degenerative diseases, such as cancer and cardiovascular diseases. The elucidation of the mode of action of these compounds has been the object of many studies, and it is believed that they act as antioxidants, inhibitors of cell proliferation, antiestrogenics, modulators of the cell signalling. The identification and quantification of flavonoids in foods are carried out principally by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector, after extraction and hydrolysis of the glycosides to the aglycones. The levels in foods are determined genetically, but are also influenced by factors such as season, climate, soil composition, stage of maturity, preparation, processing and storage of foods. Reliable data on the concentrations of flavonoids in fresh as well as processed foods are needed to understand the mechanisms of degradation and to optimize the conditions of processing and storage, in order to maintain or increase their levels in foods, for the promotion of health.

Keywords: flavonoids, analytical methods, health effects, composition

1 – INTRODUÇÃO

Flavonóides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos.

Os flavonóides, principalmente antocianinas e flavonóis, atuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes. Além de proporcionarem uma pigmentação bonita em frutas, flores, sementes e folhas, os flavonóides também têm importantes funções na sinalização entre plantas e micróbios, na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes contra micróbios e na proteção à radiação ultravioleta (Smith e Bank, 1986; Winkel-Shirley, 2001).

Os flavonóides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido shiquímico) e ácido acético. Primeiramente, a fenilalanina é transformada em ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amônio liase, enzima que liga os metabolismos primário (via do ácido shiquímico) e secundário (fenilpropanóides). O ácido cinâmico é hidrolisado a ácido cumárico (C9) que é condensado a 3 unidades de malonil-CoA (C2) formando uma chalcona (C15), a partir da qual todos os flavonóides são formados (Kühnau, 1976).

A estrutura dos flavonóides é baseada no núcleo que consiste de dois anéis fenólicos (A e B) e um anel (C) (*Figura 1*), que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C4 do anel (C), compreendendo as principais classes dos flavonóides (*Figura 2*). Esta revisão dará enfoque aos principais aspectos das classes dos flavonóis e flavonas, compostos mais amplamente envolvidos em estudos de promoção à saúde.

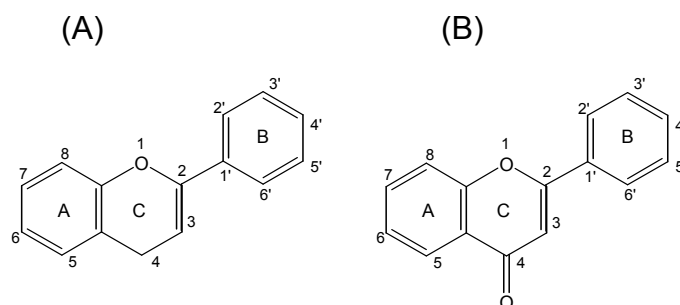


Figura 1. (A) Estrutura básica dos flavonóides e (B) Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4.

A atividade biológica dos flavonóides e de seus metabólitos depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica permite uma série de modificações, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outros mecanismos que irão modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos.

Os flavonóides (exceto as catequinas) são encontrados em plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente o-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7 (DiCarlo, Mascolo, Izzo e Capasso, 1999; Erlund, 2004; Hermann, 1988). Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose, porém, pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide, resultando em um grande número de glicosídeos conhecidos. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas.

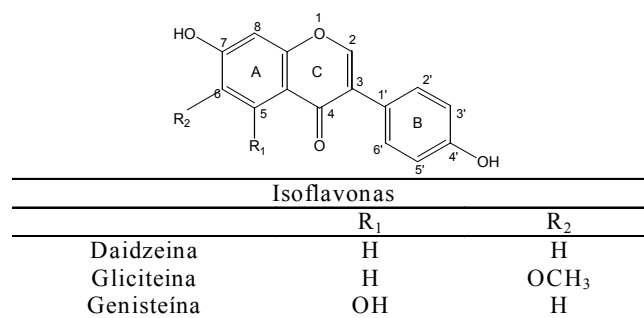
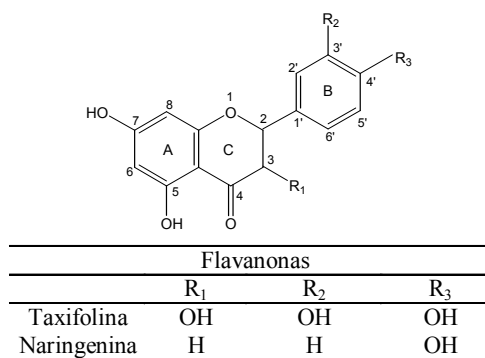
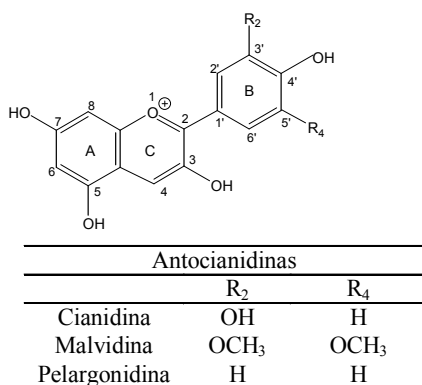
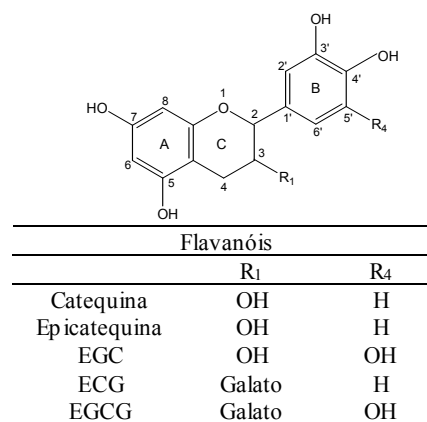
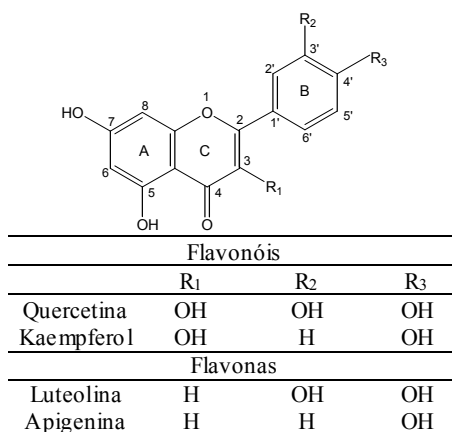


Figura 2. Principais classes dos flavonóides.

2 – EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE

Os flavonóides vêm despertando um grande interesse devido a estudos epidemiológicos que mostram que uma dieta rica nestes compostos está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares (Hertog, Feskens, Hollman, Katan e Kromhout, 1993a; Hertog et al. 1995; Hertog, Feskens e Kromhout, 1997; Knekt, Jarvinen, Reunanen e Maatela, 1996; Yochum, Kushi, Meyer e Folsom, 1999) e algumas formas de câncer (Block, Patterson e Subar, 1992; Franke, Cooney, Custer, Mordan e Tanaka, 1998; Knekt et al. 1997; Neuhouwer, 2004).

Historicamente, os polifenóis eram considerados antinutrientes, devido a alguns efeitos adversos no metabolismo humano, exercidos principalmente pela classe dos taninos. Recentemente, o conhecimento das propriedades antioxidantes destes fenólicos despertou um novo interesse em relação aos possíveis efeitos benéficos à saúde (Bravo, 1998).

Acredita-se que as propriedades relacionadas à saúde humana exercidas pelos compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides, são baseadas principalmente na sua atividade antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais livres (Prior e Cao, 2000; Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996 e 1997) e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (Silva, Piskula, Tamamoto, Moon e Terao, 1998; Terao e Piskula, 1999). Radicais livres produzidos no corpo podem causar danos extensos às macromoléculas (Thomas, 1995), inclusive o DNA (relevante, por exemplo, ao câncer) e lipídeos (relevante, por exemplo, às doenças cardiovasculares). Estes radicais vêm sendo implicados em mais de 100 doenças, embora exista atualmente prova científica do seu envolvimento na patogênese de apenas algumas doenças (Kehrer, 1993; Stohs, 1995; Thomas, 1995).

Os mecanismos precisos pelos quais os flavonóides exercem seus efeitos benéficos à saúde permanecem incertos. No entanto, recentes estudos especulam

a improvável atuação apenas pela sua clássica atividade antioxidante na explicação dos efeitos celulares. Estas evidências baseiam-se, primariamente, em estudos que mostram que os flavonóides são extensamente metabolizados *in vivo*, resultando em significantes alterações no seu potencial redox. Estudos mostram que as formas bioativas dos flavonóides não são aquelas encontradas nas plantas, como por exemplo, os glicosídeos ou agliconas, mas sim metabólitos e formas conjugadas destes compostos, absorvidos no intestino (Day e Williamson, 2003; Donovan e Waterhouse, 2003; Spencer, Schroeter, Rechner e Rice-Evans, 2001; Spencer, Srai e Rice-Evans, 2003; Walle, Walgren, Walle, Galijatovic e Vaidyanathan, 2003). Outro fato, é que as concentrações de flavonóides e seus metabólitos acumulados *in vivo*, por exemplo, no plasma ou em órgãos como o cérebro, são menores que aquelas reportadas para antioxidantes como ácido ascórbico e tocoferol (Halliwell, Zhao e Whiteman, 2000). Desta forma, torna-se improvável que os flavonóides exerçam seus efeitos antioxidantes competindo com outros compostos presentes em concentrações bem maiores. Estas pesquisas sugerem a atuação dos flavonóides como mediadores, através da interação com proteínas específicas, fundamentais na cascata intracelular sinalizante (Schroeter, Boyd, Spencer, Williams, Cadenas e Rice-Evans, 2002), podendo interagir seletivamente dentro da via sinalizante da proteína quinase mitogênio ativada (MAPK), enzima responsável pela transdução do sinal intracelular (Kobuchi, Roy, Sem, Nguyen e Packer, 1999; Kong, Yu, Chen, Mandlekar e Primiano, 2000; Williams, Spencer, Rice-Evans, 2004).

Outros modos de ação também têm sido atribuídos aos flavonóides, como inibição da proliferação celular (Kuntz, Wenzel e Daniel, 1999; Wenzel, Kuntz, Brendel e Daniel, 2000) e efeitos antiestrogênicos (Miksicek, 1995).

3 – ASPECTOS ANALÍTICOS

Métodos espectrofotométricos e métodos utilizando cromatografia em camada delgada eram os utilizados na identificação e quantificação de flavonóides. No entanto, o interesse em pesquisar os efeitos biológicos destes compostos, tornou imprescindível que dados confiáveis do conteúdo destes em alimentos fossem adquiridos. Assim, nos últimos 20 anos, iniciou-se o emprego de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Amiot, Tacchini, Aubert e Oleszek, 1995; Bilik, Cooper e Sapers, 1984; Crozier, Lean, McDonald e Black, 1997; Ewald, Fjelkner-Modig, Johansson, Sjöholm e Akesson, 1999; Franke, Custer, Arakaki e Murphy, 2004; Häkkinen, Kärenlampi, Heinonen, Mykkänen e Törrönen, 1998; Hertog, Hollman e Katan, 1992a; Hertog, Hollman e Venema, 1992b; Hertog, Hollman e van de Putte, 1993b; Justesen, Knuthsen e Let, 1998; Merken e Beecher, 2000a; Merken e Beecher, 2000b; Nuutila, Kammiovirta e Oksman-Caldentey, 2002; Price, Bacon e Rhodes, 1997). Os métodos por CLAE utilizam quase exclusivamente colunas de fase reversa.

Os fenóis absorvem na região ultravioleta (UV). Duas bandas de absorção são características dos flavonóides. A banda II, com máximo de absorção em 240-285nm, acredita-se ser resultante do anel A. Já a banda I, com máximo de absorção em 300-550nm, presume-se resultar do anel B (Robards e Antolovich, 1997). Flavonas, flavonóis e flavonóis glicosilados são usualmente detectados em comprimento de onda de 270nm (Brolis, Gabetta, Fuzzati, Pace, Panzeri e Peterlongo, 1998), 365nm (Crozier et al., 1997) e 370nm (Ewald et al., 1999), embora detecções em 280 e 350nm têm sido usadas (Cooman, Everaert e Keukeleire, 1998). O detector de arranjo de diodos é o mais utilizado nas publicações acerca de flavonóides em que se usa CLAE como técnica analítica.

Os sistemas de eluição são compostos por um solvente aquoso acidificado, como ácido acético, ácido perclórico, fosfórico ou fórmico e um segundo solvente

menos polar, como metanol ou acetonitrila, que também pode ser acidificado (Merken e Beecher, 2000a).

A extração dos flavonóides presentes nos alimentos é normalmente realizada simultaneamente com a hidrólise das formas glicosídicas a agliconas. A hidrólise preliminar das amostras tem sido usada com a finalidade de minimizar interferentes na cromatografia e simplificar os dados cromatográficos, uma vez que existe uma diversidade grande de glicosídeos para cada flavonóide, sendo que para muitos destes não são disponíveis padrões comercialmente. Os glicosídeos de um mesmo flavonóide variam nos comprimentos de onda de absorção máxima (Swain, 1976), podendo ainda apresentar diferentes absorvidades, não sendo adequado o uso de agliconas ou apenas um tipo de glicosídeo para quantificar todos os glicosídeos presentes em uma amostra.

Na etapa de extração e hidrólise, utiliza-se, na maioria dos casos, ácido clorídrico em metanol aquoso (Crozier et al. 1997, Hertog et al. 1992a e 1992b, McDonald, Hughes, Burns, Lean, Matthews e Crozier, 1998) em condições de refluxo.

O procedimento utilizado na maioria das pesquisas é o estabelecido por Hertog et al. (1992b), que emprega refluxo das amostras por 2 horas a 90°C com HCl 1,2M em solução aquosa de metanol 50%.

Häkkinen et al. (1998), utilizando uma mistura de padrões de flavonóis e ácidos fenólicos, comparou o procedimento estabelecido por Hertog et al. (1992b) com outras duas condições de hidrólise, utilizando 0,6M de HCl em metanol 50%, com tempo de 16h a 21°C ou 35°C sob atmosfera de nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com 1,2M de HCl a 90°C e 0,6M de HCl a 35°C. Esses dois procedimentos foram comparados para amostras de “blackcurrant” e morango, sendo que a melhor condição para quercetina e miricetina em “blackcurrant” foi a 90°C, porém, kaempferol não foi detectado após esta hidrólise.

Nas amostras de morango, este procedimento também foi mais eficiente para quercetina, porém miricetina e kaempferol não foram detectados. O método de escolha foi hidrólise a 35°C por 16 horas usando 1,2M de HCl. Ácido ascórbico e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) foram testados sendo que o primeiro foi escolhido, já que TBHQ interferiu na identificação da quercetina.

Mais recentemente, Nuutila et al. (2002) compararam os métodos de Hertog et al. (1992b) e Häkkinen et al. (1998), utilizando uma mistura de padrões (ácidos fenólicos, flavonóis, flavonas e catequinas) e também padrões separados. Os melhores resultados, para a maioria dos compostos, foram obtidos utilizando-se refluxo a 90°C por 2 horas (Hertog et al. 1992b) sem adição de antioxidante. Porém, na ausência de antioxidante, a miricetina era extensivamente degradada. Ácido ascórbico e TBHQ foram comparados, obtendo-se os mesmos resultados de Häkkinen et al. (1998). Foi estabelecida a quantidade ideal de antioxidante, 2mg para 5mL de solução, em amostras de cebola e espinafre.

Ribani (2006), utilizando Delineamento Estatístico de Composição Central e Análise por Superfície de Resposta, demonstrou que as condições ótimas de hidrólise, isto é, hidrólise completa sem degradação, variam de acordo com a matriz alimentícia.

Estas variações demonstram a importância da otimização e validação de métodos analíticos para cada alimento analisado, devido às variações na natureza da matriz e na composição e glicosilação dos flavonóides.

4 – COMPOSIÇÃO DE FLAVONÓIDES EM ALIMENTOS E FATORES QUE AFETAM SEUS TEORES

Dados sobre a composição de flavonóides em alimentos são ainda insuficientes mesmo a nível mundial. Esta carência é ainda mais acentuada no Brasil, onde praticamente não temos estudos sobre estes compostos importantes.

Os flavonóides são encontrados em frutas, verduras, hortaliças, sementes, flores, e seus produtos derivados, sendo importantes constituintes da dieta humana (Middleton e Kandaswami, 1994). As fontes alimentares são avaliadas principalmente em relação a três flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) e duas flavonas (apigenina e luteolina) (Crozier et al. 1997; Hertog et al. 1992a e 1992b, 1993a, 1993b; Vries, Janssen, Hollman, Van Staveren e Katan, 1997), sendo estes os mais amplamente distribuídos nos alimentos e portanto, os mais investigados em estudos sobre compostos anticarcinogênicos.

Os perfis de flavonóides em cada espécie vegetal são determinados por um sistema intrínseco de enzimas controladas geneticamente que regulam a síntese e distribuição nas plantas (Kühnau, 1976). Em adição aos fatores intrínsecos, o conteúdo de flavonóides é fortemente influenciado por fatores extrínsecos, como estação do ano, incidência de radiação UV, clima, composição do solo, preparo e processamento do alimento (Ewald et al., 1999; Hertog et al., 1992a; McDonald et al. 1998, Trichopoulou et al., 2000).

Crozier et al. (1997) analisaram os flavonóides presentes em tomate, cebola, alface e aipo. Quercetina foi encontrada em todas as amostras, com exceção de aipo, que apresentou as flavonas apigenina (nd-191µg/g) e luteolina (nd-40µg/g). Os maiores teores de quercetina foram detectados em cebola branca (185-634µg/g), cebola roxa (201µg/g) e alface “Lollo Rosso” var. Malibu, com teores de 911µg/g nas folhas externas e 450µg/g nas internas. Tomates apresentaram teores entre 2-203µg/g, dependendo da variedade.

Franke et al. (2004) avaliaram 50 amostras, entre diferentes variedades de frutas, hortaliças, verduras e alguns derivados destas, consumidas no Hawaii, e verificaram que as concentrações de quercetina nestes alimentos foram bastante variadas, sendo o flavonol mais encontrado. Os maiores teores foram relatados em cebola (238µg/g). Luteolina foi encontrada em maiores concentrações em uvas (31µg/g). Kaempferol foi constatado em maiores níveis em espinafre (90µg/g) e miricetina em cebola roxa (59µg/g). Os teores de apigenina foram menores que o limite de quantificação em todas as amostras.

Um total de 28 verduras e hortaliças e 9 frutas foram avaliadas, quanto aos teores de flavonóides, por Hertog et al. (1992a). Os maiores teores de quercetina foram encontrados em cebola (284-486µg/g) e couve (110µg/g). Os maiores teores de kaempferol foram constatados em espinafre (211µg/g). As maiores concentrações de quercetina, dentre as frutas analisadas, foram encontradas em maçãs, que apresentaram 21-72µg/g deste flavonol, dependendo da variedade. Miricetina foi detectada apenas em “broad beans” (26µg/g) e apigenina não foi encontrada nas amostras analisadas.

Ribani (2006) analisou diferentes cultivares de 9 frutas, totalizando 20 amostras alimentícias normalmente consumidas no Brasil, sendo que em todas foi encontrada quercetina, com exceção de manga e mamão. A maior concentração foi constatada em maçã (cultivar Fuji) (75µg/g). Acerola apresentou os maiores teores de kaempferol (8,7-12µg/g). Pitanga apresentou as maiores concentrações de miricetina (31-37µg/g). Apigenina e luteolina não foram detectadas nas frutas analisadas.

A ingestão das flavonas apigenina e luteolina na dieta é normalmente menor que a de flavonóis, pois ocorrem em concentrações significativas em poucos alimentos, principalmente em temperos. As fontes mais importantes são pimenta vermelha (Hertog et al., 1992a) e aipo (Hertog et al., 1992b).

Bilik et al. (1984) constataram diferenças no conteúdo de quercetina e kaempferol entre diversas variedades de cebola, variando de nd-62mg/Kg de quercetina e nd-7mg/Kg de kaempferol. Amiot et al. (1995) estudaram peras e notaram que a composição de fenólicos foi mais fortemente influenciada pelo tipo de cultivar do que pelo estágio de maturação.

Flavonóides geralmente absorvem comprimentos de onda na região de 280-315nm, sendo capazes de agir como filtros de radiação UV nas plantas, exercendo proteção contra danos aos tecidos fotossintéticos. Desde os primeiros experimentos fisiológicos, já existiam algumas evidências de que os flavonóides estavam envolvidos na proteção UV. No entanto, apenas nas últimas décadas, uma série de experimentos em diferentes laboratórios no mundo inteiro (Buchholz, Ehmann e Wellmann, 1995; Cuadra e Harborne, 1996; Cuadra, Harborne e Waterman, 1997; Gitz, Liu e McClure, 1998; Markham, Ryan, Bloor e Mitchell, 1998a; Markham, Tanner, Caasi-Lit, Whitecross, Nayudu e Mitchell, 1998b; Olsson, Veit, Weissenböck e Bornman, 1998; Ormrod, Landry e Conklin, 1995; Reuber, Bornman e Weissenböck, 1996; Schnitzler et al. 1996, Stapleton e Walbot, 1994) forneceram evidências convincentes de que plantas artificialmente sujeitas à radiação UV respondem por mudanças na síntese de flavonóides (Harborne e Williams, 2000).

Variações sazonais nos teores de flavonóides em vegetais consumidos na Holanda foram estudadas por Hertog et al. (1992a), sendo que o conteúdo destes compostos foi três a cinco vezes maior no verão que em outras estações do ano em alface (30 vs 1,9µg/g de quercetina), chicória (95 vs 15µg/g de kaempferol) e alho-poró (56 vs 11µg/g de kaempferol). Variações sazonais nos teores de quercetina também foram observadas em tomates produzidos na Inglaterra (Crozier et al. 1997). Nestes trabalhos, porém, não foram apresentadas as variações de temperatura durante as estações analisadas.

Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) quantificaram os flavonóides presentes em alface, pimentão, cebola branca, cebola roxa, chicória e rúcula, vegetais comumente consumidos no Brasil. O conteúdo total de flavonóides, em vegetais de diferentes épocas de colheita, apresentou grande variação, como em chicória (38,1 vs 17,9mg/100g), rúcula (118,1 vs 40,7mg/100g) e alface lisa (4,2 vs 2,3mg/100g), os quais apresentaram níveis bem maiores de flavonóides durante o segundo semestre de 2001 quando comparados ao primeiro semestre de 2002. Essa variação, no entanto, foi baixa em cebola branca (55,6 vs 48,2mg/100g). Em alface crespa (20,8 vs 18,6mg/100g) e alface roxa (67,1 vs 67mg/100g), os maiores teores foram encontrados no primeiro semestre de 2002, embora a diferença também tenha sido pequena. Por outro lado, os teores de flavonóides em cebola roxa foram bem maiores durante o primeiro semestre de 2002 em relação ao segundo semestre de 2001 (99,7 vs 39,9mg/100g). Os níveis de flavonóides em pimentões não apresentaram uma tendência clara quanto à variação sazonal. Esses autores também não apresentaram as variações de temperatura durante os períodos estudados.

Gliszczynska-Swiglo, Kaluzewicz, Lemanska, Knaflewski e Tyrakowska (2007) verificaram o efeito da radiação solar nos teores de flavonóides em inflorescências de brócolis e concluíram que os níveis destes compostos são positivamente correlacionados com a radiação desde o plantio até a colheita.

O efeito do processamento em flavonóides ainda é pouco estudado. Ewald et al. (1999) demonstraram que as maiores perdas de flavonóides aconteceram durante o pré-processamento, descascamento, corte e branqueamento de cebolas, provavelmente devido a perda das camadas mais externas das cebolas, mais ricas nestes compostos. Também verificaram que o cozimento e fritura de cebolas previamente branqueadas não afetou o conteúdo de flavonóides. Outros estudos reportaram o efeito do cozimento na composição e conteúdo de flavonóis glicosídeos em cebola (Price et al., 1997), brócolis (Price, Casuscelli, Colquhoun e Rhodes, 1998) e vagem (Ewald et al., 1999), sendo que os flavonóis foram

estáveis durante o cozimento e processo de enlatamento, mas houve perdas dos glicosídeos dos tecidos para a água de cozimento, sendo que uma maior taxa de quercetina glicosídica foi perdida em relação ao kaempferol glicosídico. Por outro lado, Price et al. (1998) verificaram que durante o processo de cozimento de brócolis, apenas 14-28% dos glicosídeos de flavonóides presentes na amostra crua foram retidos no tecido cozido. Em cebola, Price et al. (1997) relataram que as perdas de quercetina glicosídicas variaram de 20-25%.

O processamento mínimo de frutas e hortaliças está em franco crescimento. Esta tendência é estimulada pela demanda crescente por produtos frescos, de alta qualidade, valor nutritivo e conveniência para o preparo. O processamento mínimo geralmente envolve a pré-seleção e lavagem, remoção de partes não comestíveis e injuriadas, corte, aplicação de um agente anti-microbiano, lavagem, centrifugação e embalagem. Como este processamento não envolve condições drásticas, como o uso de alta temperatura, espera-se que os produtos minimamente processados mantenham seu frescor e valor nutricional. No entanto, a retirada da casca e o corte tornam as frutas e hortaliças mais perecíveis que os produtos intactos, pois permitem a interação de enzimas e substratos e o aumento da exposição ao oxigênio, acelerando reações danosas como a oxidação enzimática, no caso dos carotenóides, que já foram estudados em folhas (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2005a e 2005b; Howard e Dewi, 1996; Howard e Hernandez-Brenes, 1998).

Dentre os estudos disponíveis sobre alimentos minimamente processados, podemos citar a avaliação das flavonas apigenina e luteolina em aipo até 24 horas após o processamento. Foi observado um aumento nos teores destes compostos nas primeiras horas, sendo que os teores após 24 horas de estocagem foram iguais ou ligeiramente maiores que os iniciais (Viña e Chaves, 2007).

Os glicosídeos de quercetina em alface minimamente processada e estocada a 5°C, foram estáveis durante 14 dias, sendo que estes níveis, em alface

roxa, aumentaram em sete dias e diminuíram ao final de 14 dias (Ferrerres, Gil, Castañer e Tomás-Barberán, 1997).

DuPont, Mondin, Williamson e Price (2000) avaliaram 11 variedades de alface e chicória e verificaram um decréscimo no conteúdo de glicosídeos durante a estocagem a 1°C por sete dias em nove variedades, sendo que uma variedade não foi afetada significativamente e outra mostrou aumento nos teores.

Há necessidade de mais estudos sobre os fatores que podem alterar os teores de compostos bioativos, como os flavonóides, no intuito de incrementar suas concentrações em alimentos frescos, bem como para que os processos de produção e estocagem sejam otimizados, evitando perdas desses compostos importantes na promoção da saúde.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S. Y.; Oleszek, W. (1995) Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1132-1137.

Arabbi, P. R.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. (2004) Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1124-1131.

Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. (2005a) Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), 845-855.

Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. (2005b) Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 591-597.

Bilik, A.; Cooper, P. L.; Sapers, G. M. (1984) Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 274-276.

Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1-29.

Bravo, I. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Review*, 56, 317-333.

Brolis, M.; Gabetta, B.; Fuzzati, N.; Pace, R.; Panzeri, F.; Peterlongo, F. (1998) Identification by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825, 9-16.

Buchholz, G.; Ehmann, B.; Wellmann, E. (1995) UV light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons. *Plant Physiology*, 108, 227-234.

Cooman, L. de; Everaert, E.; de Keukeleire, D. (1998) Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochemical Analysis*, 9, 145-150.

Crozier, A.; Lean, M. E. J.; McDonald, M. S.; Black, C. (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590-595.

Cuadra, P.; Harborne, J. B. (1996) Changes in epicuticular flavonoids and photosynthetic pigments as a plant response to UV-B radiation. *Zeitschrift für Naturforschung*, 51c, 671-680.

Cuadra, P.; Harborne, J. B.; Waterman, P. G. (1997) Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteoalbum* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 45, 1377-1383.

Day, A. J.; Williamson, G. (2003) Absorption of quercetin glycosides. In: Rice-Evans, C.; Packer, L., eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 31-412.

DiCarlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4), 337-353.

Donovan, J. L.; Waterhouse, A. L. (2003) Bioavailability of flavanol monomers. In: Rice-Evans, C.; Packer, L., eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 413-440.

DuPont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K. R. (2000) Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3957-3964.

Erlund, I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.

Ewald, C.; Fjellkner-Modig, S.; Johansson, K.; Sjöholm, I.; Akesson, B. (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.

Ferreres, F.; Gil, M. I.; Castañer, M.; Tomás-Barberán, F. A. (1997) Phenolic metabolites in red pigmented lettuce. Changes with minimal processing and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4249-4254.

Franke, A. A.; Cooney, R. V.; Custer, L. J.; Mordan, L. J.; Tanaka, Y. (1998) Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Manthey, J. A.; Buslig, B. S., eds. *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum.

Franke, A. A.; Custer, L. J.; Arakaki, C.; Murphy, S. P. (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food and Composition Analysis*, 17(1), 1-35.

Gitz, D. C.; Liu, L.; McClure, J. W. (1998) Phenolic metabolism, growth and UV-B tolerance in phenylalanine ammonia lyase inhibited red cabbage seedlings. *Phytochemistry*, 49, 377-386.

Gliszczynska-Swiglo, A.; Kaluzewicz, A.; Lemanska, K.; Knaflewski, M.; Tyrakowska, B. (2007) The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence, *Food Chemistry*, 100, 241-245.

Häkkinen, S.; Kärenlampi, S.; Heinonen, M.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, A. R. (1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77, 543-551.

Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M. (2000) The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant activity? *Free Radical Research*, 33, 819-830.

Harborne, J. B.; Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Hermann, K. (1988) On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 186,1-5.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. (1993a) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Kromhout, D. (1997) Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 349, 699-699.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. (1992a) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.

Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; van de Putte, B. (1993b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1242-1246.

Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Venema, D. P. (1992b) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598.

Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.

Howard, L. R.; Dewi, T. (1996) Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of mini-peeled carrots. *Journal of Food Science*, 61, 643-645, 651.

Howard, L. R.; Hernandez-Brenes, C. (1998) Antioxidant content and market quality of jalapeno pepper rings as affected by minimal processing and modified atmosphere packaging. *Journal of Food Quality*, 21, 317-327.

Justesen, U.; Knuthsen, P.; Let, T. (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.

Kehrer, J. P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Review of Toxicology*, 23, 21-48.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research ed.)*, 312, 478-481.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliovaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, 146, 223-230.

Kobuchi, H.; Roy, S.; Sem, C. K.; Nguyen, H. G.; Packer, L. (1999) Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *American Journal of Physiology*, 277, 403-411.

Kong, N. A.; Yu, R.; Chen, C.; Mandlekar, S.; Primiano, T. (2000) Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathway in homeostatic response and induction of apoptosis. *Archives of Pharmacal Research*, 23, 1-16.

Kühnau, J. (1976) The flavonoids, a class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117-191.

Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38, 133-142.

Markham, K. R.; Ryan, K. G.; Bloor, S. J.; Mitchell, K. A. (1998a) An increase in the luteolin-apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48, 791-794.

Markham, K. R.; Tanner, G. J.; Caasi-Lit, M.; Whitecross, M. F.; Nayudu, M.; Mitchell, K. A. (1998b) Protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by UV-B in a tolerant rice cultivar. *Phytochemistry*, 49, 1913-1919.

McDonald, M.; Hughes, M.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Matthews, D.; Crozier, A. (1998) Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 368-375.

Merken, H. M.; Beecher, G. R. (2000a) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.

Merken, H. M.; Beecher, G. R. (2000b) Liquid chromatography method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897, 177-184.

Middleton, Jr. E.; Kandaswami, C. (1994) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J. B. *The flavonoids*. ed. London: Chapman and Hall.

Miksicek, R. J. (1995) Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 44-50.

Neuhouser, M. L. (2004) Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50, 1-7.

Nuutila, A. M.; Kammiovirta, K.; Oksman-Caldentey, K. M. (2002) Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519-525.

Olsson, L. C.; Veit, M.; Weissenböck, G.; Bornman, J. F. (1998) Flavonoid response to UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*, 49, 1021-1028.

Ormrod, D. P.; Landry, L. G.; Conklin, P. L. (1995) Short term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation of flavonoid-deficient *Arabidopsis mutants*. *Physiologia Plantarum*, 93, 602-610.

Price, K. R.; Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. C. (1997) Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 938-942.

Price, K. R.; Casascelli, F.; Colquhoun, I. J.; Rhodes, M. J. C. (1998) Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77, 468-472.

Prior, R. L.; Cao, G. (2000) Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. *Horticulture Science*, 35, 588-592.

Reuber, S.; Bornman, J. F.; Weissenböck, G. (1996) A flavonoid mutant of barley exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in primary leaves. *Plant Cell Environment*, 19, 593-599.

Ribani, R. H. (2006) Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science Reviews*, 2(4), 152-159.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Robards, K.; Antolovich, M. (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*, 122, 11R-34R.

Schnitzler, J. P.; Jungblut, T. P.; Feicht, C.; Koferlein, M.; Langobartek, C.; Heller, W.; Sandermann, H. (1996) UV-B screening pigments and chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist*, 132, 247-258.

Schroeter, H.; Boyd, C.; Spencer, J. P. E.; Williams, R. J.; Cadenas, E.; Rice-Evans, C. (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology Aging*, 23, 861-880.

Silva, L. da; Piskula, M. K.; Tamamoto, N.; Moon, J. H.; Terao, J. (1998) Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Letters*, 430, 405-408.

Smith, D. A.; Bank, S. W. (1986) In: Middleton, E.; Harborne, J. B., eds. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationship*. New York: Alan R. Liss Inc.

Spencer, J. P. E.; Schroeter, H.; Rechner, A. R.; Rice-Evans, C. (2001) Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidant Redox Signaling*, 3, 1023-1039.

Spencer, J. P. E.; Srai, S. K.; Rice-Evans, C. (2003) Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In: Rice-Evans, C.; Packer, L., eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 363-390.

Stapleton, A. E.; Walbot, V. (1994) Flavonoids can protect maize DNA from the induction of UV radiation damage. *Plant Physiology*, 105, 881-889.

Stohs, S. J. (1995) The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology*, 6, 205-228.

Swain, T. Flavonoids. (1976) In: Goodwin, T. W. , ed. *Chemistry and biochemistry of plants pigments*. Academic Press, 2a. ed. Vol. 2. p. 176-177.

Terao, J.; Piskula, M. K. (1999) Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. *Nutrition*, 15, 790-791.

Thomas, M. J. (1995) The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 35, 21-39.

Trichopoulou, A.; Vasilpoulou, E.; Hollman, P.; Chamalides, C.; Foufa, E.; Kaloudis, D.; Kromhout, D.; Miskaki, P.; Petrochilou, I.; Poulima, E.; Stafilakis, K.;

Theophilou, D. (2000) Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green peas: A potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 70, 319-323.

Viña, S. Z.; Chaves, A. R. (2007) Respiratory activity and phenolic compounds in pre-cut celery. *Food Chemistry*, 100, 1654-1660.

Vries, J. de; Janssen, K.; Hollman, P. C. H.; Van Staveren, W. A.; Katan, M. B. (1997) Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Letters*, 114, 141-144.

Walle, T.; Walgren, R. A.; Walle, U. K.; Galijatovic, A.; Vaidyanathan, J. B. (2003) Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. In: Rice-Evans, C.; Packer, L., eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 349-362.

Wenzel, U.; Kuntz, S.; Brendel, M. D.; Daniel, H. (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60, 3823-3831.

Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? In: Rice-Evans, C. editor. Serial Review: Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (7), 838-849.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485-493.

Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K.; Folsom, A. R. (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149, 943-949.

6 – AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora, à FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos PRONEX nº 2003/10151-4 e Projeto Universal nº 477189/2004-0, respectivamente.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Flavonóis e Flavonas por CLAE em Hortaliças

LÍSIA SENGER HUBER
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA
MARIA ISABEL RODRIGUES

Artigo a ser submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Flavonóis e Flavonas por CLAE em Hortaliças

Lísia S. HUBER¹, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA¹, Maria I. RODRIGUES²

¹Departamento de Ciência de Alimentos, ² Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862 Campinas, SP.

RESUMO

Flavonóis e flavonas são compostos pertencentes à classe dos flavonóides, um dos grupos de substâncias bioativas consideradas responsáveis pela diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares. A importância de conhecer os teores destes compostos em alimentos é reconhecida mundialmente, no entanto no Brasil, os dados ainda são limitados. A determinação de flavonóides na forma glicosídica, como são encontrados na maioria dos vegetais, é difícil devido ao grande número de glicosídeos diferentes existentes para cada flavonóide e a dificuldade de aquisição de padrões. A hidrólise dos glicosídeos para liberar as agliconas oferece um método mais prático. Porém, as condições devem ser otimizadas de tal forma que a hidrólise seja completa, sem provocar degradação. O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em hortaliças. A hidrólise foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), investigando os efeitos da concentração de ácido clorídrico (HCl) e do tempo de hidrólise. Esta etapa foi realizada simultaneamente com a extração por metanol aquoso 50%, em refluxo a 90°C. Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Waters (modelo 2690), com injetor manual Rheodyne, coluna Nova-Pak C18 (4µm, 3,9x150mm) e detector de arranjo de diodos (Waters 996), controlados por software Millenium 32. Os compostos estudados foram os flavonóis miricetina (M), quercetina (Q) e kaempferol (K) e as flavonas luteolina (L) e apigenina (A). As condições ótimas encontradas para extração/hidrólise para cada hortaliça foram: 1,0M de HCl por 6 horas para espinafre e couve, 1,6M de HCl por 5 horas para rúcula, 1,2M de HCl

por 2 horas para alface, 1,7M de HCl por 4,3 horas para salsa e 0,8M de HCl por 2,5 horas para cebola. O melhor gradiente (CLAE) para separação os flavonóides destas hortaliças constituiu-se de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e voltando a 20:80 em 20 minutos. As curvas analíticas para os flavonóides estudados apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Os limites de detecção obtidos através da relação sinal-ruído, foram 0,5, 0,4, 0,5, 0,6 e 1,0 µg/mL para M, Q, L, K e A, respectivamente.

Palavras-chave: flavonóides, análise por CLAE, hortaliças

SUMMARY

Flavonols and flavones are compounds belonging to the class of flavonoids, a group of bioactive substances considered responsible for the reduction of the risk of degenerative diseases such as cancer and cardiovascular diseases. The importance of knowing the levels of these compounds in food is recognized worldwide, but in Brazil, the data are still limited. The determination of flavonóides in the glycosidic form, as they are found in the majority of plant foods, is difficult because of the existence of a big number of different glycosides per each flavonoid and the difficulty in obtaining standards. Hydrolysis of the glycosides to liberate the aglycone offers a more practical method, but degradation can occur. The objective of this work was to optimize the analytical methodology for the determination of flavonols and flavones in vegetables. Hydrolysis was optimized using a Central Composite Rotational Design (CCRD), investigating the effects of HCl concentration and time of hydrolysis. This step was carried out simultaneously with extraction with 50% aqueous methanol, refluxing at 90°C. A Waters (model 2690) liquid chromatograph was used, equipped with a Rheodyne injector, Nova-Pak C18 column (4µm, 3.9x150mm), photodiode array detector, controlled by software Millennium 32. The compounds studied were the flavonols myricetin, quercetin and

Kaempferol and the flavones luteolin and apigenin. The optimum conditions found for hydrolysis for each vegetable were: 1.0M HCl for 6 hours for spinach and kale, 1.6M HCl for 5 hours for rocket, 1.2M HCl for 2 hours for lettuce, 1.7M HCl for 4.3 hours for parsley, and 0.8M HCl for 2.5 hours for onion. The best gradient (HPLC) for the separation of the flavonoids of these vegetables consisted of methanol:water (acidified with 0.03% formic acid) 20:80, changing to 45:55 in 5 minutes, 48:52 in 17 minutes, returning to 20:80 in 20 minutes. The analytical curves of the flavonoids studied had coefficients of correlation greater than 0.99. The detection limits, obtained by the signal-to-noise ratio, were 0.5, 0.4, 0.5, 0.6 and 1.0 µg/mL for M, Q, L, K and A, respectively.

Keywords: flavonoids, HPLC analysis, vegetables

1 – INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal. Divididos em grandes grupos, como as antocianinas, isoflavonas, flavonas, flavanóis, flavonóis e flavanonas, estes compostos vêm despertando um crescente interesse devido aos estudos que mostram uma relação inversa entre o seu consumo e o risco de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares^{1, 2, 4, 7-9, 11, 15-19, 25, 26, 28, 31, 32}. Esta possível proteção pelos flavonóides é atribuída à sua ação como antioxidantes, devido a suas propriedades como sequestradores de oxigênio singlete, quelantes de metais, agentes redutores ou doadores de hidrogênio, sendo potentes sequestradores de radicais livres^{4, 28, 29}, além de atuarem como inibidores da proliferação celular^{20, 34}, e como antiestrogênicos^{21, 24}.

As fontes alimentares de flavonóides são avaliadas principalmente em relação a três flavonóis, quercetina, miricetina e kaempferol, e duas flavonas, apigenina e luteolina^{6, 12-14, 22, 33}. Estes são também os flavonóides mais investigados em estudos sobre compostos anticarcinogênicos.

Os métodos analíticos quantitativos empregados para flavonóides são diversificados, embora utilize-se maciçamente a cromatografia, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eletroforese capilar é uma técnica bastante promissora, mas os relatos ainda são modestos em comparação à CLAE.

Os métodos por CLAE para flavonóides envolvem, na maioria das análises, colunas de fase reversa e detector de arranjo diodos²³.

Em plantas, com exceção das catequinas, os flavonóides ocorrem na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcar. A determinação quantitativa de flavonóides na forma glicosídica é difícil devido ao grande número de glicosídeos diferentes existentes para cada flavonóide e a dificuldade de adquirir padrões. A hidrólise das diversas formas de glicosídeos para liberar as agliconas oferece um método mais prático, porém, pode provocar a degradação dos flavonóides. Glicosídeos são hidrolisados usando-se normalmente HCl em metanol aquoso^{6, 12, 14}. A hidrólise dos glicosídeos requer concentrações relativamente altas de ácidos minerais (1-2M), em condições de refluxo, numa mistura de metanol e água (50:50, V/V)¹⁴. É necessário, portanto, a otimização das condições de hidrólise para garantir a extração e hidrólise eficiente dos glicosídeos, ao mesmo tempo evitando a degradação.

No geral, a otimização de processos pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos. Os tradicionais processos que otimizam um fator de cada vez demandam maior tempo, e podem ignorar as interações entre os vários fatores, sendo que o resultado da otimização pode não explicar o real modelo de interações. No entanto, as atuais respostas aos processos, resultam da influência das interações entre as variáveis. Os processos estatísticos de otimização permitem que sejam levadas em consideração estas interações¹⁰. A Análise por Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.³, é um dos

métodos que permite a avaliação dos efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta.

O objetivo deste estudo foi estabelecer as melhores condições cromatográficas para separação de flavonóis e flavonas de hortaliças e otimizar, através de delineamento estatístico, as melhores condições para extração/hidrólise destes compostos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

As amostras de hortaliças foram adquiridas em três supermercados da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. Foram coletados 3 maços (hortaliças folhosas) ou pelo menos 1kg (cebola) de cada amostra em cada supermercado, para cada lote, totalizando 9 maços para as hortaliças folhosas e 3Kg para cebola. Foram determinadas as condições ótimas de extração/hidrólise e análise cromatográfica dos flavonóides presentes em alface (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleraceae*), espinafre (*Tetragonia expansa*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*) e cebola (*Allium cepa*).

2.2 - Reagentes e padrões

Para a preparação das amostras e fases móveis, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA) e acetonitrila da Merck do Brasil (São Paulo, Brasil). Ácido acético, ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), luteolina (L) e apigenina (A) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL e conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses em -18°C.

2.3 – Equipamento e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690), Milford, EUA, equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), controlado por Software Millennium 32. Foi utilizada uma coluna Nova-Pack C18, (4µm, 3,9x150mm) e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm.

Para a definição das condições cromatográficas, foram realizados testes utilizando-se uma mistura de padrões dos cinco compostos em estudo, M, Q, L, K e A, dissolvidos em metanol, adicionado de ácido clorídrico conforme procedimento utilizado para as amostras. Neste estudo, foram testadas as seguintes fases móveis: água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico; água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético; e água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e pelos espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos, utilizando-se padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições após hidrólise das hortaliças.

Alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q com ácido ascórbico para obter-se 0,04% na solução de injeção. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M e o volume foi completado a 5mL com metanol.

2.4 – Extração e hidrólise dos flavonóides

Para se obter a máxima eficiência de extração e hidrólise sem promover degradação, a hidrólise de cada hortaliça foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)³⁰.

Os maços de cada tipo de hortaliça folhosa foram divididos em duas partes iguais ou longitudinalmente ao meio no caso de alface. Tomou-se uma metade de cada um dos 9 maços e misturou-se. Estes foram lavados, secos com papel absorvente, e após remoção das partes não comestíveis, cortados em porções menores que foram trituradas em processador de alimentos. As cebolas foram descascadas, quarteadas, e quartis opostos de cada unidade foram misturados e triturados em processador de alimentos. Sub-amostras de cada amostra foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (variando conforme o tipo de amostra, em proporções de 1:0,5 a 1:2) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. A solução de extração assim obtida consistiu de diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Esta amostra foi levada a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, os extratos foram resfriados e filtrados em funil sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e a solução foi colocada em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) Millipore de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

2.5 – Planejamento experimental e Análise de Superfície de Resposta

A otimização da extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas das hortaliças estudadas foi realizada através da Análise de Superfície de Resposta. Seis DCCRs constituídos por 12 experimentos conduzidos aleatoriamente foram utilizados para avaliação da concentração do ácido e tempo de hidrólise na eficiência da extração e hidrólise dos flavonóides. A *Tabela 1* apresenta os valores estudados para cada hortaliça e a *Tabela 2* a matriz do planejamento com as distintas condições de hidrólise para determinação das concentrações de flavonóides nas hortaliças estudadas.

Tabela 1. Fatores e níveis testados (valores codificados estão entre parênteses) para o Delineamento Composto Central Rotacional.

Hortaliça	Fatores (M ^a / h;min ^b)				
	Ponto axial inferior (- α)	Nível inferior (-1)	Nível intermediário (0)	Nível superior (+1)	Ponto axial superior (+ α)
Alface	0,4M/35min	0,8M/1h	1,2M/2h	1,6M/3h	2M/3h25min
Cebola	0,6M/5min	0,8M/30min	1,2M/1h30min	1,6M/2h30min	1,8M/2h55min
Couve	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1,0M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h14min
Espinafre	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1,0M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h14min
Rúcula	1,0M/2h11min	1,2M/3h	1,6M/5h	2,0M/7h	2,2M/7h49min
Salsa	0,6M/2h11min	0,8M/3h	1,2M/5h	1,6M/7h	1,8M/7h49min

^aConcentração molar de HCl na solução de hidrólise; ^bTempo de hidrólise.

Tabela 2. Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonóides analisados nas hortaliças.

			Concentração de flavonóides (µg/g)								
			Alface	Cebola	Couve		Espinafre		Rúcula		Salsa
Ensaio	X ₁	X ₂	Q	Q	Q	K	Q	K	Q	K	A
1	-1	-1	12,34	155,01	260,40	129,04	27,85	97,77	278,03	553,80	1656,39
2	-1	+1	12,24	374,25	419,38	229,11	58,21	201,70	289,56	570,00	2377,72
3	+1	-1	13,95	305,14	458,28	270,87	63,58	225,05	283,27	563,44	2603,44
4	+1	+1	11,06	232,22	175,53	117,78	58,47	204,29	281,13	557,53	2352,31
5	- 1,41*	0	10,86	281,24	105,56	51,42	25,84	72,84	294,68	563,98	1722,09
6	+ 1,41*	0	9,06	280,77	269,82	173,73	62,40	220,25	301,00	579,72	2577,75
7	0	- 1,41*	11,29	52,44	386,83	206,08	45,51	153,87	262,74	544,89	1746,17
8	0	+ 1,41*	11,47	311,17	404,50	242,91	73,45	233,45	288,72	575,66	2393,63
9	0	0	14,50	372,23	442,11	258,02	69,73	249,47	303,46	592,67	2564,83
10	0	0	13,68	359,33	478,22	281,81	66,64	237,33	304,66	611,87	2442,34
11	0	0	14,91	367,80	491,95	282,90	67,08	239,85	300,21	608,05	2565,50
12	0	0	13,29	334,30	485,15	275,63	66,31	234,56	301,54	592,80	2462,06

X₁=concentração molar de HCl , X₂=tempo de hidrólise, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina.

*α=±2 para X₁ em alface e ±1,5 em cebola, rúcula e salsa.

Os resultados obtidos na *Tabela 2* foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote STATISTICA for Windows, versão 6.0 da STATSOFT. Verificou-se a possibilidade de ajuste de modelos codificados de segunda ordem através da *Equação 1*.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada flavonóide extraído das hortaliças, verificando-se a adequação dos modelos para obtenção e análise das superfícies de resposta.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad \text{Eq.(1)}$$

Onde b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} e b_{12} representam os coeficientes de regressão, X_1 a concentração molar de HCl e X_2 o tempo de hidrólise.

2.6 – Validação da extração e método cromatográfico

Foram construídas curvas analíticas com padrões de agliconas em cinco concentrações diferentes, baseadas nas faixas esperadas dos seus teores nas amostras, sendo que cada ponto foi preparado e injetado em triplicata. A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas. A avaliação dos limites de detecção do equipamento (LD) foi feita pelo método da relação sinal-ruído 3:1, por diluições sucessivas dos padrões, onde determinou-se a menor quantidade detectável para cada um deles como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído. O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o LD^{5, 27}.

Para verificar a precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para cada hortaliça e para avaliação da exatidão, triplicatas de recuperações com adição de padrão em um nível de concentração foram obtidas para cada amostra, utilizando-se as condições otimizadas de extração/hidrólise e parâmetros cromatográficos definidos neste estudo²⁷. Como as condições de

hidrólise foram as mesmas para couve e espinafre, a recuperação foi avaliada apenas em espinafre.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Condições cromatográficas

Com a fase móvel água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de quercetina e luteolina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo, com água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético, porém os picos apresentaram cauda. Água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, proporcionaram boa separação dos compostos em estudo, sendo que os picos não apresentaram cauda. Esta foi a fase móvel escolhida, e extratos hidrolisados das amostras, com e sem acréscimo de padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo-se os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e o volume de injeção foi 20uL. O gradiente que melhor separou os flavonóides das amostras de alface, cebola, couve, espinafre, rúcula e salsa foi o mesmo conseguido para a separação dos padrões: iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear.

Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas para cada extrato das hortaliças são apresentados na *Figura 1*. Os flavonóides M, Q, L, K e A eluíram nesta seqüência nos tempos de retenção de 10,4 minutos, 12,5 minutos, 14,0 minutos, 16,2 minutos e 16,6 minutos, respectivamente.

3.2 – Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas

As amostras de alface e cebola apresentaram apenas o flavonol quercetina. Salsa apresentou a flavona apigenina. Couve, espinafre e rúcula apresentaram os flavonóis quercetina e kaempferol (*Figura 1*).

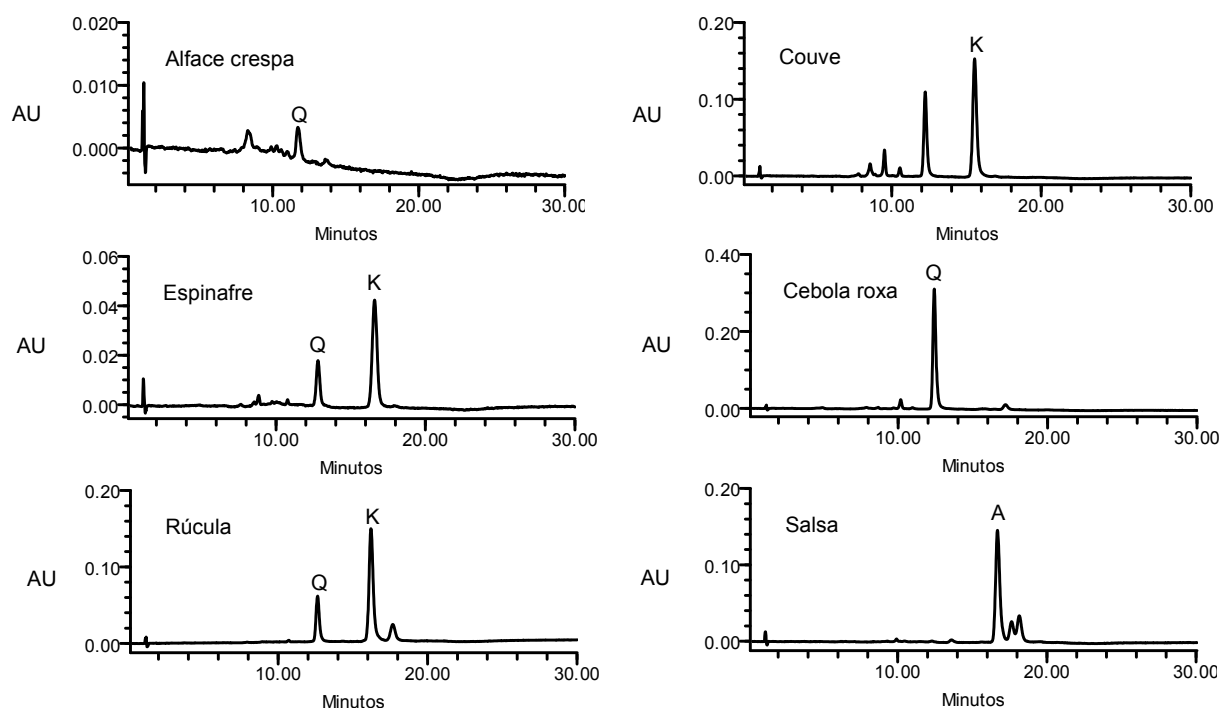


Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de alface crespa, couve, espinafre, cebola roxa, rúcula e salsa, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.

Na etapa de hidrólise/extração, o objetivo é liberar os açúcares ligados às agliconas, para que estas sejam mais facilmente identificadas e quantificadas.

Essa etapa deve ser eficaz na quebra das ligações glicosídicas, porém sem degradar as agliconas liberadas. Assim, considera-se que se utilizarmos uma concentração muito alta de ácido por um longo período, podemos liberar completamente as agliconas, porém acelerar sua degradação. Se utilizarmos uma concentração de ácido baixa por curto período, a liberação das agliconas pode não ser completa. Desta maneira, a interação que pode ocorrer no efeito destas duas variáveis, indica que as melhores condições devem ser alcançadas quando utilizamos uma baixa concentração de ácido por um período mais longo, ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Estas diferentes condições dependerão dos tipos de glicosídeos presentes na amostra, bem como do tipo de matriz analisada.

A *Tabela 3* apresenta os coeficientes de regressão para as agliconas extraídas das hortaliças analisadas. Para a elaboração dos modelos, em função das variáveis estudadas, adotou-se 5% de significância na avaliação estatística dos coeficientes de regressão obtidos.

As equações codificadas com os parâmetros estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação (R^2), F calculados e F tabelados estão apresentados na *Tabela 4*.

Pelos coeficientes de determinação (R^2) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um bom ajuste aos modelos obtidos (R^2 entre 0,85 e 0,98) com exceção da extração/hidrólise de quercetina em alface e kaempferol em rúcula, com R^2 de 0,74 e 0,77, respectivamente.

Assim, foi possível gerar as nove superfícies de respostas apresentadas na *Figura 2*. Observa-se pelos eixos das respostas que as figuras estão apresentadas em ordem crescente dos teores de flavonóides.

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático e significância (p-valor), para a resposta dos teores de flavonóides agliconas nas hortaliças analisadas.

ALFACE			CEBOLA	
Quercetina			Quercetina	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	14,20*	<0,0001	359,28*	<0,0001
B ₁	-0,26	0,3528	0,87	0,9500
B ₁₁	-1,01*	0,0021	-28,26	0,0898
B ₂	-0,34	0,3273	64,08*	0,0034
B ₂₂	-1,21*	0,0177	-80,90*	0,0020
B ₁₂	-0,70	0,1756	-73,04*	0,0093
COUVE				
Quercetina			Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	474,24*	<0,0001	274,53*	<0,0001
B ₁	23,27	0,2603	25,44*	0,0476
B ₁₁	-134,62*	0,0007	-76,74*	0,0005
B ₂	-12,39	0,5326	-0,14	0,9898
B ₂₂	-30,02	0,2027	-20,44	0,1256
B ₁₂	-110,43*	0,0058	-63,29*	0,0047
ESPINAFRE				
Quercetina			Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	67,44*	<0,0001	240,27*	<0,0001
B ₁	10,97*	0,0001	42,34*	0,0002
B ₁₁	-11,65*	0,0001	-43,99*	0,0003
B ₂	8,11*	0,0004	24,49*	0,0035
B ₂₂	-3,92*	0,0237	-20,29*	0,0139
B ₁₂	-8,86*	0,0017	-31,17*	0,0058
RÚCULA				
Quercetina			Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B ₀	302,36*	<0,0001	601,17*	<0,0001
B ₁	0,74	0,6879	2,44	0,5039
B ₁₁	-2,83	0,1755	-14,36*	0,0074
B ₂	5,77*	0,0189	6,73	0,1069
B ₂₂	-14,45*	0,0004	-22,27*	0,0014
B ₁₂	-3,42	0,2294	-5,53	0,3125
SALSA				
Apigenina				
	Coeficientes	p-valor		
B ₀	2511,97*	<0,0001		
B ₁	259,43*	0,0005		
B ₁₁	-136,23*	0,0145		
B ₂	173,41*	0,0045		
B ₂₂	-190,74*	0,0051		
B ₁₂	-243,11*	0,0047		

*p-valor < 0,05

Tabela 4. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (X1) e tempo de hidrólise (X2) presentes nas hortaliças estudadas.

		EQUAÇÃO Y = (μg Flavonol /g hortaliça) (Valores de X ₁ e X ₂ codificados)	R ²	F _{CAL}	F _{TAB} (α , v _R , v _r)
Alface	Q	$Y = 14,20 - 1,01 X_1^2 - 1,21 X_2^2$	0,74	15,87	4,26
Cebola	Q	$Y = 359,28 + 64,08 X_2 - 80,90 X_2^2 - 73,04 X_1 X_2$	0,86	15,84	4,07
Couve	Q	$Y = 474,24 - 134,62 X_1^2 - 110,43 X_1 X_2$	0,85	25,38	4,26
	K	$Y = 274,53 + 25,44 X_1 - 76,74 X_1^2 - 63,29 X_1 X_2$	0,88	19,47	4,07
Espinafre	Q	$Y = 67,44 + 10,97 X_1 - 11,65 X_1^2 + 8,11 X_2 - 3,92 X_2^2 - 8,86 X_1 X_2$	0,98	51,18	4,39
	K	$Y = 240,27 + 42,34 X_1 - 43,99 X_1^2 + 24,49 X_2 - 20,29 X_2^2 - 31,17 X_1 X_2$	0,96	34,17	4,07
Rúcula	Q	$Y = 302,36 + 5,77 X_2 - 14,45 X_2^2$	0,85	25,23	4,26
	K	$Y = 601,17 - 14,36 X_1^2 - 22,27 X_2^2$	0,77	37,13	4,26
Salsa	A	$Y = 2511,97 + 259,43 X_1 - 136,23 X_1^2 + 173,41 X_2 - 190,74 X_2^2 - 243,11 X_1 X_2$	0,95	22,99	4,39

R²= coeficiente de determinação; F_{Calc} = (QM_{Regressão}/QM_{Resíduo}); Q=quercetina; K=kaempferol; A=apigenina.

α =nível de significância (5%); v_R=graus de liberdade da regressão; v_r=graus de liberdade dos resíduos.

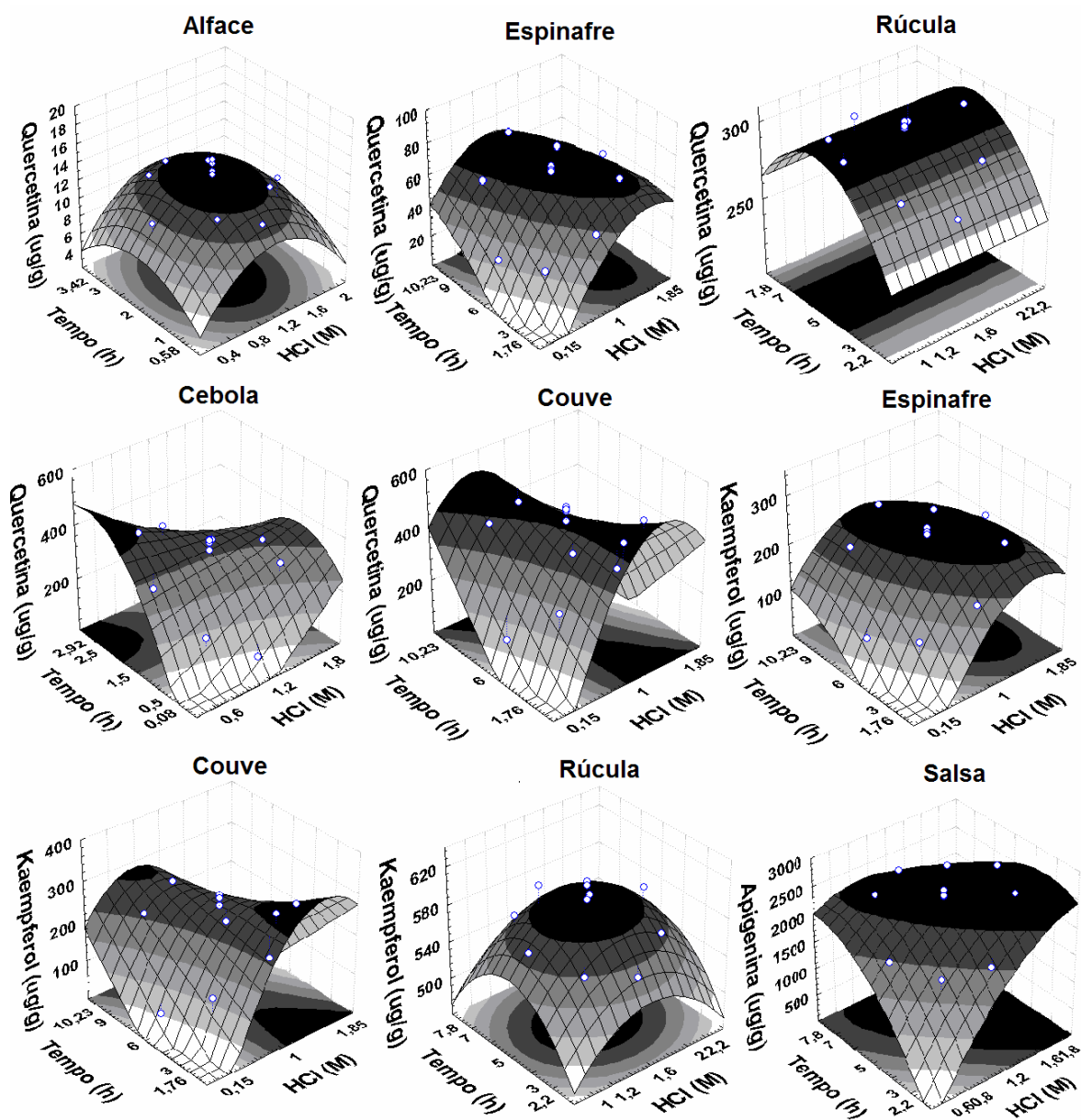


Figura 2. Superfícies de resposta na determinação das agliconas quercetina, kaempferol e apigenina nas amostras analisadas.

Alface foi a hortalíça com menor teor de quercetina. Espinafre, rúcula, cebola e couve apresentaram teores crescentes deste flavonol. Kaempferol foi encontrado em espinafre, couve e rúcula, sendo a rúcula, a hortalíça mais rica neste composto. Salsa apresentou altos teores de apigenina.

Através das superfícies de resposta geradas, determinou-se as faixas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise ótimos para cada aglicona presente nas hortaliças analisadas. As melhores condições de extração/hidrólise foram estabelecidas, sendo: 1,2M de HCl por 2 horas para alface, 0,8M de HCl por 2,5h para cebola, 1,0M de HCl por 6 horas para couve e espinafre, 1,6M de HCl por 5 horas para rúcula e 1,7M de HCl por 4,3 horas para salsa.

A *Figura 3* apresenta os cromatogramas obtidos da amostra de espinafre submetida a diferentes condições de hidrólise: (A) com HCl 0,15M por 6 horas, onde ainda pode-se observar a presença de glicosídeos, indicando uma hidrólise incompleta destes compostos a agliconas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas, condição ótima obtida a partir da superfície de resposta, onde podemos verificar que todos os glicosídeos foram hidrolisados e (C) com HCl 1,0M por 10,23 horas, condição na qual os compostos de interesse já sofreram degradação, apresentando menores teores. Para algumas matrizes e condições de hidrólise, ocorre a presença de picos de degradação.

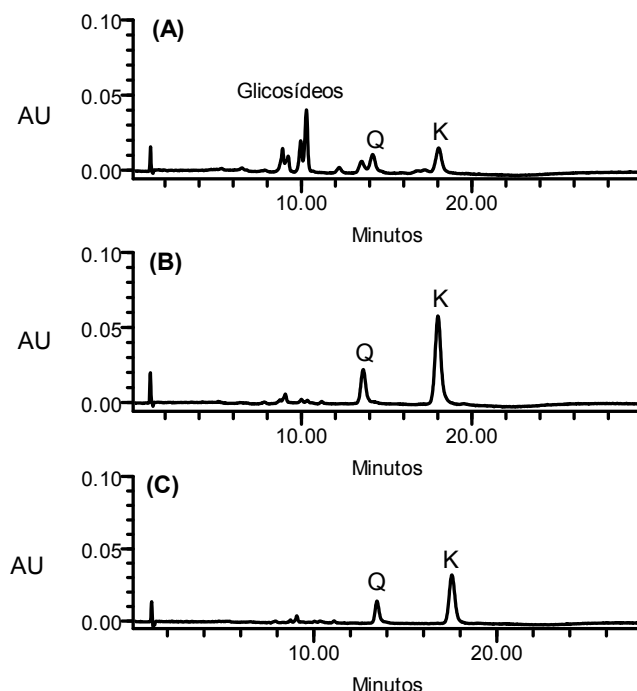


Figura 3. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de espinafre, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) com HCl 0,15M por 6 horas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas e (C) com HCl 1,0 M por 10,23 horas, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.

3.3 – Avaliação da metodologia analítica

As curvas padrão passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (*Tabela 5*). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99. Os limites de detecção obtidos para M, Q, L, K e A foram, respectivamente, 0,5; 0,4; 0,5; 0,6 e 1,0 ug/mL. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação das replicatas (*Tabela 6*), que variaram de 0,75 para cebola a 5,0 para alface. As taxas de recuperação para os flavonóides das diferentes hortaliças analisadas estão apresentadas na *Tabela 7*, variando de 89,9% para quercetina em rúcula a

102,1% para quercetina em alface. Essas características comprovam o excelente desempenho do método analítico.

Tabela 5. Propriedades das curvas padrão

Flavonóide	Faixa de concentração (µg/mL)	Coeficiente de determinação (r^2)	Coeficiente de variação entre as triplicatas (%)
Miricetina	7 – 60	0,9988	0,8
Quercetina	9,4 – 84	0,9996	1,8
Luteolina	7,1 – 61,2	0,9990	1,5
Kaempferol	14,3 – 125,5	0,9998	1,8
Apigenina	7,1 – 60,6	0,9998	2,2

Tabela 6. Teores de flavonóides nas amostras e seus respectivos coeficientes de variação

AMOSTRA	Concentração (µg/g)*	Coeficiente de variação (%)
Alface	Q 70,52 ± 3,55	5,00
Cebola	Q 299,60 ± 2,24	0,75
Couve	Q 265,39 ± 11,47	4,32
	K 337,51 ± 16,67	4,94
Espinafre	Q 31,17 ± 0,54	1,73
	K 161,96 ± 3,92	2,42
Rúcula	Q 251,18 ± 4,52	1,80
	K 945,98 ± 9,42	1,00
Salsa	A 2143,43 ± 58,04	2,71

* média de sete repetições, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina.

Tabela 7. Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados

Flavonóide	Quantidade adicionada (ug/g)	Recuperação ^a (%)	CV (%)
Alface	Q 27,9	102,1	0,2
Cebola	Q 166,7	96,3	3,9
Espinafre	Q 16,73	92,0	0,9
	K 77,8	91,8	1,1
Rúcula	Q 147,14	89,9	0,9
	K 525,70	92,7	2,4
Salsa	A 672,34	102,0	5,0

^a Média de três determinações, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina.

4 – CONCLUSÕES

A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras estudadas, foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Nova-Pak (4µm, 3,9 x 150mm), utilizando-se como fase móvel metanol e água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear, iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, com fluxo de 1mL/min e volume de injeção de 20 µL.

A análise por superfície de resposta foi imprescindível na otimização da extração/hidrólise dos flavonóis e flavonas, sendo possível estabelecer as condições ótimas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise para cada hortaliça.

Com base nesta otimização, fica evidente que as condições ótimas de hidrólise para análise de flavonóides variam e devem ser determinadas para cada matriz estudada.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, R. F.; AMARASINGHE, C.; FISHER, L. J.; MAK, W. B.; PACKER, J. E. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. **Free Rad Res**, 33: 91-103, 2000.
2. BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer**, 18: 1-29, 1992.
3. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York, Wiley, 1978.
4. CASTELLUCCIO, C.; PAGANGA, G.; MELIKIAN, N.; BOLWELL, G. P.; PRIDHAM, J.; SAMPSON, J.; RICE-EVANS, C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. **FEBS Letters**, 368: 188-192, 1995.
5. CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical chemists**. 1st Ed., Chapman and Hall, London, 253 p., 1983.
6. CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; McDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **J Agric Food Chem**, 45: 590-595, 1997.
7. DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolics antioxidants. **Curr Opin Lipidol**, 11: 43-47, 2000.
8. FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol**, 32(12): 1061-1080, 1995.
9. FRANKE, A. A.; COONEY, R. V.; CUSTER, L. J.; MORDAN, L. J.; TANAKA, Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Manthey, J. A., Buslig, B. S. **Flavonoids in the living system**. New York: Plenum; 1998.
10. HAALAND, P. O. **Experimental design in biotechnology**, New York: Marcel Dekker, 1989.

11. HERTOOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, 342: 1007-1011, 1993.
12. HERTOOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem**, 40: 2379-2383, 1992.
13. HERTOOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. **J Agric Food Chem**, 41: 1242-1246, 1993.
14. HERTOOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **J Agric Food Chem**, 40: 1591-1598, 1992.
15. HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. **Biochem Soc Trans**, 24: 785-789, 1996.
16. HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother**, 51: 305-310, 1997.
17. HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **J Sci Food Agric**, 81: 842-852, 2001.
18. KANDASWANI, C.; MIDDLETON, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Adv Exp Med Biol**, 366: 351-376, 1994.
19. KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **Brit Med J**, 312: 478-481, 1996.
20. KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur J Clin Nutr**, 38: 133-142, 1999.

21. MAKELA, S.; POUTANEN, M.; KOSTIAN, M. L.; LEHTIMAKI, N.; SALO, L. Inhibition of 17B-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. In: **3rd International Conference of Phytoestrogens**, Little Roc, AK, 1995.
22. McDONALD, M.; HUGHES, M.; BURNS, J.; LEAN, M. E. J.; MATTHEWS, D.; CROZIER, A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. **J Agric Food Chem**, 46: 368-375, 1998.
23. MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **J Agric Food Chem**, 48: 577-599, 2000.
24. MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proc Soc Exp Biol Med**, 208: 44-50, 1995.
25. MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. **Biochem Pharm**, 43: 1167-1179, 1992.
26. MIDDLETON, Jr. E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J. B. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1994.
27. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova**, 27: 771-780, 2004.
28. RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Rad Res**, 22: 375-383, 1995.
29. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad Biol Med**, 20: 933-956, 1996.
30. RODRIGUES, M. I. ; IEMMA, A F . **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.
31. STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. **J Am Diet Assoc**, 96: 1027-1039, 1996.

32. VERLANGIERI, A. J.; KAPEGHIAN, J. C.; el-DEAN, S.; BUSH, M. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. **Med Hypotheses**, 16: 7-15, 1985.
33. VRIES, J. de; JANSSEN, K.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN STAVEREN, W. A.; KATAN, M. B. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. **Cancer Lett**, 114: 141-144, 1997.
34. WENZEL, U.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Res**, 60: 3823-31, 2000.

6 – AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora, à FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos PRONEX n° 2003/10151-4 e Projeto Universal n° 477189/2004-0, respectivamente.

CAPÍTULO 3

Efeitos sazonais nos teores de flavonóides em hortaliças

LÍSIA SENGER HUBER
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à Revista Food Chemistry

Efeitos sazonais nos teores de flavonóides em hortaliças

Lísia Senger Huber e Delia B. Rodriguez-Amaya*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP,
Brasil

RESUMO

Flavonóides são importantes constituintes da dieta humana devido aos seus efeitos benéficos à saúde, principalmente atuando contra doenças degenerativas. Dados confiáveis dos teores destes compostos nos alimentos são necessários para apontar as fontes, estabelecer melhor a associação entre ingestão e o risco ou incidência de doenças e compreender seu mecanismo de ação. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os teores de flavonóis e flavonas em hortaliças e avaliar possíveis efeitos sazonais. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C18. Os compostos estudados foram os flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol e as flavonas luteolina e apigenina. Quercetina foi o flavonóide mais distribuído nas hortaliças, sendo encontrada em alface lisa, alface crespa, cebola nacional, cebola argentina, couve, espinafre e rúcula (faixa da concentração média, 6,73-423µg/g). Kaempferol foi encontrado em couve, espinafre e rúcula (faixa de concentração média, 145-501µg/g), e apigenina em salsa (média de 1578µg/g). Miricetina e luteolina não foram encontradas nas hortaliças investigadas. Com exceção do kaempferol em rúcula, que foi maior no inverno (diferença não significativa), os teores de flavonóides tenderam a ser maiores no verão, embora a diferença tenha sido estatisticamente significativa apenas para quercetina de alface crespa e couve. Além da grande variação encontrada nos teores de flavonóides entre lotes da mesma estação do ano, para cada hortaliça, não houve grande diferença entre as temperaturas durante o verão (média de 30,2°C) e inverno (média de 26,3°C) no ano de análise.

Palavras-chave: flavonóides, análise por CLAE, hortaliças

SUMMARY

Flavonoids are important constituents of the human diet due to their beneficial effects on health, principally their action against degenerative diseases. Reliable data on the levels of these compounds in foods are necessary to identify sources, establish better the association between consumption and risk or incidence of diseases and understand their mechanism of action. The objective of this work was to identify and quantify the flavonols and flavones of vegetables and evaluate possible seasonal effects. The analyses were done by high performance liquid chromatography in a C18 column. The compounds studied were the flavonols myricetin, quercetin and kaempferol and the flavones luteolin and apigenin. Quercetin was the most widely distributed in the vegetables, being encountered in Boston lettuce, curly lettuce, national onion, Argentinian onion, New Zealand spinach and rucula (range of average concentration 6,73-423 μ g/g). Kaempferol was encountered in kale, New Zealand spinach and rucula (range of average concentration 145-501 μ g/g) and apigenin (average of 1578 μ g/g) in parsley. With the exception of kaempferol in rucula, which was significantly greater in the winter, the flavonol contents tended to be higher in the summer, but the difference was statistically significant only for quercetin in curly lettuce. Temperature difference between the two seasons during the year of study was slight and variation between lots of the same season for each vegetable was appreciable.

Keywords: flavonoids, HPLC, vegetables

1 – INTRODUÇÃO

Uma dieta rica em frutas, verduras e hortaliças, exerce um efeito positivo na saúde humana, contribuindo na prevenção de um grande número de doenças crônicas. Este efeito protetor tem sido atribuído a uma variedade de compostos presentes nestes vegetais, como ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis, glutathiona, ácidos fenólicos e flavonóides (Ames, Shigenaga & Hagen, 1993; Rice-Evans & Miller, 1995).

Estudos epidemiológicos indicam que uma dieta rica em flavonóides está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares (Hertog, Feskens, Hollman, Katan & Kromhout, 1993; Hertog et al. 1995; Hertog, Feskens & Kromhout, 1997; Knekt, Jarvinen, Reunanen & Maatela, 1996; Yochum, Kushi, Meyer & Folsom, 1999) e algumas formas de câncer (Block, Patterson & Subar, 1992; Franke, Cooney, Custer, Mordan & Tanaka, 1998; Knekt et al. 1997; Neuhouwer, 2004). Desta maneira, o teor de flavonóides em frutas e hortaliças tem sido objeto de pesquisas.

Flavonóides são fenilpropanóides ($C_6-C_3-C_6$), largamente distribuídos em plantas onde ocorrem, predominantemente, na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcar. Estão divididos em cinco classes principais: flavonóis e flavonas, encontrados na maioria dos alimentos vegetais; flavanonas, concentradas principalmente em frutas cítricas; antocianinas, encontradas em algumas frutas, principalmente “berries”; e catequinas ou flavanóis, que ocorrem predominantemente em chás. (Harborne, 1994)

Flavonóides geralmente absorvem em comprimentos de onda na região de 280-315nm, sendo capazes de agir como filtros de radiação UV nas plantas, exercendo proteção contra danos aos tecidos fotossintéticos. Assim, a luz torna-se um dos fatores mais importantes no controle da síntese destes compostos nos vegetais. A exposição à radiação UV B provoca mudanças na biossíntese de flavonóides (Harborne & Williams, 2000).

Variações sazonais nos teores de flavonóides já foram estudadas, sendo três a cinco vezes maiores durante o verão que em outras estações, como em alface (30 vs 1,9µg/g de quercetina), escarola (95 vs 15µg/g de kaempferol) e alho poró (56 vs 11µg/g de kaempferol)(Hertog, Hollmann & Katan, 1992).

Gliszczynska-Swiglo, Kaluzewicz, Lemanska, Knaflewski & Tyrakowska (2007) verificaram o efeito da radiação solar nos teores de flavonóides em

inflorescências de brócolis e concluíram que estes são positivamente correlacionados com a radiação desde o plantio até a colheita.

O conhecimento dos teores de flavonóides e suas variações na cadeia alimentar, pode ser uma ferramenta útil nos esforços de incrementar os níveis destes compostos na dieta para a promoção da saúde. A identificação de fontes ricas em flavonóides é um meio de incentivar o consumo destes na dieta, promovendo a saúde e bem-estar da população.

O objetivo deste trabalho foi determinar os teores de flavonóides em hortaliças que fazem parte da dieta da população brasileira e verificar o efeito sazonal nos teores destes.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

As hortaliças analisadas neste estudo foram: alface (*Lactuca sativa*) lisa e crespa, couve (*Brassica oleraceae*), espinafre (*Tetragonia expansa*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*), cebola (*Allium cepa*) branca e roxa.

As amostras de hortaliças foram adquiridas em três supermercados da cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. Foram coletados 3 maços (hortaliças folhosas) ou pelo menos 1kg (cebola) de cada amostra em cada supermercado para cada lote, totalizando 9 maços para as hortaliças folhosas e 3Kg para cebola. Foram analisados cinco lotes de cada hortaliça em cada estação (verão e inverno). Cebola branca nacional foi analisada apenas durante o verão, pois não estava disponível durante o inverno, sendo substituída pela cebola branca argentina nesta estação.

As máximas temperaturas durante o inverno foram de 17,8 a 34,7°C (média de 26,3°C), e no verão variaram de 23,5°C a 36,9°C (média de 30,2°C).

2.2 - Reagentes e padrões

Para a preparação dos padrões, amostras e fases móveis, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA). Ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol e apigenina foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL e foram conservadas a -18°C, protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nestas condições.

2.3 – Análise dos flavonóides

Os maços de cada hortaliça folhosa foram divididos em duas partes iguais (alfaces foram divididas longitudinalmente ao meio). Tomou-se uma metade de cada um dos maços e misturou-se. Retiradas as partes não comestíveis, estes foram lavados, secos com papel absorvente e cortados em porções menores que foram trituradas em processador de alimentos. As cebolas foram descascadas, quarteadas, e quartis opostos de cada unidade foram misturados aos demais e triturados em processador de alimentos. Porções dessas amostras foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (variando conforme o tipo de amostra, em proporções de 1:0,5 a 1:2) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de ácido clorídrico (HCl). A solução de extração assim obtida consistiu de diferentes concentrações

molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Esta amostra foi levada a refluxo a 90°C.

As condições de hidrólise foram 1,2M de HCl por 2 horas para alface; 0,8M de HCl por 2,5 horas para cebola; 1,0M de HCl por 6 horas para couve e espinafre; 1,6M de HCl por 5 horas para rúcula e 1,7M de HCl por 4,3 horas para salsa. Estas condições foram previamente otimizadas através de um delineamento composto central rotacional (Capítulo 2).

Após a hidrólise, os extratos foram resfriados, filtrados em funil sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e a solução foi colocada em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE. As análises foram conduzidas em duplicata.

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690) (Milford, EUA), controlado por Software Millenium 32, equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i) e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm.

Foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18 (4µm, 3,9x150mm). O fluxo da fase móvel foi 1mL/min e o volume de injeção 20µL. A fase móvel foi composta por metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos de padrões, co-cromatografia e pelos espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de

trabalho em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras. Para simular as condições após hidrólise das hortaliças, alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada com ácido ascórbico para obter-se 0,04% na solução de injeção. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M e o volume foi completado a 5mL com metanol. As curvas analíticas passaram pela origem e foram lineares nas faixas de concentração estabelecidas. Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99.

2.4 – Avaliação do método

O método foi avaliado e validado conforme descrito no Capítulo 2, segundo Ribani, Bottoli, Collins, Jardim e Melo (2004). Os limites de detecção obtidos para miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol e apigenina foram, respectivamente, 0,5; 0,4; 0,5; 0,6 e 1,0µg/mL. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação das replicatas, sendo todos inferiores a 5%. As taxas de recuperação para os flavonóides das diferentes hortaliças analisadas variaram de 89,9 a 92,7%.

2.5 – Análise dos Dados

Com a finalidade de se definir se existiu ou não diferença significativa entre os valores obtidos para os teores de flavonóides em hortaliças produzidas durante o inverno e verão, realizou-se teste t, utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Figura 1* apresenta o cromatograma com a separação dos cinco padrões dos compostos analisados, mostrando a diferença na absorvidade destes, através das diferentes áreas obtidas para cada composto, injetados na mesma concentração, e por isso, apresentando diferentes limites de detecção.

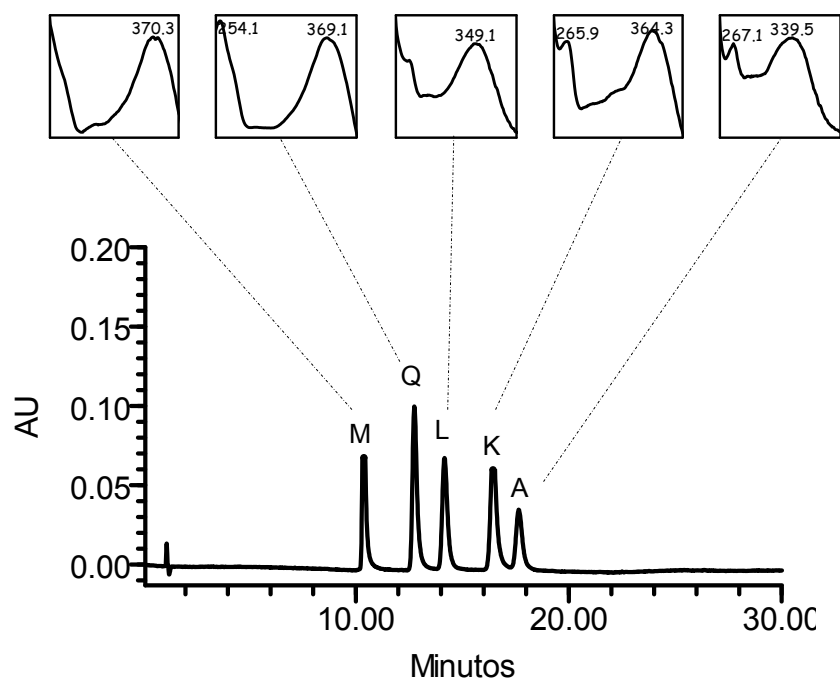


Figura 1. Cromatograma dos padrões de flavonóides M=miricetina, Q=quercetina, L=luteolina, K=kaempferol e A=apigenina, com correspondentes espectros de absorção, injetados na mesma concentração, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.

Os cromatogramas das amostras de alface, couve, espinafre e rúcula são apresentados na *Figura 2*. A *Figura 3* apresenta os cromatogramas das amostras de cebola e salsa.

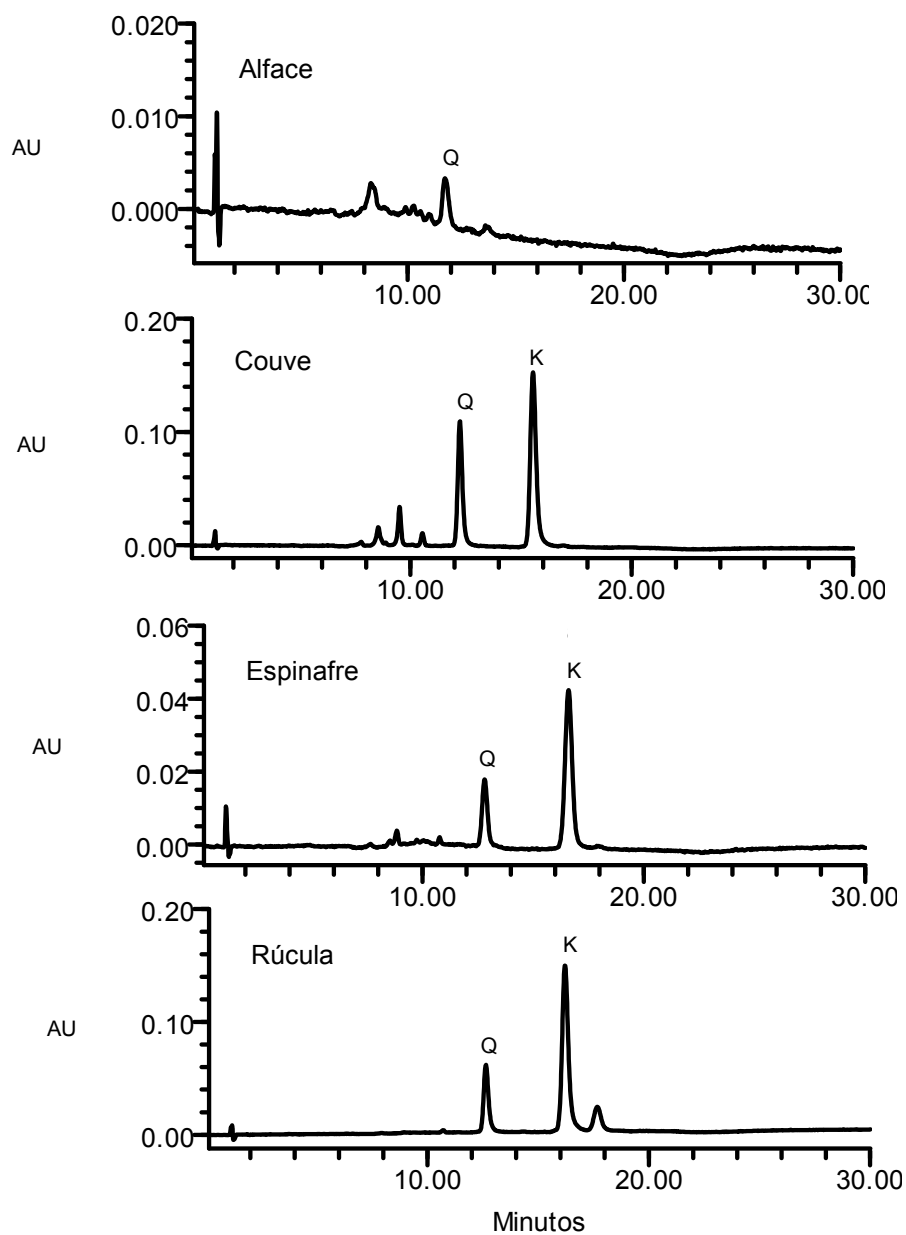


Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina e K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de alface, couve, espinafre e rúcula, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.

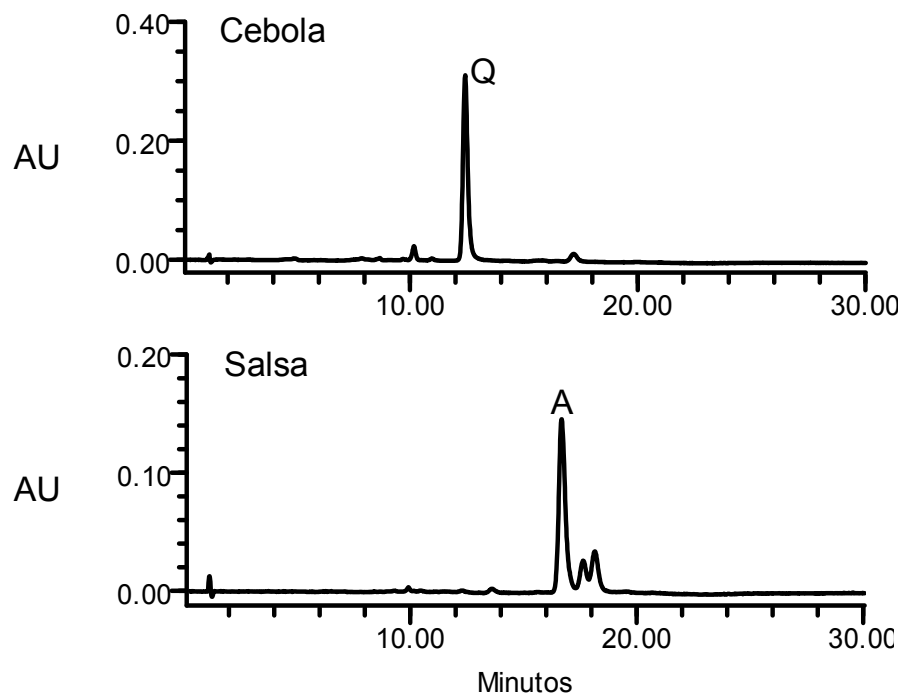


Figura 3. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de cebola e salsa, para coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear.

Através da comparação entre os cromatogramas obtidos para os padrões e amostras, pode-se verificar que alface apresentou apenas o flavonol quercetina, não se observando a presença de outros picos nos tempos de retenção dos demais compostos em estudo.

O cromatograma de cebola mostrou que, embora apresente picos próximos aos tempos de retenção de miricetina e apigenina, os espectros de absorção correspondentes não foram característicos destes compostos, indicando a presença apenas de quercetina, a exemplo da alface.

Couve, espinafre e rúcula não apresentaram picos entre os de quercetina e kaempferol, indicando a ausência de luteolina. Estas amostras também não apresentaram picos com tempos de retenção maiores que o kaempferol, não

apresentando apigenina, com exceção de rúcula, que apresentou um pico próximo ao tempo de retenção da apigenina, porém com diferente espectro de absorção.

Salsa não apresentou picos com tempo de retenção menores ao da apigenina, mostrando a ausência dos demais compostos em estudo.

Os teores de flavonóides nas hortaliças analisadas durante o verão e inverno estão apresentados na *Tabela 1*. Quercetina foi o flavonóide mais distribuído nas hortaliças. Cebola branca nacional e argentina, apresentaram altos teores deste flavonol, em faixas de 294-381µg/g e 295-410µg/g, respectivamente. Estes teores de quercetina são ligeiramente menores que os encontrados em cebola branca por Arabbi, Genovese & Lajolo (2004) (482-556µg/g) mas dentro da faixa reportada por Crozier, Lean, McDonald & Black (1997) (185-634µg/g), e semelhante aos valores obtidos por Ewald, Fjelkner-Modig, Johansson, Sjöholm & Akesson (1999) (390-420µg/g) e Hertog et al. (1992) (284-486µg/g).

Os altos teores de quercetina encontrados na cebola roxa (390-423µg/g), corroboram àqueles encontrados por Arabbi et al. (2004) (383-936µg/g) e Ewald et al. (1999) (390-420µg/g), sendo maiores que os reportados por Crozier et al. (1997) (201µg/g) e Franke, Custer, Arakaki & Murphy (2004) (77-195µg/g).

Alface lisa e alface crespa apresentaram os menores teores de flavonóides, variando de 6,7-9,8µg/g de quercetina para alface lisa e 7,2-30,8µg/g de quercetina para alface crespa. Hertog et al. (1992) também encontrou apenas quercetina (1,9-30µg/g) na alface da cultivar Capitata. Franke et al. (2004) encontrou 1-11µg/g de quercetina e ainda 1-6µg/g de kaempferol na cultivar Iceberg. Arabbi et al. (2004) reportou 22-32µg/g de quercetina para alface lisa e 184-206µg/g para alface crespa e ainda 1-10µg/g de luteolina nestas amostras. Luteolina e kaempferol não foram encontrados nas amostras de alface do presente estudo.

Arabbi et al. (2004) não utilizaram hidrólise das amostras, quantificando os flavonóides na forma glicosídica, porém não ficou claro se estes autores utilizaram padrões de glicosídeos, os quais são difíceis de adquirir devido a grande variedade de glicosídeos existentes para cada flavonóide, ou se a quantificação foi realizada utilizando padrões de agliconas. Os demais autores citados realizaram hidrólise utilizando HCl 1,2M por 2 horas, a exemplo do presente trabalho.

Couve apresentou altos teores de quercetina (256-399 μ g/g) e kaempferol (333-339 μ g/g). Esses teores foram superiores aos encontrados por Hertog et al. (1992) (110 μ g/g de quercetina e 211 μ g/g de kaempferol).

Os maiores teores de kaempferol foram encontrados em rúcula (402-501 μ g/g), que também contém quercetina (55-56 μ g/g). Arabbi et al. (2004) também encontraram estes dois flavonóis em amostras de rúcula, mas em faixas muito amplas (não detectado-139 μ g/g de quercetina e 407-1042 μ g/g de kaempferol).

Salsa apresentou apenas apigenina (1521-1636 μ g/g), porém em alta concentração. Justesen e Knuthsen (2001) também avaliaram amostras de salsa e encontraram além de apigenina (5100-6300 μ g/g), quantidades comparativamente bem menores de quercetina (0-10 μ g/g) e luteolina (0-40 μ g/g).

Pode-se verificar uma tendência de aumento nos teores para todos os compostos estudados durante o verão, porém, o aumento foi significativo apenas para quercetina em alface crespa. Uma exceção foi o teor de kaempferol em rúcula que foi maior durante o inverno.

A falta de diferença significativa nos teores de flavonóides entre verão e inverno pode ser atribuída a dois fatores. Foi constatada uma grande variação nos teores dos flavonóides entre lotes de cada hortaliça, de uma mesma estação do ano, assim mascarando a variação sazonal. Além disso, a pequena diferença de

temperatura entre verão (média de 30,2°C) e inverno (média de 26,3°C) foi, aparentemente, insuficiente para provocar um efeito mais pronunciado.

Tabela 1. Teores de flavonóides em hortaliças analisadas durante o inverno e verão.

Hortaliça/Estação	Concentração (µg/g)*		
	Quercetina	Kaempferol	Apigenina
Cebola			
Nacional	323 ± 35a	nd	nd
Argentina	362 ± 54a	nd	nd
Cebola roxa			
Inverno	390 ± 81a	nd	nd
Verão	423 ± 61a	nd	nd
Alface lisa			
Inverno	6,73 ± 2,86a	nd	nd
Verão	9,77 ± 4,18a	nd	nd
Alface crespa			
Inverno	7,18 ± 5,16b	nd	nd
Verão	30,8 ± 12,9a	nd	nd
Couve			
Inverno	256 ± 28b	333 ± 95a	nd
Verão	399 ± 80a	339 ± 66a	nd
Espinafre			
Inverno	52,8 ± 12,3a	145 ± 30a	nd
Verão	62,3 ± 10,6a	170 ± 16a	nd
Rúcula			
Inverno	137 ± 56a	501 ± 172a	nd
Verão	143 ± 55a	402 ± 111a	nd
Salsa			
Inverno	nd	nd	1521 ± 169a
Verão	nd	nd	1636 ± 125a

* média de cinco lotes analisados em duplicata; nd = não detectado; letras diferentes para a mesma hortaliça entre teores de inverno e verão representam diferença significativa ($p < 0.05$).

4 – CONCLUSÕES

Quercetina foi o flavonóide mais encontrado nas hortaliças analisadas, sendo que os maiores teores foram encontrados em cebola roxa, cebola branca e couve. Kaempferol foi encontrado em rúcula, couve e espinafre. Apigenina foi encontrada em salsa. Miricetina e luteolina não foram detectadas nas hortaliças estudadas. Os teores de flavonóides tenderam a ser maiores durante o verão (com exceção de kaempferol em rúcula que foi maior durante o inverno).

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames, B. N.; Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 7915-7922.

Arabbi, P. R.; Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. (2004) Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1124-1131.

Block, G.; Patterson, B. & Subar, A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1-29.

Crozier, A.; Lean, M. E. J.; McDonald, M. S. & Black, C. (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590-595.

Ewald, C.; Fjellkner-Modig, S.; Johansson, K.; Sjöholm, I. & Åkesson, B. (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.

Franke, A. A.; Cooney, R. V.; Custer, L. J.; Mordan, L. J. & Tanaka, Y. (1998) Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Mantney, J. A. & Buslig, B. S. *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum.

Franke, A. A.; Custer, L. J.; Arakaki, C. & Murphy, S. P. (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (1), 1-35.

Gliszczynska-Swiglo, A.; Kaluzewicz, A.; Lemanska, K.; Knaflewski, M. & Tyrakowska, B. (2007) The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence, *Food Chemistry*, 100, 241-245.

Harborne, J. B. (1994) *The flavonoids, advances in research since 1986*. London: Chapman & Hall.

Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. & Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M. & Kromhout, D. (1997) Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 349, 699-699.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.

Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.

Justesen, U. & Knuthsen, P. (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245-250.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A. & Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 312, 478-481.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliovaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E. & Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, 146, 223-230.

Neuhouser, M. L. (2004) Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50, 1-7.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. & Melo, L. F.C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.

Rice-Evans, C. & Miller, N. J. (1995) Antioxidants - the case for fruit and vegetables in the diet. *British Food Journal*, 97, 35-40.

Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K. & Folsom, A. R. (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149, 943-949.

6 – AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora, à FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos PRONEX nº 2003/10151-4 e Projeto Universal nº 477189/2004-0, respectivamente.

CAPÍTULO 4

Flavonóides em alimentos processados

LÍSIA SENGER HUBER
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido ao Journal of Agricultural and Food Chemistry

Flavonóides em alimentos processados

Lísia Senger Huber , Delia B. Rodriguez-Amaya*

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862 Campinas, SP.

RESUMO

Flavonóides são compostos bioativos promotores da saúde, prevenindo doenças degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares. Dados confiáveis dos teores destes compostos nos alimentos são necessários não somente em alimentos *in natura*, mas também em alimentos processados. O objetivo deste trabalho foi determinar flavonóis e flavonas em sucos e polpas processadas de caju, acerola e pitanga, e em amostras de cebola e salsa desidratadas. Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Os compostos estudados foram os flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol e as flavonas luteolina e apigenina. Quercetina foi encontrada em todas as amostras processadas de caju, acerola e pitanga, estando presente em maior concentração nas polpas de acerola e pitanga. Miricetina foi constatada em sucos e polpas de caju e pitanga, sendo que a polpa de pitanga apresentou os maiores teores. Kaempferol foi encontrado nos derivados de caju e acerola, estando em maiores concentrações nas polpas de acerola. Os teores dos compostos estudados foram sempre maiores nas polpas congeladas, seguidos pelos sucos concentrados e sucos prontos para consumo. As amostras de cebola desidratada apresentaram quercetina. Altas concentrações de apigenina foram constatadas em salsa desidratada. Os teores dos alimentos processados foram notadamente menores que os previamente obtidos dos respectivos alimentos *in natura*, indicando possíveis perdas durante processamento e estocagem.

Palavras-chave: flavonóides, análise por CLAE, caju, acerola, pitanga, cebola, salsa, produtos processados

SUMMARY

Flavonoids are bioactive compounds that promote health, preventing degenerative diseases such as cancer and cardiovascular diseases. Reliable data on the levels of these compounds in foods are necessary not only for raw produce, but also for processed foods. The objective of the present work was to determine flavonols and flavones in juices and pulps of cashew-apple, acerola and pitanga and in dehydrated onion and parsley. High performance liquid chromatography with a photodiode array detector was used. The compounds studied were the flavonols myricetin, quercetin and kaempferol and the flavones luteolin and apigenin. Quercetin was encountered in all of the processed samples of cashew-apple, acerola and pitanga, the highest concentration being in the pulps of acerola and pitanga. Myricetin was found in the juices and pulps of cashew-apple and pitanga, the pitanga pulp having the highest amounts. Kaempferol was encountered in the products of cashew-apple and acerola, with the highest concentration in the acerola pulp. The levels of the compounds studied were always greater in the frozen pulp, followed by the concentrated juice and the ready-to-drink juice. The samples of dehydrated onion had quercetin, and dehydrated parsley had high concentrations of apigenin. The levels found in the processed products were notably lower than those previously obtained from the respective raw foods, indicating possible losses during processing and storage.

Keywords: flavonoids, HPLC analysis, cashew-apple, acerola, pitanga, onion, parsley, processed foods

1 – INTRODUÇÃO

Flavonóides são metabólitos secundários das plantas e podem ser encontrados em altas concentrações em muitos alimentos, dentre eles algumas bebidas, como vinhos e chás, frutas e hortaliças.

Embora sejam considerados componentes não nutritivos dos alimentos, o interesse em pesquisar flavonóides deve-se aos possíveis efeitos benéficos à saúde exercidos por estes compostos, principalmente a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer (Block, Patterson e Subar, 1992; Franke, Cooney, Custer, Mordan e Tanaka, 1998; Knekt *et al.*, 1997; Neuhouser, 2004) e doenças cardiovasculares (Hertog, Feskens, Hollman, Katan e Kromhout, 1993; Hertog *et al.*, 1995; Hertog, Feskens e Kromhout, 1997; Knekt, Jarvinen, Reunanen e Maatella, 1996; Yochum, Kushi, Meyer e Folsom, 1999).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de vegetais. Para obter-se um melhor aproveitamento desta matéria-prima, permitindo o consumo a longo prazo e em lugares distantes do local da produção, utilizam-se métodos de conservação e processamento, disponibilizando produtos com maior tempo de vida útil que os frescos. No entanto, este processamento e o subsequente armazenamento podem promover perdas de componentes importantes dos alimentos. Assim, a verificação do efeito do processamento e estocagem nos teores de compostos que promovem a saúde se faz necessária no intuito de buscar condições que melhor preservem tais compostos.

No caso específico de flavonóides, os trabalhos sobre alimentos processados ainda são escassos. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os flavonóides presentes em diferentes marcas de suco pronto para o consumo, sucos concentrados e polpas congeladas de caju, acerola e pitanga, e em amostras de cebola e salsa desidratadas. A escolha destes

produtos processados foi baseada em pesquisas anteriores que indicaram estes vegetais como fontes ricas em flavonóides (Ribani, 2006).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

Foram analisados 5 lotes de cada uma das marcas dos produtos que seguem: 3 marcas de suco pronto para consumo (A, B, C), suco concentrado (A, D, E) e polpa congelada (F, G, H) de caju, 1 marca de suco de acerola concentrado (E), 2 marcas de polpa congelada de acerola (F, G), 2 marcas de suco de pitanga concentrado (E, I), 1 marca de polpa de pitanga congelada (G), 5 lotes de 3 marcas (J, L, M) de cebola desidratada e 5 lotes de 4 marcas (J, M, N, O) de salsa desidratada em flocos. Cada lote foi composto por três embalagens que foram combinadas e homogeneizadas para posterior análise.

2.2 - Reagentes e padrões

Para a preparação das amostras, padrões e fases móveis, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA). Ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL e foram conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nestas condições.

2.3 – Extração e hidrólise dos flavonóides

Cebola e salsa desidratadas. Aproximadamente 3g de salsa desidratada e 15g de cebola desidratada foram pesados e adicionados de quantidade conhecida de água (1:20 e 1:4, respectivamente, para salsa e cebola) e ácido ascórbico, sendo homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Desta, foram tomados 7,5g, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de ácido clorídrico (HCl), sendo 4M para as amostras de cebola e 8,5M para salsa. A solução assim obtida consistiu de diferentes concentrações molares finais de HCl (0,8M para cebola e 1,7M para salsa) em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Esta amostra foi levada a refluxo a 90°C por 2,5h para cebola e 4,3h para salsa. Estas condições foram otimizadas através de um delineamento composto central rotacional, como mostrado no Capítulo 2. Em seguida, os extratos foram resfriados, filtrados em funil sinterizado com porosidade G2, e depois que o volume foi completado a 50mL com metanol, colocados em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE. Todas as análises foram conduzidas em duplicata.

Polpas e sucos. Aproximadamente 15mL de suco ou 15g de polpa foram pesados e acrescidos de ácido ascórbico, 25mL de metanol e 10mL de ácido clorídrico (HCl), sendo 1M para as amostras de caju, 2M para acerola e 3M para pitanga. A solução de extração assim obtida consistiu de concentrações molares finais de HCl de 0,2M para caju, 0,4M para acerola e 0,6M para pitanga, em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Esta amostra foi levada a refluxo a 90°C por 110min para caju, 90min para acerola e 40min para pitanga. Em seguida, os extratos foram resfriados, o volume foi completado a 50mL com metanol e as soluções foram colocadas em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE. Todas as análises foram conduzidas em duplicata.

2.4 – Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690), (Milford, EUA), controlado por Software Millenium 32, equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm.

Para a separação dos flavonóides presentes em cebola e salsa desidratadas, foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18, (4µm, 3,9x150mm). O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e o volume de injeção 20uL. A fase móvel foi constituída por metanol:água (acidificados com ácido fórmico), com gradiente linear iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos.

Para as amostras de polpas e sucos de frutas, foi utilizada uma coluna Symmetry C18 (3,5µm, 2,1x150mm), sendo que o fluxo da fase móvel foi de 0,2mL/min e o volume de injeção 5uL. O gradiente utilizado na separação dos flavonóides foi 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, mantido até o final da corrida, sempre em gradiente linear.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e pelos espectros de absorção, utilizando-se padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições após hidrólise das amostras. Assim, alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q com ácido ascórbico para obter-se 0,04% na solução

de injeção. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M e o volume foi completado a 5mL com metanol. As curvas padrões traçadas passaram pela origem, foram lineares, cobrindo as faixas esperadas nas amostras. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 e os coeficientes de variação das replicatas foram inferiores a 5%, conforme recomendado por Khachik et al. (1992).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Tabela 1* apresenta os teores de flavonóides encontrados nas amostras processadas de caju, acerola, pitanga, cebola desidratada e salsa desidratada.

Tabela 1. Teor de flavonóides em alimentos processados.

	Miricetina*	Quercetina*	Kaempferol*	Apigenina*
Caju				
Suco Pronto				
Marca A	tr	tr	nd	nd
Marca B	tr-1,91 (1,62 ± 0,32)a	tr-1,72 (1,61 ± 0,29)a	nd	nd
Marca C	tr-1,83 (1,74 ± 0,11)a	tr-1,63 (1,50 ± 0,29)a	nd	nd
Suco Concentrado				
Marca A	2,48-3,53 (3,12 ± 0,54)a	tr-1,67 (1,50 ± 0,49)a	nd	nd
Marca D	2,38-3,40 (2,84 ± 0,38)a	1,26-1,60 (1,44 ± 0,15)a,b	nd	nd
Marca E	2,76-4,22 (3,27 ± 0,57)a	1,77-2,18 (1,95 ± 0,15)b	nd	nd
Polpa Congelada				
Marca F	6,19-8,00 (7,42 ± 0,76)a	4,32-4,95 (4,67 ± 0,24)a	nd	nd
Marca G	2,43-3,76 (3,21 ± 0,57)b	1,49-1,86 (1,70 ± 0,15)b	nd	nd
Marca H	2,93-9,23 (5,15 ± 2,87)a,b	1,81-6,06 (3,39 ± 1,92)a,b	nd	nd

Tabela 1. Continuação

Acerola				
Suco Concentrado				
Marca E	nd	10,1-18,4 (14,4 ± 2,94)	3,66-5,37 (4,19 ± 0,68)	nd
Polpa Congelada				
Marca F	nd	20,7-29,2 (25,4 ± 3,46)a	7,21-10,2 (8,78 ± 1,22)a	nd
Marca G	nd	17,9-22,8 (20,8 ± 2,08)b	3,87-5,01 (4,43 ± 0,41)b	nd
Pitanga				
Suco Concentrado				
Marca E	7,40-15,1 (12,3 ± 4,28)a	16,1-21,9 (19,6 ± 3,11)a	tr-1,65 (1,53 ± 0,28)a	nd
Marca I	15,5-20,0 (17,4 ± 2,31)a	21,8-28,1 (24,8 ± 3,19)a	tr-1,78 (1,64 ± 0,03)a	nd
Polpa Congelada				
Marca G	10,4-19,9 (15,6 ± 4,81)	20,4-29,7 (25,1 ± 4,64)	tr-1,74 (1,62 ± 0,25)	nd
Cebola Desidratada				
Marca J	nd	nd-603	nd	nd
Marca L	nd	nd-1250	nd	nd
Marca M	nd	nd-916	nd	nd
Salsa Desidratada				
Marca J	nd	nd	nd	22506-26612 (24312±1755)a
Marca M	nd	nd	nd	21495-30523 (25113±3761)a
Marca N	nd	nd	nd	16275-30339 (22942±5478)a
Marca O	nd	nd	nd	14226-23881 (17746±3661)a

* faixa (média ± desvio padrão), teores em µg/mL para sucos e ug/g para polpas, cebola e salsa desidratadas, média de cinco lotes. Letras diferentes entre as linhas para um mesmo tipo de amostra, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as marcas analisadas. Amostras de mesma marca são indicadas pela mesma letra. tr=traços, nd=não detectado, limites de detecção: 0,5µg/mL para miricetina, 0,4µg/mL para quercetina, 0,5µg/mL para kaempferol e 1,0µg/mL para apigenina.

Cromatogramas típicos das amostras analisadas são apresentados na *Figura 1*.

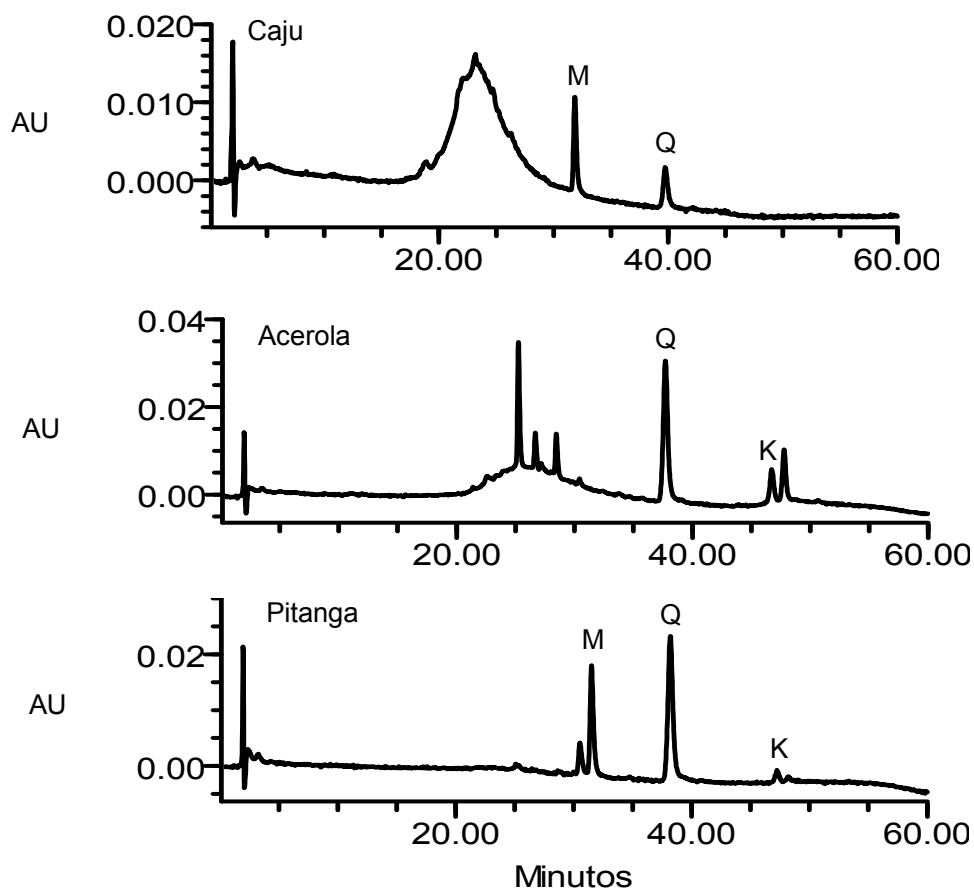


Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas M = miricetina, Q = quercetina, K = kaempferol, dos extratos hidrolisados de polpa de caju, polpa de acerola e polpa de pitanga, coluna Symmetry C18, 3,5 μ m, 2,1x150mm, fase móvel 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, mantido até o final da corrida, sempre em gradiente linear.

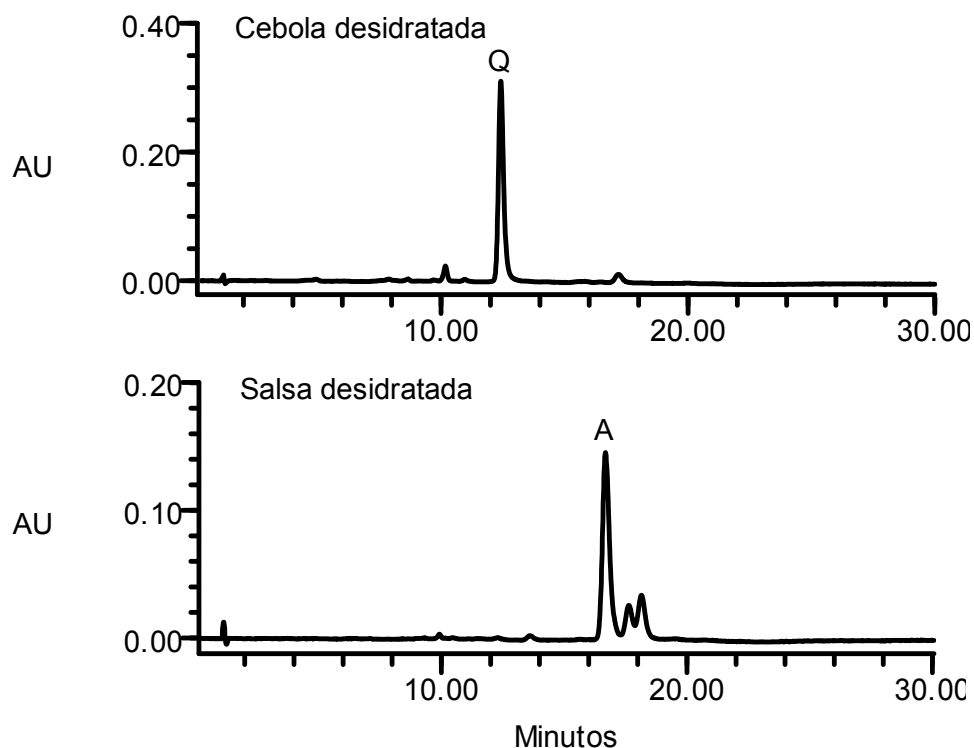


Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de cebola e salsa desidratadas (coluna Nova-Pak C18, 3,9x150mm, 4 μ m, fase móvel, iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear).

Foram encontrados apenas flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) nas amostras processadas de frutas. Quercetina foi encontrada em todas as amostras processadas de caju, acerola e pitanga. Miricetina foi encontrada em sucos e polpas de caju e pitanga, e kaempferol em amostras derivadas de caju e acerola.

Os teores de miricetina e quercetina em suco de caju pronto para o consumo foram semelhantes para as marcas B e C, sendo que apenas traços foram encontrados na marca A. Não houve variação nestes teores para as diferentes marcas de suco concentrado de caju. A polpa congelada da marca G apresentou menores teores de miricetina e quercetina que a marca F, porém equivalentes aos da marca H.

Entre os três produtos analisados, as polpas congeladas de caju apresentaram os maiores teores de miricetina e quercetina. Como parte da água foi retirada na concentração dos sucos, esperava-se encontrar maiores teores de miricetina e quercetina nestes produtos que nas polpas congeladas. Embora as polpas sejam pasteurizadas, os resultados indicam que houve degradação dos flavonóides no processamento térmico mais drástico e prolongado do suco concentrado.

Os teores de miricetina nas polpas de caju foram de três a seis vezes menores, dependendo da marca analisada, que os encontrados por Ribani (2006) em frutas frescas de caju ($20\mu\text{g/g}$). Os teores de quercetina foram até oito vezes menores que os reportados pelo mesmo autor ($13\mu\text{g/g}$), indicando perdas mesmo para a polpa congelada.

A polpa congelada de acerola da marca F apresentou maiores teores de quercetina e kaempferol que a marca G. As polpas congeladas apresentaram maiores teores de quercetina e kaempferol que a única marca de suco concentrado, indicando degradação no suco concentrado a exemplo do caju.

Os teores de quercetina nas polpas foram cerca de 50% daqueles encontrados por Ribani (2006). Já os conteúdos de kaempferol foram semelhantes aos relatados para acerola *in natura*, indicando uma maior retenção deste composto durante o processamento, em relação à quercetina.

Os produtos processados de pitanga apresentaram os três flavonóis estudados. Os teores médios dos flavonóis não diferiram entre as duas marcas estudadas, indicando possivelmente um mesmo tipo de processamento e variedade de pitanga utilizada, embora a variação entre lotes tenha sido marcante, indicando falta de controle na produção.

Os teores de miricetina e quercetina encontrados nos sucos concentrados de pitanga foram equivalentes aos encontrados nas polpas congeladas, indicando degradação durante a concentração, como nos casos de caju e acerola. Por outro lado, os níveis dos flavonóides nas polpas congeladas foram em média a metade daqueles reportados por Ribani (2006) para os três flavonóis em pitangas frescas, indicando perdas neste produto também.

Comparando-se as três frutas estudadas no presente trabalho, os maiores teores de miricetina foram encontrados em polpa e suco concentrado de pitanga, chegando a ser de duas a cinco vezes maiores que os encontrados nas polpas de caju.

O suco concentrado de pitanga apresentou cerca de 10 vezes mais quercetina que o suco concentrado de caju e quase o dobro do teor do suco concentrado de acerola. Os teores de quercetina foram semelhantes nas polpas de acerola e pitanga, sendo maiores que os encontrados nas polpas de caju.

Por outro lado, o suco concentrado de acerola apresentou até quatro vezes mais kaempferol que o suco concentrado de pitanga. A polpa de acerola teve teores até oito vezes maiores de kaempferol que a polpa de pitanga.

As amostras de cebola desidratada apresentaram a quercetina como único flavonol. Houve grande variação nos teores deste composto. Alguns lotes analisados das três marcas não apresentaram teores detectáveis, enquanto outros apresentaram valores de 603µg/g (marca J), 1250µg/g (marca L) e 916µg/g (marca M). Isso indica o uso de diferentes cultivares de cebola como matéria-prima e diferença nas condições de processamento e estocagem. O estágio de maturação da matéria-prima pode ser outro fator.

Salsa desidratada apresentou altos teores da flavona apigenina. Não houve diferença significativa entre as quatro marcas analisadas. Embora este tempero

seja utilizado em pequenas quantidades em sopas, carnes, entre outros, é uma importante fonte de apigenina na dieta, pois esta flavona é raramente encontrada em outros alimentos. Os teores encontrados neste estudo foram 11 a 16 vezes maiores que os reportados nas amostras de salsa *in natura* (Capítulo 3 desta tese), devido à retirada de água durante a desidratação, indicando, provavelmente, poucas perdas durante este processo.

O resultado deste estudo indica perda de flavonóides durante o processamento e estocagem de alimentos. Isso deve ser confirmado, monitorando os teores desde a matéria-prima até os produtos finais e durante a estocagem, apontando os fatores que promovem ou inibem a degradação. Obviamente, há necessidade de estudos de elucidação dos mecanismos de degradação de flavonóides, quase inexistentes no momento. Resultados de tais estudos podem auxiliar na otimização das condições de processamento e estocagem para melhor retenção de flavonóides.

4 – LITERATURA CITADA

Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, 1992, 18: 1-29.

Franke, A. A.; Cooney, R. V.; Custer, L. J.; Mordan, L. J.; Tanaka, Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Manthey JA, Buslig BS, editores. *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum; 1998.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*, 1997, 146: 223-230.

Neuhouser, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*, 2004, 50: 1-7.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 1993, 342: 1007-1011.

Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Arch Intern Med*, 1995, 155: 381-386.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Kromhout, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 1997, 349: 699-699.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatella, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J Clin Res Ed* 1996, 312: 478-481.

Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K, Folsom, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 1999, 149: 943-949.

Ribani, R. H. Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006.

Khachik, F.; Beecher, G. R.; Goli, M. B.; Lusby, W. R. Separation and quantification of carotenoids in foods. *Meth Enzymol*, 1992, 213: 347-359.

5 – AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora, à FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos PRONEX n° 2003/10151-4 e Projeto Universal n° 477189/2004-0, respectivamente.

CAPÍTULO 5

Comportamento de flavonóis em couve, espinafre e rúcula minimamente processados durante a estocagem

LÍSIA SENGER HUBER
DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA
CLAIRE I. G. L. SARANTÓPOULOS

Artigo a ser submetido a Food Control

Comportamento de flavonóis em couve, espinafre e rúcula minimamente processados durante a estocagem

LÍLIA S. HUBER, DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA*, CLAIRE I. G. L. SARANTÓPOULOS

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP,
Brasil

RESUMO

O processamento mínimo de hortaliças vem crescendo estimulado pela crescente demanda por produtos de alta qualidade, nutritivos, frescos e práticos ao uso. Os efeitos desta nova tendência de comercialização nas substâncias bioativas, promotoras da saúde, deve ser investigado. Neste trabalho, foi estudado o comportamento dos flavonóis em couve, espinafre e rúcula minimamente processados durante a estocagem em atmosfera modificada sob diferentes condições de temperatura e luz, cobrindo o período de vida útil desses alimentos, o qual foi determinado através da avaliação da qualidade sensorial. Quercetina e kaempferol em couve foram estáveis durante a estocagem por 15 dias a 1°C sem luz. A 11°C sem luz, quercetina foi estável durante 10 dias, aumentando ligeiramente no 8° dia. Kaempferol diminuiu no 5° dia, aumentou no 8° dia, diminuindo novamente no 10° dia. Após cinco dias a 11°C com luz, os níveis foram significativamente maiores que os teores iniciais. Em espinafre estocado a 1°C sem luz, quercetina diminuiu no 4° dia, aumentou no 7° dia, permanecendo em níveis maiores que o inicial até o 10° dia, decrescendo no 15° dia a teor equivalente ao inicial. Kaempferol diminuiu no 2° dia, aumentou no 7° dia e diminuiu novamente no 15° dia. A 9°C sem luz, quercetina diminuiu no 2° dia, aumentou no 4° dia, permanecendo em níveis bem maiores que o inicial até o 15° dia. Kaempferol também diminuiu no 2° dia e aumentou no 4°, porém decresceu gradualmente a teor equivalente ao inicial em 15 dias. A 9°C com luz, os flavonóis

aumentaram do 1° ao 2° dia, diminuindo no 7°. Em rúcula a 1°C sem luz, os flavonóis permaneceram estáveis até o 8° dia, aumentando no 12° dia. A 9°C, quercetina e kaempferol aumentaram durante cinco dias de estocagem sem luz e três dias com luz. Os resultados demonstram que não ocorreram perdas pronunciadas nos teores de quercetina e kaempferol durante a estocagem em atmosfera modificada nas três folhas minimamente processadas, podendo inclusive aumentar os teores em certos períodos de armazenamento.

Palavras-chave: flavonóis, hortaliças, processamento mínimo

SUMMARY

Minimal processing of vegetables is expanding, stimulated by the increased demand for high quality, nutritive, fresh and convenient-to-use products. The effects of this new commercialization trend on bioactive substances, which promote health, have to be investigated. In the present work, the behavior of flavonoids in minimally processed kale, New Zealand spinach and roquette during modified atmosphere storage, under different conditions of temperature and light exposure, covering the shelf life of these foods as determined by sensory evaluation, was investigated. In kale, quercetin and kaempferol were stable during storage for 15 days at 1°C in the absence of light. At 11°C in the dark, quercetin was stable during 10 days, increasing slightly on the 8th day. Kaempferol decreased up to the 5th day but increased on the 8th day, decreasing again on the 10th day. After 5 days at 11°C under light, the flavonol levels were significantly higher than those of the initial values. In New Zealand spinach stored at 1°C without light, quercetin decreased on the 4th day and increased on the 7th day, remaining at levels higher than the initial value up to the 10th day, but decreasing to the initial value on the 15th day. Kaempferol decreased on the 2nd day, but increased up to the 7th day, decreasing again on 15th day. In samples stored at 9°C in the dark, quercetin decreased on the 2nd day, but increased on the 4th day, remaining at levels much higher than the initial value up to the 15th day. Kaempferol also decreased on the 2nd day and increased on the 4, but thereafter

decreased gradually to a value equivalent to the initial level in 15 days. At 9°C under light, the flavonols presented increasing values from the 1st to the 2nd day, subsequently decreasing on the 7th day. In roquette stored at 1°C in the absence of light, both flavonols remained stable up to the 8th day, increasing on the 12th day. At 9°C, both flavonols increased during storage, as observed for 5 days in the dark and for 3 days under light. The results showed no pronounced loss of quercetin and kaempferol during modified atmosphere storage of the three minimally processed leafy vegetables, the levels even increasing at certain periods of storage.

Keywords: flavonols, leafy vegetables, minimal processing

1 – INTRODUÇÃO

O consumo freqüente de frutas e hortaliças está associado ao baixo risco de câncer (Block, Patterson e Subar, 1992; Franke, Cooney, Custer, Mordan e Tanaka, 1998; Knekt *et al.* 1997; Neuhouser, 2004) e doenças cardiovasculares (Hertog, Feskens, Hollman, Katan e Kromhout, 1993; Hertog *et al.* 1995; Hertog, Feskens e Kromhout, 1997; Knekt, Jarvinen, Reunanen e Maatela, 1996; Yochum, Kushi, Meyer e Folsom, 1999). Esta proteção tem sido atribuída a fitoquímicos presentes nestes alimentos, como por exemplo, os flavonóides. Os flavonóides pertencem à classe dos polifenóis, apresentam atividade antioxidante (DiSilvestro, 2001; Castellucio *et al.*, 1995; Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley e Pridham, 1995), sendo também capazes de modular a atividade de algumas enzimas (Fiander e Schneider, 2000; Makela, Poutanen, Kostian, Lehtimaki e Salo, 1995) e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares (Kuntz, Wenzel e Daniel, 1999; Wenzel, Kuntz, Brendel e Daniel, 2000).

Os produtos minimamente processados, conhecidos como *fresh cut*, têm se destacado no mercado, seguindo a tendência mundial de consumo de alimentos saudáveis, frescos e de alta qualidade. O processamento mínimo de hortaliças

inclui operações de seleção, lavagem, classificação, fatiamento, sanitização, centrifugação, embalagem e refrigeração, realizadas de modo a obter-se um produto fresco que necessite de um mínimo de preparo para consumo.

O estilo de vida moderno da população, que diminui o tempo disponível para o preparo das refeições, o aumento do poder aquisitivo e conscientização do consumidor em relação à saúde, são fatores que contribuem para aumentar de forma significativa a demanda por alimentos minimamente processados (Baldwin, Nisperos-Carriedo e Baker, 1995).

No entanto, os cortes e o aumento da superfície respiratória dos alimentos minimamente processados, aumentam a atividade de algumas enzimas do metabolismo vegetal, tais como catalase, peroxidase e polifenol oxidase (Bolin e Huxsoll, 1991), podendo diminuir a qualidade e o tempo de vida dos produtos (Wiley, 1994; Moretti, Marouelli e Silva, 2002). Essas enzimas causam o aparecimento de odores (*off flavors*), escurecimento do vegetal, lignificação da parede celular (Brecht, 1995).

Buscando minimizar as perdas sensoriais e nutricionais, bem como o crescimento microbiano, utilizam-se atualmente medidas como a estocagem dos alimentos minimamente processados em baixas temperaturas, assim como o uso de embalagens com atmosfera modificada e revestimentos comestíveis (Gurbuz Gunes e Chang Lee, 1997; Zagory e Kader, 1988).

Este trabalho teve como objetivo determinar o comportamento dos flavonóis de couve, espinafre e rúcula minimamente processados durante a estocagem em atmosfera modificada.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Reagentes e padrões

Para a preparação das amostras, padrões e fases móveis, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA). Ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de quercetina e kaempferol foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL, e conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses em -18°C.

2.2 – Processamento mínimo

Foram adquiridas amostras comerciais de couve, espinafre e rúcula, minimamente processados, de uma empresa de processamento mínimo localizada na cidade de São Roque, SP. As amostras foram processadas e imediatamente transportadas (acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável) ao Centro de Tecnologia de Embalagens, no Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas, SP, onde foram armazenadas para análise.

Durante o processamento mínimo, folhas de couve, espinafre e rúcula passaram por um processo de pré-limpeza, retirada do excesso de talos e seleção pela aparência e integridade. Couve e rúcula foram lavadas com água clorada a aproximadamente 6°C; espinafre foi lavado com sabão para vegetais. As folhas de couve foram cortadas em tiras de 2mm. Seguiu-se de sanitização por imersão em

solução de hipoclorito (couve) ou ácido peracético (espinafre e rúcula), novo enxágüe em água e centrifugação a baixa velocidade de rotação. Após a sanitização com ácido peracético, as folhas de rúcula foram imersas em solução de ácido cítrico. Estas etapas foram realizadas em sala refrigerada em torno de 15°C. Porções de aproximadamente 150g de couve foram colocadas em bandejas de poliestireno expandido e envoltas com filme esticável de PVC (cloreto de polivinila). Porções de espinafre e rúcula (150g e 200g) foram colocadas em embalagens flexíveis termosseladas. O material da embalagem foi composto por um filme multicamada à base de polipropileno bi-orientado (BOPP) e polietileno de baixa densidade (PEBD). Foi injetado nitrogênio nas embalagens contendo espinafre para gerar uma atmosfera modificada de baixo teor de oxigênio e conferir proteção mecânica ao produto, devido ao estufamento da embalagem. Nas embalagens contendo rúcula, foi injetado ar também para conferir proteção mecânica e para evitar anaerobiose durante a estocagem.

2.3 – Armazenamento

O armazenamento das embalagens foi feito a uma temperatura média de 1°C na ausência de luz, e a uma temperatura média de 9°C (para espinafre e rúcula) ou 11°C (para couve), na ausência e presença de luz. As amostras armazenadas na presença de luz ficaram em prateleiras especiais com duas lâmpadas em cada nível de estocagem, com comprimento igual ao da prateleira, de marca Osram, modelo 30W/765, luz do dia.

2.4 – Avaliação da qualidade sensorial

A qualidade sensorial das amostras foi determinada através das análises da aparência geral do produto (para rúcula), qualidade geral das folhas, murchamento e deterioração (para couve, rúcula e espinafre), descoloração e odor (para couve e espinafre).

As alterações na qualidade sensorial foram avaliadas por um grupo de 10 provadores não-treinados (para couve e rúcula) e 14 provadores não-treinados (para espinafre). O odor indesejável foi avaliado por três provadores. Todos os atributos foram avaliados em uma escala estruturada de cinco pontos. Os pontos das escalas para qualidade geral e aparência geral (rúcula) e qualidade visual (couve e espinafre) foram: 1 - Péssima, 2 - Ruim, 3 - Regular, 4 - Boa, 5 - Excelente. Os pontos das escalas de murchamento e deterioração (rúcula) foram: 1 – Muito intenso(a), 2 – Intenso(a), 3 - Moderado(a), 4 - Leve e 5 - Ausente. Os pontos das escalas de descoloração, murchamento, deterioração e odor (couve e espinafre) foram: 1 - Ausente, 2 - Leve, 3 - Moderado(a), 4 - Intenso(a) e 5 - Muito intenso(a). Para cada provador foi apresentada uma embalagem do produto, de cada tratamento. Considerou-se a nota três como limite de aceitabilidade do produto para cada atributo de qualidade avaliado.

2.5 – Determinação de flavonóis

A análise dos flavonóis foi realizada enquanto a qualidade sensorial das hortaliças analisadas apresentavam-se dentro dos limites de aceitabilidade. Assim, as amostras de couve armazenadas a 1°C na ausência de luz foram analisadas aos 1, 3, 5, 8, 10, 12 e 15 dias; as armazenadas a 11°C na ausência de luz, aos 1, 3, 5, 8 e 10 dias e na presença de luz, aos 1, 3 e 5 dias. As amostras de espinafre armazenadas a 1°C e 9°C na ausência de luz foram analisadas aos 1, 2, 4, 7, 10 e 15 dias; as armazenadas a 9°C na presença de luz, aos 1, 2, 4 e 7 dias. As amostras de rúcula armazenadas a 1°C na ausência de luz foram analisadas aos 2, 3, 5, 8 e 12 dias; as armazenadas a 9°C na ausência de luz, aos 2, 3 e 5 e na presença de luz, aos 2 e 3 dias.

Três embalagens foram misturadas para cada análise, sendo que uma sub-amostra foi retirada e triturada em processador de alimentos. Alíquotas dessa sub-amostra foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (conforme o tipo de amostra, variando de 1:1 para couve e espinafre a 1:2 para rúcula) e

ácido ascórbico e homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de ácido clorídrico (HCl), sendo 5M para couve e espinafre e 8M para rúcula. A solução de extração assim obtida consistiu de diferentes concentrações molares finais de HCl (1M para couve e espinafre e 1,6M para rúcula) em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Esta solução foi levada a refluxo a 90°C por 6 horas para couve e espinafre e 5 horas para rúcula. Estas condições foram previamente otimizadas através de um delineamento composto central rotacional, como mostrado no Capítulo 2. Em seguida, os extratos foram resfriados e filtrados em funil sinterizado de porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e as soluções foram colocadas em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE. As análises foram conduzidas em triplicata.

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690) (Milford, EUA), controlado por Software Millenium 32 e equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm.

Foi utilizada coluna Nova-Pak C18 (4µm, 3,9x150mm). O fluxo da fase móvel foi 1mL/min e o volume de injeção 20µL. A fase móvel foi metanol:água (acidificados com ácido fórmico) em gradiente começando com 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos.

A identificação dos flavonóis foi feita utilizando-se tempos de retenção, co-cromatografia e espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos, em comparação com padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, simulando as condições após hidrólise das hortaliças, sendo que alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada Milli-Q com ácido ascórbico para obter-se 0,04% na solução de injeção. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 5M e o volume foi completado a 5mL com metanol. As curvas padrões passaram pela origem e foram lineares nas faixas de concentração estabelecidas. Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99.

2.6 – Análise dos Dados

Com a finalidade de se definir se existiu ou não diferença significativa entre os valores obtidos para os teores de flavonóides avaliados em hortaliças analisadas durante a estocagem, realizou-se análise de variância ($p < 0.05$), sendo que as médias foram comparadas através do Teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Comportamento de flavonóis em couve minimamente processada

A *Figura 1* apresenta os gráficos obtidos para os parâmetros de qualidade sensorial avaliados em couve minimamente processada.

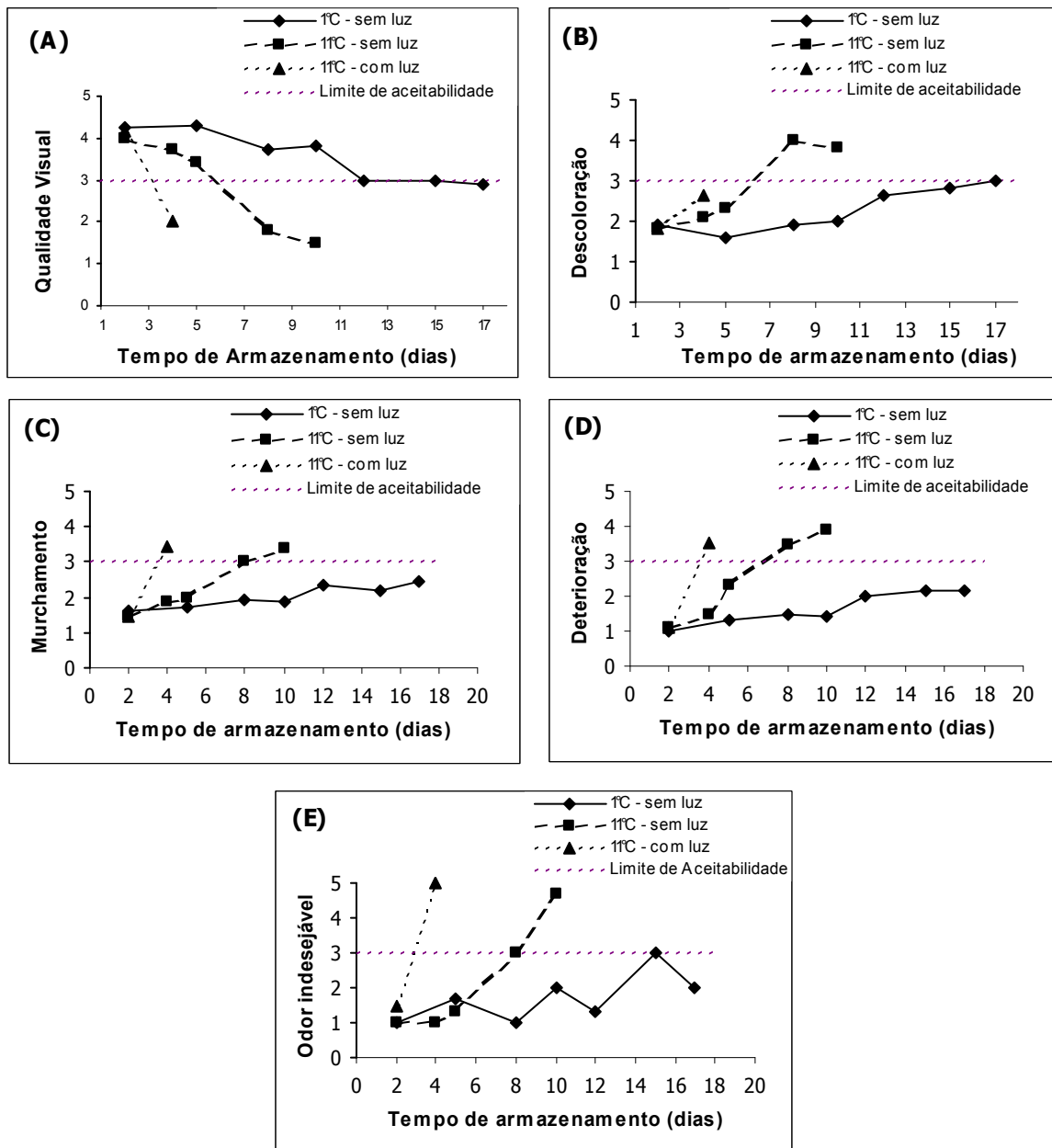


Figura 1. Qualidade sensorial de couve minimamente processada, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) qualidade geral das folhas; (B) descoloração; (C) murchamento; (D) deterioração e (E) odor.

Pela qualidade visual e desenvolvimento de odor indesejável, o tempo de vida útil para as amostras estocadas a 1°C na ausência de luz foi estimado em 15 dias. Durante este período, os atributos murchamento e deterioração continuaram dentro da faixa aceitável. Para as amostras estocadas a 11°C na ausência de luz,

a vida útil foi de seis dias, também pelos atributos de qualidade visual e descoloração. A couve estocada a 11°C na presença de luz atingiu o limite de aceitabilidade para odor indesejável e qualidade visual já no 3º dia, sendo este considerado o tempo de vida útil para essas amostras.

A vida útil das amostras de couve foi, portanto, reduzida mais da metade pelo aumento da temperatura de 1°C para 11°C e pela metade pela exposição a luz a 11°C.

A *Figura 2* mostra os teores de flavonóis durante a estocagem de couve minimamente processada.

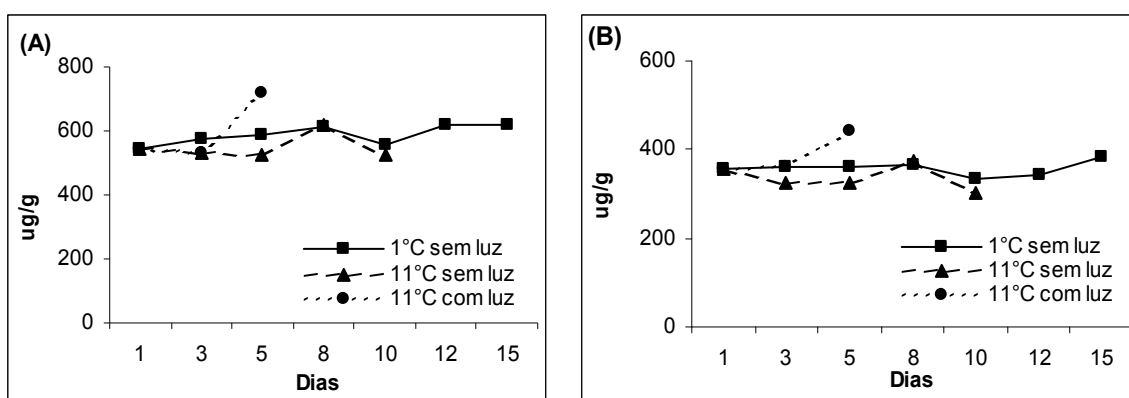


Figura 2. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em couve minimamente processada durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 11°C na ausência e presença de luz.

Os flavonóis quercetina e kaempferol, encontrados nas amostras de couve, foram estáveis durante os 15 dias de estocagem a 1°C na ausência de luz, com o kaempferol aumentando ligeiramente no 15º dia. A 11°C na ausência de luz, a quercetina teve um ligeiro aumento no 8º dia de armazenamento, porém, voltou ao nível inicial em 10 dias. Kaempferol diminuiu até o 5º dia, aumentou no 8º dia e diminuiu novamente no 10º dia. Os níveis de quercetina e kaempferol nas

amostras estocadas a 11°C com luz, foram equivalentes no 1° e 2° dias, porém em cinco dias, estes foram estatisticamente maiores que os iniciais.

3.2 – Comportamento de flavonóis em espinafre minimamente processado

Na *Figura 3* são apresentados os resultados referentes à análise sensorial de espinafre minimamente processado.

A vida útil para espinafre estocado a 1°C e 9°C, na ausência de luz, foi aproximadamente 13 e nove dias, respectivamente. Para essas amostras, a vida útil foi determinada pela qualidade visual, que atingiu o limite de aceitabilidade neste período. Murchamento e deterioração (“ensopamento”) alcançaram o limite de aceitabilidade em 15 dias, porém a descoloração e odor permaneceram aceitáveis até 15 dias. O espinafre estocado a 9°C com luz, não atingiu o limite de aceitabilidade em sete dias de análise.

A elevação da temperatura também reduziu a vida de prateleira do espinafre, mas em menor extensão que na couve. Infelizmente, por falta de amostras, o efeito da luz não pode ser avaliado.

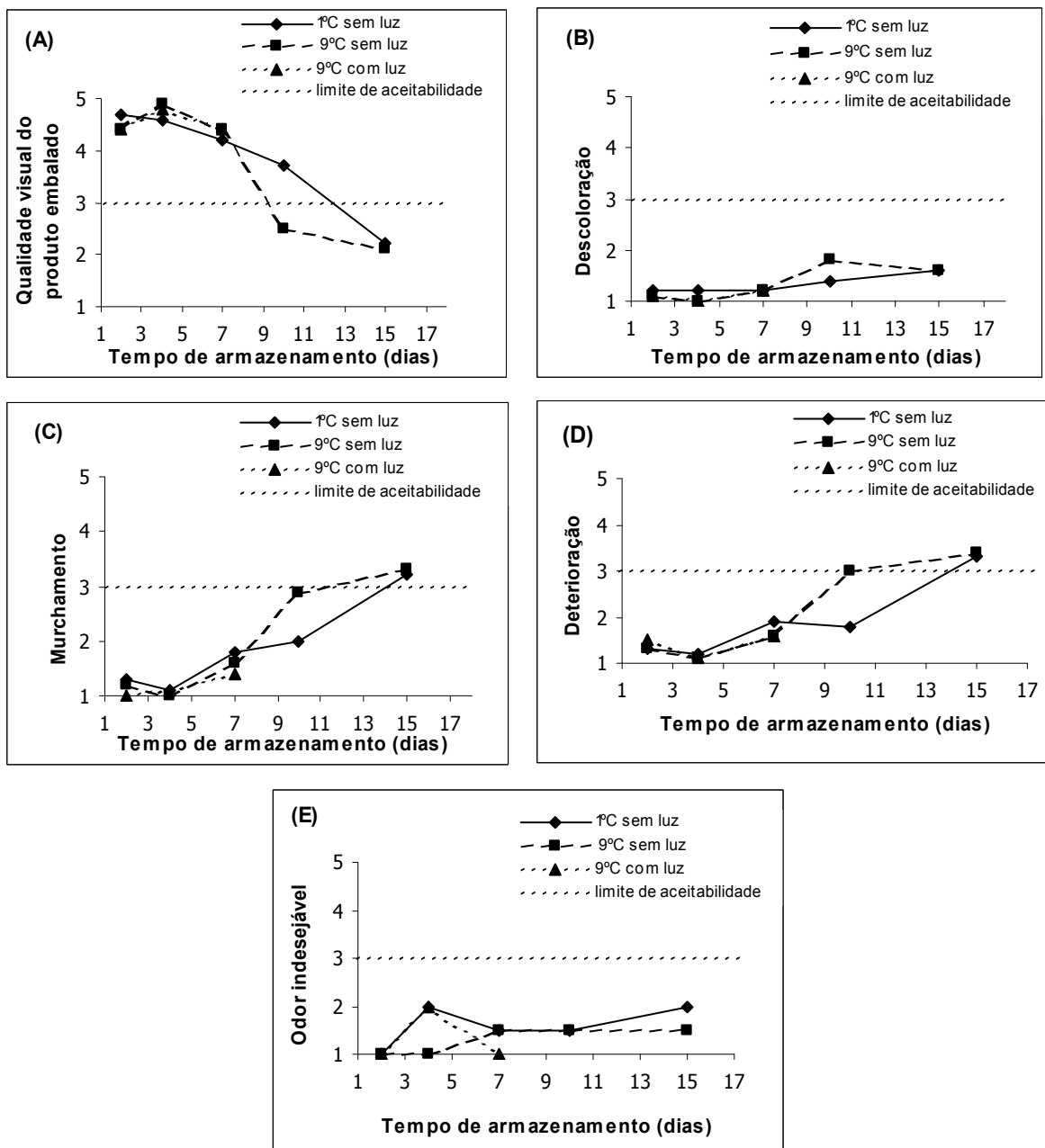


Figura 3. Qualidade sensorial de espinafre minimamente processado, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) qualidade geral das folhas; (B) descoloração; (C) murchamento; (D) deterioração e (E) odor.

A *Figura 4* apresenta os dados obtidos dos teores de flavonóides em espinafre minimamente processado.

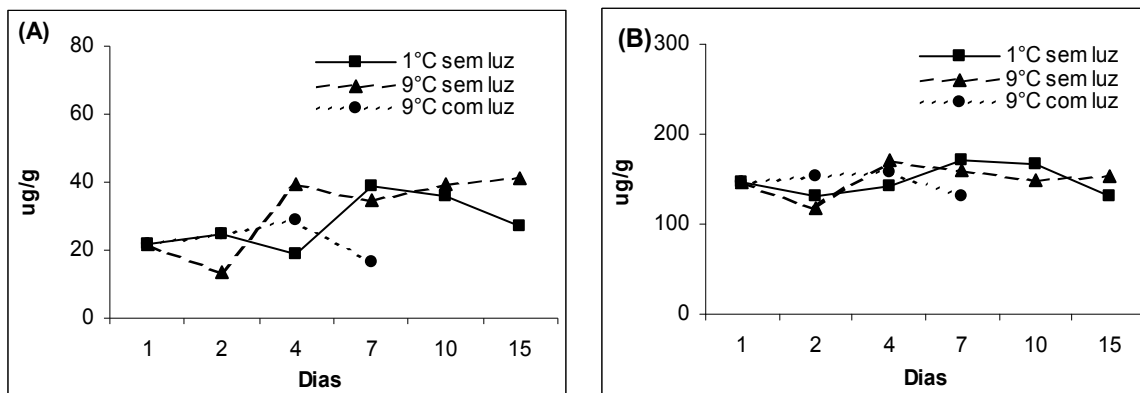


Figura 4. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em espinafre minimamente processado durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 9°C na ausência e presença de luz.

Nas amostras a 1°C sem luz, quercetina diminuiu no 4° dia, aumentou no 7° dia, permanecendo com teores maiores que os iniciais até o 10° dia, diminuiu em 15 dias, a níveis equivalentes aos do 1° dia. Kaempferol diminuiu no 2° dia, mas aumentou até o 7° dia, diminuindo novamente no 15° dia. A 9°C sem luz, a quercetina diminuiu no 2° dia, porém aumentou no 4°, permanecendo em níveis bem maiores que o inicial até o 15° dia. Kaempferol também diminuiu no 2° dia e aumentou no 4° dia, diminuindo gradualmente a um valor equivalente ao inicial em 15 dias. A 9°C com luz, os flavonóis apresentaram teores crescentes do 1° ao 4° dia, porém diminuíram no 7° dia. Não houve uma tendência clara quanto ao efeito da elevação da temperatura de 1°C a 9°C e a presença de luz.

3.3 – Comportamento de flavonóis em rúcula minimamente processada

A *Figura 5* apresenta os resultados da avaliação dos atributos sensoriais de rúcula minimamente processada.

Em 12 dias de análise, os atributos de qualidade analisados para as amostras a 1°C e 9°C sem luz, permaneceram aceitáveis, não sendo possível estimar a vida

útil dessas. Pela aparência geral do produto, a rúcula estocada a 9°C na presença de luz, teve a vida útil estimada em três dias.

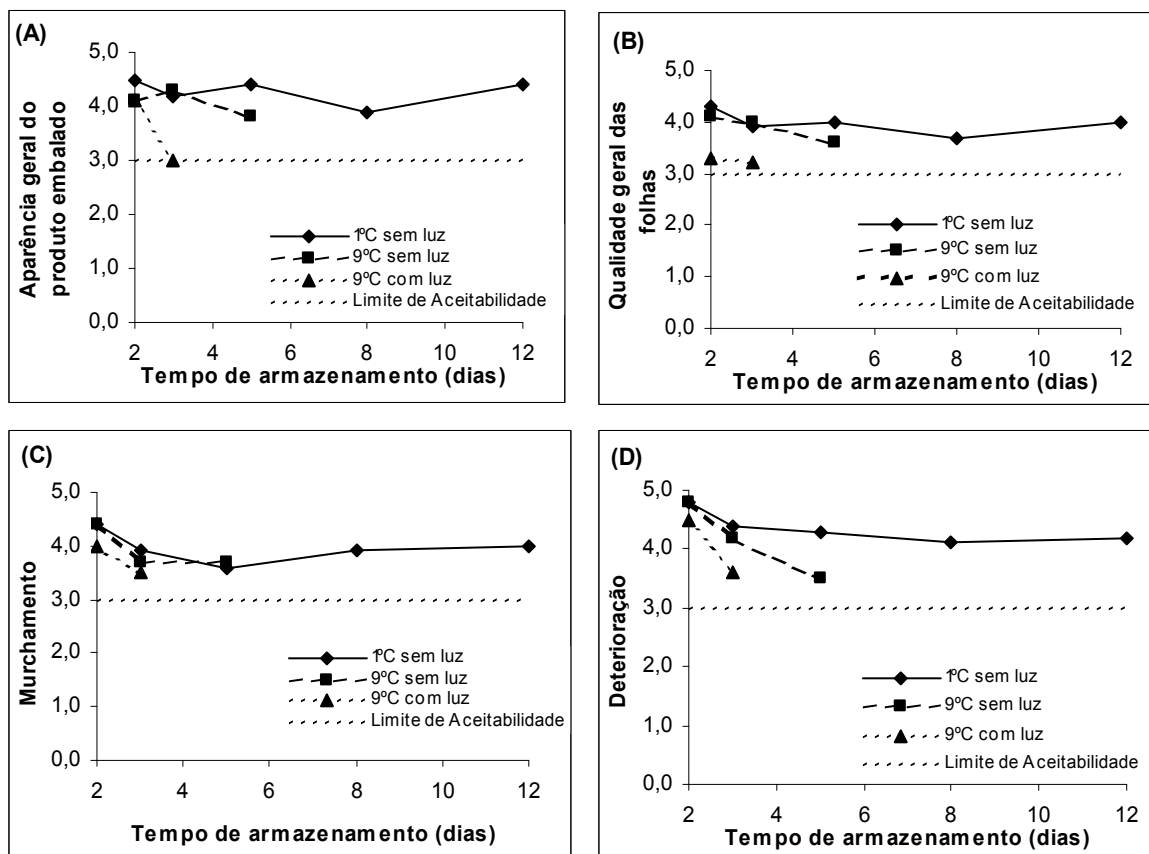


Figura 5. Qualidade sensorial de rúcula minimamente processada, durante estocagem em diferentes condições de luz e temperatura. (A) aparência geral do produto; (B) qualidade geral das folhas; (C) murchamento e (D) deterioração.

A *Figura 6* apresenta os teores de flavonóis durante a estocagem de rúcula minimamente processada.

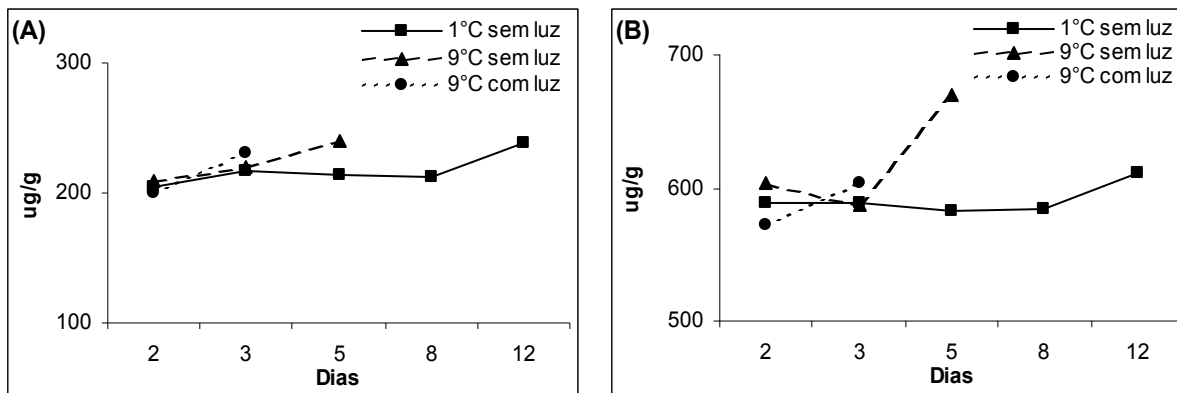


Figura 6. Teores de (A) quercetina e (B) kaempferol em rúcula minimamente processada durante estocagem a 1°C na ausência de luz e 9°C na ausência e presença de luz.

As amostras estocadas a 1°C na ausência de luz apresentaram teores de quercetina e kaempferol estáveis até o 8º dia. Aos 12 dias, os níveis destes compostos aumentaram. Quercetina e kaempferol, em amostras armazenadas a 9°C sem luz, aumentaram em cinco dias de estocagem. Este perfil foi o mesmo observado nas amostras a 9°C com luz, porém para três dias de estocagem. Com exceção do teor de kaempferol no 3º dia, a elevação da temperatura de estocagem, de 1°C para 9°C, aumentou os teores de quercetina e kaempferol. Não foi observado efeito da luz durante o curto tempo de estocagem.

Os resultados demonstram que a perda de flavonóis não constitui um problema sério na estocagem de folhas minimamente processadas, podendo inclusive ocorrer aumentos dos teores em certos períodos de armazenamento.

Gil, Ferreres e Tomás-Barberán (1999) estudaram o efeito da estocagem e processamento nos teores de flavonóides em espinafre minimamente processado e verificaram que o conteúdo total destes compostos permaneceu estável após sete dias de estocagem a 10°C em embalagens contendo ar ou atmosfera modificada.

Neste caso, cabe esclarecer que o espinafre consumido no Brasil (*Tetragonia expansa*) não é o mesmo consumido nos países da Europa (*Spinacea oleracea*).

Viña e Chaves (2007) avaliaram o conteúdo de fenólicos totais e as flavonas apigenina e luteolina em aipo minimamente processado, de zero a 24 horas após o processamento, e estocadas a 0, 10 e 20°C em bandejas cobertas com filme de PVC. Os teores de apigenina e luteolina aumentaram entre duas e seis horas após o processamento, dependendo da temperatura de estocagem. No entanto, esses teores após 24 horas foram comparáveis ou ligeiramente maiores que os níveis iniciais. O efeito da temperatura foi verificado nos fenólicos totais, sendo que a 0°C, os teores foram constantes e a 10°C e 20°C houve tendência de aumento nas primeiras horas, seguindo com níveis equivalentes aos iniciais até 24h. Os autores concluíram que a temperatura de 0°C pode ter atuado na inibição da resposta dos fenólicos ao processamento.

Ferreres, Gil, Castañer e Tomás-Barberán (1997) verificaram que os glicosídeos de quercetina em alfaces minimamente processadas e estocadas a 5°C em embalagens plásticas perfuradas e mantidas em pequenas salas com ar umidificado, foram estáveis durante 14 dias em alface branca e verde. Em alface vermelha, onde os níveis são mais elevados, houve aumento em sete dias e decréscimo até o final do período, 14 dias.

Nove entre 11 variedades de alface e chicória *in natura*, mantidas intactas, avaliadas por DuPont, Mondin, Williamson e Price (2000) mostraram decréscimo no conteúdo de flavonóides glicosilados durante estocagem a 1°C por sete dias; uma variedade não foi significativamente afetada e outra mostrou um aumento nos teores.

A elevação da temperatura e exposição à luz pode ter dois efeitos com conseqüências opostas nos teores de flavonóides. Pode aumentar a biossíntese dos flavonóides ou pode acelerar a sua degradação. Os níveis destes compostos, portanto, refletiriam o efeito que estaria prevalecendo.

No caso de vegetais minimamente processados, como não houve tratamento térmico, as enzimas biossintéticas poderiam estar ainda atuando. Por outro lado, o corte das folhas poderiam ter destruído a compartimentalização de enzimas-substratos, pelo rompimento da parede celular. Assim, enzimas degradativas seriam liberadas, e poderiam agora agir sobre os flavonóides, provocando a sua degradação. Desta maneira, o resultado dos processos de biossíntese e degradação (aumento ou diminuição) nos teores de flavonóides depende do processo que estará atuando mais intensamente.

A biossíntese seria favorecida quanto mais preservada a integridade celular. A destruição da estrutura celular promoveria a degradação enzimática. Neste trabalho, as folhas de couve foram cortadas em tiras, enquanto as de espinafre e rúcula foram deixadas inteiras. Portanto, o aumento nos teores de flavonóides foi mais pronunciado nas duas últimas folhas.

Outra possível razão para o aumento dos teores de flavonóides seria decorrente das mudanças nos teores de água no vegetal durante a estocagem. Essa hipótese foi avaliada nas amostras de couve e verificou-se que os teores de umidade foram constantes até o final do experimento, não interferindo nas concentrações dos flavonóides.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldwin, E. A.; Nisperos-Carriedo, M.O. & Baker, R.A. (1995) Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30(1), 35-38.

Block, G.; Patterson, B. & Subar, A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1-29.

Bolin, H. R. & Huxsoll, C. C. (1991) Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *Journal of Food Science*, 56(2), 416-418.

Brecht, J. K. (1995) Physiology of lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30(1), 18-22.

Castelluccio, C.; Paganga, G.; Melikian, N.; Bolwell, G.P.; Pridham, J.; Sampson, J. & Rice-Evans, C. (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 368, 188-192.

DiSilvestro, R. A. (2001) Flavonoids as antioxidants. In: Widman, R. E. C., *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press LLC.

DuPont, M. S.; Mondin, Z.; Williamson, G. & Price, K. R. (2000) Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3957-3964.

Ferreres, F.; Gil, M. I.; Castañer, M. & Tomás-Barberán, F. A. (1997) Phenolic metabolites in red pigmented lettuce. Changes with minimal processing and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4249-4254.

Fiander, H. & Schneider, H. (2000) Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Letters*, 156(1), 17-24.

Franke, A. A.; Cooney, R. V.; Custer, L. J.; Mordan, L. J. & Tanaka, Y. (1998) Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Manthey, J. A., Buslig, B. S. *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum.

Gil, M. I.; Ferreres, F. & Tomás-Barberán, F. A. (1999) Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2213-2217.

Gurbuz Gunes, A. E. & Chang Lee, Y. (1997) Color of minimally processed potatoes as affected by modified atmosphere packaging and antibrowning agents. *Journal of Food Science*, 62, 572-575.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. & Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.

Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M. & Kromhout, D. (1997) Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 349, 699.

Hertog, M. G. L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A. & Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 312, 478-481.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliovaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E. & Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, 146, 223-230.

Kuntz, S.; Wenzel, U. & Daniel, H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38, 133-142.

Makela, S.; Poutanen, M.; Kostian, M. L.; Lehtimäki, N. & Salo, L. (1995) Inhibition of 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. In: 3rd *Int. Conf. Phytoestrogens*, Little Roc, AK.

Moretti, C. L.; Marouelli, W. A. & Silva, W. L. C. (2002) Respiratory activity and browning of minimally processed sweet potatoes. *Horticultura Brasileira*, 20, 497-500.

Neuhouser, M. L. (2004) Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50, 1-7.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. & Melo, L. F.C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Bolwell, G. P.; Bramley, P. M. & Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.

Viña, S. Z. & Chaves, A. R. (2007) Respiratory activity and phenolic compounds in pre-cut celery. *Food Chemistry*, 100, 1654-1660.

Wenzel, U.; Kuntz, S.; Brendel, M. D. & Daniel, H. (2000) Dietary flavone is a potential apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60, 3823-3831.

Wiley, R.C. (1994) *Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. London: Chapman & Hall, 357 p.

Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K. & Folsom, A. R. (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 149, 943-949.

Zagory, D. & Kader, A. A. (1988) Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technology*, 42(9), 70-77.

5 – AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa à primeira autora, à Fapesp e ao CNPq, pelo financiamento dos Projetos PRONEX nº 2003/10151-4 e Projeto Universal nº 477189/2004-0, respectivamente. Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (Ital) e à Empresa Hydrosalads.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As melhores condições para hidrólise dos flavonóides variam entre as hortaliças e podem ser estabelecidas eficientemente por Delineamento Estatístico de Composição Central e Análise por Superfície de Resposta.
2. Quercetina foi encontrada nas amostras de alface lisa, alface crespa, cebola nacional, argentina e roxa, couve, espinafre e rúcula, sendo que kaempferol foi encontrado nas três últimas. Apigenina só foi detectada em salsa, em alta concentração.
3. Dentre as amostras alimentícias analisadas, a melhor fonte de quercetina foi cebola roxa e de kaempferol foi rúcula.
4. Os teores de flavonóides nas hortaliças avaliadas em diferentes épocas do ano tenderam a ser maiores no verão que no inverno.
5. Miricetina e luteolina não foram detectadas em nenhuma das amostras de hortaliças analisadas.
6. Os teores de flavonóis foram maiores nas polpas de frutas que nos sucos concentrados, sendo que os sucos prontos para o consumo apresentaram os menores teores, para as três frutas (caju, acerola e pitanga) analisadas. Cebola desidratada apresentou grande variação nos teores de quercetina.
7. Os teores encontrados nos alimentos processados foram menores que os previamente obtidos em amostras *in natura*, indicando perda durante processamento e estocagem.

8. A qualidade sensorial de couve, espinafre e rúcula minimamente processadas foi negativamente influenciada pelo aumento da temperatura de estocagem de 1°C para 9°C (ou 11°C) e pela presença de luz.

9. A perda de flavonóides não constitui um problema sério na estocagem de folhas minimamente processadas.