

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

COMPOSTOS FENÓLICOS EM ERVA-MATE E FRUTAS

Rosemary Hoffmann Ribani

Engenheira Química
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Profa. Dra. Delia 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

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

R352c

Ribani, Rosemary Hoffmann

Compostos fenólicos em erva-mate e frutas/ Rosemary Hoffmann
Ribani. – Campinas, SP:[s.n.], 2006.

Orientador: Delia Rodriguez-Amaya

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

.....1. Flavonóides. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Fruta. 4.

Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Rodriguez-Amaya, Delia.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Dra Delia Rodriguez-Amaya
(Orientadora)

Dr. Agenor Maccari Junior

Dra. Helena Teixeira Godoy

Dra. Marisa Padula

Dra. Mieko Kimura

Dra. Myrna Sabino

DEDICO,
esta conquista ao meu amor Marcelo,
marido dedicado e companheiro,
às filhas amadas Esther, Giulia e Hanna Louise,
e a amada Gertrud, mãe e incentivadora.
Obrigada!

Tudo o tempo leva...
A própria vida não dura.
Com sabedoria,
Colhe a alegria de agora
Para a saudade futura.

HELENA KOLODY

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo seu amor e constante proteção, e à **Maria**, meiga mãe do meu Jesus.

À Profa. Dra. **Delia Rodriguez-Amaya** pela dedicada e sábia orientação, imprescindível durante o decorrer do trabalho. *Foi um privilégio ser sua aluna, meu profundo agradecimento.*

Aos professores, Dr. **Agenor Maccari Junior**, Dra. **Helena Teixeira Godoy**, Dra. **Marisa Padula**, Dra. **Myrna Sabino** e Dra. **Mieko Kimura**, membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao **PICDT-UFPR** pela concessão de bolsa de doutorado e aos professores do **Departamento de Engenharia Química** da UFPR pela liberação para execução do trabalho.

Aos professores da UFPR, Prof. MS. **Paulo S. G. Fontoura** pelo apoio e incentivo nas horas boas e nas difíceis, Prof. Dr. **Agenor Maccari Junior** pelo fornecimento das amostras de erva-mate e incentivos, Profa Dra. **Maria Cristina Braga** pelo uso de sua sala durante a escrita do trabalho. A funcionária da UFPR, amiga Dra. **Sônia Cachoeira Stertz** pelo constante apoio, disposição e incentivo.

Às “abelhinhas-amigas” do Laboratório de Carotenóides, **Lísia Senger Huber**, **Cintia Nanci Kobori e Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira** “No mundo existem pessoas tão boas, a quem queremos tão bem ... Não por consangüinidade, mas que na verdade são nossa família real...”

À toda minha **família, meus sogros e irmãos**, especialmente a **Josef Hoffmann Neto** grande irmão, pela atenção, conversas, e suporte emocional.

Aos caros **funcionários** do departamento de ciência de alimentos, especialmente à **Debora Subirá**, da biblioteca e da secretaria de pós-graduação, especialmente ao **Cosme**, e aos demais funcionários da faculdade de engenharia de alimentos, pela disposição em ajudar.

A **todos** que de alguma maneira contribuíram na construção desse trabalho, seja pelas sugestões, ou preciosa amizade.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	XIV
GENERAL ABSTRACT	XVII
INTRODUÇÃO GERAL	XX
CAPÍTULO 1: Flavonóides em Frutas e Erva-mate	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
<i>Biossíntese dos Flavonóides</i>	7
<i>Propriedades nas Plantas</i>	8
<i>Metabolismo dos Flavonóides</i>	9
<i>Atividade Biológica dos Flavonóides</i>	10
<i>Composição de Flavonóides em Frutas Brasileiras</i>	11
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de Método para Determinação de Flavonóis e Flavonas por CLAE em Frutas	37
RESUMO	38
SUMMARY	39
1 – INTRODUÇÃO	41
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 – Amostras	43
2.2 - Reagentes e padrões	43
2.3 - Preparo das amostras	44
2.4 – Estabelecimento das condições cromatográficas para CLAE	45
2.5 - Extração e hidrólise dos flavonóides	46
2.6. Delineamento estatístico	47
2.7 - Análise de Superfície de Resposta	49

2.8 Validação do método	50
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 - Condições cromatográficas ótimas para CLAE	51
3.2 - Condições ótimas de extração e hidrólise dos flavonóides	53
3.3 Desempenho do método desenvolvido	60
3.4 - Verificação experimental.....	61
4 - CONCLUSÕES.....	64
5 – REFERÊNCIAS	64
6 - AGRADECIMENTOS.....	69
 CAPÍTULO 3: Occurrence of Flavonols and Flavones in Tropical and Sub-tropical Fruits	71
ABSTRACT	72
INTRODUCTION	74
MATERIAL AND METHODS	75
RESULTS AND DISCUSSION	79
LITERATURE CITED	86
 CAPÍTULO 4: Determinação de flavonóis e flavonas em erva-mate e chimarrão...93	
RESUMO	94
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAIS E MÉTODOS	96
2.1. Reagentes e Soluções.	96
2.2. Amostras.	97
2.3 Preparação do chimarrão.....	97
2.4. Extração da erva-mate.....	98
2.5. Análise por CLAE.	98
2.6. Otimização da extração e hidrólise dos flavonóides por análise estatística.	99
2.7. Validação do método.	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101

3.1. Condições cromatográficas ótimas.....	102
3.2. Condições ótimas de extração e hidrólise dos flavonóides.....	103
3.3. Desempenho do método analítico.....	106
3.4. Teores de flavonóides em chimarrão e erva-mate.	108
AGRADECIMENTOS	111
REFERÊNCIAS	111
CAPÍTULO 5: Compostos fenólicos em erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> L.) e chimarrão.....	116
RESUMO	117
1. INTRODUÇÃO.....	119
2. MATERIAIS E MÉTODOS	121
2.1. Padrões e reagentes.....	121
2.3. Preparação das amostras.	122
2.4. Análise cromatográfica.....	123
2.5. Validação do método.	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
3.1. Validação do método cromatográfico.....	124
3.2. Conteúdo de rutina, ácido cafeico e 5CQA em amostras de chimarrão e erva-mate.	125
AGRADECIMENTOS	129
REFERÊNCIAS	129
CONCLUSÕES GERAIS	134

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Conteúdo de flavonóides em laranja, maçã e morango segundo alguns autores.....	17
--	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Fatores e níveis testados (valores codificados estão entre parênteses) para o Delineamento de Composição Central com pontos axiais	47
TABELA 2. Condições experimentais do delineamento estatístico de Composição Central (DCC) com pontos axiais (fatores com valores codificados)	48
TABELA 3. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático, erro puro e significância (p), para a resposta dos teores de flavonóis agliconas em pitanga	55
TABELA 4. Análise de variância (ANOVA) para os flavonóis em amostra de pitanga	56
TABELA 5. Equações de regressão em modelo codificado representando a superfície de resposta dos experimentos em teores dos flavonóis presentes nas frutas estudadas	58
TABELA 6. Propriedades das curvas analíticas	60
TABELA 7. Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados sobre a amostra de acerola.....	61
TABELA 8. Conteúdo de flavonóis em frutas analisadas segundo as condições estabelecidas neste estudo.....	63

CAPÍTULO 3

TABLE 1. Standard Curve Characteristics	81
TABLE 2. Added Amounts, Recoveries (%) and Coefficients of Variation (CV) of Acerola Samples Spiked with Flavonoids.	81
TABLE 3. Flavonol Content of Brazilian fruits.....	83
TABLE 4. Comparison of Quercetin and Kaempferol Levels in Apple, Strawberries and Orange, Reported in Different Studie	84

CAPÍTULO 4

TABELA 1: Condições experimentais do Delineamento Estatístico de Composição Central (DCC).....	100
TABELA 2: Estimativa dos efeitos da regressão do modelo polinomial quadrático, erro puro e significância (p), dos teores de flavonóis agliconas em chimarrão	104
TABELA 3: Análise de variância (ANOVA) para os flavonóis em chimarrão.....	105
TABELA 4: Propriedades das curvas analíticas	107
TABELA 5: Valores adicionados, recuperação em percentagem e Coeficientes de Variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados sobre amostra de chimarrão.	108
TABELA 6: Conteúdos ($\mu\text{g/g}$) de quercetina e kaempferol em chimarrão e erva-mate. ..	110
TABELA 7: Comparação dos níveis de flavonóis em infusões de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	111

CAPÍTULO 5

TABELA 1: Propriedades das curvas analíticas	124
TABELA 2: Valores adicionados, recuperações em percentagens e Coeficientes de Variação (CV) das recuperações dos flavonóides com amostra de chimarrão.....	125
TABELA 3: Conteúdos de rutina e 5-CQA em amostras de chimarrão e erva-mate.....	127
TABELA 4: Comparação dos níveis de 5-CQA em infusões de erva-mate.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. A- Estrutura básica dos flavonóides e B- Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4.4

FIGURA 2. Principais classes dos Flavonóides.6

FIGURA 3. Esquema ilustrando as etapas da biossíntese para formação da chalcona intermediária básica C₁₅, da qual todos flavonóides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase.8

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Cromatogramas da adição do padrão de miricetina com constituinte do extrato hidrolisado da amostra de morango, para a coluna Nova Pak C18 (3,9X150 mm, 4 µm). A) extrato hidrolisado de morango adicionado dos padrões. B) extrato hidrolisado de morango. M = Miricetina; CA = Componente da Amostra; Q = Quercetina; K = Kaempferol; Lu = Luteolina; Ap = Apigenina. Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando na proporção de 20:80, chegando a 45:55 em cinco minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear.52

FIGURA 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas M = miricetina, Q = quercetina, K = kaempferol, dos extratos hidrolisados de pitanga; goiaba; jaboticaba; figo, para coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5µm). Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando com a proporção de 20:80 passando para 48:52 em 6 minutos, esta proporção mantida até os 29 minutos, então alterada para 28:72 em 2 minutos. Finalmente aos 43 minutos alterada para a composição inicial 20:80, mantida assim até aos 60 minutos.54

FIGURA 3. Superfícies de resposta na determinação das agliconas miricetina, quercetina e kaempferol em amostras de pitanga; e quercetina em goiaba, figo e jaboticaba, em função da concentração molar do HCl e tempo de hidrólise em minutos.59

CAPÍTULO 3

FIGURE 1. Response surface of the extraction and hydrolysis of quercetin in fruits as a function of (X)= real hydrolysis time in minutes and (Z)= HCl molar concentration in

hydrolysis solution; the (Y)= regression equations in real model, and the optimum model work range for acerola, apple and cashew apple.80

FIGURE 2. HPLC chromatograms of the flavonoids aglycons of acerola, apple and cashew apple. Descriptions of the chromatographic conditions are in text., M = myricetin, Q = quercetin, K = kaempferol.....82

CAPÍTULO 4

FIGURA 1: Cromatogramas típicos dos flavonóides no A) chimarrão e B) chimarrão adicionado de padrões. Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando com 20:80, chegando em 38:62 em 1 minuto, durante 5 minutos e aos 7 minutos passando para 40:60, até os 25 minutos, voltando então para 20:80 em 5 minutos para re-equilíbrio da coluna, sempre com gradiente linear. Coluna: Nova Pak C18 (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Waters.....103

FIGURA 2: Superfícies de resposta na determinação das agliconas quercetina e kaempferol em amostras de chimarrão, em função da concentração molar do HCl, e tempo de hidrólise em minutos.....106

CAPÍTULO 5

FIGURA 1. Cromatogramas típicos de compostos fenólicos em chimarrão. A) Rutina, detectada em 370nm (tr = 28,5minutos), B) 5-CQA, detectado em 325nm (tr = 10,5minutos). Fase móvel: metanol:água (ambos com 0,45% de ácido fórmico) em gradiente linear inicial de 20:80 alterado para 30:70 em 1 minuto, esta proporção mantido até os 3 minutos, alterada para 45:55 aos 4min assim permanecendo até aos 13minutos, alterada para 100:0 até os 18 minutos, mantida até aos 20 minutos, voltando para 20:80 até os 25 minutos, assim permanecendo até os 50 minutos de corrida cromatográfica. Coluna: Symmetry C-18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) da Waters.....126

RESUMO GERAL

Considerando a possível importância dos compostos fenólicos à saúde e a falta de dados brasileiros, o presente trabalho foi realizado para quantificar os flavonóides miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina e luteolina em frutas e erva-mate. Também foram determinados o ácido cinâmico e seu ester, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) na erva-mate.

Uma revisão bibliográfica, abrangendo a biossíntese e propriedades de flavonóides nas plantas, a importância de flavonóides em saúde humana e os dados nacionais e internacionais sobre os conteúdos de flavonóides em frutas e erva-mate, é apresentada no Capítulo 1. Foram observadas variações na composição devido a fatores como variedade, clima, grau de maturação entre outros, ficando demonstrada a falta de dados sobre estes compostos, em frutas e erva-mate, mesmo no exterior.

O Capítulo 2 descreve o desenvolvimento da metodologia para a determinação dos flavonóides de interesse, na forma de aglicona, por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições cromatográficas foram definidas como: coluna de fase reversa Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) e fase móvel de metanol e água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear. Utilizando Delineamento Estatístico de Composição Central, definiu-se as condições ótimas para a hidrólise dos flavonóis à forma aglicona

para cada fruta que foram: acerola, 0,4M HCl, 90 minutos; maçã, 0,5M HCl, 70 minutos; caju, 0,2M HCl, 110 minutos; figo, 0,5M HCl, 160 minutos; goiaba, 0,6M HCl, 55 minutos; jaboticaba, 0,6M HCl, 45 minutos; laranja, 1,5M HCl, 90 minutos ; pitanga, 0,6M HCl, 40 minutos; morango, 1,2M HCl, 120 minutos de hidrólise.

Aplicando as condições estabelecidas para a análise, no Capítulo 3 estão apresentados os dados obtidos para acerola (2 cultivares), caju, goiaba (2 cultivares), figo, jaboticaba, manga, laranja (4 cultivares), mamão (3 cultivares) e pitanga, analisadas em cinco diferentes períodos, utilizando amostras compostas adquiridas em três supermercados diferentes. Os cinco flavonóides investigados não foram detectados em manga e mamão e as flavonas apigenina e luteolina não foram encontrados em nenhuma das frutas estudadas. Quercetina foi encontrada em todas as outras frutas estudadas, variando de 3,0 mg/kg na laranja cultivar Pêra a 75 mg/kg em maçã cultivar Fuji. O kaempferol foi encontrado na acerola (8,7 – 12 mg/kg), morango (7,0 – 8,9 mg/kg), pitanga (3,9 – 4,5 mg/kg) e caju (<LQ – 2,7 mg/kg). A miricetina foi detectada em pitanga (31 – 37 mg/kg) e caju (20 mg/kg).

No Capítulo 4 estão relatados os níveis de flavonóides em 24 amostras de erva-mate provenientes do Sul do Brasil e em extrato de chimarrão preparadas destas. A extração/hidrólise para obtenção das formas agliconas dos flavonóides foi definida por Delineamento Estatístico de Composição Central (1,2 M de HCl e 60 minutos de hidrólise) e as condições para análise por CLAE foram: coluna C18 Nova Pak e fase móvel metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), em gradiente linear. O teor de quercetina variou de 19 a 65 µg/mL no chimarrão e de 1090 a 3940 µg/g na erva. O kaempferol variou de 8 a 18 µg/mL no chimarrão

e de 447 a 1000 µg/g na erva. Observou-se que o preparo do chimarrão não extraiu totalmente os flavonóides da erva-mate.

O Capítulo 5 apresenta os teores obtidos por CLAE do flavonol glicosídico rutina e dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico em erva-mate e no extrato de chimarrão correspondente de 12 amostras provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul. O ácido cafeico livre não foi detectado nas amostras. O teor de rutina no chimarrão variou de 0,04 a 0,15 mg/mL e na erva-mate de 2,37 a 8,03 mg/g. O ácido 5-cafeoilquínico variou de 0,25 a 0,49 mg/mL no chimarrão e de 13,1 a 24,7 mg/g na erva-mate. A preparação de chimarrão extraiu de 82 a 96 % do conteúdo de rutina e de 98 a 101% do conteúdo de ácido 5-cafeoilquínico da erva-mate.

GENERAL ABSTRACT

Considering the potential importance of phenolic compounds in health and the lack of Brazilian data, the present work was carried out to quantify the flavonoids myricetin, quercetin, kaempferol, apigenin and luteolin in fruits and erva-mate. The cinnamic acid and its ester, caffeic and 5-caffeoylquinic acids, were also determined in erva-mate.

A review, covering the biosynthesis and properties of flavonoids in plants, the importance of flavonoids in human health, and national and international data on the flavonoid contents of fruits and erva-mate, is presented in Chapter 1. Compositional variation was observed due to such factors as variety, climate, stage of maturity, and the lack of data on these compounds in fruits and erva-mate, even in other countries, was demonstrated.

Chapter 2 describes the development of the method for the determination of the flavonoids of interest, in the aglycone form, by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic conditions were defined as: reverse phase Symmetry C18 column (2.1 x 150 mm, 3.5 μ m) and mobile phase of methanol and water, acidified with 0.3% formic acid, in linear gradient. Using Statistical Design of Central Composition, the optimum conditions for the hydrolysis of flavonols to their aglycones for each fruit were: acerola, 0.4M HCl, 90 minutes; apple, 0.5M HCl, 70 minutes; cashew-apple, 0.2M HCl, 110 minutes; fig, 0.5M HCl, 160 minutes; guava, 0.6M HCl, 55 minutes; jaboticaba, 0.6M HCl, 45 minutes;

orange, 1.5M HCL, 90 minutes; pitanga, 0.6M HCl, 40 minutes; strawberry, 1.2M HCl, 120 minutes of hydrolysis.

Applying the conditions established for analysis, the data obtained for acerola (2 cultivars), cashew-apple, guava (2 cultivars), fig, jaboticaba, mango, orange (4 cultivars), papaya (3 cultivars) and pitanga, analyzed at five different times, utilizing composite samples acquired from three different supermarkets, are presented in Chapter 3. The five flavonoids investigated were not found in mango and papaya and the flavones apigenin and luteolin were not encountered in any of the fruits studied. Quercetin was found in all of the other fruits studied, varying from 3.0 mg/kg in orange cultivar Pêra to 75 mg/kg in apple cultivar Fuji. Kaempferol was encountered in acerola (8.7 – 12 mg/kg), strawberry (7.0 – 8.9 mg/kg), pitanga (3.9 – 4.5 mg/kg) and cashew-apple (<LQ – 2.7 mg/kg). Myricetin was detected in pitanga (31 – 37 mg/kg) and cashew-apple (20 mg/kg).

In Chapter 4, the flavonoid levels in 24 samples of “erva-mate” from Southern Brazil and in “chimarrão” extract prepared from them are reported. The extraction/hydrolysis for obtaining the aglycones of the flavonoids was defined by Statistical Design of Central Composition (1.2M HCl and 60 minutes of hydrolysis) and the HPLC chromatographic conditions were: Nova Pak C18 column and mobile phase of methanol:water (acidified with 0.3% formic acid) in linear gradient. The quercetin content varied from 19 to 65 µg/mL in “chimarrão” and from 1090 to 3940 µg/g in “erva-mate”. Kaempferol varied from 8 to 18 µg/mL in “chimarrão” and from 447 to 1000 µg/g in “erva-mate”. It was observed that the preparation of the “chimarrão” did not fully extract the flavonoids of the “erva-mate”.

Chapter 5 presents the concentrations of the flavonol glycoside rutin and of caffeic and 5-caffeoylquinic acids in “erva-mate” and the corresponding “chimarrão”

extracts of 12 samples from Paraná and Rio Grande do Sul. Free caffeic acid was not detected in the samples. The rutin content in “chimarrão” varied from 0.04 to 0.15 mg/mL and in the “erva-mate” from 2.37 to 8.03 mg/g. 5-Caffeoylquinic acid varied from 0.25 to 0.49 mg/ml in “chimarrão and from 13,1 to 24.8 mg/g in “erva-mate”. The preparation of “chimarrão” extracted 82 to 96% of the rutin content and from 98 to 101% of the 5-caffeoylquinic acid content of “erva-mate”.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos epidemiológicos relacionam a ocorrência de doenças degenerativas à dieta e apontam uma relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais e a incidência destas doenças, particularmente doenças cardiovasculares e câncer. Os compostos fenólicos são considerados um dos grupos de compostos bioativos responsáveis pelos efeitos benéficos de vegetais à saúde. Embora existam outros mecanismos, o modo de ação mais citado é a atividade antioxidante pela habilidade de seqüestrar espécies ativas de oxigênio e quelar íons metálicos.

O conhecimento do conteúdo dos compostos fenólicos em alimentos, a base de plantas, é ferramenta para o entendimento do seu papel na fisiologia da planta e na saúde humana, bem como para programas que visam o aumento do seu consumo. Este trabalho, portanto, foi realizado para determinar a composição de flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos em erva-mate, bem como flavonóides em frutas produzidas no Brasil: acerola, caju, figo, goiaba, jaboticaba, laranja, maçã, mamão, manga, morango e pitanga.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) de origem brasileira é habitualmente consumida na forma de chimarrão no sul do Brasil. O país também tem uma diversidade de frutas. Tanto para erva-mate como para frutas brasileiras, existem ainda poucos estudos dos compostos fenólicos.

CAPÍTULO 1

Flavonóides em Frutas e Erva-Mate

Rosemary HOFFMANN-RIBANI

Delia RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à **Revista de Nutrição** *Brazilian Journal of Nutrition*

Flavonóides em Frutas e Erva-Mate

Rosemary HOFFMANN-RIBANI¹

Delia RODRIGUEZ-AMAYA²

RESUMO

Os flavonóides são compostos naturais encontrados numa variedade de alimentos de origem vegetal. Estes compostos pertencentes a uma classe dos polifenóis, apresentam atividade antioxidante, sendo também capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares. Eles podem conferir efeitos benéficos a saúde, reduzindo a ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer, podendo ainda possuir outras atividades como antialérgica e anti-inflamatória. O Brasil é rico em frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado, com produção considerável para consumo doméstico e exportação. São largamente apreciadas pela população que as consome principalmente na forma natural, ou na forma de sucos, doces e geléias. A determinação da composição dos flavonóides de frutas brasileiras está apenas começando, assim a maioria das informações desta revisão relatam dados do exterior. Mesmo no exterior, os dados ainda são limitados. A erva-mate, consumida principalmente na forma de chimarrão, faz parte do hábito alimentar de grande parte da população do sul do Brasil e também é fonte de flavonóides.

Termos de indexação: flavonóides, frutas, erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

ABSTRACT

Flavonoids are natural compounds found in a variety of foods of plant origin. These compounds, which belong to a class of polyphenols, have antioxidant activity, and are also capable of modulating the activity of enzymes and affect the behavior of many cellular systems. They can confer beneficial effects on health, reducing the occurrence of cardiovascular diseases and cancer, additionally having other activities such as anti-allergic and anti-inflammatory properties. Brazil is rich in tropical, sub-tropical and temperate fruits, with considerable production for domestic consumption and export. These fruits are widely appreciated by the population, being consumed principally fresh or as juices, sweets or marmalades. The determination of the flavonoid composition of Brazilian fruits is only starting, thus majority of the information in this review is from abroad. But even abroad, the data are still limited. Erva-mate, consumed mainly as “chimarrão”, is part of the dietary habit of a great part of the population of Southern Brazil. It is also a source of flavonoids.

Index terms: flavonoids; fruits, erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

¹ Doutoranda, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

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

Correspondência para / *Correspondence to*: E-mail: delia@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

Os flavonóides são metabólitos aromáticos secundários sintetizados pelas plantas, pertencentes ao grupo dos fenólicos¹⁻³. Estão presentes na maioria das frutas e vegetais comestíveis, variando qualitativa e quantitativamente entre espécies e entre diferentes partes e populações da mesma espécie⁴⁻⁶. Esses compostos não nutritivos apresentam atividade antioxidante, anti-mutagênica e anti-carcinogênica em diferentes sistemas⁷⁻¹⁴.

Os flavonóides consistem de dois anéis benzênicos (A e B), que são conectados por um anel de três carbonos contendo oxigênio (anel C). O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonóide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4.

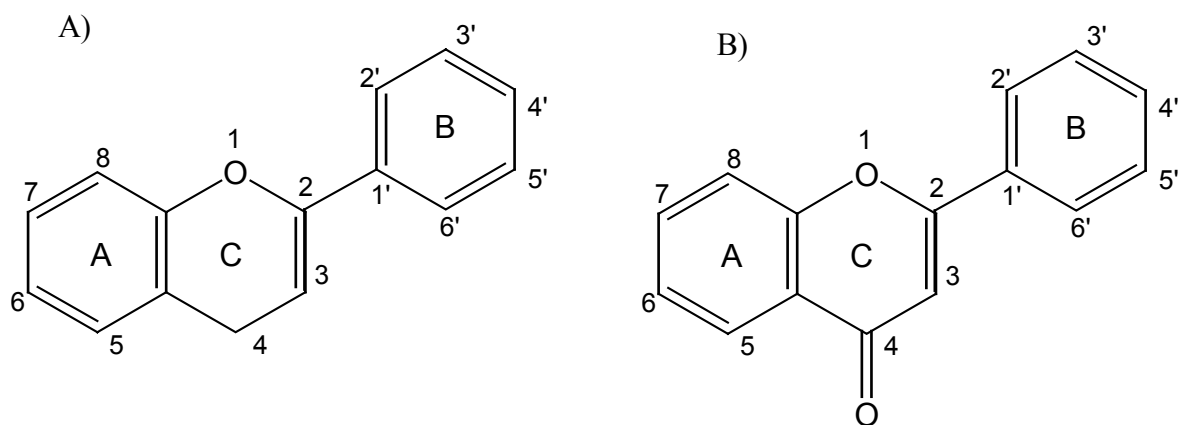


Figura 1. A- Estrutura básica dos flavonóides e B- Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4.

A variação estrutural no anel C subdivide os flavonóides em seis principais classes: flavonóis (p.ex., quercetina, kaempferol, miricetina), contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas (p.ex., luteolina, apigenina), contendo apenas a carbonila na posição 4; flavanóis (p.ex. catequina) contendo apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; flavanonas contendo apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; antocianidinas (p.ex., cianidina, pelargonidina) apenas contendo a hidroxila no C-3; isoflavonas (p.ex., genisteína, daidzeína) em que o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (Figura 2)¹⁵⁻¹⁸.

Glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, etc., são mecanismos importantes para modular a polaridade, toxicidade, solubilidade e direcionamento intracelular dos flavonóides, estocados nos vacúolos das células das plantas. A forma conjugada contribui para a extraordinária variação na distribuição, propriedades e funções destes^{4,17,19}. São encontrados em plantas principalmente na forma conjugada como glicosídeos, pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações desses (di ou trissacarídeos) podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide aglicona, resultando no grande número de flavonóides conhecidos. Os açúcares mais comuns incluem D-glucose e L-ramnose. Os glicosídeos são normalmente *O*-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C-3 ou C-7^{6,20,21}.

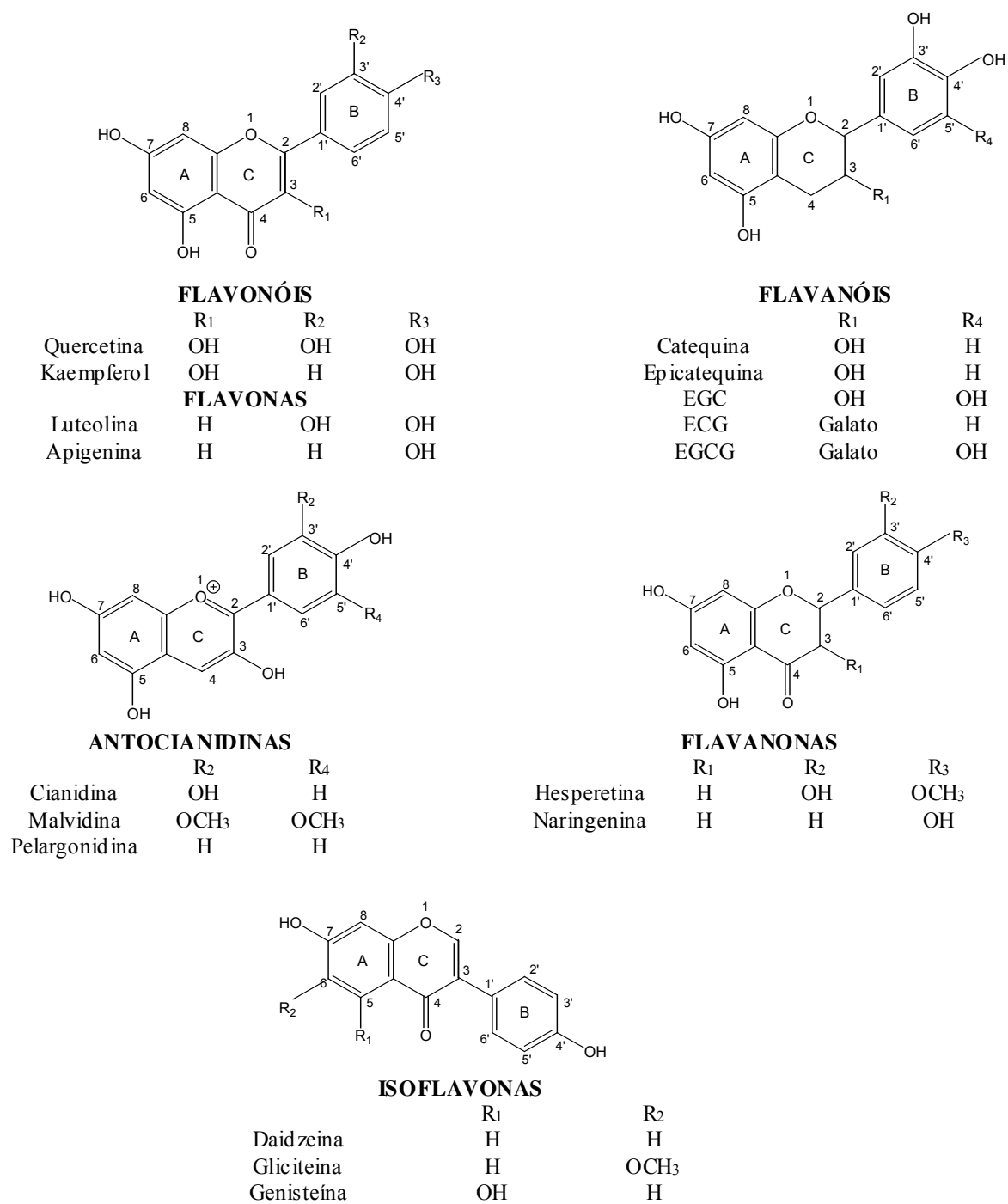


Figura 2. Principais classes dos flavonóides.

Biossíntese dos Flavonóides

Os flavonóides, junto com os isoprenóides e alcalóides, compreendem as três maiores classes de produtos secundários produzidos pelas plantas superiores, e são parte essencial na adaptação à vida destes num ambiente adverso e inconstante. Na maioria das espécies de plantas, o excesso de luz e alta radiação UV desencadeiam um aumento na síntese e acúmulo de compostos não fotossintéticos relacionados a via dos fenil propanóides contendo o esqueleto C6-C3 (fenil propano), derivados do ácido cinâmico, sintetizado do ácido shiquímico^{3,21-24}.

Os flavonóides são sintetizados pela combinação das vias metabólicas do ácido shiquímico e da acetil-CoA carboxilase (Figura 3). A chalcona sintase é a enzima que cataliza a formação da chalcona intermediária básica C₁₅, da qual todos flavonóides são formados, pela condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, (C6-C3). Além do 4-coumaroil-CoA, que é o principal substrato fisiológico para formação das chalconas, a chalcona sintase de algumas espécies de plantas aceita como substratos o cafeoil-CoA ou o feruloil-CoA. O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canaliza o esqueleto C6-C3 da fenilalanina via o ácido *trans*-cinâmico pelo metabolismo fenilpropanoide. A introdução da função hidróxi na posição 4 do ácido *trans*-cinâmico é catalizada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações, pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil-CoA), substrato preferido pela chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado da acetil-CoA e CO₂. Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, as plantas sintetizam as diferentes classes dos flavonóides^{21,25-27}.

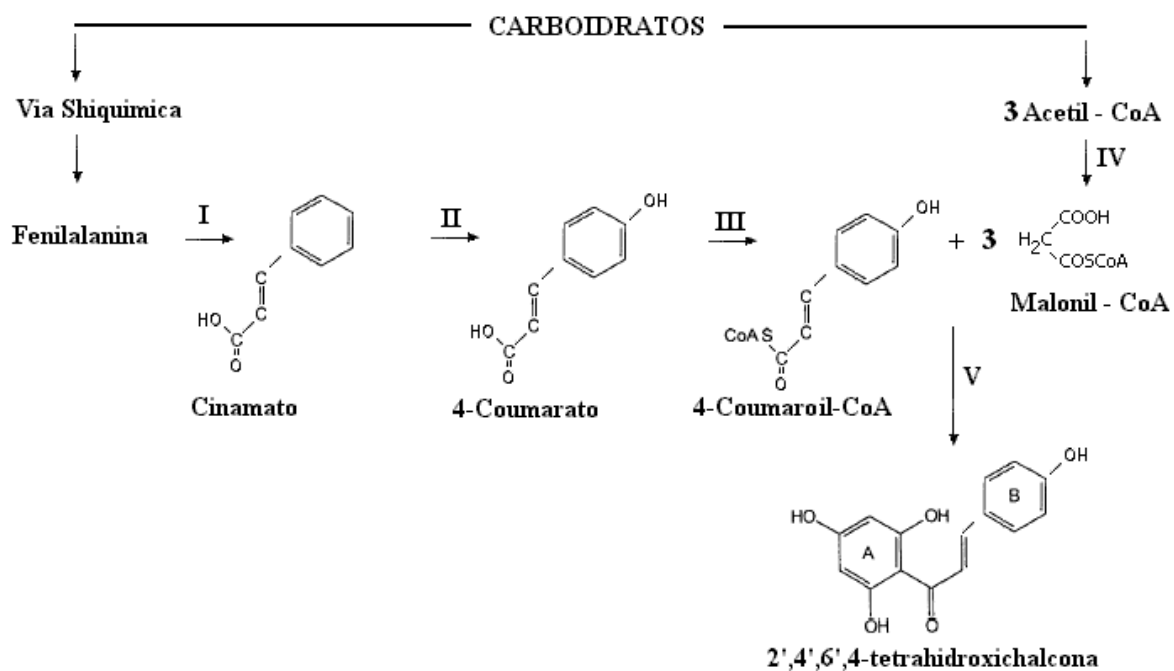


Figura 3. Esquema ilustrando as etapas da biossíntese para formação da chalcona intermediária básica C₁₅, da qual todos flavonóides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase.

Propriedades nas Plantas

Além de proporcionarem uma pigmentação bonita em flores, sementes e folhas para atrair polinizadores e disseminadores de sementes, os flavonóides também tem importantes funções na sinalização entre plantas e micróbios, na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes contra micróbios e na proteção à radiação UV^{26,28}.

Os flavonóides absorvem na região do UV ao visível do azul ao verde, essa absorção de radiação age como um anteparo para o excesso de luz e radiação UV, sendo importantes na fotoproteção^{23,24}. Outra função importante para os flavonóides é sua atividade antioxidante como seqüestrador de espécies reativas de oxigênio, relevante em problemas de saúde humana. Numerosos experimentos *in vitro* fornecem evidências, sugerindo uma relação entre estrutura e função na ocorrência dessa atividade. A principal característica é a presença das ligações duplas conjugadas permitindo o deslocamento dos elétrons π ²⁹⁻³², bem como o grupo orto-dihidroxi do anel B-catecol, em alguns flavonóides, que permite uma transição redox envolvendo a formação de radical semiquinona livre, com função antioxidante^{19,33,34}.

Metabolismo dos Flavonóides

Os flavonóides são extensivamente metabolizados para formas bioativas *in vivo* que não são aquelas formas encontradas nas plantas, por exemplo, os glicosídeos e, em alguns casos, agliconas, mas os conjugados e metabólitos formados destes na absorção intestinal³⁵⁻³⁹. Isso afeta a atividade biológica destes compostos, sua habilidade para entrar nas células e altera seu potencial redox. Existem agora evidências fortes para a extensiva ocorrência da fase I - deglicosilação extensiva e fase II - metabolismo das agliconas resultantes para as formas glucoronídeas, sulfatos e *O*-metiladas, durante a passagem através do intestino delgado^{35,40}. Conjugados glucoronídeos e sulfatos são formados com a maioria dos flavonóides no intestino delgado e no fígado, enquanto as formas *O*-metiladas são formadas somente quando o flavonóide possui um anel B-catecol como a epicatequina ou quercetina.

Os flavonóides uma vez na corrente sangüínea podem sofrer três formas de metabolismo intracelular : (1) conjugação com tióis, particularmente glutatona; (2) metabolismo oxidativo; e (3) metabolismo relacionado com P450. O metabolismo intracelular da quercetina, em fibroblastos dérmicos humanos têm demonstrado envolver a formação de produtos de oxidação intracelular, a geração de 2'-glutationil quercetina , e a demetilação das formas *O*-metiladas da quercetina⁴¹. Os metabólitos gerados na célula, como o 2'-glutationil quercetina, são de interesse uma vez que são capazes de proporcionar efeitos benéficos ou tóxicos nas células.

Atividade Biológica dos Flavonóides

O potencial dos flavonóides em reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares e câncer é normalmente explicado pelos efeitos biológicos como antioxidantes⁴²⁻⁴⁴, antiestrogênicos^{45,46} e inibidores da proliferação celular^{47,48}. Existem estudos porém que relatam o efeito prooxidante destes em certas condições⁴⁹⁻⁵¹, sendo ainda necessárias mais pesquisas sobre este assunto. Além disso, os estudos têm sido conduzidos principalmente com flavonóides agliconas ou glicosídeos. Até muito recentemente, metabólitos de flavonóides raramente eram usados, principalmente porque dados sobre sua identidade eram raros e padrões químicos para apenas poucos metabólitos podiam ser adquiridos comercialmente⁶. Tem-se colocado ainda que os flavonóides, e seus metabólitos *in vivo*, não agem como os convencionais antioxidantes doadores de hidrogênio⁵². As evidências sugerem que os efeitos celulares dos flavonóides podem ser mediados pela sua interação com proteínas específicas, fundamentais para a cascata intracelular sinalizante⁵³. Podem

interagir seletivamente dentro da via sinalizante de proteína kinase mitogênio ativada (MAPK)^{54,55}. Os flavonóides parecem ser capazes de proteger neurônios contra stress oxidativo mais eficientemente que o ascorbato, mesmo quando o último foi utilizado em concentrações 10 vezes maiores⁵⁶, o que apóia uma atividade não antioxidante.

Composição de Flavonóides em Frutas Brasileiras e Erva-mate

Neste artigo de revisão, serão focalizados frutas brasileiras e erva-mate, demonstrando a falta de dados sobre flavonóides destes alimentos importantes na dieta brasileira. Em relação as frutas, a maior parte dos dados são do exterior, observando-se variações na composição dos flavonóides devido a diferentes fatores como variedades/cultivares e partes do fruto. A composição é dependente do grau de incidência de luz uma vez que a formação dos flavonóides é influenciada pela luz. São localizados principalmente nas folhas, flores, e nas frutas em suas partes externas, pele ou casca, decrescendo em concentração até o centro destas^{16,25,57-60}.

Os flavonóides podem contribuir para a qualidade das frutas de várias maneiras, por exemplo, com os atributos sensoriais como a coloração e sabor (p.e. gosto amargo de algumas frutas). Em frutas como a maçã, os flavonóides contribuem para a textura da fruta. Também estão envolvidos na formação de pigmentos marrons indesejáveis em frutas frescas após injúria ou corte como resultado da oxidação enzimática dos fenólicos em quinonas que então polimerizam formando produtos marrons^{1,25}.

Acerola (*Malpighia puniceifolia* L.)

A acerola ou cereja das antilhas (*Malpighia glabra* L. ou *Malpighia puniceifolia* L. ou ainda *Malpighia emarginata* DC) é originária das Antilhas, e devido ao seu elevado teor de vitamina C dispersou-se para outras regiões do mundo. No Brasil, a introdução desta frutífera ocorreu na década de 50, mas só nos anos 80, depois de sua divulgação como fruta rica em vitamina C, é que se espalhou rapidamente e de forma indiscriminada^{61,62}.

A principal região brasileira produtora de acerola é a Nordeste representando cerca de 70% da produção brasileira, seguida da região Sudeste com 15%. Dentre os principais estados brasileiros produtores de acerola estão Pernambuco, Ceará e São Paulo⁶³. Além da geléia a acerola pode ser consumida de várias outras formas: *in natura* ou em suco, licor, xarope, sorvete, em calda e pastas. Pode ainda ser misturada a outros sucos industrializados⁶⁴.

Lima *et al.*⁶⁵, trabalhando com 15 genótipos de Pernambuco definiu o conteúdo de fenólicos totais variando de 1888 a 7370 mg/kg. Musser⁶⁶ relatou teor de flavonóis totais calculados em quercetina na faixa de 70 a 185mg/kg da polpa. Vendramini *et al.*⁶⁷, trabalhando com acerolas do Rio de Janeiro, apenas identificaram os flavonóis quercetina e kaempferol e determinaram o teor total de antocianinas na casca das acerolas maduras que foi de 375 mg/kg. Os pigmentos identificados foram a pelargonidina e cianidina 3-monoglicosilada e a malvidina 3,5-diglicosilada⁶⁷. As frutas maduras de Pernambuco, estudadas por Musser⁶⁶ apresentaram antocianinas totais de 381 a 474 mg/kg.

Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O cajueiro *Anacardium occidentale* L., pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma árvore originária do Brasil, encontrada em vários países de clima tropical.. É no litoral do Nordeste brasileiro, onde o cajueiro encontra as melhores condições ecológicas para seu cultivo⁶⁸. O caju, fruto do cajueiro, tem duas partes: o fruto propriamente dito, que é a castanha, e o pseudofruto ou pedúnculo floral hipertrofiado, carnoso e suculento, geralmente de excelente sabor. São conhecidos cerca de vinte tipos de caju, classificados segundo a consistência da polpa, o paladar, o formato e a cor da fruta, predominando as periformes e arredondadas e as colorações vermelha e amarela e com matizes destas duas cores⁶⁹. A produção nacional concentra-se na região nordeste, sendo produtores os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Maranhão.

A parte suculenta do caju é muito apreciada em diversas formas: suco, em forma de compota, fruta cristalizada, massa “cajuada” e passa de caju, além do suco pasteurizado, a “cajuína”, e do suco fermentado, o “mocaroró”. O suco filtrado, cozido, contendo 20% de álcool dá a “jeropiga”, consumida como vinho. Se, antes de acrescentar o álcool, o suco for concentrado para a metade de seu volume, chega-se a uma jeropiga encorpada, usada como vinho licoroso. O suco fermentado dá um vinho fino⁶⁹.

Segundo Wang *et al.*⁷⁰, parte da capacidade antioxidante das frutas se deve aos flavonóides. Abas *et al.*⁷¹ determinaram a atividade antioxidante do *Anacardium occidentale* e concluíram ser esta fruta uma boa fonte de compostos antioxidantes. Miesan *et al.*⁷² analisando frutas tropicais da Malásia, relatou conteúdos de 188 mg/kg para miricetina e 262,5 mg/kg para quercetina em amostra desidratada de caju.

Goiaba (*Psidium guajava* L.)

A goiabeira pertence a família das Myrtaceae sendo originária das regiões tropicais Americanas, onde ocorre desde o México até o Sul do Brasil. Atualmente, é cultivada em todas as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo⁷³.

No Brasil, o cultivo em escala comercial da goiabeira é praticado desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão, com destaque para os Estados de São Paulo e Pernambuco. A goiabada é o doce em massa mais servido no Brasil. Compotas, geléias, xaropes e sucos de goiaba são muito apreciados⁷⁴.

Miean *et al.*⁷², trabalhando com diversas frutas, relatou o conteúdo de 549,5 mg/kg para o flavonol miricetina e de 579 mg/kg para a flavona apigenina em goiaba desidratada.

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* e *Myrciaria cauliflora* Berg)

Originária do Centro-Sul do Brasil, destacam-se dentre as espécies de jaboticaba a *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg, conhecida como Sabará, sendo comuns outras espécies como a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg ou jaboticaba Paulista, Açú ou Ponhema. São árvores pequenas em que as flores e frutas nascem diretamente sobre o tronco principal ou galhos mais velhos. As frutas crescem rapidamente, completando seu desenvolvimento entre 40-60 dias^{69, 75}. As frutas são globosas, com 2-3cm de diâmetro, sendo vermelhas a roxas ou mesmo pretas quando maduras. A jaboticaba além de ser consumida *in natura*, também é utilizada na produção artesanal de licores e geléias⁷⁶.

Einbond *et al.*⁷⁷ avaliando antocianinas antioxidantes em frutas comestíveis, identificaram cianidina 3-*O*- β -glucopiranosídeo em amostras de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*).

Laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

Laranja da família Rutaceae, fruta originária da Ásia, especialmente da China e do Arquipélago Malaio, é o nome genérico dado a várias frutas que pertencem ao grupo dos citrus. No Brasil, as variedades mais cultivadas e conhecidas de laranjas são: laranja-da-baía, também conhecida como laranja-de-umbigo porque tem uma saliência na parte de baixo; laranja-da-terra, conhecida em algumas regiões como laranja-cavalo e em outras como laranja-azeda ou laranja-bigarada, tem cor amarelo-forte com tons avermelhados, forma achatada e não é muito grande; laranja-lima uma variedade menos ácida, tem casca fina de cor amarelo-clara, sabor suave e doce e polpa muito succulenta; laranja-seleta, quase do tamanho da laranja-da-baía, é bem succulenta, tem sabor adocicado, pouco ácido, e casca amarelo-clara; laranja-pêra, menor que as outras variedades, tem casca fina e lisa, cor amarelo-avermelhada e polpa succulenta, sabor adocicado, e é especial para o preparo de sucos e geléias; laranja-barão, embora com formato parecido ao da laranja-pêra, é menor e tem cor mais clara, casca fina e lisa e a polpa muito succulenta, sendo recomendada para o preparo de sucos. Com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil tornou-se, na década de 80, o maior produtor mundial da fruta. A maior parte da produção brasileira de laranjas destina-se à indústria do suco, concentrada no estado de São Paulo, responsável por 70% das laranjas e 98% do suco que o Brasil produz⁷⁸.

As flavanonas são os principais flavonóides presentes em citrus^{1,79}, sendo relativamente rara sua ocorrência em outras plantas. São encontrados em maior concentração na casca da fruta⁸⁰, que na laranja representa em torno da metade da massa da fruta⁸¹. Hesperetina e naringenina são as principais flavanonas presentes na polpa (Tabela 1) e casca de laranjas⁸¹⁻⁸⁵, sendo também encontradas em sucos comerciais obtidos pelo esmagamento da fruta com casca^{86,87}. Quercetina é um flavonóide minoritário em laranjas^{82,88,89}. Franke *et al.*⁸⁹, também relataram a presença da flavona luteolina (12-18mg/kg) em polpa de laranja. Também é peculiar nas frutas cítricas a ocorrência de flavonas polimetoxiladas (p.ex. nobiletina, sinensetina)^{25,81,82}. Além do interesse nas propriedades farmacológicas destes compostos⁹⁰, a sinensetina presente na casca (Tabela 1) pode conferir sabor amargo ao suco de laranja mesmo em concentração inferior a 0,1mg/L⁹¹.

Maçã (*Malus pumila* Mill.)

A macieira, uma planta da família das rosáceas, sub família das pomáceas, produz a maçã, que devido a sua exuberante aparência e beleza, possui o título de “a rainha das frutas”^{92,93}. Fruta das regiões temperadas tem duas épocas de produção no Brasil, de março a maio e de agosto a outubro⁹⁴. As cultivares mais produzidas são: gala, golden delicious e fuji, que

Tabela 1. Conteúdo de flavonóides em laranja, maçã e morango segundo alguns autores.

Fruta	Flavonóides	Conteúdo (µg/g)	REFERÊNCIA
Laranja	polpa	Quercetina	8-9 ⁸² ; 4-7 ⁸⁹ ;
		Naringenina	170- 286 ⁸² ; 110 ⁸³ ;
		Hesperetina	169-149 ⁸² ; 310 ⁸³ ;
		Luteolina	12-18 ⁸⁹ ;
	casca	Quercetina	360-410 ⁸² ;
		Naringenina	170-374 ⁸² ; 33-426 ⁸⁴ ;
		Hesperetina	149-1094 ⁸² ; 905 - 1101 ⁸⁴ ;
		Sinensitina	69 ⁸¹ ; 170-196 ⁸²
Maçã	com casca	Nobiletina	98 ⁸¹ ;
		Quercetina	20 ⁸³ ; 25-80 ⁸⁹ ; 21 – 72 ¹⁰²
		Quercetina Glicosídeos totais	4-101 ⁸² ; 54 – 98 ⁹⁶ ; 26-74 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Galactosídeo	22 ⁹⁶ ; 1-29 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Rutinosídeo	2 ⁹⁶ ; nd-3 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Glicosídeo	3 ⁹⁶ ; 3-7 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Xilosídeo	11 ⁹⁶ ; 2-10 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Arabinosídeo	32 ⁹⁶ ; 5-19 ¹⁰⁰ ;
		Quercetina-3-Ramnosídeo	41 ⁹⁶ ; 4-22 ¹⁰⁰ ;
		Catequina	13-51 ⁸² ;
		Epicatequina	54-104 ⁸² ; 99 ⁹⁶
		Phloridzina	20-23 ⁸² ; 20 ⁹⁶
		Cianidina-3- Galactosídeo	nd ⁸² ; 5 ⁹⁶
Morango		Quercetina	3-5 ¹⁰⁹ ; 22-57 ¹¹⁰ ;
			6 ⁸³ ; 9 ⁸⁹ ; 8-10 ¹⁰² ;
		Kaempferol	5 ⁸³ ; 6 ⁸⁹ ; 7-16 ¹⁰² ; 2-9 ¹⁰⁹ ; 5-20 ¹¹⁰
		Antocianinas	120 ¹⁰⁸ ; 130-550 ¹¹⁰ ; 800 ¹¹¹ ; 300 ¹¹²

variam na textura e sabor da polpa. Muito bem adaptadas aos climas regionais brasileiros, provém especialmente do Sul e do Sudeste do país, onde os estado de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná são responsáveis pela quase totalidade do volume produzido, destacando-se Santa Catarina e Rio Grande do Sul com 99,6 % do total produzido em 2001. Além do consumo *in natura*, podem ser aproveitadas industrialmente

como suco, polpa, produtos fermentados (sidra, vinho, vinagre e bebidas destiladas), produtos desidratados, conservas, geléias e pectina comercial^{93,95}.

A composição de flavonóides da maçã é caracterizada por apresentar flavonóis em glicosídios da quercetina⁹⁶⁻⁹⁸, flavanols (catequina, epicatequina e epigallocatequina)^{82,85,96,97,99,100}, dihidrochalcona (phloridzina)^{82,96} e antocianina (cianidina 3-galactosídeo)^{57,58,100,101}. Price *et al.*¹⁰⁰, observaram que o conteúdo dos flavonóis glicosídeos está concentrado na casca das maçãs, representando de 63,0% a 97,1% do flavonol nas frutas estudadas. Awad *et al.*⁵⁷, também observaram que flavonóides individuais não são igualmente distribuídos na fruta, sendo que quercetina 3-glicosídeo e antocianina foram encontrados quase exclusivamente na casca das maçãs, o teor sendo maior em frutas nascidas no topo das árvores seguidas das frutas das partes externas das árvores, enquanto os menores níveis foram encontrados em frutas do interior das árvores. A Tabela 1 indica os flavonóis conjugados da quercetina e os flavanóis catequina e epicatequina, como os principais flavonóides presentes na fruta.

Manga (*Mangifera indica* L.)

A mangueira é uma planta tropical pertencente à família Anacardiaceae, que se desenvolve bem em condições de clima subtropical. Originária do Sul da Ásia, a manga dispersou-se por todos os continentes, sendo cultivada, atualmente, em todos os países de clima tropical e subtropical. O Brasil é o quinto maior produtor mundial de manga, sendo sua produção destinada principalmente para exportação. São Paulo e Bahia são os principais produtores brasileiros, outros estados importantes são Minas Gerais, Ceará, Paraíba e Piauí. Os produtos derivados da fruta verde incluem picles, chutney, concentrado,

barra de frutas e manga em pó. A partir da fruta madura são produzidos o purê, seu concentrado, suco e o néctar, etc^{103,104}. As variedades mais cultivadas são de origem norte americana, como Haden, Tommy Atkins e Keitt¹⁰⁴.

Berardini *et al.*¹⁰⁵ utilizando as cascas geradas no processamento de manga como fonte para obtenção de polifenóis observou que a capacidade antioxidante destes foi superior a da mangiferina e quercetina 3-*O*-glicosídeo. Schieber *et al.*¹⁰⁶ analisou amostras de purê industrial concentrado de manga determinando cinco glicosídeos de quercetina(Q) e um de kaempferol (K). Os flavonóis glicosídeos predominantes foram Q-3-galactosídeo (22,1 mg/kg), Q-3-glicosídeo (16mg/kg), e Q-3-arabinosídeo (5mg/kg). A quantificação da mangiferina (4,4mg/kg) também foi avaliada por CLAE.

Morango (*Fragaria ananassa* Duch.)

O morangueiro, botanicamente classificado como uma hortalica da família das rosáceas, é uma cultura típica de climas mais amenos, não sendo muito tolerante a temperaturas elevadas. No Brasil o morango tem se adaptado melhor do sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, porém existem experiências até mesmo no cerrado. Nas principais regiões produtoras do Brasil a colheita é realizada de agosto a dezembro sendo comercializado na primavera quando há poucas frutas à venda. Ademais, na indústria é conhecido pelo uso freqüente em iogurtes e sorvetes¹⁰⁷. Além de sua coloração e sabor atrativos, os morangos são fonte de carboidratos, vitamina C e compostos fenólicos¹.

Entre doze frutas estudadas por Wang *et al.*⁷⁰, o morango apresentou a maior atividade antioxidante sendo que a vitamina C da fruta contribuiu com menos que 15%

desta atividade. O conteúdo de flavonóis em morango (Tabela 1) é representado pela quercetina e kaempferol. O teor de antocianina (Tabela 1) é importante para avaliar a maturidade dos frutos, sendo principal a pelargonidina 3-glicosídeo e presentes como componentes menores a cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-rutinosídeo¹⁰⁸.

Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira é mais uma mirtácea originária do Brasil, de regiões mais chuvosas, desde a fronteira com as Guianas até o norte da Argentina, tem sido largamente disseminada por outras regiões tropicais e subtropicais do mundo. Geralmente a pitangueira produz duas safras por ano, uma em outubro e outra entre dezembro e janeiro, aproximadamente três semanas após a floração. A pitanga é uma baga de 1,5 a 3 cm de diâmetro, apresentando oito sulcos longitudinais. Sua coloração (alaranjada, vermelho-sangue ou roxa, quase preta) torna essa fruta muito ornamental^{69,113}. A elevada perecibilidade da pitanga faz com que o mercado da fruta *in natura* torne-se restrito aos centros próximos às regiões de plantio, e o seu comércio seja realizado apenas durante o período de colheita. Sua polpa apresenta excelentes condições para a industrialização, em razão do seu alto rendimento, aroma agradável, cor atrativa e do sabor exótico¹¹³. O seu cultivo no estado de Pernambuco vem crescendo em razão da utilização do fruto para o preparo de polpa e suco, como também para a fabricação de sorvetes, refrescos, geléias, licores e vinhos^{114,115}.

Quanto aos flavonóides em pitanga, atualmente apenas foram identificadas as antocianinas cianidina 3-*O*- β -glucopiranosídeo e delfinidina 3-*O*- β -glucopiranosídeo⁷⁷.

Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Auguste de Saint-Hilaire)

A erva-mate é uma espécie florestal arbórea nativa da família Aquifoliaceae, encontrada principalmente no Brasil, na Argentina e no Paraguai. Sua produção no Brasil compreende os estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul¹¹⁶. A erva-mate constitui uma das principais matérias-primas na elaboração de bebidas estimulantes sendo consumida de três formas diferentes. O mate tradicional que é a forma principal, em que se coloca erva-mate em um recipiente similar a um vaso, sobre o qual se verte água quente (entre 70 a 85°C) e se suga por meio de uma bomba. A segunda forma, de uso durante os meses de verão ou em regiões quentes, é similar a anterior, porém utilizando água a temperaturas que variam entre 5 e 10°C (tererê). A terceira forma de consumo é uma infusão preparada de maneira similar aos chás¹¹⁷.

A relevância do caráter social da atividade ervateira é demonstrada pelos indicadores das propriedades rurais envolvidas, ou seja, um total aproximado de 180.000 produtores. Além disso, essas propriedades envolvidas com a erva-mate permitem que sejam gerados empregos para cerca de 710.000 pessoas¹¹⁸.

Filip *et al.*¹¹⁹ estudaram compostos fenólicos em sete espécies *Ilex* da América do Sul. Analisaram diretamente as infusões obtidas das folhas secas e moídas por cromatografia líquida de fase reversa determinando rutina (600mg/kg), quercetina (31mg/kg) e kaempferol (12mg/kg) em base seca.

Matsubara¹²⁰ trabalhando com erva-mate após hidrólise da amostra para liberação das formas agliconas dos flavonóis, obteve conteúdos de quercetina (2500-3300mg/kg) comparáveis ao dos chás verde e preto, embora o kaempferol (300-600mg/kg) estivesse

em baixos teores. Curiosamente, nenhum flavonol foi encontrado no chá mate, apesar deste ser proveniente de mesma fonte que a erva-mate, devido provavelmente ao efeito de processamento de torragem das folhas.

Matsubara¹²⁰ utilizando cromatografia líquida e detecção por arranjo de diodos não encontrou catequinas e teaflavinas em amostras de erva-mate e chá mate. Esses resultados são concordantes com os relatados por Carlson *et al.*¹²¹, que também não encontraram catequinas em amostra de mate.

REFERÊNCIAS

1. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 1999; 66: 401-436.
2. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.* 1995; 61: 103-116.
3. Shirley BW. Flavonoids biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends in Plant Science* 1996; 11(1): 377-382.
4. Harborne JB. Classes and function of secondary products. *In*: Walton NJ, Brown DE, editores. *Chemicals from Plants, Perspectives off Secondary Plant Product*. London: Imperial College Press; 1999.

5. Van Burden J. Fruit phenolics. *In*: Hulme AC, editors. The Biochemistry of fruits and their products. London: Academic Press; 1970.
6. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 2004; 24: 851-874.
7. Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radic. Res.* 2000; 33:91-103.
8. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolics antioxidants. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000; 11:43-47.
9. Kandaswani C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994; 366:351-376.
10. Formica JV, Regelson W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* 1995; 32(12): 1061-1080.
11. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganda G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20: 933-956.
12. Franke AA, Cooney RV, Custer LJ, Mordan LJ, 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.
13. Caslelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 1995; 368:188-192.

14. Middleton E, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 43:1167-1179.
15. Harborne JB, editor. *The flavonoids, advances in research since 1986.* London: Chapman & Hall; 1994.
16. Kühnau J. The flavonoids: a class of semi-essential foods components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 1976; 24:117-191.
17. Aherne AS, O'Brien NM. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* 2002; 18:75-81.
18. Ross JA, Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Reviews of Nutrition* 2002; 22:19-34.
19. Edreva A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture Ecosystems & Environment* 2005; 106:135-146.
20. Hermann K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1988; 186:1-5.
21. DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999; 65(4):337-353.
22. Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs J. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol.* 2002; 155:349-351.
23. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1085-1097.

24. Greenberg BM, Wilson MI, Huang XD, Duxbury CL, Gerhardt KE, Gensemer RW. The effect of ultraviolet-B radiation on higher plants. *In*: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS, editores. *Plants for Environmental Studies*. Boca Raton, NY: CRC Lewis Publisher; 1997.
25. Robards K, Antolovich M. Analytical Chemistry of Bioflavonoids, A Review. *The Analyst* 1997; 122:11R-34R.
26. Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 2001; 126: 485-493.
27. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Srinivasa Reddy MS, Wang L. The phenylpropanoid pathway and plant defense – a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 2002; 3:371-390.
28. Smith DA, Bank SW. *In*: Middleton E, Harborne JB, editores. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationship*. New York: Alan R. Liss Inc; 1986.
29. Bors W, Michel C, Stettmainer K. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *In*: Packer L, editor. *Flavonoids and Other Polyphenols. Methods in Enzymology*. Vol.335. San Diego, CA: Academic Press. 2001; 166-180.
30. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:2774-2779.
31. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidant activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 468-472.

32. Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:6172-6181.
33. Markam KR, Tanner GJ, Caasi-Lit M, Whitecross ML, Nayudu M, Mitchell KA. Possible protective role for 3',4'-dihydroxy flavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* 1998; 49:1913-1919.
34. Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C. Flavonoid gene expression and UV-protection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 2002; 59:23-32.
35. Spencer JPE, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid. Redox Signal.* 2001; 3:1023-1039.
36. Spencer JPE, Srai SK, Rice-Evans C. Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. *In: Rice-Evans C, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker; 2003.
37. Walle T, Walgren RA, Walle UK, Galijatovic A, Vaidyanathan JB. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. *In: Rice-Evans C, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker. 2003:349-362.
38. Day AJ, Williamsom G. Absorption of quercetin glycosides. *In: Rice-Evans C, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker; 2003.
39. Donovan JL, Waterhouse AL, Bioavailability of flavanol monomers. *In: Rice-Evans C, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker; 2003.

40. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters* 1999; 458:224-230.
41. Spencer JPE, Kuhnle GG, Williams RJ, Rice-Evans C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochemistry Journal* 2003; 372: 173-181.
42. DiSilvestro RA. Flavonoids as antioxidants. In: Widman REC, editores. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press LLC; 2001.
43. Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P. Effects of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subject. *Br. J. Nutr.* 1999; 81:447-55.
44. Fiander H, Schneider H. 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 the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett.* 2000; 156:17-24.
45. Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; 208:44-50.
46. Makela S, Poutanen M, Kostian ML, Lehtimäki N, Salo L. Inhibition of 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. In: 3rd Int. Conf. Phytoestrogens., 1995 Dec; Little Rock, AK; 1995.
47. 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. Journal of Nutrition* 1999; 38: 133-142.

48. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3823-31.
49. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters* 1996; 104: 193-196.
50. Dickanaitė E, Nemeikaitė A, Kalvelytė A, Cenas N. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: structure-activity relationships. *Biochemistry of Molecular Biology International* 1998; 45: 923-930.
51. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. In: Rice-Evans C, editor. *Serial Review: Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004; 37(3): 287-303.
52. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? In: Rice-Evans C, editor. *Serial Review: Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004; 36(7): 838-849.
53. Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging*, 2002; 23: 861-880.
54. Kobuchi H, Roy S, Sem CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am. J. Physiol.*, 1999; 277: C403-C411.
55. Kong NA, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* 2000; 23: 1-16.

56. Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA. Phenolics antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 1222-1233.
57. Awad M, Jager A, van Westing LM.. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae* 2000; 83:249-263.
58. Awad M, Jager A, Plas LHW, van der Krol AR. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of “Elstar” and “Jonagold” apples during development and ripening. *Scientia Horticulturae* 2001; 90: 69-83.
59. Harborne JB. Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, editores. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. New York: Alan R. Liss; 1986.
60. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45:590-595.
61. Netto LM, editor. *Acerola, a cereja tropical*. São Paulo: Livraria Nobel AS; 1986.
62. Brunini MA, Macedo NB, Coelho CV, Siqueira GF. Caracterização Físico e Química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. *Rev. Bras. Frutic.* 2004; 26(3):486-489.
63. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Senso Agropecuário 1996*. Disponível: <http://www.ibge.gov.br>

64. Petinari RA, Tarsitano MAA. Análise econômica da produção de acerola para mesa, em Jale-SP: um estudo de caso. Rev. Bras. Frutic. 2002; 24(2): 411-415.
65. Lima VLAG. Mélo EA, Maciel MIS, Prazeres FG, Musser R , Lima DES. Total phenolics and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. Food Chemistry 2005;90: 565-68.
66. Musser RS. Caracterização de acessos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) do Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE em Pernambuco. [dissertação]. Recife:UFRPE; 2001.
67. Vendramini ALA, Trugo LC. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). J. Braz. Chem. Soc 2004;15: 664-69.
68. Soares JB, editor. O caju, Aspectos Tecnológicos. Fortaleza: BNB; 1986.
69. Andersen O, Andersen VU. As frutas silvestres brasileiras. Rio de Janeiro: Editora Globo; 1988.
70. Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agri. Food Chem. 1996; 44: 701-705.
71. Abas F, Lajis NH, Israf DA, Khozirah S, Kalsom YU. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. Food Chemistry 2006; 95(4):566-573.
72. Miesan KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of edible tropical plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001; 49:3106-3112.

73. Medina JC, editor. Goiaba: cultura, materia-prima, processamento e aspectos econômicos – Série Frutas Tropicais Nº6. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos; 1988.
74. Pereira FM, Martinez Junior H, editores. Goiabas para industrialização. Jaboticabal:UNESP. 1986
75. Matos JLR, editor. Frutíferas nativas do Brasil. São Paulo: Nobel; 1983.
76. Wiltbank WJ, Chalfun NNJ, Andersen O. The jaboticaba in Brazil. Proc. Am. Soc. Hortic.Sci. 1983; 27A: 57-69.
77. Einbond LS, Reynertson KA, Luo X-D, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. Food Chemistry 2004;84:23-28.
78. Hasse G, editor. A Laranja no Brasil. São Paulo: Edição de Duprat & Iobe Propaganda; 1987.
79. Nogata Y, Ohta H, Yoza K, Berhow M, Hasegawa S. High-performance liquid chromatography determination of naturally occurring flavonoids in Citrus with a photodiode-array detector. J. Chromatogr. A 1994; 667: 59-66.
80. Kanes K, Tisserat B, Berhow M, Vandercook C. Phenolic composition of various tissues of Rutaceae species. Phytochemistry 1993; 32:967-974.
81. Manthey JA, Grohmann K. Concentrations of Hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. J Agric Food Chem 1996; 44: 811-814.
82. Arabbi, P.R.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. J. Agric Food Chem. 2004; 52: 1124-1131.

83. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. 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* 1998; 799(1-2):101-110.
84. Larrauri JA, Rupérez P, Bravo L, Saura-Calixto F. High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. *Food Research International* 1996; 29(8):757-762.
85. Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 571-581.
86. Bronner WE, Beecher GR. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatography A* 1995; 705:247-256.
87. Leuzzi U, Caristi C, Panzera V, Licandro G. Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 5501-5506.
88. Careri M, Elviri L, Mangia A, Musci M. Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *J. Chromatogr A* 2000; 881:449-460.
89. Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, Murphy SP. Vitamin C and Flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawai'i. *J. Agric. Food Chem* 2004; 17: 1-35.
90. Robbins RC. Medical and nutritional aspects of citrus bioflavonoids. *In*: Nagy S, Attaway JÁ, editores. *Citrus Nutrition and Quality*. Washington, DC: American Chemical Society. 1980: 43-59p.

91. Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J. Clin. Nutr.* 2000; 72: 1424-1435.
92. Gomes P. *Fruticultura brasileira*. 11ed. São Paulo, Livraria Nobel S.A., 1985.446p
93. Fontoura PSG. Caracterização físico-química e sensorial de algumas variedades de maçã cultivadas no estado do Paraná ara consumo “in natura” e fins tecnológicos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1987.
94. Castro PCR, Kluge RA, editores. *Ecofisiologia de fruteiras – abacateiro, aceroleira, macieira, pereira e videira*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda; 2003.
95. Cruess WV, editor. *Produtos industrias de frutas e hortaliças*. São Paulo:Edgard Blücher Ltda; 1973.
96. van der Sluis AA, Dekker M, Jager A de, J WMF. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in Apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 3606-3613.
97. Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acid and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001; 910: 265-273.
98. Dick AJ, Redden PR, DeMarco AC, Lidster PR, Grindley TB. Flavonoid glycosides of spartan apple peel. *J. Agric. Food Chem.* 1987; 35: 529-531.
99. Arts ICW, Putte BV, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1746-1751.

100. Price KR, Prosser T, Richetin AMF, Rhodes MJC. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem.* 1999; 66: 489-494.
101. Awad MA, Jager A de. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biology and Technology.* 2000; 20: 15-24.
102. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40: 2379-2383.
103. Nanjundaswamy AM. Processing. *In*: Litz RE, editor. The mango. Botany, production and uses. Wallingford,UK:CAB International; 1998.
104. Silva SP, editor. Frutas do Brasil. São Paulo: Empresa das Artes; 1996.
105. Berardini N, Knödler M, Schieber A, Carle R. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2005; 6:442-452.
106. Schieber A, Ullrich W, Carle R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2000; 1: 161-166.
107. Darolt, M.R. As Dimensões da Sustentabilidade: Um estudo da agricultura orgânica na região metropolitana de Curitiba-PR. Curitiba, 2000. Tese de Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Federal do Paraná/ParisVII. 310 p.

108. Gil MI, Holcroft DM, Kader AA. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 1662-1667.
109. Häkkinen SH, Törrönen AR. Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. Food Research Intern. 2000; 33: 517-524.
110. Codernunsi BR, Nascimento JRO do, Genovese MI, Lajolo FM. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 2581-2586.
111. Montero TM, Mollá EM, Esteban RM, López-Andréu FJ. Quality attributes of strawberry during ripening. Sci. Hortic. 1996; 65:239-250.
112. Woodward JR. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. J. Sci. Food Agric. 1972; 23:465-473.
113. Bezerra JEF, Lederman IE, Silva Júnior JF, Alves MA. Comportamento da Pitangueira (*Eugenia uniflora*) sob irrigação na Região do Vale di Rio Moxotó, Pernambuco. Ver. Bras. Frut. 2005; 26(1): 177-179.
114. Bezerra JEF, Silva Junior JF, Lederman IE, editores. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Jaboticabal:FUNEP; 2000.
115. Lederman IE, Bezerra JEF, Calado GA, editores. A pitangueira em Pernambuco. Recife:IPA; 1992.

116. Mazuchowski JZ, editor. Manual da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba: Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER – PR; 1991.
117. Ramallo LA, Smorcowski M, Valdez EC. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. La alimentación latinoamericana. 1998;255:48-52.
118. Maccari Jr. A, Mazuchowski JZ, editores. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná MCT/CNPq/ Projeto PADCT Erva-mate. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba:EMATER; 2001.
119. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia 2001;72: 774-778.
120. Matsubara S, Rodriguez-Amaya D. Polifenóis em chás comercializados no Brasil [Dissertação]. Campinas : Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2001.
121. Carlson M, Thompson RD. Liquid Chromatographic Determination of Methylxanthines and Catechins in Herbal Preparations Containing Guaraná. J. AOAC Intern. 1998; 81(4): 691-701.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de Método para Determinação de Flavonóis e Flavonas por CLAE em Frutas

Rosemary HOFFMANN-RIBANI

Delia RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à Revista **Ciência e Tecnologia de Alimentos**

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS E FLAVONAS POR CLAE EM FRUTAS¹

Rosemary HOFFMAN-RIBANI², Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA²

RESUMO

Os flavonóides, que incluem os flavonóis e flavonas, proporcionam efeitos biológicos benéficos à saúde humana. O Brasil possui uma grande variedade de frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado que são potenciais fontes de flavonóides, sendo poucos os estudos publicados de seus conteúdos. O objetivo do presente trabalho foi otimizar as condições de cromatografia líquida de alta eficiência para determinar os flavonóides luteolina, apigenina, miricetina, quercetina e kaempferol na forma aglicona, bem como definir as melhores condições para hidrólise/extração destes flavonóides, utilizando delineamento estatístico de Composição Central com pontos axiais e Análise por Superfície de Resposta. Onze frutas foram estudadas e as análises foram conduzidas em cromatógrafo a líquido com detector de arranjo de diodos. A melhor resolução dos flavonóides foi conseguida com a coluna de fase reversa Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5µm) e fase móvel de metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico em gradiente linear. As condições ótimas para a hidrólise dos flavonóis para cada fruta foram: acerola, 0,4M HCl, 90 minutos; maçã, 0,5M HCl, 70 minutos; caju, 0,2M HCl, 110 minutos; figo, 0,5M HCl, 160 minutos; goiaba, 0,6M HCl, 55 minutos; jaboticaba, 0,6M HCl, 45 minutos; laranja, 1,5M HCl, 90 minutos ; pitanga, 0,6M HCl, 40 minutos; morango, 1,2M HCl, 120 minutos de

hidrólise. Os flavonóides investigados não foram detectados em manga e mamão e as flavonas apigenina e luteolina não foram encontrados em nenhuma das frutas estudadas.

Palavras-chave: flavonóides, análise por CLAE, frutas

SUMMARY

The flavonoids, which include the flavonols and flavones, have beneficial biological effects on human health. Brazil has a wide variety of tropical, sub-tropical and temperate fruits which are potential sources of flavonoids, but few studies have been published on their contents. The objective of the present work was to optimize the conditions of high performance liquid chromatography to determine the flavonoids luteolin, apigenin, myricetin, quercetin and kaempferol in aglycone form, as well as to define the best conditions for hydrolysis/extraction of these flavonoids, using statistical design of Central Composition with axial points and Analysis of Response Surface. Eleven fruits were investigated, the analyses being conducted in a liquid chromatograph with photodiode array detector. The best resolution of the flavonoids was achieved with a reverse phase Symmetry C18 column (2.1 x 150 mm, 3.5 μ m) and mobile phase of methanol and water acidified with 0.3% formic acid in a linear gradient. The optimum conditions for the hydrolysis of the flavonols for each fruit were: acerola, 0.4M HCl, 90 minutes; apple, 0.5M HCl, 70 minutes; cashew-apple, 0.2M HCl, 110 minutes; fig, 0.5M HCl, 160 minutes; guava, 0.6M HCl, 55 minutes; jaboticaba, 0.6M HCl, 45 minutes; orange, 1.5M HCl, 90 minutes; pitanga, 0.6M

HCl, 40 minutes; strawberry, 1.2M HCl, 120 minutes. The flavonoids investigated were not detected in mango and papaya and the flavones apigenin and luteolin were not found in the fruits studied.

Keywords: flavonoids, HPLC analysis, fruits

¹Manuscrito recebido em

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

*A quem a correspondência deve ser enviada.

1 – INTRODUÇÃO

Um aumento na ingestão de frutas e vegetais tem sido correlacionado com a redução do risco de doenças crônicas como as doenças cardiovasculares e câncer [2, 4, 6, 8, 25, 30 31]. A atividade antioxidante dos flavonóides, encontrados na maioria das frutas e vegetais, é considerada um dos fatores que contribuem para esta redução [10, 15, 18, 19, 23, 27, 28].

Os flavonóides constituem uma família de moléculas diversas que consistem de dois anéis aromáticos, que estão conectados por um anel pirano. Estes compostos podem ser agrupados em seis subgrupos principais: flavonas (p.e. apigenina, luteolina), flavonóis (p.e. quercetina, miricetina), catequinas ou flavanóis (p.e. epicatequina, galocatequina), flavanonas (p.e. naringenina, hesperitina), antocianidinas (p.e. cianidina, pelargonidina) e isoflavonas (p.e. genisteina, daidzeina). Das principais classes, os flavonóis glicosídicos predominam em frutas e verduras [20, 22, 32].

A determinação quantitativa de flavonóides glicosídicos individuais é difícil porque a maioria dos compostos de referência não existe para aquisição comercial. Além disso, mais de 50 glicosídios diferentes para cada um dos flavonóides mais comuns já foram descritos. A hidrólise dos glicosídios para liberar as agliconas oferece um método mais prático para determinação dos flavonóides [17].

Dependendo do tipo de açúcar ligado ao flavonóide, muitos parâmetros podem influenciar na eficiência da hidrólise como a composição de solventes, tempo de

extração, concentração do ácido empregado, temperatura de extração entre outros, podendo ocorrer degradação ou mesmo hidrólise incompleta do glicosídeo. HERTOOG, HOLLMAN & VENEMA [17] definiram em seu estudo o uso do ácido clorídrico para hidrólise dos flavonóides, bem como maior eficiência da extração dos flavonóides com solução aquosa a 50% de metanol.

A resposta de um processo é resultado da influência interativa dos vários parâmetros sobre este, e o procedimento estatístico para otimização permite levar em consideração estas interações [13]. A Análise por Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por BOX & WILSON [5], permite a avaliação dos efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta. Assim, ASR é uma coletânea de técnicas matemáticas e estatísticas que têm sido utilizadas com sucesso para desenvolver, melhorar e otimizar processos [24]. Utilizada com frequência na modelagem e otimização de processos bioquímicos e biotecnológicos relacionados a sistemas de alimentos, a ASR também tem sido empregada na otimização de metodologias para extração e análise de alimentos [7, 9, 11, 21].

No Brasil há uma grande variedade de frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado que são principalmente consumidas cruas. Sendo potenciais fontes de flavonóides, estudos dos conteúdos nestas, se fazem necessários.

O objetivo deste trabalho foi definir as condições cromatográficas para a determinação dos flavonóides luteolina (L), apigenina (A), miricetina (M), quercetina (Q) e kaempferol (K) em frutas na forma aglicona, bem como definir as melhores condições da hidrólise/extração destes flavonóides utilizando ASR.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

Frutas maduras e frescas foram adquiridas em três supermercados ou jardins de Campinas/São Paulo-Brasil (pelo menos 1kg de cada fruta para cada local), no período entre junho e setembro de 2004. As seguintes frutas foram analisadas: acerola (*Malpighia glabra* L.), maçã (*Mallus pumila* Mill), cajú (*Anacardium occidentale* L.), figo (*Ficus carica* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg), manga (*Mangifera indica* L.), laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), mamão (*Carica papaya* L.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e morango (*Fragaria ananassa* Duch.).

2.2 - Reagentes e padrões

A água utilizada para o preparo das amostras e fases móveis foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore). O metanol e acetonitrila de grau cromatográfico e o ácido acético, ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Merck, 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 500 µg/mL, conservadas a -18°C e protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses em -18°C. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes. Como a altura, forma e tempo de retenção dos picos cromatográficos podem ser afetados pela composição da solução de injeção, preparou-se a solução padrão de trabalho simulando as condições após hidrólise das frutas. Aliquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q com 0,08% de ácido ascórbico. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M e o volume foi completado a 5mL com metanol (solução padrão de trabalho).

2.3 - Preparo das amostras

Ao contrário dos trabalhos publicados, neste estudo foi decidido que as amostras seriam utilizadas na forma natural, sem prévia liofilização. Durante o processo de liofilização pode ocorrer perda de flavonóides, especialmente a miricetina. Além disso, para o cálculo dos teores obtidos de amostras liofilizadas, é necessária a determinação do teor de umidade destas. Apesar de ser uma determinação simples, uma imprecisão nas análises de umidade, em

torno de g/100g, pode influenciar significativamente nos conteúdos de flavonóides, que estão em torno de mg/kg.

As frutas pequenas (morango, pitanga, acerola e jaboticaba), foram misturadas e, por quarteamento, o tamanho da amostra foi reduzido para aproximadamente 800g. As frutas maiores (mamão, manga, laranja, maçã, goiaba, cajú e figo), foram cortados em quatro longitudinalmente e duas porções opostas de cada fruta foram juntadas. Após a retirada da parte não comestível das frutas, estas foram cortadas manualmente em pequenos pedaços (1-2cm). Cada amostra foi inicialmente homogeneizada em multiprocessador de alimentos com 0,135% (p/p) de ácido ascórbico como antioxidante. Foi então homogeneizada durante 3 minutos na velocidade 25 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça).

2.4 – Estabelecimento das condições cromatográficas para CLAE

As análises por CLAE foram conduzidas em cromatógrafo a líquido Waters (Milford, EUA), controlado pelo Software Millennium 32, injetor manual com alça de volume fixo Rheodyne (modelo 7725i), e detector de arranjo de diodos modelo 996, a detecção fixada em 370nm e espectros na faixa de 200 a 600nm.

Foi inicialmente utilizada uma coluna Nova Pak C18 (3,9 x 150 mm, 4 µm) e depois definido o uso da coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5µm), ambas da Waters.

Para definir as condições cromatográficas de separação dos flavonóides agliconas, foi empregada a seguinte estratégia. Utilizando uma solução de padrões, foram inicialmente testados vários gradientes de fases móveis aquosas com solventes orgânicos, metanol ou acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido acético ou ácido fórmico. Posteriormente, extratos hidrolisados das amostras de frutas, com ou sem adição de padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos.

2.5 - Extração e hidrólise dos flavonóides

Para obter a máxima eficiência de extração e hidrólise sem promover degradação, a hidrólise dos flavonóides glicosídicos à forma aglicona para cada amostra de fruta, foi otimizada utilizando delineamento estatístico de Composição Central com pontos axiais [3]. Foram tomadas 15,0g de cada fruta homogeneizada com os 0,02g de ácido ascórbico já adicionado no preparo da amostra. Dez mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais (três níveis) e 25mL de metanol foram adicionados. A solução de extração assim obtida consistiu de diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa a 50% em metanol (v/v), com 0,04% de antioxidante. Após o refluxo a 90°C durante diferentes períodos (três tempos), os extratos foram resfriados e o volume completado a 50mL com metanol. Então cada amostra foi filtrada primeiro em peneira de 130 mesh e depois por filtro (PTFE) MILLIPORE de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

2.6. Delineamento estatístico

Um delineamento estatístico de Composição Central (DCC) com pontos axiais foi escolhido para investigar a não linearidade dos efeitos dos fatores, concentração do ácido e tempo de hidrólise, na eficiência da extração e hidrólise das agliconas. Cada fator foi testado em três níveis (*Tabela 1*).

TABELA 1. Fatores e níveis testados (valores codificados estão entre parênteses) para o Delineamento de Composição Central com pontos axiais

Fruta	Fatores (M ^a / min ^b)				
	Ponto axial inferior (-1,41)	Nível inferior (-1)	Nível intermediário (0)	Nível superior (+1)	Ponto axial superior (+1,41)
Acerola (<i>Eugenia uniflora</i>)	0,2M / 15min	0,3M / 40min	0,4M / 90min	0,5M/140min	0,6M/165min
Maçã (<i>Mallus pumila</i> Mill.)	0,3M / 10min	0,5M / 20min	0,9M / 45min	1,3M / 70min	1,5M/80min
Cajú (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	0,1M/40min ^c	0,1M / 40min	0,2M / 90min	0,3M/140min	0,3M/140min ^c
Figo (<i>Fícus carica</i> L.)	0,6M / 45min	0,8M / 60min	1,2M/120min	1,6M/180min	1,8M/205min
Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	0,12M/15min	0,2M / 35min	0,4M / 90min	0,6M/140min	0,7M/165min
Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> Berg)	0,2M/15min ^c	0,2M / 15min	0,6M / 45min	1,0M / 75min	1,0M / 75min ^c
Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	0,2M / 15min	0,4M / 30min	1,0M / 60min	1,6M / 90min	1,8M/105min
Pitanga (<i>Malpighia glabra</i> L.)	0,2M / 15min	0,4M / 30min	1,0M / 60min	1,6M / 90min	1,8M/105min
Morango (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	0,6M / 35min	0,8M / 60min	1,2M/120min	1,6M/180min	1,8M/205min

^aConcentração molar do HCl na solução de hidrólise; ^bTempo de hidrólise em minutos; ^cDelineamento onde pontos no centro de cada lado do quadrado substituem os pontos axiais

Um DCC com k-fatores e três níveis requer $2^k + 2k + C$ experimentos, onde 2^k pontos estão nos cantos do quadrado, representando a amplitude (o domínio) do experimento. Os pontos axiais $2k$ estão numa distância codificada de $\pm 1,41$ ($\pm \alpha$) do centro do delineamento que medem a possibilidade da não linearidade nos valores obtidos de agliconas em função dos fatores. Os pontos C em replicatas no centro do quadrado (ponto central) são uma estimativa do erro experimental. Assim, considerando dois fatores e quatro replicatas do ponto central, o planejamento envolveu 12 experimentos, que foram executados em ordem aleatória (*Tabela 2*).

TABELA 2. Condições experimentais do delineamento estatístico de Composição Central (DCC) com pontos axiais (fatores com valores codificados)

Experimento (seqüência teórica)	Fatores (valores codificados)		Concentração de flavonóis em pitanga (mg/kg)		
	Concentração Molar HCl	Tempo de hidrólise (min)	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
1	-1	-1	43,8	55,7	2,81
2	+1	-1	24,1	49,2	2,58
3	-1	+1	42,5	59,9	2,94
4	+1	+1	21,9	38,9	2,53
5	-1,41	0	43,9	59,3	2,08
6	+1,41	0	15,2	32,7	1,69
7	0	-1,41	45,7	59,7	3,34
8	0	+1,41	32,1	54,1	2,81
9	0	0	42,8	62,3	3,68
10	0	0	42,5	60,7	3,71
11	0	0	42,6	61,5	3,69
12	0	0	42,6	61,6	3,70

As primeiras 4 linhas da *Tabela 2* são suficientes para a determinação do modelo linear para hidrólise/extração, da linha 5 até a linha 8 do planejamento estão os pontos axiais e as 4 replicatas do experimento, que são os pontos centrais, estão da linha 9 até a linha 12.

2.7 - Análise de Superfície de Resposta

A hidrólise e extração podem ser otimizadas estatisticamente se o valor das concentrações das agliconas dos flavonóides for conhecido como uma função dos fatores experimentais, gerando um modelo matemático. Um gráfico dessa função produz a superfície de resposta para as agliconas que é obtida aplicando regressões lineares múltiplas para os valores obtidos das concentrações em µg/g em função dos fatores experimentais.

A superfície de resposta pode ser representada pelo modelo matemático como segue:

$$Y = b_0 + b_1X + b_2Z + b_{11}X^2 + b_{22}Z^2 + b_{12}XZ \quad \text{Eq.(1)}$$

Na Eq. (1), a resposta (Y) ou variável dependente foi a concentração em mg/kg, obtida para cada aglicona dos flavonóides por peso de amostra de fruta. Os valores b são as estimativas dos coeficientes do polinômio, os valores X e Z representam os valores codificados dos fatores (tempo de hidrólise e concentração do ácido, respectivamente). Os termos lineares, b_1X e b_2Z , são responsáveis pelos efeitos principais, os termos quadráticos, $b_{11}X^2$ e $b_{22}Z^2$, responsáveis pelos efeitos da curvatura e pelo produto bifatorial dos termos, e $b_{12}XZ$, é responsável pelos efeitos das interações. Foi realizado teste estatístico

de F para determinar a significância dos diferentes modelos obtidos. A análise estatística completa foi conduzida separadamente para a definição da condição de extração e hidrólise de cada tipo de fruta e cada aglicona presente nesta. Todas as análises e testes foram conduzidos utilizando o pacote estatístico STATISTICA for Windows, versão 6.0 da STATSOFT.

2.8 Validação do método

A linearidade do método por cromatografia foi verificada para flavonóis e flavonas na faixa de 0,2 – 50 µg/mL. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas nas faixas esperadas dos seus teores nas amostras de frutas. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$ respectivamente, sendo SD o desvio padrão do branco e S a inclinação da curva analítica [29]. Para comprovação prática dos valores calculados, estes foram injetados nas condições estabelecidas para a análise por CLAE. Para verificar a exatidão e precisão do método, valores de sete recuperações foram obtidas utilizando um nível de concentração em torno de 10 µg/g de acerola para os flavonóis e 17 µg/g de acerola para as flavonas. Todas as determinações nas amostras foram conduzidas em duplicata.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Condições cromatográficas ótimas para CLAE

Para a coluna Nova Pak C18 (3,9X150 mm, 4 μ m), com volume de injeção de 20 μ L e vazão de 1mL/minuto, fases móveis de água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico, não separaram os picos de quercetina e luteolina, bem como a apigenina do kaempferol, conforme também relatado por outros autores [17]. Água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético resultaram em boa separação dos compostos, porém, os picos apresentaram cauda. A melhor separação de padrões foi conseguida com a fase móvel metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando na proporção de 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear. Utilizando estas condições para amostras como o morango e a jaboticaba, ricas em antocianinas, a adição de padrões demonstrou co-eluição destes constituintes com o padrão de miricetina. (*Figura 1*).

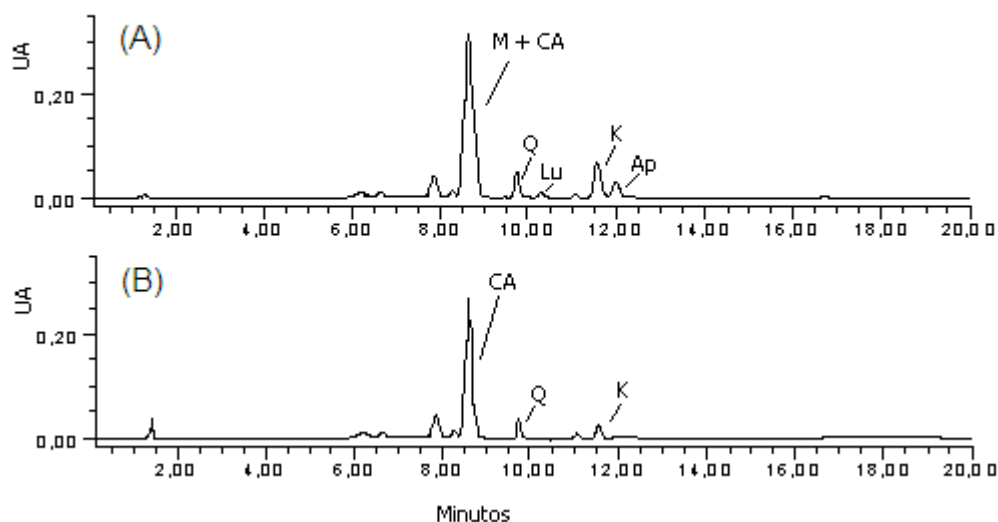


FIGURA 1. Cromatogramas da adição do padrão de miricetina com constituinte do extrato hidrolisado da amostra de morango, obtido com coluna Nova Pak C18 (3,9X150 mm, 4 μ m). A) extrato hidrolisado de morango adicionado dos padrões. B) extrato hidrolisado de morango. M = Miricetina; CA = Componente da Amostra; Q = Quercetina; K = Kaempferol; Lu = Luteolina; Ap = Apigenina. Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando na proporção de 20:80, chegando a 45:55 em cinco minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear.

A coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) com volume de injeção de 5 μ L e vazão de 0,2 mL por minuto, teve desempenho muito melhor. A melhor separação foi obtida utilizando como fase móvel metanol e água acidificados

com 0,3% de ácido fórmico, iniciando com a proporção de 20:80 passando para 48:52 em 6 minutos, esta proporção mantida até os 29 minutos, então alterada para 28:72 em 2 minutos, permanecendo até aos 40 minutos. Finalmente aos 43 minutos foi alterada para a composição inicial 20:80, mantida assim até aos 60 minutos para re-equilíbrio da coluna antes da próxima injeção. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas para cada extrato das frutas são apresentados na *Figura 2*. Os flavonóides miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol e apigenina eluíram nesta seqüência nos tempos de retenção de 29,0 minutos, 33,5 minutos, 35,5 minutos, 41,0 minutos e 42,0 minutos, respectivamente.

3.2 - Condições ótimas de extração e hidrólise dos flavonóides

A *Tabela 2* apresenta as concentrações em $\mu\text{g/g}$, obtidos para os flavonóis agliconas em pitanga para diferentes condições experimentais do DCC. Utilizando os valores codificados, foram calculadas por regressões múltiplas as estimativas dos efeitos (parâmetros b) do modelo matemático de regressão (Eq. 1) e foram determinados seus erros padrões. Ao nível de 95% de confiança, todos os parâmetros do modelo para extração/hidrólise foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) em amostra de pitanga (*Tabela 3*).

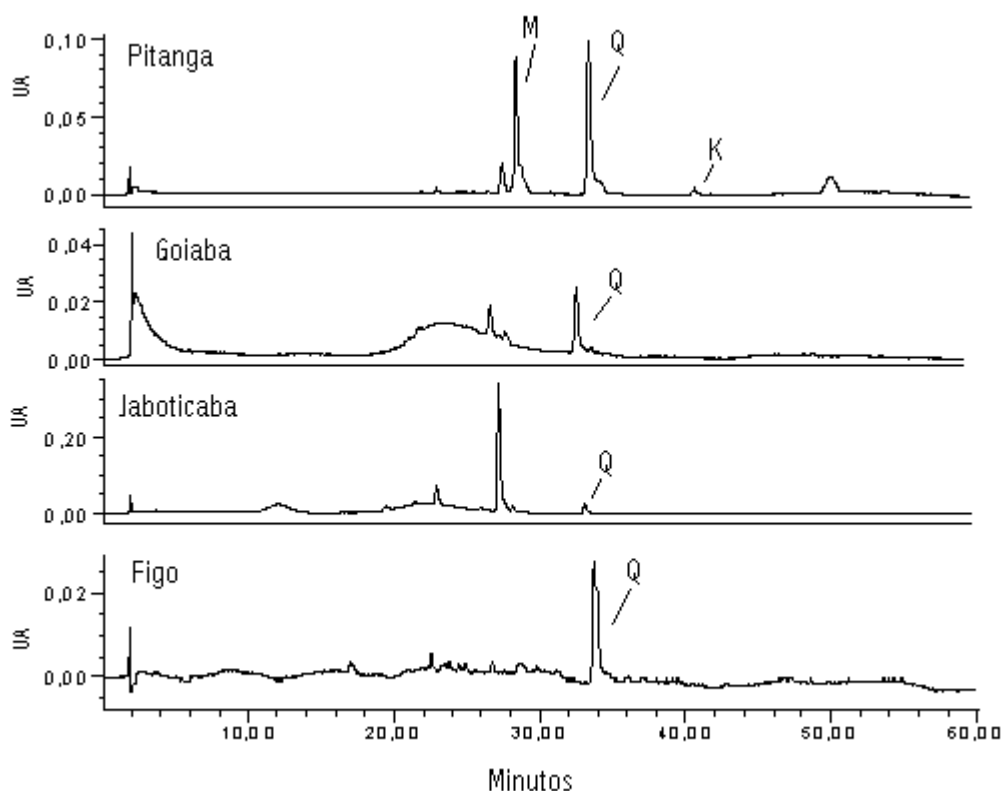


FIGURA 2. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas M = miricetina, Q = quercetina, K = kaempferol, dos extratos hidrolisados de pitanga; goiaba; jaboticaba; figo, para coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m). Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando com a proporção de 20:80 passando para 48:52 em 6 minutos, esta proporção mantida até os 29 minutos, então alterada para 28:72 em 2 minutos. Finalmente aos 43 minutos alterada para a composição inicial 20:80, mantida assim até aos 60 minutos.

TABELA 3. Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático, erro puro e significância (p), para a resposta dos teores de flavonóis agliconas em pitanga

Coeficiente	Miricetina			Quercetina			Kaempferol		
	Estimativa Coeficiente do polinômio	Erro Puro	p	Estimativa Coeficiente do polinômio	Erro Puro	p	Estimativa Coeficiente do polinômio	Erro Puro	p
b_0	42,63	0,05	4,53E-09	61,53	0,33	3,51E-07	3,695	0,006	8,02E-09
b_1	-10,12	0,04	1,2E-07	-8,14	0,24	5,37E-05	-0,148	0,004	4,45E-05
b_2	-2,83	0,04	5,5E-06	-1,76	0,24	0,004983	-0,085	0,004	2,29E-04
b_{11}	-6,84	0,04	5,49E-07	-7,93	0,26	8,15E-05	-0,849	0,005	3,3E-07
b_{22}	-2,17	0,04	1,73E-05	-2,44	0,26	0,002713	-0,251	0,005	1,29E-05
b_{12}	-0,22	0,05	0,026476	-3,62	0,33	0,001674	-0,045	0,006	4,173

p – significância de 5%

Os cálculos da análise de variância (ANOVA) para os resultados da regressão são apresentados na *Tabela 4*.

Nos limites do experimento, as três primeiras equações da *Tabela 5* representam o modelo experimental da extração/hidrólise de miricetina, quercetina e kaempferol, respectivamente, para amostra de pitanga. As equações estão em função das variáveis estudadas, tempo de hidrólise em minutos (X) e concentração molar do HCl (Z), sendo r^2 o coeficiente de determinação destas.

TABELA 4. Análise de variância (ANOVA) para os flavonóis em amostra de pitanga

Flavonol	Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Miricetina	Regressão	1182,942	5	236,588	41,57	F _(5,6) =4,39
	Resíduo	34,144	6	5,691		
	Falta de ajuste	34,109	3			
	Erro puro	0,035	3			
	Total	1217,086	11			
Quercetina	Regressão	1010,076	5	202,01	80,29	F _(5,6) =4,39
	Resíduo	15,093	6	2,516		
	Falta de ajuste	13,759	3			
	Erro puro	1,334	3			
	Total	1025,169	11			
Kaempferol	Regressão	4,865	5	0,973	28,62	F _(5,6) =4,39
	Resíduo	0,206	6	0,034		
	Falta de ajuste	0,205	3			
	Erro puro	0,001	3			
	Total	5,071	11			

Aplicando a mesma sequência analítica por regressões múltiplas aos dados dos DCC, foi possível obter um modelo matemático para cada flavonol aglicona presente nas demais frutas estudadas, considerando os termos lineares, quadráticos e seus produtos. Nos modelos matemáticos refinados obtidos (*Tabela 5*), ao nível de 95% de confiança, todos os coeficientes foram significativos ($p \leq 0,05$). Os valores dos coeficientes de determinação (r^2) de cada equação gerada variaram de 0,83 a 0,99. Estes resultados demonstraram que o modelo quadrático seria adequado para descrever as condições de extração/hidrólise. Para verificar o quanto o modelo matemático calculado representa os dados experimentais, foi conduzida análise de variância

(ANOVA). As razões entre o quadrado médio da regressão pelo quadrado médio do resíduo $F_{CAL} = (QM_{REGRESSÃO}/QM_{RESÍDUO})$, variaram de 15,80 a 209,60 (*Tabela 5*) para as equações dos modelos de extração/hidrólise dos flavonóis nas demais frutas. Todos valores foram superiores ao valor tabelado de $F_{5,6}=4,39$ para o nível de 95% de confiança, indicando equações de regressão significativas, ou a validade do modelo experimental. A boa repetitividade do experimento na análise de cada flavonol pode ser avaliada pelos baixos valores dos erros puros obtidos na análise de variância das regressões para cada fruta, também apresentados na *Tabela 5*, que variaram de 0,001 a 1,334.

Uma vez que os modelos propostos são válidos, as equações de regressão permitem prever o efeito dos dois parâmetros estudados sobre a extração/hidrólise das agliconas. A relação entre as variáveis independentes e a dependente é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta gerada pelos modelos para as agliconas dos flavonóis presentes em cada amostra, conforme *Figura 3*.

Constatou-se através da análise de superfície de resposta que as faixas ótimas de trabalho para determinação dos flavonóis em pitanga foram: 0,2M a 1M de HCl e 15 a 80 minutos de tempo de hidrólise para miricetina, 0,2M a 1,2M de HCl e 15 a 105 minutos de hidrólise para quercetina, e 0,6M a 1,2M de HCl e 15 a 90 minutos de hidrólise para kaempferol, conforme *Tabela 5*. Estão apresentadas também na *Tabela 5* as faixas para as demais frutas estudadas, obtidas através do mesmo procedimento utilizado para pitanga. Para pitanga que contém os três flavonóis, pela análise da superfície de resposta, as condições de extração/hidrólise são: 0,6M/40minutos; 0,6M/60minutos

e 1M/50 minutos para miricetina, quercetina e kaempferol respectivamente.

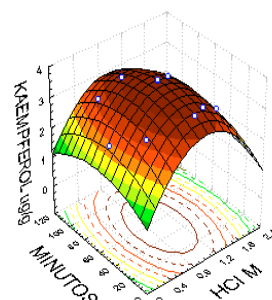
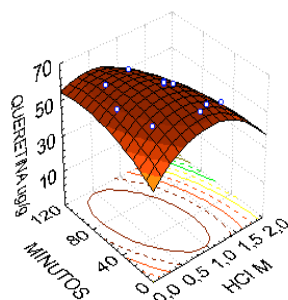
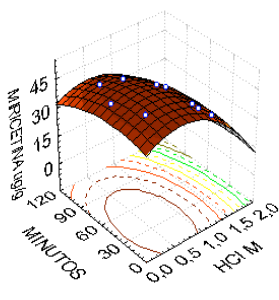
Optou-se pela condição de 0,6M HCl por 40 minutos.

Tabela 5. Equações de regressão em modelo codificado representando a superfície de resposta dos experimentos em teores dos flavonóis presentes nas frutas estudadas

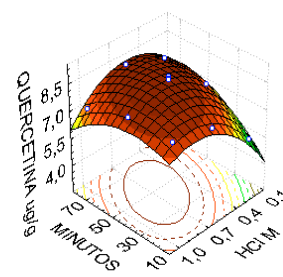
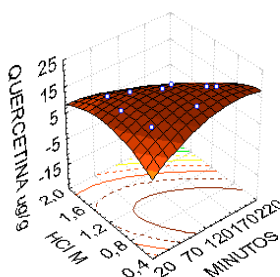
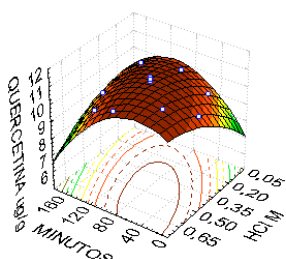
FRUTA	F L A V O N O L	EQUAÇÃO Y = (µg Flavonol /g Fruta) (Modelo Codificado)	r ²	F _{cal}	ERRO PURO	FAIXA ÓTIMA DE TRABALHO (MODELO)	CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE
Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	M	Y= 42,63 -10,12X -2,83Z -6,84X ² -2,17Z ² -0,22XZ	0,97	41,57	0,035	15 ≤ X ≤ 80 0,2 ≤ Z ≤ 1	40 X e 0,6 Z
	Q	Y= 61,53 -8,14X -1,76Z -7,93X ² -2,44Z ² -3,62XZ	0,98	80,29	1,334	15 ≤ X ≤ 105 0,20 ≤ Z ≤ 1,2	
	K	Y= 3,695 - 0,148X - 0,085Z + 0,849X ² - 0,251Z ² -0,045XZ	0,96	28,62	0,001	15 ≤ X ≤ 90 0,6 ≤ Z ≤ 1,2	
Acerola (<i>Malpighia glaba</i> L.)	Q	Y= 35,34 + 0,66X -0,36Z -3,27X ² -2,10Z ² +0,37XZ	0,83	15,79	0,055	50 ≤ X ≤ 130 0,25 ≤ Z ≤ 0,5	90 X e 0,4 Z
	K	Y= 15,07 -0,92X -0,11Z -0,10X ² -0,87Z ²	0,83	18,65	0,019	15 ≤ X ≤ 90 0,3 ≤ Z ≤ 0,5	
Maçã (<i>Mallus pumila</i> Mill.)	Q	Y= 56,64 -0,37X -6,05Z -4,57X ² -4,01Z ² -5,87XZ	0,98	82,40	0,018	30 ≤ X ≤ 80 0,30 ≤ Z ≤ 1,0	70 X e 0,5 Z
	M	Y= 19,96 -1,77X -0,26Z -2,61X ² -1,02Z ² -0,23XZ	0,99	209,6	0,032	90 ≤ X ≤ 130 0,15 ≤ Z ≤ 0,3	
Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	Q	Y= 11,55 -0,80X -0,44Z -1,27X ² -0,99Z ² -0,80XZ	0,96	25,90	0,062	80 ≤ X ≤ 140 0,15 ≤ Z ≤ 0,3	110 X e 0,2 Z
	K	Y= 2,47 +0,23X -0,08Z -0,25X ² -0,03Z ² -0,09XZ	0,95	29,80	0,003	60 ≤ X ≤ 140 0,1 ≤ Z ≤ 0,3	
	Q	Y= 14,42 -1,86X -4,29Z -2,20X ² -2,06Z ² -3,06XZ	0,95	23,15	0,009	45 ≤ X ≤ 205 0,60 ≤ Z ≤ 1,6	
Goiba (<i>Psidium guajava</i> L.)-	Q	Y= 10,74 -0,32X -0,17Z -0,81X ² -0,28Z ² -0,60XZ	0,97	36,27	0,031	15 ≤ X ≤ 110 0,20 ≤ Z ≤ 0,7	55 X e 0,6 Z
	Q	Y= 8,53 -0,39X -0,51Z -0,88X ² -1,20Z ² -0,87XZ	0,98	75,60	0,018	25 ≤ X ≤ 70 0,40 ≤ Z ≤ 1,0	
Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> Berg)	Q	Y= 3,69 -0,59X -0,73Z -0,41X ² -0,66Z ²	0,90	15,86	0,003	60 ≤ X ≤ 105 0,60 ≤ Z ≤ 1,8	90 X e 1,5 Z
	Q	Y= 7,88 +0,79X -0,40Z -1,17X ² -0,86Z ² -0,99XZ	0,88	18,57	0,275	90 ≤ X ≤ 200 0,80 ≤ Z ≤ 1,8	
Morango (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	K	Y= 11,01 -0,43X -1,26Z -1,42X ² -1,36Z ² -1,94XZ	0,88	19,12	0,122	100 ≤ X ≤ 205 0,6 ≤ Z ≤ 1,2	120 X e 1,2 Z
	K						

M = miricetina; **Q** = quercetina; **K** = kaempferol; **X**= tempo de hidrólise em minutos; **Z**= HCl Molar, concentração na solução de hidrólise;

r²= coeficiente de determinação; F_{calc} = (QM_{Regressão}/QM_{Resíduo})



PITANGA



GOIABA

FIGO

JABOTICABA

FIGURA 3. Superfícies de resposta na determinação das agliconas miricetina, quercetina e kaempferol em amostras de pitanga; e quercetina em goiaba, figo e jaboticaba, em função da concentração molar do HCl e tempo de hidrólise em minutos.

As condições que resultaram na melhor resposta experimental em mg/kg, (Tabela 5) para cada fruta foram: pitanga (0,6M HCl/40 minutos de hidrólise); acerola (0,4M HCl/90 minutos de hidrólise); maçã (0,5M HCl/70 minutos de hidrólise); caju (0,2M HCl/110 minutos de hidrólise); figo (0,5M HCl/160 minutos

de hidrólise); goiaba (0,6M HCl/55 minutos de hidrólise); jaboticaba (0,6M HCl/45 minutos de hidrólise); laranja (1,5M HCl/90 minutos de hidrólise); pitanga (0,6M HCl/40 minutos de hidrólise); morango (1,2M HCl/120 minutos de hidrólise).

3.3 Desempenho do método desenvolvido

As curvas analíticas passaram pela origem e apresentaram-se lineares nas faixas de concentração em que se encontraram as amostras, com coeficientes de correlação entre 0,9971 até 0,9999. A *Tabela 6* mostra os dados obtidos para cada curva analítica.

Os Limites de Detecção (LOD), obtidos pelos parâmetros da curva analítica, foram: 0,86 mg/kg ; 0,73 mg/kg; 0,86 mg/kg; 1,03 mg/kg e 2,71 mg/kg, respectivamente para miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina.

Tabela 6. Propriedades das curvas analíticas

Flavonóide	Faixa de concentração (µg/mL)	Coeficiente de determinação (r^2)
Miricetina	0,6 – 23	0,9995
Quercetina	0,3 – 48	0,9999
Kaempferol	0,18 – 37	0,9997
Luteolina	1,1 – 26	0,9989
Apigenina	1,6 – 38	0,9971

A média dos sete valores de recuperação dos flavonóides em percentagem (*Tabela 7*) resultou em 87,1%; 94,8%; 95,4%; 96,3% e 94,8%, respectivamente, para miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina, mostrando a exatidão do método. A precisão (repetitividade) foi demonstrada pelos coeficientes de variação das recuperações, expressos na *Tabela 7*.

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

Flavonóide	Quantidade adicionada (mg/kg)	Recuperação ^a (%)	CV (%)
Miricetina	9,7	87,1	2,4
Quercetina	10,0	94,8	2,3
Kaempferol	10,2	95,4	3,1
Luteolina	21,3	96,3	1,9
Apigenina	14,7	94,8	1,4

^a Média de sete determinações.

3.4 - Verificação experimental

Para verificar a performance nas condições definidas pelas análises por superfície de resposta, estas foram aplicadas nas amostras das frutas em estudo, resultando nos valores expressos na *Tabela 8*. Os teores de quercetina e kaempferol obtidos (Q=10 mg/kg e K=9,6 mg/kg) para amostra de morango, são comparáveis aos reportados por FRANKE et al. (Q=9 mg/kg e K=6 mg/kg)

[12], HÄKKINEN & TÖRRÖNEN (Q=3 a 5 mg/kg e K=2 a 9 mg/kg) [14] e HERTOOG, HOLLMAN & KATAN (Q=7,7 a 10 mg/kg e K=7 a 16 mg/kg) [16]. Para maçã, o teor de quercetina de 63 mg/kg obtido é coerente ao citado nos trabalhos de ARABBI, GENOVESE & LAJOLO (4 a 104 mg/kg) [1], FRANKE et al. (26 a 76mg/kg) [12] e PRICE & PROSSER (26,4 a 73,9 mg/kg) [26]. Também para amostra de laranja o baixo teor de quercetina observado (4,3 mg/kg) é comparável ao relatado por FRANKE et al. (4 a 6 mg/kg) [12] e ARRABI, GENOVESE & LAJOLO (8 a 9 mg/kg) [1].

Em todas amostras estudadas não foram detectadas as flavonas apigenina e luteolina.

Tabela 8. Conteúdo de flavonóis em frutas analisadas segundo as condições estabelecidas neste estudo.

Fruta	Concentração (mg/kg) ^a		
	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Acerola (<i>Eugenia uniflora</i> L.) De jardins (variedade não definida)	nd	41 ± 0	11 ± 0
Maçã (<i>Mallus pumila</i> Mill.) Fuji (vermelha, com casca)	nd	63 ± 1	<LQ
Cajú (<i>Anacardium occidentale</i> L.) De supermercado (variedade não definida)	23 ± 1	13 ± 1	2,7 ± 0,5
Figo (<i>Ficus carica</i> L.) Roxo	nd	13 ± 0	nd
Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.) Ogawa (vermelho)	nd	11 ± 1	nd
Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> Berg) de supermercado (variedade não definida)	nd	8,7 ± 2,8	nd
Laranja (<i>Citrus sinensis</i>) Selecta	nd	4,3 ± 0,7	nd
Pitanga (<i>Malpighia glabra</i> L.) De supermercado (variedade não definida)	42 ± 2	67 ± 2	4,1 ± 1,0
Morango (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.) Oso Grande	nd	10 ± 0	9,6 ± 0,7

^a Média ± desvio padrão (mg/kg de fruta natural), análise em duplicata

LQ= Limite de quantificação: miricetina=2,6mg/kg; quercetina=2,3mg/kg; kaempferol=2,6mg/kg

nd= não detectado / LOD = Limite de Detecção: miricetina=0,86mg/kg; quercetina=0,73mg/kg; kaempferol=0,86mg/kg

4 - CONCLUSÕES

As melhores condições cromatográficas para análise dos flavonóides agliconas em frutas foram: coluna de fase reversa Symmetry C-18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m), volume de injeção de 5 μ L; fase móvel de metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear e vazão de 0,2 mL por minuto. A alta correlação dos modelos definidos pela análise de superfície de resposta demonstrou que o modelo polinomial de segunda ordem deve ser usado para otimização das condições de extração e hidrólise dos flavonóides em amostras de frutas. As condições estabelecidas de extração e hidrólise foram diferentes para cada amostra e permitiram uma rápida e confiável quantificação dos flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol nas frutas estudadas.

5 – REFERÊNCIAS

1. ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
2. ARMSTRONG, B. K.; MANN, J.L.; ADELSTEIN, A.M.; ESKIN, F. Commodity consumption and ischemic heart disease mortality, with special reference to dietary practices. **Journal of Chronic Disease**, v.28, p. 455-469, 1975.

3. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, L.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**, 2ª edição. Campinas: EDUCAMP, 1995.
4. BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
5. BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1-15, 1951.
6. BURR, M.C.; SWEETNAM, P.M. Vegetarianism, dietary fibre, and mortality. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.36, p.673-677, 1982.
7. CACACE, J.E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 240-248, 2003.
8. CARAGAY, A.B. Cancer: preventive foods and ingredients. **Food Technology**, v. 46, p.65-68, 1992.
9. CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 449-460, 2000.
10. CASTELLUCIO, 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. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 368, p. 188-192, 1995.

11. CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 326-329, 2001.
12. FRANKE, A.A.; CUSTER, L.J.; ARAKAKI, C.; MURPHY, S.P. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawai'i. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, p. 1-35, 2004.
13. HAALAND, P.O. **Experimental design in biotechnology**, New York: Marcel Dekker, 1989.
14. HÄKKINEN, S.; TÖRRÖNEN, R. Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, v. 33, p. 517-524, 2000.
15. 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**, v. 342, p. 1007-1011, 1993.
16. HERTOOG, M.G.L.; HOLLMANN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2379-2383, 1992.
17. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1591-1598, 1992.

18. KELI, S.O.; HERTOOG, M.G.L.; FESKIN, E.J.M.; KROMHOUT, D.; Dietary flavonoids, antioxidant vitamin and incidence of stroke: the Zutphen study. **Archives of International Medicine**, v. 156, p. 632-642, 1996.
19. KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 312, p. 478-481, 1996.
20. KÜHNAU, J. The flavonoids: a class of semi-essential foods components: their role in human nutrition. **World Review Nutrition Dietetics**, v.24, p.117-191, 1976.
21. LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 47-56, 2005.
22. MARKHAM, K.R. Flavones, flavonols and their glucosides. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 1, p. 197 -235, 1989.
23. MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on imune and inflammatory functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1167-1179, 1992.
24. MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. 2^a ed., New York: Wiley Company, 2002.
25. PHILLIPS,R.L.; LEMON, F.R.; BEESON, W.L.; KUZMA, J.W. Coronary heart disease mortality among Seventh-Day Adventist with differing dietary habits: a preliminary report. **American Journal of Clinical Nutrition, The**, v.31, 191-198, 1978.

26. PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RICHETIN, A.M.F.; RHODES, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chemistry**, v. 66, p. 489-494, 1999.
27. 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 Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.
28. RIMM, E.B.; KATAN, M.B.; ASCHERIO, A.; STAMPER, M.J.; WILLET, W.C. Relationship between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of International Medicine**, v. 125, n. 5, p. 384-389, 1996.
29. SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.
30. STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, p.1027-1039, 1996.
31. VERLANGIERI, A.J.; KAPEGHIAN, J.C.; el-DEAN, S.; BUSH, M. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. **Medical Hypotheses**, v. 16, p.7-15, 1985.

32. WILLIAMS C.A.; HARBORNE, J. B. Flavone and flavonol glycosides. In: HARBORNE J.B (Ed.) **The flavonoids. Advances in research since 1986.** London: Chapman & Hall, 1994. Cap.8, p. 337-385.

6 - AGRADECIMENTOS

Ao PICDT / UFPR pela concessão de bolsa à primeira autora, e ao PRONEX / FAPESP nº 2003/10151-4 pelo apoio financeiro para execução do experimento.

CAPÍTULO 3

Occurrence of Flavonols and Flavones in Tropical and Sub-tropical Fruits

ROSEMARY HOFFMANN-RIBANI AND DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

Artigo a ser submetido à Revista **Journal of Agricultural and Food Chemistry**

Occurrence of Flavonols and Flavones in Tropical and Sub-tropical Fruits

ROSEMARY HOFFMANN-RIBANI AND 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, Brazil

Abstract

Flavonols (myricetin, quercetin, kaempferol) and flavones (luteolin and apigenin) were determined in tropical and sub-tropical fruits. Ripe fruits of acerola (2 cultivars), cashew-apple, guava (2 cultivars), fig, jaboticaba, mango (3 cultivars), oranges (4 cultivars), papaya (3 cultivars), and pitanga were sampled at different times from July 2004 to January 2005. Apple (3 cultivars) and strawberry (3 cultivars) were also sampled and analyzed for comparison. The flavonoids were determined as aglycones by HPLC-DAD. The optimum condition for hydrolysis for each fruit was established using Central Composite Experimental Design (CCD). The five flavonoids investigated were not detected in mango and papaya. Quercetin was found in all the other fruits investigated, varying from 3.0 mg/kg in orange cultivar Pêra to 74.7 mg/kg in apple cultivar Fuji. Kaempferol was encountered in strawberry (7.0 – 8.9 mg/kg), acerola (8.7 – 12.2 mg/kg),

pitanga (3.9 – 4.5 mg/kg) and cashew apple (<LQ – 2.7 mg/kg). Myricetin was detected only in pitanga (31.5 – 36.8 mg/kg) and cashew-apple (19.9 mg/kg). Luteolin and apigenin were not detected in any of the fruits. Among the fruits analyzed, the best sources of flavonoids are pitanga and cashew apple, containing the three flavonols, and acerola with quercetin and kaempferol.

KEYWORDS: flavonols, flavones, HPLC determination, fruits

INTRODUCTION

Numerous articles have been published on the possible health benefits of flavonoids. Antioxidant (1, 2), anti-inflammatory (3) and antimutagenic (4) properties have been attributed to these compounds. Epidemiological studies have shown a correlation between increased consumption of flavonoids and reduced risk of cardiovascular diseases (5 - 8) and certain types of cancer (9-11), but the evidence is still not conclusive (12) as such association was not observed in other studies (13, 14).

Reliable analytical data are needed to identify food sources of flavonoids and study their role against diseases. The flavonoid composition of fruits has been reported (15 - 18), but more data are needed. Marked compositional variability has been observed due to varietal or cultivar differences, season, climate, degree of ripeness, processing, and storage of the fruits (19, 20), but analytical uncertainty appears to be also involved.

Except the flavanols, flavonoids are usually found in plants as glycosides. Quantitative determination of individual glycosides is difficult because several glycosides can occur for each flavonoid, each has a characteristic spectrum different from that of the aglycone, and standards are not commercially available for most of these compounds (21). Reports on food flavonoids levels generally determine the aglycones after hydrolysis of food extracts in order to reduce the complexity of the analysis. However, methodological differences, particularly the conditions of hydrolysis, can result in different flavonoid levels (16, 21, 22).

Brazil is rich in tropical and subtropical fruits, which are frequently consumed fresh. The objective of this study was to determine three major flavonols (myricetin, quercetin and

kaempferol) and two major flavones (luteolin and apigenin) in these fruits, after optimizing the extraction/hydrolysis procedure.

MATERIAL AND METHODS

Fruits. Ripe fresh fruits were sampled and analyzed at five different times from July 2004 to January 2005, harvest time for most of the fruits in Brazil. At each sampling date, samples of each fruit (1 kg or a minimum of 3 units) were purchased from three supermarkets or gardens in Campinas, São Paulo. A composite sample was prepared for analysis as described below. The following fruits were analyzed: acerola (*Malpighia glabra* L.) cultivars Olivier and Longa Vida and garden lots of undefined variety; apple (*Malus pumila* Mill) cultivars Fuji, Gala, and Golden; cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) supermarket lots of undefined variety; fig (*Ficus carica* L.) purple type; guava (*Psidium guajava* L.) white and red cultivar Ogawa; jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg) supermarket lots of undefined variety; mango (*Mangifera indica* L.) cultivars Haden, Palmer, and Tommy Atkins; oranges (*Citrus sinensis*) cultivars Bahia, Selecta, Lima, and Pêra; papaya (*Carica papaya* L.) cultivars Formosa, Golden, and Solo; pitanga (*Eugenia uniflora* L.) supermarket and garden lots of undefined varieties; strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars Oso Grande, Sweet Charlie, and Kamarossa.

Chemicals. The standards of myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Water was purified with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, USA). Methanol (HPLC-grade) was purchased from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, USA). Reagent grade formic acid

and ascorbic acid were from Merck (Frankfurt, Germany) and Labsynth Ltda. (Diadema, Brazil) respectively.

Sample preparation. To preserve the labile analytes during storage of samples prior to analysis, studies on the flavonoid content of food frequently use lyophilized samples. In this work, samples were analyzed immediately after collection. Aside from the need of a freeze dryer, lyophilization can cause rupture of cell walls and increase the porosity of the samples, thus promoting oxidative losses of flavonoids, especially myricetin. Additionally, to calculate the flavonoid concentrations in the food, it is necessary to measure the moisture content, and despite being a simple analysis, the moisture content (which is in percentage) is not too accurate and the error could be carried on to and magnified in the flavonoid content (which is at the low mg/kg level).

For each composite sample small fruits (acerola, jaboticaba, strawberry and pitanga) taken from the three sampling sites were mixed, quartered to reduce the size of the sample to approximately 800g, homogenized first in a food processor with 0.135 % w/w ascorbic acid as antioxidant, then homogenized at speed 25 during 3 min in a Polytron homogenizer (Polytron System MR2100, Kinematica-AG, Switzerland). For the bigger fruits, the unedible parts of the fruits taken from the three sampling sites were removed, the fruits were cut longitudinally into quarters, opposite section were combined, sliced (1-2cm) by hand and homogeneized as described for the small fruits.

HPLC analysis. This analysis was performed on a Waters System, equipped with a Rheodyne injection valve with a 5 μ L fixed loop, a quaternary pump (Waters model 600), and a UV-Visible photodiode array detector (Waters model 996), controlled by a Millenium workstation (version 32). A Symmetry C-18 (2.1 x 150 mm, 3.5 μ m) Waters column was

used, the mobile phase consisted of methanol and water, both acidified with 0.3% formic acid and the flow rate being 0.2 mL per min. A multilinear gradient was applied from 20:80 to 48:52 in 6 min, this proportion being maintained until 29 min, and then changed to 28:72 in 2 min, this proportion being maintained until 40 min. Finally, the mobile phase was brought back to the initial proportion of 20:80 in 3 min, maintaining this proportion until 60 min, for column reequilibration before subsequent injection. Analytes were monitored from 200-600 nm and detection at 370 nm were used for quantification. Samples were injected in duplicate, and the flavonoids were quantified by external standardization.

Standards. Stock solutions were prepared by dissolving the flavonoids in HPLC grade methanol to a concentration of approximately 500 µg/mL, stored at -18°C, and protected from light, when in use. Standard stock solutions were found to be stable for over 2 months at -18°C. To match the standard and sample solutions, the standard working solution was prepared as follows: standard stock solutions were diluted in 1.5 mL Milli-Q water to which 0.08% ascorbic acid was added. One mL of 6M HCl was added and the solution was made up to 5 mL with methanol.

Flavonoid extraction and hydrolysis. To insure efficient extraction while avoiding sample degradation, the factors acid concentration and time for the hydrolysis of the flavonoid glycosides to the aglycones were optimized using a Central Composite Experimental Design (CCD) with axial points (23). Each factor was tested at three levels, where four points were in the corners of the square of the experimental design, four axial points were at a codified distance of ± 1.41 ($\pm\alpha$) from the center of the design, and four replicates points in the center of the square. This involved 12 experiments, which were performed in random order. By applying multiple regression analysis on the CDD data, it was possible to obtain a refined mathematical model for each flavonoid, with all

coefficients significant ($p \leq 0.05$). Statistical F tests were performed to determine significances of the different models obtained. The three-dimensional plot of these mathematical models formed the response surface for each aglycone, allowing that optimum ranges of hydrolysis conditions be obtained. All statistical analysis and tests were carried out using the statistical package STATISTICA for Windows, version 6.0 from STATSOFT.

For this optimization, a 15 g subsample was taken and 10 mL HCl at different initial molar concentration (three levels) and 25 mL methanol were added. The extraction solution thus obtained consisted of different final HCl concentration in 50% aqueous methanol (v/v), and 0.04% antioxidant. After refluxing at 90°C during different periods (three periods), the extracts was allowed to cool and the volume subsequently made up to 50 mL with methanol. The sample was passed through a 130 mesh sieve and filtered through a 0.45 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter (Millipore Ltd., Bedford, USA) prior to HPLC analysis.

Validation of the HPLC method. The linearity of the HPLC method was checked for flavonols and flavones in the 0.2 – 50 $\mu\text{g/mL}$ range. Calibration was performed by injecting the standard working solution in triplicates at five different concentrations for each flavonoid work solution, based on the expected flavonoid content ranges in the samples.

The limits of detection (LOD), calculated as the minimal concentration corresponding to $3.3 \times (\text{SD}/S)$, SD being the standard deviation of the blank and S the slope of the standard curve (24). The calculated values were confirmed with actual analytical values under the chromatographic conditions established. The accuracy of the method, was verified in recovery tests, using acerola samples spiked with 10 $\mu\text{g/g}$ of flavonol standards and 17 $\mu\text{g/g}$ of flavone standards, the test being done seven times for each flavonoid.

RESULTS AND DISCUSSION

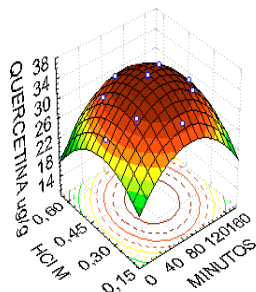
Optimum conditions for extraction/hydrolysis. In the final refined mathematical model obtained for each flavonoid aglycone, the statistical F test demonstrated the goodness of fit of the calculated model to the experimental data. The extraction and hydrolysis showed a dependence on the factors acid concentration and hydrolysis time, which could be represented by the response surface. The three-dimensional plots of the modelled response surface for some fruits are shown in **Figure 1**.

Based on these data, the optimum conditions for each fruit were: acerola, 0.4M HCl for 90 min; apple, 0.5M HCl for 70 min; cashew apple, 0.2M HCl for 110 min; fig, 0.5M HCl for 160 min; guava, 0.6M HCl for 55 min; jaboticaba, 0.6M HCl for 45 min; oranges, 1.5M HCl for 90 min; pitanga, 0.6M HCl for 40 min; strawberry, 1.2M for 120 min.

HPLC/DAD method Performance. All standard curves passed through the origin, were linear in the concentration ranges expected in the samples, with coefficients determination of 0.9971 to 0.9999. **Table 1** presents the standard curve data. The LOD, defined with the standard curve parameters, were 0.86 µg/g; 0.73 µg/g; 0.86 µg/g; 1.03 µg/g and 2.71 µg/g, respectively, for myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin.

The recoveries mean of the flavonoids in percentages (**Table 2**) were 87.1%; 94.8%; 95.4%; 96.3% and 94.8%, respectively, for myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin. The Coefficients of Variation (CV) showed good repeatability (**Table 2**).

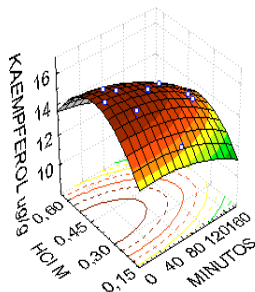
ACEROIA



Y (µg quercetin/ g fruit) =

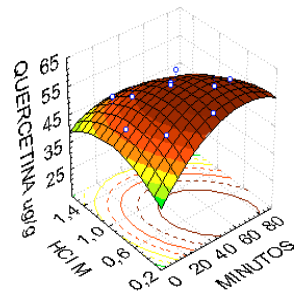
$$35,34 + 0,66X - 0,36Z - 3,27X^2 - 2,10Z^2 + 0,37XZ$$

APPI.E



Y (µg kaempferol/ g fruit) =

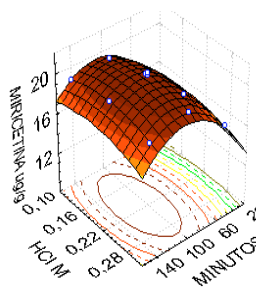
$$15,07 - 0,92X - 0,11Z - 0,10X^2 - 0,87Z^2$$



Y (µg quercetin/ g fruit) =

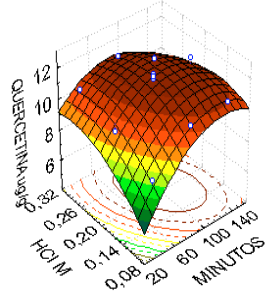
$$56,64 - 0,37X - 6,05Z - 4,57X^2 - 4,01Z^2 - 5,87XZ$$

CASHEW APPI.E



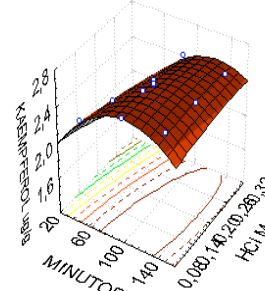
Y (µg myricetin/ g fruit) =

$$19,96 - 1,77X - 0,26Z - 2,61X^2 - 1,02Z^2 - 0,23XZ$$



Y (µg quercetin/ g fruit) =

$$11,55 - 0,80X - 0,44Z - 1,27X^2 - 0,99Z^2 - 0,80XZ$$



Y (µg kaempferol/ g fruit) =

$$2,47 + 0,23X - 0,08Z - 0,25X^2 - 0,03Z^2 - 0,09XZ$$

Figure 1. Response surface of the extraction and hydrolysis of quercetin in fruits as a function of (X)= real hydrolysis time in minutes and (Z)= HCl molar concentration in hydrolysis solution; the (Y)= regression equations in real model, and the optimum model work range for acerola, apple and cashew apple.

Table 1. Standard Curve Characteristics

flavonoid	concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	coefficient of determination (r^2)
myricetin	0.6 – 23	0.9995
quercetin	0.3 – 48	0.9999
kaempferol	0.18 – 37	0.9997
luteolin	1.1 – 26	0.9989
apigenin	1.6 – 38	0.9971

Table 2. Added Amounts, Recoveries (%) and Coefficients of Variation (CV) of Acerola Samples Spiked with Flavonoids.

flavonoids	added contend in $\mu\text{g/g}$ of fruit	mean recovery ^a (%)	CV (%)
myricetin	9.7	87.1	2.4
quercetin	10.0	94.8	2.3
kaempferol	10.2	95.4	3.1
luteolin	21.3	96.3	1.9
apigenin	14.7	94.8	1.4

^a Mean of the recovery determinations.

Flavonol and flavone levels in the fruits. Typical chromatograms of the flavonols of some fruits are shown in **Figure 2**. Quercetin was found in all fruits, the highest concentrations being found in apple cultivar Fuji and pitanga, with mean values of 75 and 62-55 mg/kg, respectively. Kaempferol ranged from below the limit of detection (LOD) for most fruits to about 12 mg/kg in acerola (garden lot). Myricetin was not detected in the

fruits, except pitanga and cashew apple with about 31-37 and 20 mg/kg, respectively (**Table 3**). The flavones luteolin and apigenin were not detected in all the fruits analyzed.

Quercetin was the main flavonol in acerola. Its concentration ranged from 23 to 92 mg/kg fresh weight, being lowest in the cultivar “Longa Vida” (41 ± 11 mg/kg) and highest in the cultivar “Olivier” (53 ± 2.4 mg/kg). Kaempferol varied from 6.4 to 16 mg/kg, being also lowest in “Longa Vida” (8.7 ± 2.9 mg/kg) and highest in the garden lots (12 ± 3.5 mg/kg). The kaempferol contents in acerola fruits were the highest among those analyzed in this study.

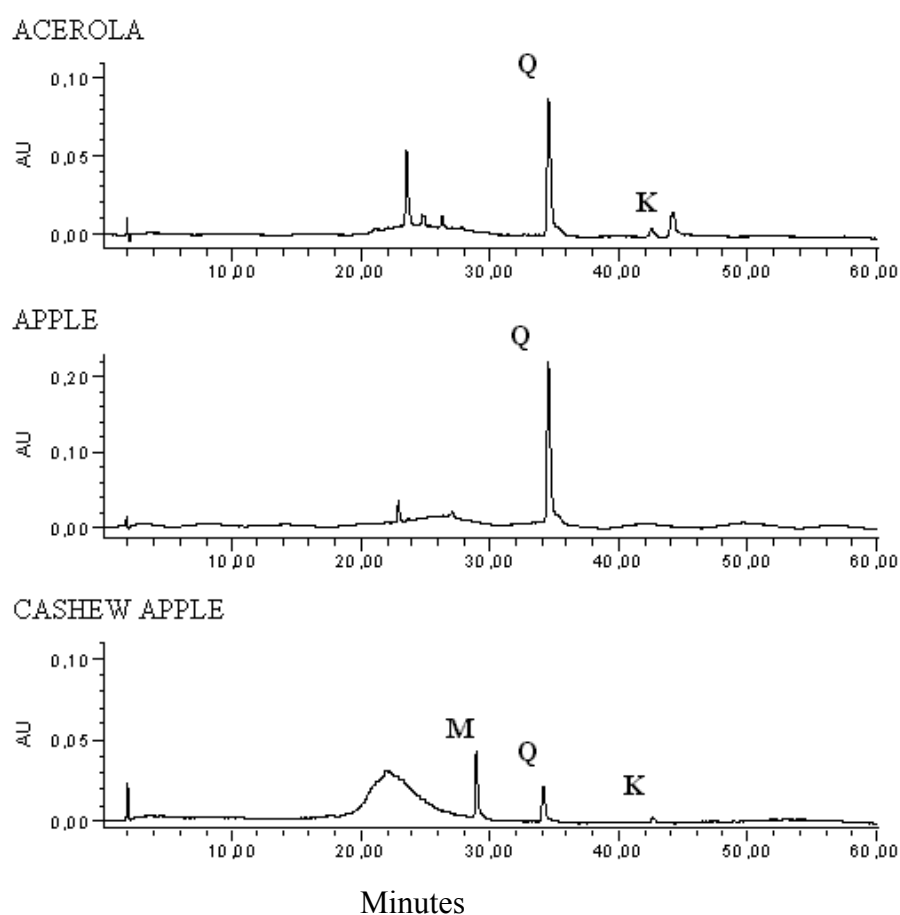


Figure 2. HPLC chromatograms of the flavonoids aglycons of acerola, apple and cashew apple. Descriptions of the chromatographic conditions are in text.

M = myricetin, Q = quercetin, K = kaempferol

Table 3. Flavonol Content of Brazilian fruits

fruit	n	concentration (mg/kg fresh weight) ^a		
		myricetin	quercetin	kaempferol
acerola (<i>Malpighia glabra</i> Linn.)				
garden lots (undefined variety)	6	nd	35 - 92 (50 ± 1.3)	7.8 - 16 (12 ± 3.3)
cultivar Longa Vida	5	nd	23 - 54 (41 ± 11)	6.4 - 12 (8.7 ± 2.9)
cultivar Olivier	3	nd	50 - 55 (53 ± 2.4)	8.2 - 11 (9.6 ± 1.4)
apple (<i>Mallus pumila</i> Mill.)				
cultivar Fuji (red, with skin)	5	nd	63 - 86 (75 ± 11)	<LQ
cultivar Golden Delicious (green, with skin)	5	nd	28 - 42 (37 ± 6)	nd
cultivar Gala (red, with skin)	5	nd	40 - 80 (56 ± 16)	<LQ
cashew-apple (<i>Anacardium occidentale</i> L.)				
supermarket lots (undefined variety)	5	13 - 28 (20 ± 5.3)	10 - 19 (13 ± 3.5)	<LQ-2,7
fig (<i>Ficus carica</i> L.)				
purple type	5	nd	8.3 - 19 (13 ± 3.9)	nd
guava (<i>Psidium guajava</i> L.)-				
cultivar Ogawa (red)	7	nd	8.4 - 11 (9.7 ± 0.9)	nd
white type (white)	5	nd	10 - 12 (12 ± 0.8)	nd
jabuticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> Berg)				
supermarket lots (undefined variety)	8	nd	8.7 - 13 (11 ± 1.6)	nd
orange (<i>Citrus sinensis</i>)				
cultivar Pêra	5	nd	2.3 - 4.1 (3.0 ± 0.9)	nd
cultivar Bahia	5	nd	2.9 - 4.8 (3.8 ± 0.8)	nd
cultivar Lima	5	nd	2.6 - 4.1 (3.2 ± 0.6)	nd
Cultivar Selecta	4	nd	2.4 - 4.3 (3.2 ± 0.8)	nd
pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)				
garden lots(undefined variety)	3	33 - 42 (37 ± 4.1)	56 - 73 (62 ± 9.2)	3.8 - 4.4 (3.9 ± 0.3)
supermarket lots (undefined variety)	4	27 - 36 (31 ± 4.5)	51 - 67 (55 ± 10)	3.1 - 5.8 (4.5 ± 1.1)
strawberry (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.)				
cultivar Kamarossa	3	nd	7.2 - 8.8 (7.8 ± 0.9)	5.6 - 7.9 (7.0 ± 1.2)
cultivar Oso Grande	5	nd	8.6 - 14 (11 ± 2.2)	5.5 - 13 (8.9 ± 2.5)
cultivar Sweet Charlie	2	nd	7.3 - 10 (8.8 ± 2.1)	6.2 - 9.8 (7.9 ± 2.6)

^a range (mean ± standard deviation)

n= number of composite samples analyzed in duplicate

LQ= Limit of Quantitation: myricetina=2.6mg/kg; quercetin=2.3mg/kg; kaempferol=2.6mg/kg

nd= not detected; LOD = Limit Of Detection: myricetina=0.86mg/kg; quercetin=0.73mg/kg; kaempferol=0.86mg/kg

The “Golden Delicious” apple cultivar had lower quercetin content (37 ± 6 mg/kg), compared to the apples “Gala” (56 ± 16 mg/kg) and “Fuji” (75 ± 11 mg/kg). In general, the apple quercetin levels (28 to 86 mg/kg) obtained in the present study compare well with findings reported earlier by Arabi et al., (25), Franke et al. (16), Price et al., (26) and Hertog et al. (17) ranging from 4 to 104 mg/kg, 25 to 80 mg/kg, 26.4 to 75.9 mg/kg and 21 to 72 mg/kg, respectively (**Table 4**).

Table 4. Comparison of Quercetin and Kaempferol Levels in Apple, Strawberries and Orange, Reported in Different Studie

fruits	references	concentration range (mg/kg)	
		quercetin	kaempferol
apple			
3 cultivars	present study	28 – 86	nd - < 2.7
3 cultivars	Arabbi et al. (25)	4 - 104	nd
2 cultivars	Franke et al. (16)	25 - 80	< 0.1
4 cultivars	Price et al. (26)	26.4 – 73.9	nd
6 cultivars	Hertog et al. (17)	21 - 72	nd
orange (pulp)			
3 cultivars	present study	2.3 – 4.8	nd
2 cultivars	Franke et al. (16)	4 - 6	nd
2 cultivars	Arabbi et al. (25)	8 - 9	nd
strawberry			
3 cultivars	present study	7.2 - 14	5.5 - 13
3 samples	Hertog et al. (17)	7.7 - 10	7.0 - 16
4 samples	Justenssen et al. (31)	6	5
2 cultivars	Häkkinen et al. (30)	7	5 - 8
9 cultivars	Häkkinen et al.(32)	3 - 5	2 - 9
1 variety	Franke et al. (16)	9	6
3 Varieties	Cordenunsi et al. (29)	39 - 53	13 - 21

nd = not detected

Unlike the other fruits, cashew apple had myricetin (19.9 ± 5.5 mg/kg) as the major flavonol followed closely by quercetin (13.4 ± 3.5 mg/kg). Kaempferol ranged from below the LQ to 2.7 mg/kg. The cashew-apple lots analyzed in the present study were purchased at local supermarkets and were mixtures of 3 types, elongated yellow, elongated red and round red, which botanically are not considered established cultivars.

Only quercetin was found in fig, guava, and jaboticaba with similar concentration ranges. The purple fig had 8.3 to 19 mg/kg quercetin. The red guava “Ogawa” had slightly lower quercetin concentration (9.7 ± 0.9 mg/kg) compared to the white type (12 ± 0.8 mg/kg). The anthocyanin-rich jaboticaba had 11 ± 1.6 mg/kg quercetin. Míean et al. (18), reported myricetin and apigenin contents of 549.5 and 579.0 mg/kg dry weight, respectively, in guava.

Quercetin was also the only flavonol detected in the four cultivars of oranges analyzed but at much lower levels (about 3 mg/kg of pulp). This is not surprising since the flavanones hesperidin and narirutin are the predominant flavonoids in orange pulp (16, 25), orange juice (27) and peel (28).

Among the fruits investigated in the present study, pitanga had the highest myricetin content (31 ± 4.5 and 37 ± 4.1 mg/kg, respectively, for the supermarket and garden lots). It also presented the highest quercetin concentration (55 ± 10 and 62 ± 9.2 mg/kg, respectively, for the supermarket and garden lots). This fruit also had kaempferol but at levels (3.9 ± 0.3 and 4.5 ± 1.1 mg/kg, respectively, for the supermarket and garden lots) lower than those of acerola and strawberry.

In strawberry, the lowest quercetin and kaempferol values were observed in the cultivar “Kamarossa” (7.8 ± 0.9 and 7.0 ± 1.2 mg/kg, respectively) and the highest in the cultivar

“Oso Grande” (11 ± 2.2 and 8.9 ± 2.5 mg/kg, respectively). In general, our findings with strawberry compare well with those reported in earlier studies (**Table 4**). In the present study quercetin concentrations were higher than those of kaempferol, similar to the pattern found by several authors (16, 29, 30, 31), although Cordenunsi et al, (29) obtained much higher values than our results and those of the other authors. On the other hand, Hertog et al. (17) and Häkkinen et al. (32), reported kaempferol as the main flavonol in strawberries, although the ranges of Hertog et al.(17) are close to ours. The concentrations found by Häkkinen et al. (32) are lower.

Conclusions. Among the Brazilian fruits analyzed, the best sources of flavonoids are pitanga and cashew apple, containing the three flavonols, and acerola, containing quercetin and kaempferol.

LITERATURE CITED

- (1) Afanas'ev, I.B.; Dorozhko, A.I.; Brodskii, A.V.; Kostyuk, V.A.; Potapovitch, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid oxidation, *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38, 1763-1769.
- (2) Vinson, J.A.; Dabbagh, Y.A.; Serry M.M.; Jang, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agr. Food Chem.* **1995**, 43, 2800-2802.
- (3) Middleton, E. Kandaswani, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol.* **1992**, 43, 1167-1179.

- (4) Namiki, M. Antioxidant / antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1990**, 29, 273-300.

- (5) Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollmann, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **1993**, 342, 1007-11.

- (6) 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.

- (7) Keli, S.O.; Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Kromhout, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch. Int. Med.* **1996**, 156, 637-642.

- (8) Geleijnse, J.M.; Launer, L.J.; Van der Kuip, D.A.; Hofman, A.; Witteman, J.C. Inverse Association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 75, 880-886.

- (9) Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, 146, 223-30.

- (10) De Stefani, E.; Boffetta, P.; Deneo-Pellegrini, H.; Mendilaharsu, M.; Carzoglio, J.C.; Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* **1999**, 34, 100-10.
- (11) Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C. A.; Agudo, A.; Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. **1999**, 10, 71-75.
- (12) Hollman, P.C.H. Evidences for health benefits of plant phenols: Local or systemic effects? *J. Sci. Food Agric*. **2001**, 81, 842-852.
- (13) Goldbohm, R.A.; van den Brandt, P.A.; Hertog, M.G.L.; Brants, H.A.M.; van Poppel, G. Flavonoid intake and risk of cancer: a prospective cohort study. *Am. J. Epidemiol*. **1995**, 141, S61.
- (14) Hertog, M.G.L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Gianpaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and câncer in the Seven Countries Study. *Arch. Inter. Med*. **1995**, 155, 381-86.
- (15) Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem*. **2003**, 51, 571-581.

- (16) Franke, A.A.; Custer, L.J.; Arakaki, C.; Murphy, S.P. Vitamin C and Flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawai'i. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 17, 1-35.
- (17) Hertog, 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.* **1992**, 40, 2379-83.
- (18) Miesan, K. H.; Mohamed, S.; Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3106-112.
- (19) Aherne, S.A.; O'Brien, N.M.; Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutr.* **2002**, 18, 75-81.
- (20) Robards, K.; Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *The Analyst.* **1997**, 122, 11R-34R.
- (21) Hertog, 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.* **1992**, 40, 1591-1598.

- (22) Merken, H.M.; Merken, C.D.; Beecher, G.R. Kinetics method for the quantitation of anthocyanidins, flavonols, and flavones in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2727-32.
- (23) Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas, SP:Editora da UNICAMP, 1995. 299p.
- (24) Shabir, G.A Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 57-66.
- (25) Arabbi, P.R.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J. Agric Food Chem.* **2004**, 52, 1124-1131.
- (26) Price, K.R.; Prosser, T.; Richetin, A.M.F.; Rhodes, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry* **1999**, 66, 489-94.
- (27) Careri, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Musci, M. Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and

optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice.
J. Chromatogr. A 2000, 881, 449-60.

- (28) Manthey, J.A.; Grohmann, K. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 40, 811-14.
- (29) Cordenunsi, B.R.; Genovese, M.I.; Nascimento, J.R.O.; Hassimotto, N.M.; Santos, R.J.; Lajolo, F.M. Effects of the temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.* **2005**, 91, 113-21.
- (30) Häkkinen, S.; Kärenlampi, S.; Heinonen, M.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2274 – 79.
- (31) Justessen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. 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. *J. Chromatogr. A* **1998**, 799, 101-10.
- (32) Häkkinen, S.; Törrönen, R. Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research Inter.* **2000**, 33, 517-524.

CAPÍTULO 4

Determinação de flavonóis e flavonas em erva-mate e chimarrão.

R. Hoffmann-Ribani, D. Rodriguez-Amaya

Artigo a ser traduzido e submetido à Revista **Journal of Food Composition and Analysis**

Determinação de flavonóis e flavonas em erva-mate e chimarrão.

R. Hoffmann-Ribani ^a, D. Rodriguez-Amaya ^b

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, C. P. 19011, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

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

Resumo

Foram analisadas 24 amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) provenientes do Sul do Brasil e os extratos simulando a bebida chimarrão preparados destas, quanto ao conteúdo de flavonóis miricetina, quercetina e kaempferol, e as flavonas luteolina e apigenina. Empregou-se análise de superfície de resposta para definir as condições ótimas de hidrólise/extração para obtenção dos flavonóides na forma aglicona. Para quantificação, usou-se cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e coluna C18. A fase móvel foi metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) em gradiente linear. Os teores de quercetina variaram de 19 a 65 µg/mL no chimarrão e de 1090 a 3940 µg/g na erva-mate. Os teores de kaempferol variaram de 8 a 18 µg/mL no chimarrão e de 447 a 1000 µg/g na erva-mate. Observou-se que a erva-mate contém teores de flavonóis superiores em 13,3% para quercetina (µg/g) e 15,0% para kaempferol (µg/g), quando comparado ao chimarrão, indicando que o extrato elaborado não extrai totalmente os flavonóis da erva-mate. As amostras dos ervais nativos contiveram menores teores de quercetina que as dos ervais plantados.

Palavras-chave: Flavonóides; Erva-mate (*Ilex paraguariensis* L.); Análise por CLAE

1. Introdução

O mais distribuído e diverso dos grupos fenólicos é o dos flavonóides, que tem o esqueleto C₆-C₃-C₆, cujas classes são diferenciadas no grau de insaturação e oxidação do anel intermediário. As principais classes de flavonóides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (ou flavanóis), antocianidinas, isoflavonas. São constituintes importantes da dieta humana e comumente encontrados em vegetais como legumes, cereais e frutas e seus produtos derivados e também em chá, cidra, óleo e vinho, (Erlund et al., 2004; Maiani et al, 1997; Ross et al., 2002). Os flavonóides contribuem com as características sensoriais como cor, sabor e adstringência de alimentos (Ross et al., 2002; Robards et al., 1997).

Existem agora evidências convincentes que o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer está associado a espécies reativas que iniciam reações que causam danos a moléculas orgânicas de importância biológica no organismo e, além disso, que os efeitos podem ser amenizados por constituintes da dieta (Block et al., 1992; Cheeseman et al., 1993; Hertog, et al., 1993; Keli et al., 1996; Knekt et al., 1996; Rimm et al., 1996). Os flavonóides, bem como os carotenóides e outros metabólitos secundários, tem demonstrado agir como antioxidantes e acredita-se que contribuam com os efeitos benéficos dos vegetais e frutas à saúde (Wilms et al., 2005; DiSilvestro, 2001; Schieber et al, 2001; Fremont, et al., 1998; Ness, et al., 1997).

Além dos fatores intrínsecos como enzimas geneticamente controladas, os conteúdos de flavonóides nas plantas são fortemente influenciados por fatores extrínsecos como estação, clima, grau de amadurecimento, preparação do alimento, e processamento.

Exceto para catequinas, os flavonóides ocorrem como derivados glicosídicos nas plantas, (Aherne et al, 2002, Hertog et al, 1992b e 1992a ; Crozier et al, 1997). A

glicosilação aumenta a polaridade da molécula, que é necessária para estocagem nos vacúolos das células das plantas (Harborne 1999; Edreva, 2005).

A hidrólise dos glicosídeos para agliconas oferece um método prático para determinação dos flavonóides, (Hertog et al, 1992a; Rommel et al., 1993), sendo empregada pela maioria dos estudos de níveis de flavonóides em alimentos (Franke et al, 2004; Hertog et al, 1992b; Matsubara et al., 2001). Hertog et al. (1992a) observaram maior eficiência na extração dos flavonóides agliconas com solução aquosa a 50% de metanol.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) consumida na forma de chimarrão no sul do Brasil, segundo estudos de amostras comercializadas em Campinas, São Paulo, é fonte de flavonóis quercetina e kaempferol (Matsubara, 2001).

Este estudo teve por objetivo determinar os teores dos flavonóis miricetina (M), quercetina (Q) e kaempferol (K), e as flavonas luteolina (Lu) e apigenina (Ap), após otimização do procedimento em amostras de chimarrão preparadas de erva-mate provenientes do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Para verificar se o conteúdo de flavonóides é totalmente transferido ao chimarrão, foram analisadas também as amostras de erva-mate.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e Soluções.

O metanol e acetonitrila de grau cromatográfico da JT Baker (Phillipsburg, USA) e o ácido acético, ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda. (Diadema, Brasil). A água utilizada para o preparo das fases

móveis foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de M, Q, K, Lu e Ap 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 500 µg/mL, conservadas a -18°C e protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses em -18°C. A solução de trabalho para cada padrão foi preparada simulando as condições após hidrólise das amostras. Alíquotas da solução foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q com 0,08% de ácido ascórbico. A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M e o volume foi completado a 5mL com metanol.

2.2. Amostras.

Vinte e quatro amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foram obtidas dos estados da Região Sul do Brasil, fornecidas diretamente pelos produtores, sendo quatorze amostras do estado do Paraná, três amostras de Santa Catarina e sete amostras do Rio Grande do Sul. Cada amostra foi composta de três a cinco embalagens de 700 a 1000g de erva moída a granel. Para composição de cada amostra analítica as embalagens foram misturadas, homogeneizadas, quarteadas, sub-amostras foram retiradas e pesadas.

2.3 Preparação dos extratos de chimarrão.

Para simular a bebida chimarrão foi preparado um extrato seguindo metodologia validada por [Duarte et al. \(2000\)](#). Para cada amostra, 5g em duplicata foram pesadas em

balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água a 70°C. A infusão foi agitada por 3 minutos e filtrada sob vácuo.

2.4. Extração da erva-mate.

Amostra de 2 g de cada erva-mate foi macerada com 100mL de solução H₂O:MeOH (1:1) e deixado por uma noite com agitação mecânica, a temperatura ambiente. Seguiram-se três extrações com 25mL da solução hidro-metanólica a 50% sob refluxo por 30 minutos, juntando todos extratos em balão volumétrico, o volume completado a 200mL com a solução hidro-metanólica.

2.5. Análise por CLAE.

Foi empregado um cromatógrafo a líquido Waters, controlado pelo Software Millennium 32, com detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 996, injetor manual com alça de volume fixo de 20µL Rheodyne, e coluna Nova Pak C18 (3,9 X 150 mm, 4 µm) da Waters. A detecção foi fixada em 370nm e os espectros obtidos na faixa de 200 a 600nm. Cada hidrolisado foi filtrado em filtro PTFE da Millipore, de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

Para definir as condições cromatográficas que permitiram a separação dos flavonóides agliconas, foi empregada a seguinte estratégia. Utilizando a solução padrão de trabalho, foram inicialmente testados vários gradientes de fases móveis aquosas com solventes orgânicos, metanol ou acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido acético ou ácido fórmico. Posteriormente, extratos hidrolisados das amostras de chimarrão, com ou sem

adição de padrões, foram injetados no cromatógrafo, inicialmente sob as melhores condições conseguidas para os padrões. Estas condições foram modificadas até se conseguir a melhor separação dos flavonóides constituintes do chimarrão.

A quantificação foi por padronização externa e a identificação pelo conjunto de dados de tempo de retenção, adição de padrões e espectro de absorção obtido pelo DAD.

2.6. Otimização da extração e hidrólise dos flavonóides por análise estatística.

Para obter a máxima eficiência da hidrólise sem promover degradação, as condições para esta etapa foram otimizadas utilizando Delineamento Estatístico de Composição Central (DCC), (Barros Neto et al., 1995). Foram avaliados os fatores concentração do ácido e tempo de hidrólise em três níveis (Tabela 1). Um DCC com k-fatores e três níveis requer $2^k + 2k + C$ experimentos, assim, considerando dois fatores e quatro replicatas do ponto central (C), o planejamento envolveu 12 experimentos. O planejamento experimental com os valores codificados, que foram executados em ordem aleatória, é apresentado na Tabela 1. A resposta Y ou variável dependente foi a concentração das agliconas quercetina e kaempferol na amostra de chimarrão.

Para execução do experimento, foram tomados 15mL de chimarrão, adicionados de 0,02g de ácido ascórbico como antioxidante, 10mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais (três níveis) e 25mL de metanol. A solução de extração assim obtida consistiu de diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa a 50% em metanol (v/v), com 0,04% de antioxidante. Após o refluxo a 90°C durante diferentes

períodos (três tempos), os extratos foram resfriados e o volume completado a 50mL com metanol.

Tabela 1

Condições experimentais do Delineamento Estatístico de Composição Central (DCC)

Experimento (seqüência teórica)	Fatores (valores codificados estão entre parênteses)		Y=Concentração de flavonóis obtidos no chimarrão (µg/g)	
	Concentração molar HCl	Tempo de hidrólise(min)	Quercetina	Kaempferol
1	0,8M (-1)	30 (-1)	1049,0	458,1
2	1,6M (+1)	30 (-1)	1200,4	569,3
3	0,8M (-1)	90 (+1)	1415,2	662,6
4	1,6M (+1)	90 (+1)	1202,0	549,9
5	0,8M (-1)	60 (0)	1227,8	528,2
6	1,6M (+1)	60 (0)	1253,7	555,2
7	1,2M (0)	30 (-1)	1299,7	555,3
8	1,2M (0)	90 (+1)	1426,7	658,7
9	1,2M (0)	60 (0)	1452,5	681,9
10	1,2M (0)	60 (0)	1457,5	692,8
11	1,2M (0)	60 (0)	1455,0	680,9
12	1,2M (0)	60 (0)	1451,1	698,0

A hidrólise e extração podem ser otimizadas estatisticamente se o valor das concentrações das agliconas dos flavonóides for conhecido como uma função dos fatores experimentais, gerando um modelo matemático. Um gráfico dessa função produz a superfície de resposta para as agliconas que é obtida aplicando regressões lineares múltiplas para os teores das agliconas (µg/g), em função dos fatores experimentais. Foi realizado

teste estatístico de F para determinar a significância dos diferentes modelos obtidos. A análise estatística completa foi conduzida separadamente para a definição da condição de extração e hidrólise de cada tipo de aglicona presente no chimarrão. Todas as análises e testes foram conduzidos utilizando o pacote estatístico Statistica for Windows, versão 6.0 da STATSOFT.

2.7. Validação do método.

A linearidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fixada em 370nm em detector de arranjo de diodos foi verificada além de duas ordens de grandeza para flavonóis e flavonas na faixa de 1 – 40 µg/mL. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas na faixa esperada dos seus teores no chimarrão e extrato.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$ respectivamente, sendo SD o desvio padrão do coeficiente linear e S a inclinação da curva de calibração ([Shabir, 2003](#)). Para verificar a exatidão e precisão do método, valores de sete recuperações foram estudadas para um nível de concentração, sendo de aproximadamente 420 µg/g de erva para os flavonóis e 850 µg/g de erva para as flavonas na hidrólise. Todas as determinações foram conduzidas em duplicata.

3. Resultados e discussão

3.1. Condições cromatográficas ótimas

Utilizando a estratégia proposta foi definida a melhor condição cromatográfica para separação dos flavonóides agliconas do chimarrão após extração/hidrólise. Inicialmente para a mistura de padrões, a fase móvel composta de água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico, não separaram os picos de quercetina e luteolina, bem como a apigenina do kaempferol, conforme também relatado por outros autores ([Hertog et al., 1992a](#)). Água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético resultaram em boa separação dos compostos porém os picos apresentaram cauda. A melhor separação dos padrões foi conseguida com a fase móvel metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando na proporção de 20:80, chegando a 45:55 em cinco minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear. Para o chimarrão, porém, a adição de padrões verificou a co-eluição com componentes do chimarrão, inclusive com espectros de absorção mostrando a presença de misturas dos compostos. A separação da M e Q dos componentes da erva foi conseguida iniciando com a composição da fase móvel em 20:80 (MeOH:H₂O), ambos com 0,3% ácido fórmico, passando para 38:62 em 1 minuto e permanecendo até aos 6 minutos, passando para proporção 40:60, aos 7 minutos. Para separar a Ap do último componente da amostra foi preciso patamar isocrático de pelo menos 10 minutos antes da eluição destes, [Figura 1](#).

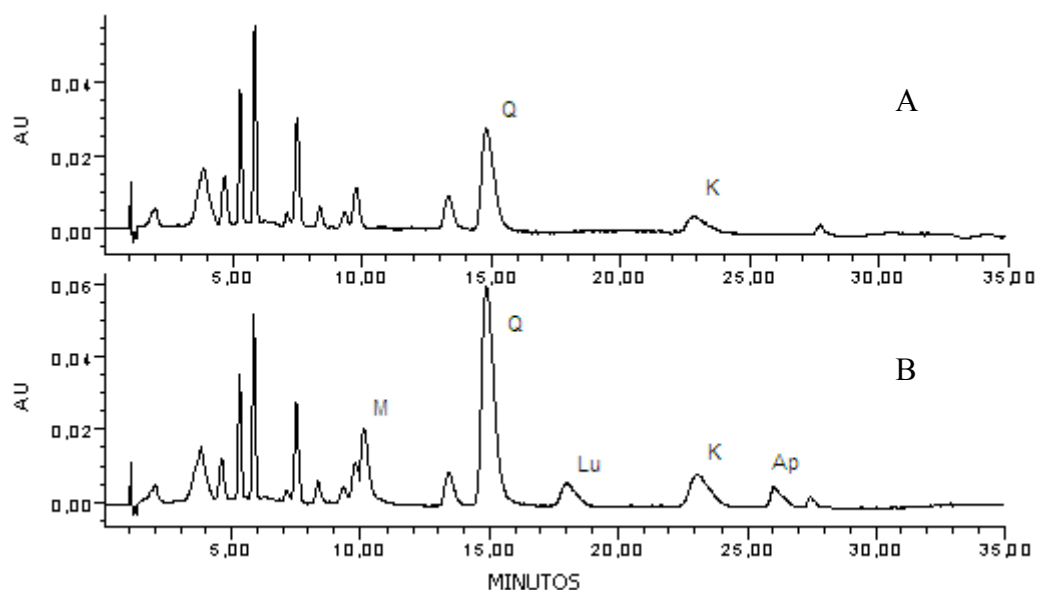


Figura 1

Cromatogramas típicos dos flavonóides no A) chimarrão e B) chimarrão adicionado de padrões. M= miricetina, Q= quercetina, K= kaempferol, Lu=luteolina e Ap=apigenina. Fase móvel, metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando com 20:80, chegando em 38:62 em 1 minuto, durante 5 minutos e aos 7 minutos passando para 40:60, até os 25 minutos, voltando para 20:80 em 5 minutos para re-equilíbrio da coluna, sempre com gradiente linear. Coluna: Nova Pak C18 (3,9 X 150 mm, 4 μ m) da Waters

3.2. Condições ótimas de extração e hidrólise dos flavonóides

A [Tabela 1](#) apresenta as concentrações em μ g/g (Y), obtidas para os flavonóis agliconas em chimarrão para diferentes condições experimentais do DCC.

Utilizando os valores codificados, foram calculadas por regressões múltiplas as estimativas dos efeitos (parâmetros b) do modelo matemático de regressão (Eq. 1) e foram determinados seus erros padrões.

$$Y = b_0 + b_1X + b_2Z + b_{11}X^2 + b_{22}Z^2 + b_{12}XZ \quad \text{Eq.(1)}$$

Ao nível de 95% de confiança, todos os parâmetros do modelo refinado para extração e hidrólise das agliconas foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), (Tabela 2).

Os cálculos da análise de variância (ANOVA) para os resultados da regressão são apresentados na Tabela 3. As relações entre o quadrado médio da regressão pelo quadrado médio do resíduo foram 47,1 e 15,4 para os modelos da quercetina e kaempferol, respectivamente. Estes valores são muito superiores aos valores de $F_{(5,6)} = 4,39$ e $F_{(4,7)} = 4,12$ para o nível de 95% de confiança, para quercetina e kaempferol, respectivamente, indicando equações de regressão válidas para utilização do modelo quadrático. Os valores dos resíduos apresentados na Tabela 3, foram baixos quando comparados com os respectivos valores de regressão, e os baixos valores dos erros puros, que mostram a magnitude do erro experimental.

As Equações 2 e 3 representam o modelo experimental codificado para extração e hidrólise da quercetina e kaempferol, respectivamente em função das variáveis estudadas, onde X = concentração molar de HCl na solução de hidrólise, e Z = tempo de hidrólise em minutos.

$$Y \text{ (}\mu\text{g/g)} = 1442,898 - 5,98702X - 82,47578Z - 179,944X^2 - 57,4285Z^2 - 91,1374XZ \quad \text{Eq (2)}$$

$$Y \text{ (}\mu\text{g/g)} = 671,7971 + 48,08482Z - 96,8557X^2 - 31,582Z^2 - 55,9553XZ \quad \text{Eq (3)}$$

Tabela 2

Estimativa dos efeitos da regressão do modelo polinomial quadrático, erro puro e significância (p), dos teores de flavonóis agliconas em chimarrão

Coeficientes	Quercetina			Kaempferol		
	Estimativa dos Coeficientes do polinômio	Erro Puro	p	Estimativa dos Coeficientes do polinômio	Erro Puro	p
b ₀	1442,9	1,3	1,5E-09	671,8	3,8	4,1E-07
b ₁	-5,9	1,1	1,3E-03	-	-	-
b ₂	82,5	1,1	5,9E-06	48,1	3,4	7,0E-05
b ₁₁	-179,9	1,7	1,9E-06	-969	5,1	3,0E-05
b ₂₂	-57,4	1,7	5,9E-05	-31,6	5,1	8,6E-04
b ₁₂	-91,1	1,4	8,1E-06	-55,9	4,2	9,0E-05

p – significância de 5%

Tabela 3

Análise de variância (ANOVA) para os flavonóis em chimarrão

Flavonol	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Quercetina	Regressão	201954,5	5	40390,9	47,1	F _(5,6) =4,39
	Resíduo	5148,9	6	858,15		
	Falta de ajuste	5125,1	3			
	Erro puro	23,8	3			
	Total	207103,4	11			
Kaempferol	Regressão	63650,0	4	15912,5	15,4	F _(4,7) =4,12
	Resíduo	7244,6	7	1034,9		
	Falta de ajuste	7034,4	4			
	Erro puro	210,2	3			
	Total	70894,6	11			

A relação entre as variáveis independentes e a dependente é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta gerada pelos modelos das equações para as agliconas dos flavonóis, conforme [Figura 2](#).

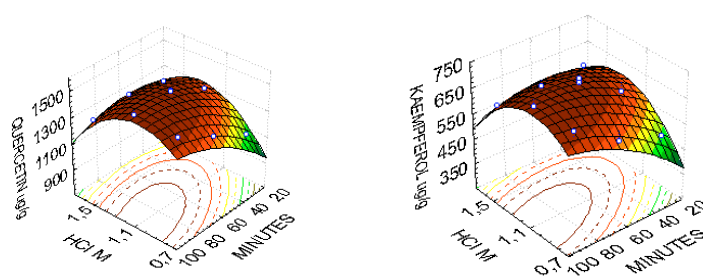


Figura 2

Superfícies de resposta para determinação das agliconas quercetina e kaempferol em amostras de chimarrão, em função da concentração molar do HCl, e tempo de hidrólise em minutos.

Analisando estas superfícies dentro dos limites do experimento executado, observa-se as faixas ótimas de trabalho para determinação dos flavonóis no chimarrão. Para quercetina a faixa compreende valores de 0,9M a 1,3M de HCl e 60 a 90 minutos de tempo de hidrólise, para o kaempferol compreende valores de 0,7M a 1,3M de HCl e 60 a 90 minutos de hidrólise. Os ensaios no ponto central (0), ou seja, concentração de 1,2 molar de HCl e 60 minutos de hidrólise, foram as condições ótimas que resultaram nos maiores teores das agliconas estudadas no chimarrão.

3.3. Desempenho do método analítico.

As curvas analíticas passaram pela origem e apresentaram-se lineares nas faixas de concentração em que se encontraram as amostras, com coeficientes de determinação entre 0,9998 até 1,0000. A [Tabela 4](#) mostra os dados obtidos de cada curva.

Tabela 4

Propriedades das curvas analíticas

Flavonóide	Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Coeficiente de determinação
Miricetina	3 - 40	0,9998
Quercetina	3 - 40	0,9999
Kaempferol	1 - 21	0,9999
Luteolina	2,5 - 32	1,0000
Apigenina	2,5 - 31	0,9999

Os Limites de Detecção obtidos pelo método da curva analítica resultaram nos valores de 83 $\mu\text{g/g}$; 14 $\mu\text{g/g}$; 40 $\mu\text{g/g}$; 25 $\mu\text{g/g}$ e 18 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, para miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina.

As médias dos sete valores de recuperação dos flavonóides em percentagem ([Tabela 5](#)) foram 89,7%; 94,4%; 99,0%; 98,6% e 97,9%, respectivamente, para miricetina, quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina. A precisão (repetitividade) foi demonstrada pelos Coeficientes de Variação das recuperações, expressos na [Tabela 5](#).

Tabela 5

Valores adicionados, recuperação em percentagem e Coeficientes de Variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados sobre amostra de chimarrão

Flavonóide	Conteúdo adicionado em $\mu\text{g/g}$ de erva	Recuperação ^a média em (%)	CV (%)
Miricetina	498,3	89,7	1,7
Quercetina	445,0	94,4	2,1
Kaempferol	441,7	99,0	2,2
Luteolina	885,0	98,6	2,4
Apigenina	851,7	97,9	1,8

^a Média de sete determinações.

3.4. Teores de flavonóides em chimarrão e erva-mate

Em todas amostras analisadas não foram detectados o flavonol miricetina, e as flavonas luteolina e apigenina. A [Tabela 6](#) apresenta os teores de quercetina e kaempferol em chimarrão e erva-mate. Observou-se que a quercetina nas amostras de ervais nativos resultou em menores teores do flavonol quando comparado as correspondentes amostras de ervais plantados.

Os teores de quercetina variaram de 19 $\mu\text{g/mL}$ a 65 $\mu\text{g/mL}$ para chimarrão e de 1090 $\mu\text{g/g}$ a 3940 $\mu\text{g/g}$ na erva-mate. Os conteúdos de kaempferol variaram de 8 $\mu\text{g/mL}$ a 18 $\mu\text{g/mL}$ para chimarrão e de 447 $\mu\text{g/g}$ a 1000 $\mu\text{g/g}$ para erva-mate. Considerando somente as amostras de chimarrão do Paraná as faixas foram 20 - 65 $\mu\text{g/mL}$ para quercetina e 9 - 14 $\mu\text{g/mL}$ para kaempferol. Os valores correspondentes para as amostras de chimarrão do Rio

Grande do Sul foram 19 - 64 µg/mL e 8 - 18 µg/mL. Considerando as variações naturais de amostras de alimentos e bebidas, estas faixas são equivalentes. As três amostras de Santa Catarina encaixaram nesta faixa.

Comparando-se os valores obtidos no trabalho com os da literatura ([Tabela 7](#)), os presentes valores são comparáveis aos relatados por [Matsubara, \(2001\)](#). [Filip et al. \(2001\)](#) analisaram a amostra diretamente sem hidrólise, quantificando apenas as formas agliconas livres na infusão, portanto os teores são muito mais baixos.

Para verificar a eficiência da passagem dos flavonóis da erva-mate para o chimarrão, o conteúdo do flavonol foi calculado em teores de µg/g da erva utilizada para a infusão e relacionada ao teor em µg/g da erva. A percentagem (razão entre o teor do flavonol obtido do chimarrão e da erva-mate, multiplicado por 100), variou de 74,2% a 95,5% (média de 86,7%) para a quercetina e de 68,2% a 99,5% (média de 85,0%) para o kaempferol, indicando que a preparação de bebida por chimarrão não extrai totalmente o conteúdo de flavonóis da erva-mate.

Tabela 6

Conteúdos (µg/g) de quercetina e kaempferol em chimarrão e erva-mate

Amostras	Quercetina			Kaempferol		
	Chimarrão (µg/mL)	Chimarrão (µg/g folhas)	Erva- mate (µg/g)	Chimarrão (µg/mL)	Chimarrão (µg/g folhas)	Erva- mate (µg/g)
1N-PR	20	1000	1250	9	468	470
1P-PR	60	3000	3300	13	638	650
2N-PR	39	1950	2380	9	469	481
2P-PR	45	2230	2510	11	526	580
3N-PR	22	1080	1230	11	547	578
3P-PR	37	1830	2000	10	509	602
4-PR	49	2460	3150	12	583	805
5-PR	55	2750	3320	14	709	822
6-PR	65	3270	3940	13	642	830
7-PR	48	2420	2690	14	723	802
8-PR	46	2320	3120	10	500	682
9-PR	28	1410	1860	13	642	890
10-PR	47	2350	2530	11	554	653
11-PR	52	2580	2840	12	608	700
12-RS	37	1830	2080	10	489	631
13-RS	45	2240	2580	11	559	820
14-RS	59	2930	3290	11	539	617
15-RS	64	3180	3330	8	404	542
16N-RS	19	972	1090	9	446	613
16P-RS	35	1770	1920	18	913	1000
17-RS	64	3200	3650	8	402	447
18-SC	31	1550	1640	11	535	555
19-SC	30	1500	1640	11	528	587
20-SC	29	1430	1670	10	507	597

N= erva nativa; P= erva plantada; PR= Paraná; SC= Santa Catarina; RS= Rio Grande do Sul

Limite de detecção: miricetina= 83 µg/g ; quercetina= 14 µg/g ; kaempferol= 40 µg/g ; luteolina= 25 µg/g e

apigenina= 18 µg/g

Tabela 7

Comparação dos níveis de flavonóis em infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Referência	Preparação das Amostras (<i>Ilex paraguariensis</i>)	Faixa de Concentração (µg/g folha)	
		Quercetina	Kaempferol
Presente Estudo	Chimarrão (com hidrólise) (n=24)	972 a 3270	402 a 913
Filip et al, 2001	Infusão (sem hidrólise) (n=1)	31 ± 9	12 ± 3
Matsubara et al, 2001	Infusão (com hidrólise) (n=3)	2000 a 3300	400 a 600

n= número de amostras analisadas

Agradecimentos

Ao PICDT / UFPR pela concessão de bolsa à primeira autora, e ao PRONEX / FAPESP nº 2003/10151-4 pelo apoio financeiro para execução do experimento.

Referências

- Aherne, S.A., O'Brien, N., 2002. Review Article, Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*. 18, 75-81.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 1995. Planejamento e otimização de experimentos. 2º ed. ,Editora da UNICAMP, Campinas, SP.

- Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention. A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18,1-29.
- Cheeseman, K.H, Slater, T.F, 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49, 481-89.
- 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 Agric. Food Chem.* 45, 590.
- DiSilvestro, R.A., 2001. Flavonoids as antioxidants. In: Wildman R.E.C. (Ed.). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC Press LLC, Washington, D.C, Chapter 8.
- Duarte, F., Waszczyński, N., 2000. Seleção, treinamento de julgadores e metodologia para análise sensorial de extrato de erva-mate./ *Dissertação de mestrado/ Universidade Federal do Paraná. Curitiba,PR.*
- Edreva, A., 2005. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture Ecosystems & Environment* 106, 135-146
- Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 24, 851-874.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., Ferraro, G., 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72, 774-778.
- Franke, A.A., Custer, L.J., Arakaki, C., Murphy, S.P., 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawai'i. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 1-35.

- Fremont, L., Gozzelino, M.T., Franchi, M.P., Linard, A., 1998. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *Journal of Nutrition* 128, 1495-1502.
- Harborne, J.B., 1999. Classes and functions of secondary products. In: Walton, N.J.; Brown, D.E. (Eds). *Chemicals from Plants. Perspectives on secondary plants products*. Imperial College Press, London, UK.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P., 1992a. 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., 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., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992b. 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.
- Keli, S.O., Hertog, M.G.L., Feskin, E.J.M., Kromhout, D., 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamin and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of International Medicine*, 156, 632-642.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*, 312, 478-481.
- Maiani, G., Serafino, M., Salucci, M., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A., 1997. Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 692, 311-317.

- Matsubara, S., 2001. Polifenóis em chás comercializados no Brasil./Dissertação de mestrado/ Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.Campinas, SP.
- Ness, A.R., Powles, J.W., 1997. Fruits and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int. J. Epidemiol.* 26: 1-13.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampher, M.J., Willet, W.C., 1996. Relationship between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of International Medicine* 125, 384-389.
- Robards, K., Antolovich, M., 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavanoids. *Analyst*, The 122, 11R-34R.
- Rommel, A., Wrolstad, R., 1993. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolics composition of red raspberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 237-1241.
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34.
- Schieber, A., Keller, P., Carle, R., 2001. Determination of phenolics acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 910, 265-273.
- Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987, 57-66.

Wilms, L. C., Hollman, P.C.H., Boots, A.W., Kleinjans, J.C.S, 2005. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research* 582, 155-162.

CAPÍTULO 5

Compostos fenólicos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* L.) e chimarrão.

R. Hoffmann-Ribani, D. Rodriguez-Amaya

Artigo a ser traduzido e submetido à Revista **Journal of Food Composition and Analysis**

Compostos fenólicos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* L.) e chimarrão.

R. Hoffmann-Ribani ^a, D. B. Rodriguez-Amaya ^b

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, C. P. 19011, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

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

Resumo

Compostos fenólicos são encontrados em chás e são extremamente diversos incluindo flavonóides e os ácidos hidroxicinâmicos. Muitos compostos fenólicos (p.ex. ésteres cafeicos, quercetina), influenciam nas propriedades sensoriais dos alimentos, bem como demonstram atividades fisiológicas benéficas a saúde do homem. No sul do Brasil, consome-se o chimarrão, preparado da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), que é fonte destes compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi determinar o flavonol glicosídico rutina e os ácidos hidroxicinâmicos, ácido cafeico e 5-CQA (ácido 5-cafeoilquínico) em chimarrão preparado de 12 amostras de erva-mate provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul. Para verificar se estes compostos são totalmente transferidos ao chimarrão, foram analisadas também as amostras de erva-mate. O chimarrão foi obtido da infusão a partir de 5g de erva-mate em 250mL de água a 70°C. Um extrato hidro-metanólico da erva-mate foi obtido por maceração de 2,5g das amostras em 100mL solução H₂O:MeOH (1:1) por uma noite com agitação, seguida de três extrações com solução hidro-metanólica 50% sob refluxo por 30 minutos. Usou-se cromatógrafo líquido, com injetor Rheodyne, coluna Symmetry C18, 3,5µm (2,1x150mm) e detector de arranjo de diodos. Utilizou-se fase

móvel metanol:água (acidificados com 0,45% de ácido fórmico) sempre em gradiente linear. Ácido cafeico livre não foi detectado nas amostras. Nas ervas, os teores de rutina variaram de 0,04 a 0,15 mg/mL no chimarrão e de 2,37 até 8,03 mg/g na erva-mate. O 5-CQA variou de 0,25 a 0,49 mg/mL no chimarrão e de 13,1 a 24,7 mg/g na erva. A preparação de bebida por chimarrão extraiu de 82,0 a 96,3 % da rutina e quase a totalidade do 5-CQA da erva.

Palavras-chave: Rutina; Ácido 5-cafeoilquínico; Ácido cafeico; Erva-mate (*Ilex paraguariensis*); Chimarrão

1. Introdução

Compostos fenólicos são constituintes bioativos de chás e estão relacionados com as propriedades sensoriais destes (Graham et al., 1992; Hara et al., 1995; Harbowy et al., 1997). Formam uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas com uma grande variação de estruturas e funções. São definidos pela origem metabólica (Robards et al., 1999 e 1997; Aherne et al., 2002), sendo substâncias derivadas da rota shiquímica e do metabolismo fenilpropanóide. A classificação dos principais grupos é baseada no tipo e número de conjugados ao fenol. O mais distribuído e diverso dos grupos fenólicos é o dos flavonóides, construído sobre o esqueleto flavona ($C_6-C_3-C_6$), no qual a ponte de três carbonos entre os grupos fenil normalmente é ciclizado com oxigênio (Robards et al., 1999). As classes de flavonóides são diferenciadas no grau de insaturação, hidroxilação, e oxidação do segmento de três carbonos. As principais classes de flavonóides incluem: flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas (ou flavanóis), antocianidinas, isoflavonas. São normalmente encontrados na forma glicosídica em frutas, verduras e chás (Crozier et al., 1997; Filip et al., 2001; Yao et al., 2004; Arabbi et al., 2004).

Os ácidos cinâmicos são uma série dos ácidos trans-fenil-3-propenóicos (C_6-C_3), diferindo nas substituições do anel fenólico. Os mais comuns são o ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), ferúlico (ácido 3-metoxi, 4-hidroxicinâmico), e p-coumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) (Rice-Evans et al., 1996). Raramente encontrados como ácidos livres na natureza, estão normalmente conjugados ao ácido quínico, málico ou tartárico, ou com glicosídeos ou lipídios, entre outros (Clifford et al., 2000). O conjugado mais conhecido é o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), às vezes referido como ácido clorogênico (CGA), termo que segundo IUPAC deve ser utilizado apenas para se referir à família de ésteres formados entre ácidos trans-cinâmicos e o ácido quínico. Esses compostos ocorrem naturalmente

distribuídos no reino vegetal e em seus produtos, alimentos e bebidas (De Maria et al., 1999; Trugo et al., 1984; Awad et al., 2001; Clifford et al., 1999). Dados publicados por Clifford et al. (1999) apontam o 5-CQA, 3-CQA e 3,5-diCQA como as principais formas encontradas em folhas de mate.

A ação antioxidante dos fenólicos nos chás é vista como benéfica para o organismo humano, onde são oxidados em preferência a outros constituintes do alimento ou componentes celulares e tecidos (Wiseman et al., 1997; Dreosti, I.E., 2000; Toit et al., 2001). Filip et al. (2000) correlacionaram a atividade antioxidante da infusão de erva-mate com o conteúdo de rutina, quercetina, kaempferol e derivados cafeoílicos desta.

Ilex paraguariensis St. Hilaire (erva-mate), cresce naturalmente ou é cultivada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. A parte aérea da planta é preparada em forma de infusão, para consumo, de três formas diferentes: o mate tradicional, que é a forma principal, onde se coloca erva-mate em um recipiente similar a um vaso, sobre o qual se verte água quente (entre 70 a 85⁰C) e se suga por meio de uma bomba. A segunda forma, de uso durante os meses de verão ou em regiões quentes, é similar a anterior, porém utilizando água a temperaturas que variam entre 5 e 10⁰C (tererê). A terceira forma de consumo é uma infusão preparada de maneira similar aos chás (Ramallo et al., 1998). Dentre os estados brasileiros consumidores, destacam-se os da região Sul. Verifica-se que do total de erva-mate processada no Brasil, aproximadamente 80% é consumido no mercado interno, o restante sendo exportado para o Uruguai, Chile, Alemanha e Estados Unidos.

A relevância do caráter social da atividade ervateira é demonstrada pelos indicadores das propriedades rurais envolvidas, ou seja, um total aproximado de 180.000 produtores. Além disso, essas propriedades envolvidas com a erva-mate permitem que sejam gerados

empregos para cerca de 710.000 pessoas, segundo Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-mate do Paraná ([Maccari et al., 2001](#)).

Neste trabalho foram determinados os conteúdos do flavonol glicosídico rutina, ácido cafeico e seu conjugado 5-CQA, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram analisadas 12 amostras de erva-mate provenientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, na forma de chimarrão. Para verificar se o conteúdo de rutina, ácido cafeico e 5-CQA é totalmente transferido ao chimarrão, também foram analisadas as ervas-mate.

2. Materiais e métodos

2.1. Padrões e reagentes.

O metanol e acetonitrila de grau cromatográfico da JT Baker (Phillipsburg, USA), o ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico, foram adquiridos da Labsynth Ltda. (Diadema, Brasil). A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de rutina, ácido cafeico e o 5-CQA foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada padrão em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL, conservadas a -18°C e protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses em -18°C. Como a altura, forma e tempo de retenção dos picos cromatográficos podem ser afetados pela composição da solução de injeção, foi

preparada uma solução padrão de trabalho simulando as condições das amostras. Alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 2,5mL de água purificada em Milli-Q com 0,04% de ácido ascórbico. Esta solução foi completada a 5mL com metanol (solução padrão de trabalho).

2.2. Amostras.

Doze amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foram obtidas dos estados da região sul do Brasil, fornecidas diretamente pelos produtores, sendo seis amostras do estado do Paraná e seis amostras do Rio Grande do Sul. Cada amostra foi composta de três a cinco embalagens de 700 a 1000g de erva a granel. Para composição de cada amostra, as embalagens foram misturadas, homogeneizadas, quarteadas e sub-amostras foram retiradas para análise.

2.3. Preparação das amostras.

O extrato produzido em laboratório simulando a bebida chimarrão, foi obtido segundo procedimento de [Duarte et al. \(2000\)](#). Para cada amostra, 5g em duplicata foram pesadas em balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água a 70°C. A infusão foi agitada por 3 minutos e filtrada sob vácuo.

O extrato aquoso com 50% de metanol foi obtido por maceração de 2g das amostras em 100mL de solução H₂O:MeOH (1:1) por uma noite com agitação mecânica, a temperatura ambiente. Seguiu-se então três extrações com 25mL da solução hidro-metanólica a 50%

sob refluxo por 30 minutos, juntou-se todos os extratos em balão volumétrico e completou-se o volume a 200mL com a solução hidro-metanólica.

2.4. Análise cromatográfica.

Utilizou-se sistema de cromatografia a líquida da Waters equipado com injetor manual Rheodyne, com alça de volume fixo de 5 μ L, bomba quaternária e detector UV-Vis de arranjo de diodos (Waters modelo 996), controlado pelo Software Millennium 32. Uma coluna Symmetry C-18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) da Waters foi utilizada com metanol:água, ambos acidificados com 0,45% de ácido fórmico, como fase móvel, num fluxo de 0,2mL/min. Foi aplicado um gradiente linear inicial de 20:80 alterado para 30:70 em 1 minuto, esta proporção mantido até os 3 minutos, alterada para 45:55 aos 4 minutos, assim permanecendo até aos 13 minutos, alterada para 100:0 até os 18 minutos, mantida até aos 20 minutos, voltando para 20:80 até os 25 minutos, assim permanecendo até o final de 50 minutos de corrida cromatográfica. A detecção foi fixada em 370 nm para rotina, em 325 nm para o ácido cafeico e 5-CQA e os espectros adquiridos na faixa de 200 a 600 nm.

2.5. Validação do método.

A linearidade do método por CLAE foi verificada além de duas ordens de grandeza para rotina, ácido cafeico e 5-CQA na faixa de 1 – 190 μ g/mL. As curvas analíticas foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrões de trabalho em cinco concentrações diferentes, baseadas na faixa dos seus teores esperados no chimarrão e erva-mate.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (\text{SD}/S)$ e $10 \times (\text{SD}/S)$ respectivamente, sendo SD o desvio padrão do coeficiente linear e S a inclinação da curva de calibração (Shabir, 2003). Para verificar a exatidão e precisão do método, valores de sete recuperações foram estudadas utilizando níveis de concentração em torno de 14 mg/g de erva para a rutina, 2,7mg/g de erva para o ácido cafeico e 17 mg/g de erva para o 5-CQA no chimarrão. Todas determinações nas amostras foram conduzidas em duplicata.

3. Resultados e discussão

3.1. Validação do método cromatográfico.

As curvas analíticas passaram pela origem e apresentaram-se lineares nas faixas de concentração em que se encontraram as amostras, com coeficientes de determinação entre 0,9979 até 0,9999. A Tabela 1 mostra os dados obtidos de cada curva.

Tabela 1

Propriedades das curvas analíticas

Composto	Faixa de concentração	
	($\mu\text{g/mL}$)	Coeficiente de determinação
Rutina	4 – 198	0,9999
Ácido cafeico	1 – 21,5	0,9979
5-CQA	2,7 - 135	0,9997

Os Limites de Detecção foram 0,48 mg/g, 0,12 mg/g e 0,71 mg/g respectivamente para rutina, ácido cafeico e 5-CQA.

A média dos sete valores de recuperação dos flavonóides em percentagem (Tabela 2) foi 98,9%; 99,6% e 99,5%, respectivamente, para rutina, ácido cafeico e 5-CQA. A precisão (repetitividade) foi verificada pelo coeficiente de variação das recuperações, expressos na Tabela 2.

Tabela 2

Valores adicionados, recuperações em percentagens e Coeficientes de Variação (CV) das recuperações dos flavonóides com amostra de chimarrão.

Composto	Conteúdo adicionado em mg/g de erva	Recuperação ^a média em (%)	CV (%)
Rutina	14,37	98,9	1,4
Ácido cafeico	2,72	99,6	2,2
5-CQA	17,12	99,5	2,1

^a Média de sete determinações

3.2. Conteúdo de rutina, ácido cafeico e 5CQA em amostras de chimarrão e erva-mate.

O cromatograma típico para rutina e 5CQA em amostra de chimarrão de erva-mate é apresentado na Figura 1.

Os teores da rutina e 5-CQA nas amostras analisadas de chimarrão e erva-mate, estão apresentados na Tabela 3. Em todas as amostras analisadas não foi detectado o ácido cafeico livre. Isso concorda com a observação de Clifford et al. (2000), de que raramente

ocorre na natureza o ácido cafeico livre. Porém, [Mazzafera \(1997\)](#) analisando infusão não hidrolisada de erva-mate, relatou teores de ácido cafeico na faixa de 0,31 a 0,38 mg/mL, [Filip et al. \(2001\)](#) também relataram um teor de 0,23 mg/g de folha de ácido cafeico para infusão de *Ilex paraguariensis* da Argentina.

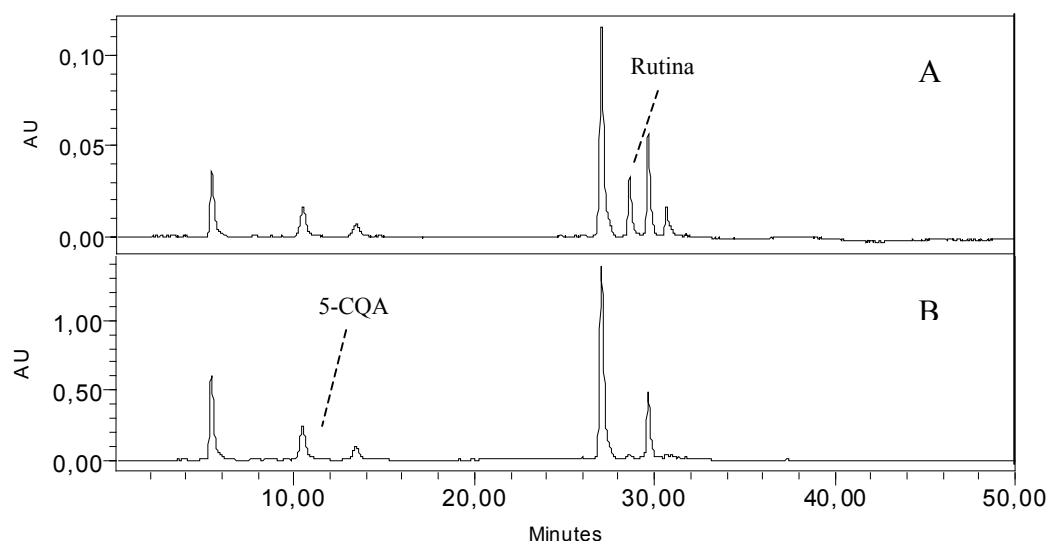


Figura 1. Cromatogramas típicos de compostos fenólicos em chimarrão. A) Rutina, detectada em 370nm (tr = 28,5minutos), B) 5-CQA, detectado em 325nm (tr = 10,5minutos). Fase móvel: metanol:água (ambos com 0,45% de ácido fórmico) em gradiente linear inicial de 20:80 alterado para 30:70 em 1 minuto, esta proporção mantido até os 3 minutos, alterada para 45:55 aos 4 minutos assim permanecendo até aos 13 minutos, alterada para 100:0 até os 18 minutos, mantida até 20 minutos, voltando para 20:80 até os 25 minutos, assim permanecendo até os 50 minutos de corrida cromatográfica. Coluna: Symmetry C-18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) da Waters.

A variação no conteúdo de 5-CQA no chimarrão foi de 0,25 mg/mL a 0,49 mg/mL e na erva-mate foi de 13,1 mg/g a 24,7 mg/g . Considerando somente as amostras de chimarrão do Paraná, a faixa para 5-CQA foi de 0,26 – 0,49 mg/mL, semelhante a faixa para as do Rio Grande do Sul de 0,25 – 0,33 mg/mL.

Tabela 3

Conteúdos de rutina e 5-CQA em amostras de chimarrão e erva-mate.

Amostras	5-CQA			Rutina		
	Chimarrão (mg/mL)	Chimarrão (mg/g folha)	Erva-mate (mg/g)	Chimarrão (mg/mL)	Chimarrão (mg/g folha)	Erva-mate (mg/g)
1-PR	0,26	13,0	13,1	0,05	2,50	2,61
2-PR	0,31	15,3	15,2	0,12	6,10	6,94
3-PR	0,49	24,3	24,6	0,10	5,20	6,37
4-PR	0,49	24,3	24,7	0,11	5,70	6,81
5-PR	0,40	19,8	19,8	0,15	7,50	8,03
6-PR	0,37	18,3	18,2	0,10	5,00	5,69
7-RS	0,25	12,7	13,1	0,09	4,70	5,28
8-RS	0,29	14,4	14,6	0,12	6,00	6,83
9-RS	0,27	13,3	13,5	0,13	6,50	6,79
10-RS	0,33	16,5	16,8	0,04	2,20	2,37
11-RS	0,27	13,7	13,8	0,07	3,70	3,90
12-RS	0,28	13,9	14,0	0,13	6,50	7,47

PR = Paraná; RS = Rio Grande do Sul.

Os valores obtidos de 5-CQA no presente trabalho, quando comparados aos da literatura (Tabela 4), são concordantes aos relatados por Clifford et al.(1990) e Filip et al. (2001), em mg/g folha, bem como aos expressos em mg/mL por Mazzafera (1997).

Tabela 4

Comparação dos níveis de 5-CQA em infusões de erva-mate

Referência	Preparo da amostra	5-CQA (mg/mL)	5-CQA(mg/g folha)
Presente estudo	Chimarrão (n=12)	0,25 – 0,49	13,0 – 24,3
Clifford et al., 1990	Infusão (n=5)		5,7 – 20,2
Mazzafera, (1997)	Chimarrão (n=3)	0,42 – 0,54	
Filip et al., 2001,	Infusão (n=1)		28 ± 3,0

n= número de amostras analisadas

Os teores de rutina variaram de 0,04 mg/mL a 0,15 mg/mL para chimarrão e de 2,37 mg/g a 8,03 mg/g para erva-mate. No chimarrão das amostras do Paraná, a faixa de rutina foi de 0,05 – 0,15 mg/mL, semelhante as amostras do Rio Grande do Sul, com faixa de 0,04 – 0,13 mg/mL.

[Ricco et al. \(1995\)](#), somente citaram a presença de rutina em erva-mate. Os conteúdos de rutina em chimarrão neste estudo foram superiores ao relatado por [Filip et al. \(2001\)](#) que constatarem um teor de $0,60 \pm 0,05$ mg/g de folha, na infusão de amostra proveniente da Argentina.

Para verificar a eficiência da passagem dos compostos fenólicos da erva-mate para o chimarrão, o teor destes foi calculado em mg/g da erva utilizada para a infusão e relacionado ao teor em mg/g da erva. A percentagem (razão entre o teor dos compostos fenólicos obtidos do chimarrão e do da erva-mate, multiplicado por 100), variou de 98,4% a 100,6% (média de 99,1%) para o 5-CQA e de 82,0% a 96,3% (média de 89,7%) para a

rutina, indicando que a preparação do chimarrão pode extrair todo o conteúdo do 5-CQA da erva-mate, porém, não extrai totalmente o conteúdo de rutina desta.

Agradecimentos

Ao PRONEX / FAPESP nº 2003/10151-4 pelo apoio financeiro para execução do experimento, e ao PICDT / UFPR pela concessão de bolsa à primeira autora.

Referências

- Aherne, S.A., O'Brien, N., 2002. Review Article, Dietary Flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81.
- 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 Agriculture and Food Chemistry* 52, 1124-1131.
- Awad, M.A., Jager, A., vanderPlas, L.H.W., vanderKrol, A., 2001. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of “Elstar” and “Jonagold” apples during development and ripening. *Scientia Horticulturae* 90, 69-83.
- Clifford, M. N., 2000. Review. Chlorogenic acids and other cinnamates- nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal Science of Food and Agriculture* 80, 1033-1043.

- Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J.R., 1990. Chlorogenic acids and purine alkaloid content of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. Food Chemistry 35, 13-21.
- 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 Agriculture and Food Chemistry 45, 590- 595.
- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., De Mariz E., Miranda, L.S., 1999. The Content of Individual Caffeoylquinic Acids in Edible Vegetables. Journal of Food Composition and Analysis, 12, 289-291.
- Dreosti, I.E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. Nutrition 16, 692-694.
- Duarte, F.; Waszczynskyj, N., 2000. Seleção, treinamento de julgadores e metodologia para análise sensorial de extrato de erva-mate./ Dissertação de mestrado/ Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., Ferraro, G., 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia 72, 774-778.
- Filip, R., Lotito, S.B., Ferraro, G., Fraga, C.G., 2000. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. Nutrition Research 20, 1437-1446.

- Graham, H.N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preservative Methodology* 21, 334-350.
- Hara, Y., Luo, S.J., Wickremasinghe, R.L., Yamanishi, T., 1995. Special issue on tea. *Food Research International* 11, 371-545.
- Harbowy, M.E., Balentine, D.A., 1997. Tea chemistry. *Critical Review in Plant Science* 16, 415-480.
- Maccari Jr. A, Mazuchowski JZ, editores. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná MCT/CNPq/ Projeto PADCT Erva-mate. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba:EMATER, 2001.
- Mazzafera, P., 1997. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry* 50, 67-71.
- Ramallo, L.A., Smorcowski, M., Valdez, E.C., 1998. Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. *La alimentación latinoamericana* 255, 48-52.
- Ricco, R.A., Wagner, M.L., Gurni, A.A., 1995. Estudio comparativo de flavonoides en especies Austrosudamericanas del genero *ILEX* . Erva-mate: biología e cultura no Cone Sul. Editora da Universidade/UFRGS, p243-249.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganda, 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 bioflavanoids. *The Analyst* 122, 11R-34R.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66, 401-436.
- Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987, 57-66.
- Toit, R., Volstedt, Y., Apostolides, Z., 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 166, 63-69.
- Trugo, L.C., Macrae, R., 1984. Chlorogenic acid composition of instant coffees. *The Analyst* 109, 263-266.

Wiseman, A.S., Balentine, D.A., Frei, B., 1997. Antioxidants in Tea. Critical Review in Food Science and Nutrition 37, 705-718.

Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., Xu, Y., 2004. HPLC analyses of flavanols and phenolics acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. Food Chemistry 84, 253-263.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Para análise dos flavonóides em frutas por CLAE a melhor resolução foi conseguida com coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) e fase móvel de metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico em gradiente linear.
2. O delineamento estatístico de Composição Central e a Análise por Superfície de Resposta auxiliaram na definição da concentração do ácido clorídrico e tempo de hidrólise para obtenção dos flavonóides nas suas formas agliconas, que foram diferentes para cada tipo de fruta estudada.
3. Quercetina foi encontrada em todas as frutas analisadas, com exceção de manga e mamão, sendo a maior concentração encontrada em maçã cultivar Fuji e pitanga. Kaempferol foi encontrado em acerola, morango, pitanga, cajú e maçã. A miricetina só foi detectada em cajú e pitanga.
4. As flavonas luteolina e apigenina não foram detectadas em nenhuma das frutas.
5. Entre as frutas brasileiras analisadas, as melhores fontes de flavonóis foram pitanga e cajú, contendo os três flavonóis, e acerola, contendo quercetina e kaempferol.

6. Para análise dos flavonóides em chimarrão e erva-mate por CLAE a melhor resolução foi conseguida com coluna Nova Pak C18 (3,9 x 150 mm, 4 μ m) da Waters e fase móvel de metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico em gradiente linear.
7. Com auxílio do delineamento estatístico de Composição Central e a Análise por Superfície de Resposta foi definida a concentração de 1,2M de HCl e 60 minutos de hidrólise como as condições ótimas de extração e hidrólise de flavonóides em chimarrão.
8. As amostras de chimarrão apresentaram conteúdos de quercetina até 8 vezes superiores aos conteúdos de kaempferol.
9. As faixas obtidas de quercetina e kaempferol foram equivalentes para as amostras de chimarrão do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.
10. Em todas as amostras de chimarrão e erva-mate analisadas, não foram detectados o flavonol miricetina e as flavonas luteolina e apigenina.
11. A preparação de bebida por chimarrão não extrai totalmente os flavonóis da erva-mate em pó.

12. Para análise dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico (5-CQA) e da rutina em chimarrão e erva-mate por CLAE, a melhor resolução foi conseguida com coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m) da Waters e fase móvel de metanol e água acidificados com 0,4% de ácido fórmico em gradiente linear.
13. As amostras de chimarrão e erva-mate provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul apresentaram faixas semelhantes para o conteúdo de 5-CQA, e concordantes com a literatura. Em todas amostras não foi detectado o ácido cafeico.
14. Os teores de rutina em chimarrão neste estudo foram até 10 vezes superiores os relatados em literatura. As faixas de variação de rutina foram equivalentes entre amostras provenientes do Paraná e Rio Grande do Sul.
15. A preparação de bebida por chimarrão pode extrair totalmente o 5-CQA e boa parte da rutina da erva-mate.

