

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

FLAVONÓIS EM FRUTAS E HORTALIÇAS - EFEITO DO COZIMENTO E MICROFILTRAÇÃO

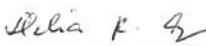
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por **Aline Yashima Bombonati** aprovado pela Comissão Julgadora em 30 de julho de 2009.

Aline Yashima Bombonati
Engenheira de Alimentos

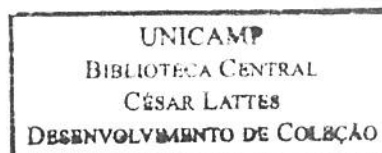
Campinas, 30 de julho de 2009

Profa. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
Orientadora


Profa. Dra. Delia Rodriguez Amaya
Presidente da Banca

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

Campinas-SP
2009



E.
R-126

BANCA EXAMINADORA



Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya
(Orientadora)



Dr. Flávio Luis Schmidt



Dra. Mieko Kimura

200717648

Palavras do Rei Salomão:

“O que ganha o homem com todo o seu esforço? Tenho visto o fardo que Deus impôs aos homens. Ele fez tudo apropriado ao seu tempo. Também pôs no coração do homem o anseio pela eternidade; mesmo assim ele não consegue compreender inteiramente o que Deus fez. Descobri que não há nada melhor do que ser feliz e praticar o bem enquanto se vive. Descobri também que poder comer, beber e ser recompensado pelo seu trabalho é um presente de Deus. Sei que tudo o que Deus faz permanecerá para sempre; a isso nada se pode acrescentar, e disso nada se pode tirar. Deus assim faz para que os homens o temam.” (Eclesiastes 3, versos 1 a 14).

“Meu filho, se você aceitar as minhas palavras e guardar no coração os meus mandamentos; se der ouvidos à sabedoria e inclinar o coração para o discernimento; se clamar por entendimento e por discernimento gritar bem alto; se procurar a sabedoria como se procura a prata e buscá-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer ao Senhor e achará o conhecimento de Deus. Pois o Senhor é quem dá sabedoria; da sua boca procedem o conhecimento e o discernimento. Ele reserva a sensatez para o justo; como um escudo protege quem anda com integridade, pois guarda a vereda do justo e protege o caminho dos seus fiéis. Então você entenderá o que é justo, direito e certo, e aprenderá os caminhos do bem. Pois a sabedoria entrará em seu coração, e o conhecimento será agradável à sua alma. O bom senso o guardará e o discernimento o protegerá.” (Provérbios 2, versos 1 a 11)

Resumindo: “Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apóie em seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos os seus caminhos e ele endireitará as suas veredas. Não seja sábio aos seus próprios olhos; Tema ao Senhor e evite o mal. Isso lhe dará saúde ao corpo e vigor aos ossos.” (Provérbios 3:5-8). “O temor do Senhor é o princípio da sabedoria” (Provérbios 9:10).

Aos meus pais Osmar e Zélia,
ao meu irmão Aher,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Àquele que está assentado no trono e ao Cordeiro sejam o louvor, a honra, a glória e o poder para todo o sempre! Amém! Primeiramente, eu te agradeço Senhor pelo favor para comigo, eu não mereço tanto! Obrigada pelo amor, misericórdia, bondade, fidelidade e presença constante, pela proteção e cuidado, pela força, por ter me dado a oportunidade de fazer mestrado e por ter me colocado no meio de pessoas especiais (laboratório de carotenóides e Igreja Batista Vida Nova), pela salvação, enfim, por tudo o que tem feito e ainda fará na minha vida. Yeshua, eu te amo!

Aos meus pais, **Osmar Bombonati e Zélia Lopes Yashima Bombonati**, e ao meu irmão **Aher Y. Bombonati**, pelo amor, incentivo, exortação, confiança, vocês são a minha referência de família, de valores, de formação de caráter - uma benção de Deus verdadeiramente. À **Melissa Baptista Fontes**, pelo **Laércio B. F. Bombonati**, nosso bebê mais lindo, e pela **Beatriz F. Pornadzick** também, que nos trazem tanta alegria e nos fazem aprender o que é o amor nas suas variadas faces. À minha nona **Hermelinda Talpo Bombonati**, pelo carinho e dedicação.

À **Profa. Dra. Delia B. Rodriguez-Amaya**, pelo exemplo de paciência e dedicação à pesquisa, pela confiança depositada em mim, pela atenção, pelas “brincas”, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela persistência e incentivo quando tudo dava errado (no começo, no meio e no fim foi difícil, gente!!!).

Ao **Prof. Dr. Flávio Schmidt**, pela atenção e disposição em ajudar para que tudo corresse bem durante os experimentos! Pelas vezes que me disse: “um resultado negativo também é um resultado Aline!”.

Às Dras **Mieko Kimura, Myrna Sabino, Rosemary Hoffmann-Ribani** e ao Dr. **Flávio Schmidt**, pela atenção e pelas sugestões a esse trabalho.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À minha família, **avós, tios e primos**, que sempre se preocuparam comigo, pelo incentivo, pelo carinho e por entenderem a minha ausência por causa da distância e dos experimentos.

Às amigas da república principalmente **Lucinéia Cestari, Marcela R. Costa, Marina V. Copetti, Cínthia O. Viegas** e à todas as meninas que já passaram pela casa, obrigada pela amizade, incentivo e pelos momentos únicos que passamos juntas. Os amigos são essenciais em nossa vida!

Aos amigos do lab debaixo (Bioaromas) **Fábio Barros (Cibola), Mário Mano (Mariola), Cedenir (Cd)**; e às amigas, **Daniela Pane e Nenis Eik**, pela amizade, pelo convívio, por tornarem meus dias mais alegres proporcionando muitas risadas.

Às meninas amigas do lab de Carotenóides **Cíntia Kabori (Ci), Giovanna Pisanelli (Gi), Natália Tawata (Natz), Michelle Sentanin (Mi), Márcia T. Martins (Márcia), Lísia S. Huber (Li), Renata L. Prates (técnica)** e ao amigo **José Emilson M. Ferreira (Emilson)**, pela amizade, companheirismo, conselhos, ajuda, bons momentos, troca de experiências, broncas, festinhas e risadas. Vocês são muito especiais e inesquecíveis! Mi e Gi, obrigada mais que obrigada pela ajuda no final!

À **Débora Subirá**, pela disposição e ajuda.

Ao **Departamento de Ciência de Alimentos e Secretaria de Pós Graduação** pelas orientações e oportunidade de realizar o mestrado.

Ao **Departamento de Tecnologia de Alimentos**, aos funcionários da área de frutas e planta-piloto (**Ana Kom, Luciana, Adalto, Bernadete**), pelas infinitas águas destiladas, pela ajuda, atenção e prestatividade na realização dos experimentos.

À **Raquel Giorgiani**, pastora, discipuladora e amiga, por me dar palavras de sabedoria, profetizar sobre a minha vida, pelo amor, atenção, incentivo e exemplo de perseverança. À **Igreja Batista Vida Nova**, meus pastores, Bispo **Paulo e Valéria Petrizi**, pelo alimento espiritual, pelas orações, por ter me ensinado a santidade e adoração que é devida ao nosso Deus. Nós temos uma aliança em Cristo!

A todos que contribuíram de alguma maneira, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse cumprido.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xv
INTRODUÇÃO GERAL	xvi
CAPÍTULO 1: FONTES BRASILEIRAS DE FLAVONÓIS.....	1
RESUMO	2
SUMMARY	2
1-INTRODUÇÃO	2
2-TEORES DE FLAVONÓIS EM FRUTAS <i>IN NATURA</i> E PROCESSADAS	4
3-TEORES DE FLAVONÓIS EM HORTALIÇAS <i>IN NATURA</i> E PROCESSADAS.....	7
4-CONSIDERAÇÕES FINAIS	8
5-REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2: TEORES DE FLAVONÓIS EM HORTALIÇAS COZIDAS DE RESTAURANTES	16
RESUMO	17
SUMMARY	17
1-INTRODUÇÃO	18
2-MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1-Amostras	19
2.2-Reagentes e padrões	20
2.3-Extração e hidrólise dos flavonóis	20
2.4-Análise cromatográfica	21
2.5-Planejamento experimental e análise de superfície de resposta.....	22
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1-Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise de agliconas	26
3.2-Avaliação da metodologia analítica	34
3.3-Comparação entre as condições ótimas de extração/hidrólise de flavonóis de hortaliças cruas e cozidas	34
3.4-Teores de flavonóis em alimentos de restaurantes.....	36

4-CONCLUSÃO	39
5-REFERÊNCIAS	39
 CAPÍTULO 3: FLAVONÓIS DE FRUTAS RICAS EM CAROTENÓIDES DO NORTE E NORDESTE DO BRASIL	42
RESUMO	43
SUMMARY	43
1-INTRODUÇÃO	44
2-MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1-Amostras	44
2.2-Reagentes e padrões	45
2.3-Determinação de flavonóis	45
2.4-Planejamento experimental e análise de superfície de resposta.....	46
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1-Análise do resultado do DCCR utilizado na otimização da extração/hidrólise da aglicona	48
3.2-Avaliação de metodologia analítica	51
3.3-Teores de flavonóis em frutas.....	51
4-CONCLUSÃO	53
5-REFERÊNCIAS	53
 CAPÍTULO 4: COMPORTAMENTO DE FLAVONÓIS DURANTE MICROFILTRAÇÃO DE POLPA DE CAJU	55
RESUMO	56
SUMMARY	56
1-INTRODUÇÃO	57
2-MATERIAIS E MÉTODOS	58
2.1-Determinação de flavonóis e vitamina C.....	59
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4-CONCLUSÃO	61
5-REFERÊNCIAS	62

CONCLUSÕES GERAIS.....	64
------------------------	----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1	1
Tabela 1. Teores de flavonóis em frutas brasileiras <i>in natura</i> e processadas.....	9
Tabela 2. Teores de flavonóis em hortaliças brasileiras <i>in natura</i> e processadas	11
 CAPÍTULO 2	 16
Tabela 1. Condições utilizadas no DCCR para otimização das condições de hidrólise de flavonóis	23
Tabela 2. Matriz do delineamento experimental e respostas quanto à concentração de flavonóis em hortaliças cruas.....	24
Tabela 3. Matriz do delineamento experimental e respostas quanto à concentração de flavonóis em hortaliças cozidas.....	25
Tabela 4. Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para as concentrações de flavonóis agliconas em hortaliças cruas	29
Tabela 5. Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para as concentrações de flavonóis agliconas em hortaliças cozidas.....	30
Tabela 6. Equações que representam os teores de flavonóis agliconas das hortaliças em relação à concentração de HCl e ao tempo de hidrólise	31
Tabela 7. Teores de flavonóis nas amostras e seus respectivos coeficientes de variação.....	34
Tabela 8. Comparação entre extração/hidrólise de flavonóis de hortaliças cozidas quando submetidas às condições ótimas estabelecidas pelo DCCR para hortaliças cruas e cozidas	35
Tabela 9. Teores de flavonóis em alimentos preparados por restaurantes da cidade de Campinas-SP.....	37
 CAPÍTULO 3	 42
Tabela 1. Valores utilizados no DCCR para otimização das condições de hidrólise de flavonóis	47
Tabela 2. Matriz do delineamento experimental e respostas quanto à concentração de quercetina em buriti	48
Tabela 3. Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para a concentração de flavonol aglicona	50
Tabela 4. Equação que representa o teor de flavonol aglicona do buriti em relação à concentração de HCl e ao tempo de hidrólise.....	50
Tabela 5. Teores de flavonóis nas amostras analisadas.....	52

CAPÍTULO 4	55
Tabela 1. Teores de flavonóis (µg/g) e vitamina C (mg/100g) em polpa, clarificado e retentado de caju	60

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	1
Figura 1. Estrutura dos flavonóis.....	4
CAPÍTULO 2	16
Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóis agliconas Q-quercetina, K-kaempferol, dos extratos hidrolisados na condição ótima de extração para brócolis cru (A), brócolis ninja cru (B), chicória crua (C) e vagem crua (D), usando coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos, mantido até os 25 minutos e 20:80 em 28 minutos, sempre em gradiente linear.....	27
Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóis agliconas Q-quercetina, K-kaempferol, dos extratos hidrolisados na condição ótima de extração para brócolis ninja cozido (A), chicória refogada (B), couve refogada (C) e vagem cozida (D), usando coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos, mantido até os 25 minutos e 20:80 em 28 minutos, sempre em gradiente linear.	28
Figura 3. Superfícies de resposta geradas na determinação de flavonóis agliconas quercetina e kaempferol das hortaliças cruas.	32
Figura 4. Superfícies de resposta geradas na determinação de flavonóis agliconas quercetina e kaempferol das hortaliças cozidas.	33
CAPÍTULO 3	42
Figura 1. Cromatogramas dos extratos hidrolisados de buriti (A), tucumã (B), pupunha crua (C) e pupunha cozida (D). Q=quercetina, K=kaempferol. Análise utilizou coluna Symmetry C18 (2,5m, 2,1x150mm), fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, sempre em gradiente linear.....	49
Figura 2. Cromatograma do extrato hidrolisado de polpa de pitanga congelada (E). M=miricetina, Q=quercetina. Análise utilizou coluna Symmetry C18 (2,5m, 2,1x150mm), fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, sempre em gradiente linear	50
Figura 3. Superfície de resposta gerada na determinação de quercetina de buriti.	51
CAPÍTULO 4	55

Figura 1. Esquema do equipamento de microfiltração (Clareto, 2007)	60
--	----

RESUMO GERAL

O Brasil possui uma grande variedade de frutas e hortaliças, no entanto, dados sobre os teores de flavonóis em alimentos ainda são limitados, principalmente em alimentos cozidos e frutas provenientes da Amazônia. Flavonóis são os flavonóides mais largamente encontrados em vegetais, aos quais são atribuídos efeitos benéficos à saúde, como a prevenção de doenças degenerativas como câncer e cardiovasculares. Este trabalho determinou teores de flavonóis em hortaliças e foi observada uma grande variação entre os lotes da mesma hortaliça de um mesmo restaurante e entre os diferentes restaurantes. Couve refogada apresentou os maiores teores de quercetina e kaempferol e brócolis ninja cozido os menores. Flavonóis foram também determinados em frutas ricas em carotenóides como buriti, tucumã, pupunha e pitanga, provenientes do Norte e Nordeste do Brasil. Não foram detectados flavonóis em tucumã e pupunha. Baixos teores de quercetina e kaempferol foram encontrados em buriti, fruta amazônica, conhecida como a fonte mais rica de β -caroteno no país. Foram obtidos também baixos níveis de miricetina e quercetina para polpa de pitanga congelada. A microfiltração foi aplicada em polpa de caju e os resultados demonstram que é possível empregar esta tecnologia, obtendo um suco clarificado com teores satisfatórios de flavonóis e vitamina C.

Palavras-chave: flavonóis, benefícios à saúde, frutas, hortaliças, alimentos de restaurantes.

INTRODUÇÃO GERAL

Alimentos de origem vegetal, de maneira geral, apresentam flavonóides, os quais possuem atividade antioxidante, quelando metais e seqüestrando radicais livres, desativam carcinógenos, inibem a expressão de genes mutantes e a atividade de enzimas que promovem câncer, além da habilidade de desintoxicar xenobióticos.

O Brasil dispõe de uma ampla diversidade em frutas e hortaliças. Recentemente e em pouco tempo, foram obtidos dados substanciais sobre os níveis de flavonóis em frutas e hortaliças brasileiras *in natura*, além de alguns dados sobre produtos processados. Os dados, porém, são ainda insuficientes. Adicionalmente, mais investigações sobre os fatores que influenciam nos teores de flavonóis nos alimentos são necessários, inclusive o efeito do preparo e processamento de alimentos. Para garantir a confiabilidade dos resultados, a metodologia analítica deve ser otimizada para cada alimento.

Dessa maneira, os objetivos deste trabalho foram: a) otimizar as condições de extração/hidrólise de flavonóis para hortaliças cozidas de restaurantes e quantificar seus teores; b) caracterizar frutas da amazônia como o buriti, tucumã e pupunha quanto aos teores de flavonóis, além de avaliar os teores em polpa de pitanga congelada; c) quantificar os teores de flavonóis e vitamina C em polpa de caju quando empregada tecnologia de microfiltração.

CAPÍTULO 1

FONTES BRASILEIRAS DE FLAVONÓIS

FONTES BRASILEIRAS DE FLAVONÓIS

RESUMO

Os flavonóides são compostos fenólicos sintetizados pelas plantas e normalmente ocorrem na forma de glicosídeos. Fazem parte da dieta humana sendo encontradas em frutas, hortaliças, chás, vinhos, grãos e castanhas. O interesse científico nos flavonóides é devido aos efeitos benéficos à saúde, principalmente em relação à prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. Os flavonóis são os flavonóides mais largamente encontrados em vegetais. Nos últimos anos, teores destes compostos em alimentos brasileiros frescos e processados foram determinados, porém, mais dados ainda são requeridos. Além disso, os efeitos de processamento merecem ser investigados.

Palavras-chave: flavonóis, aspectos químicos, vegetais, efeito do processamento

SUMMARY

The flavonoids are phenolic compounds synthesized by plants and usually occur as glycosides. They are part of the human diet being found in fruits, vegetables, tea, wine, nuts and grains. The scientific interest on flavonoids is due to beneficial effects for health, especially in relation to prevention of cancer and cardiovascular diseases. The flavonols are the most widely found flavonoids in vegetables. In recent years, levels of these compounds in fresh and processed Brazilians foods were determined, however, more data are still required. Furthermore, the effects of processing should be investigated.

Keywords: Flavonols, chemical aspects, vegetables, effect of processing

1- INTRODUÇÃO

Alimentos de origem vegetal contêm, além de seus micronutrientes (vitaminas e minerais), substâncias bioativas benéficas à saúde, como os flavonóides. Flavonóides são fitoquímicos produzidos por via metabólica secundária em plantas e estão presentes em frutas, hortaliças, castanhas, chás, óleo de oliva e vinho tinto (Aherne *et al.*, 2002).

Os flavonóides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido shiquímico) e ácido acético. Inicialmente, a fenilalanina é transformada em ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amônio liase, enzima que liga os metabolismos primário (via do ácido shiquímico) e secundário (via fenilpropanóides). O ácido cinâmico é hidrolisado a ácido cumárico (C9) que é condensado a três unidades de malonil-CoA (C2) formando uma chalcona (C15), a partir da qual todos os flavonóides são formados (Winkel-Shirley, 2001).

Sua estrutura consiste em dois anéis benzênicos (A e B) e um anel (C) que pode ser um pirano heterocíclico, ou pirona, com um grupo carbonila na posição 4 classificando os flavonóides em flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas, flavanóis e flavanonas.

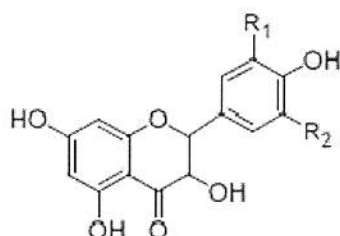
A estrutura básica dos flavonóides pode sofrer modificações como glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras, que podem modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos e influenciar a atividade biológica que é dependente da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula.

Os flavonóides ocorrem em plantas principalmente na forma de glicosídeos, isto é, ligados a moléculas de açúcares, normalmente O-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada à hidroxila na posição C3 ou C7 (Hermann, 1988; DiCarlo *et al.*, 1999; Erlund, 2004). Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose, porém pelo menos oito monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonóide, resultando em um grande número de glicosídeos.

Os efeitos benéficos dos flavonóides à saúde como redução do risco de doenças cardiovasculares (Knekt *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993, 1997; Yochum *et al.*, 1999) e certos tipos de câncer (Knekt *et al.*, 1997; De Stefani *et al.*, 1999; Garcia-Closas *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Neuhouser, 2004) são atribuídos principalmente à sua atividade antioxidante, de forma ainda não conclusiva principalmente em relação ao câncer (Hollman, 2001; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Estes compostos agem sequestrando radicais livres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Prior e Cao, 2000) e quelando metais capazes de catalisar a peroxidação lipídica (Terao e Piskula, 1999). Além das propriedades antioxidantes dos flavonóides, estes podem atuar de várias maneiras: desativando carcinógenos, inibindo a expressão de genes mutantes e a atividade de enzimas que promovem câncer, e desintoxicando xenobióticos (Kris-Etherton *et al.*, 2002).

Os flavonóis (Figura 1) são os flavonóides mais largamente encontrados em alimentos e, por esse motivo, são os mais investigados quanto aos efeitos benéficos à

saúde (Hertog *et al.*, 1992a,b,1993; Crozier, 1997; Knekt *et al.*, 1997; Yochum *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Neuhouser, 2004). Estudos visando determinar o perfil de flavonóides e suas concentrações individuais nos alimentos devem ser priorizados para elucidar a relação entre a quantidade de flavonóides ingerida na dieta e o efeito dos mesmos na prevenção de doenças (Hollman *et al.*, 1999; Neuhouser, 2004; Arts *et al.*, 2005; Scalbert *et al.*, 2005).



	Flavonóis	
	R ₁	R ₂
Miricetina	OH	OH
Quercetina	OH	H
Kaempferol	H	H

Figura 1. Estrutura dos flavonóis.

2- TEORES DE FLAVONÓIS EM FRUTAS *IN NATURA* E PROCESSADAS

Usando um método previamente otimizado e validado, Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) determinaram os teores de flavonóis em frutas brasileiras *in natura* e processadas (Tabela 1).

Os flavonóis investigados (miricetina, quercetina e kaempferol) não foram detectados na manga cultivar Haden, Palmer e Tommy Atkins e no mamão cultivar Formosa, Golden e Solo.

Quercetina foi encontrada em todas as outras frutas analisadas. O teor médio variou de 0,3 a 7,5mg/100g, sendo a maior concentração encontrada na maçã cultivar Fuji. Em morango, acerola e pitanga, os teores de kaempferol variaram de 0,4 a 1,2mg/100g, sendo maior na acerola. Somente caju e pitanga apresentaram miricetina (2,0 a 3,7mg/100g).

Acerola apresentou quercetina como principal flavonol (concentrações médias de 4,1 a 5,3mg/100g), sendo menor na cultivar Longa Vida e maior na cultivar Olivier. Kaempferol variou de 0,9 a 1,2mg/100g, sendo menor na Longa Vida e maior em acerolas de plantas cultivadas domesticamente em quintais.

Em maçã, a concentração média de quercetina variou de 3,7mg/100g no cultivar Golden Delicious a 7,5mg/100g no cultivar Fuji.

Em lotes de caju analisados, adquiridos em supermercados e constituídos de misturas de três tipos da fruta, amarelo alongado, vermelho alongado e vermelho redondo, a miricetina foi o flavonol majoritário (2,0mg/100g) seguido de quercetina (1,3mg/100g). Kaempferol variou de níveis menores que o limite de quantificação a 0,3mg/100g.

A quercetina foi o único flavonol encontrado em figo, goiaba e jabuticaba sendo a concentração média no figo roxo de 1,3mg/100g e de 1,1mg/100g na jabuticaba. Em goiaba, a cultivar Ogawa (vermelha) apresentou teor ligeiramente menor (1,0mg/100g) que o tipo branca (1,2mg/100g).

Quercetina também foi o único flavonol detectado em quatro cultivares de laranja analisadas, mas em teores bem menores (0,3mg/100g de polpa). Pelo fato das flavanonas hesperidina e naringenina serem os flavonóides predominantes nesta fruta (Arabbi *et al.*, 2004; Franke *et al.*, 2004), os teores encontrados por Hoffman-Ribani *et al.* (2009) não são surpreendentes.

Dentre as frutas analisadas por Hoffmann-Ribani *et al.* (2009), a pitanga apresentou o maior conteúdo de miricetina (3,1 e 3,7mg/100g, respectivamente, para lotes de supermercado e quintal) e a segunda maior concentração de quercetina (5,5 e 6,2mg/100g, respectivamente, para lotes de supermercado e quintal). Também apresentou kaempferol, mas em níveis menores (0,4mg/100g para lotes de supermercado e de quintal) do que aqueles encontrados em acerola e morango.

Em morango foram observados os menores teores de quercetina e kaempferol para o cultivar Kamarossa (0,8 e 0,7mg/100g, respectivamente) e os maiores para o cultivar Oso Grande (1,1 e 0,9mg/100g, respectivamente).

Drago *et al.* (2008) analisaram taperebá e murici provenientes de Belém, Pará, (Tabela 1), encontrando altos teores de quercetina, $9,2 \pm 1,7$ mg/100g em taperebá e $5,8 \pm 0,6$ mg/100g em murici. Miricetina foi detectada apenas em taperebá ($0,34 \pm 0,11$ mg/100g). Os autores chamaram atenção ao fato do taperebá apresentar o maior teor de quercetina entre todas as frutas já analisadas no Brasil, ultrapassando o

relatado para maçã, fruta internacionalmente conhecida como fonte deste composto. O teor de quercetina em murici é também maior que os de frutas comerciais, com exceção de pitanga e maçã.

Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) avaliaram suco concentrado e polpa congelada de acerola; suco pronto para beber, suco concentrado e polpa congelada de caju; e suco concentrado e polpa congelada de pitanga. Nestes, os autores verificaram que além das variações entre marcas e entre amostras, os teores de flavonóis em produtos processados foram consideravelmente menores do que em frutas frescas, especialmente em produtos de caju. A polpa congelada de caju apresentou teor de miricetina de três a seis vezes menor do que a polpa fresca; o teor de quercetina foi de três a oito vezes menor. Para pitanga, os teores de miricetina, quercetina e kaempferol foram de duas a três vezes menores em polpa congelada comparada à fruta fresca. Para acerola, foi encontrado apenas 50% da concentração de quercetina em polpa congelada em relação à fruta fresca; o conteúdo de kaempferol foi também 50% do da fruta fresca na marca C, embora tenha sido quase igual na marca B. Os baixos teores de flavonóis nos produtos processados podem ser devidos aos baixos teores dos mesmos nas frutas usadas como matéria-prima, remoção da casca e degradação durante processamento (pasteurização). Oxidação enzimática poderia estar envolvida se as frutas, depois de despulpadas, fossem armazenadas durante algum tempo antes da pasteurização e/ou a pasteurização não fosse suficiente para inativar a ação das enzimas.

Os baixos conteúdos de flavonóis em polpa congelada de acerola, caju e pitanga indicaram degradação considerável durante o tratamento térmico aplicado para concentrar o suco, muito mais drástico do que a pasteurização da polpa congelada. Os autores esperavam teores mais altos nos concentrados pela remoção da água.

Comparando com dados publicados por outros autores, Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) constataram que os seus dados obtidos concordaram mais com os encontrados em outros países do que com os de Arabbi *et al.* (2004) e Cordenunsi *et al.* (2005), que também analisaram frutas brasileiras. Variações analíticas, além de variações naturais, poderiam estar envolvidas já que estes últimos analisaram os flavonóides na forma de glicosídeos, embora quercetina e kaempferol agliconas tenham sido usados como padrões externos.

Poderia ser alegado que os dados obtidos por Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) foram menores porque houve degradação dos flavonóis durante hidrólise, embora as condições de hidrólise tivessem sido otimizadas. Price *et al.* (1997) também quantificaram quercetina

na forma glicosídica usando os seis respectivos padrões de glicosídeos e as somas foram similares ao do estudo de Hoffmann-Ribani *et al.* (2009).

3- TEORES DE FLAVONÓIS EM HORTALIÇAS *IN NATURA* E PROCESSADAS

Também utilizando metodologia otimizada e validada para as amostras investigadas, Huber *et al.* (2009) determinaram flavonóis em hortaliças (Tabela 2).

Uma triagem inicial de 20 vegetais foi realizada incluindo brócolis, repolho, cenoura, chicória comum, pepino, escarola, pimentão verde, vagem, couve, alface, espinafre, cebola, salsa, rúcula, abóbora comum e abóbora moranga, tomate, agrião, chuchu e catalônia. Destes foram selecionados por serem boas fontes os seguintes vegetais: alface lisa e crespa, couve, espinafre, rúcula, salsa e cebola branca e roxa.

Cebola roxa e branca destacaram-se como fontes riquíssimas de quercetina, sendo os maiores teores encontrados na cebola roxa (Tabela 2). Entre as folhas, a couve apresentou os maiores níveis seguida por rúcula e espinafre. As alfaces tiveram concentrações nitidamente mais baixas.

Huber *et al.* (2009) investigaram o efeito da sazonalidade, analisando cinco lotes no inverno e cinco no verão, para cada vegetal. Couve e alface crespa apresentaram médias de quercetina muito mais altas no verão. Exceto para kaempferol em rúcula, todas as outras hortaliças apresentaram teores também maiores no verão, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Dois fatores foram citados para explicar a falta de diferença significativa na sazonalidade: variação substancial no conteúdo de flavonóides da amostra durante a mesma estação; e mais provável, a pequena diferença na temperatura das duas estações durante o ano de análise. A temperatura ambiente máxima foi 17,8-34,7°C (média de 26,3°C) no inverno, e 23,5-36,9°C (média de 30,2°C) no verão.

Arabbi *et al.* (2004) analisaram alface, cebola e rúcula no segundo semestre de 2001 e primeiro semestre de 2002 (uma amostra para cada vegetal para cada período) e obtiveram grande diferença nos dois valores obtidos para cada vegetal (Tabela 2).

A variação sazonal no conteúdo de flavonóis foi mostrada por Hertog *et al.* (1992a) quando analisaram oito vegetais, sendo os maiores níveis encontrados no verão. A variação foi especialmente grande em alface (1,9 vs. 3,0mg/100g de quercetina), chicória (1,5 vs. 9,5mg/100g de kaempferol) e alho-poró (1,1 vs. 5,6mg/100g de kaempferol).

Embora a temperatura não tenha sido mencionada, uma vez que o estudo foi realizado na Holanda, a diferença na temperatura entre as duas estações deveria ser substancial.

A exemplo das frutas, a comparação dos dados feita por Huber *et al.* (2009) demonstrou que os seus resultados concordaram mais com os obtidos por outros países do que com os de Arabbi *et al.* (2004), que também analisaram hortaliças brasileiras, especialmente em relação a alface. Neste caso também, Arabbi *et al.* (2004) quantificaram os flavonóides como glicosídeos, utilizando agliconas de quercetina e kaempferol como padrões. Os outros autores fizeram hidrólise.

Huber *et al.* (2009) também analisaram cebola e salsa desidratadas (Tabela 2). Os resultados foram alarmantes. O teor de quercetina na cebola variou de não detectado a 60,3mg/100g na marca A, a 125mg/100g na marca B e 91,6mg/100g na marca C. Comparado com os teores obtidos para cebola crua, estes resultados indicaram consideráveis perdas durante o processamento, e a grande variação entre amostras da mesma marca indicou falta de controle de qualidade.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recentemente e em pouco tempo, foram obtidos dados substanciais por diversos autores sobre o conteúdo de flavonóis em frutas e hortaliças brasileiras. Os dados, porém, são ainda insuficientes. Investigações adicionais sobre os fatores que influenciam nos teores de flavonóis nos alimentos são necessárias, inclusive o efeito do preparo e processamento de alimentos.

Tabela 1. Teores de flavonóis em frutas brasileiras *in natura* e processadas.

Fruta	N	Concentração (mg/100g parte comestível)			Referência
		Miricetina	Quercetina	Kaempferol	
Acerola					
<i>In natura</i>					
De quintal (variedade indefinida)	6	n.d.	5,0	1,2	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Cultivar Longa Vida	5	n.d.	4,1	0,9	
Cultivar Olivier	3	n.d.	5,3	1,0	
Processada					
Suco concentrado	5	n.d.	1,4	0,4	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Polpa congelada (2 marcas)	10	n.d.	2,3	0,6	
Caju					
<i>In natura</i>					
De supermercado (variedade indefinida)	5	2,0	1,3	tr.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Processado	15	tr.	tr.	n.d.	
Suco pronto para beber (3 marcas)	15	0,3	tr.	n.d.	
Suco concentrado (3 marcas)	15	0,5	0,3	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Polpa congelada (3 marcas)					
Figo					
Tipo roxo	5	n.d.	1,3	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Goiaba					
Cultivar Ogawa (vermelha)	7	n.d.	1,0	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Branca	5	n.d.	1,2	n.d.	
Jabuticaba					
De supermercado (variedade indefinida)	8	n.d.	1,1	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Laranja					
Cultivar Pêra	5	n.d.	0,3	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Cultivar Bahia	5	n.d.	0,4	n.d.	
Cultivar Lima	5	n.d.	0,3	n.d.	
Cultivar Selecta	4	n.d.	0,3	n.d.	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
Laranja					
Cultivar Pêra	1	n.d.	0,9	n.d.	
Cultivar Lima	1	n.d.	0,8	n.d.	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
Maçã					
Cultivar Fuji	1	n.d.	0,4	n.d.	

Cultivar Golden Delicious	1	n.d.	2,3	n.d.	n.d.
Cultivar Gala	1	n.d.	10,1	n.d.	n.d.
Maçã					
Cultivar Fuji	5	n.d.	7,5	tr.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Cultivar Golden Delicious	5	n.d.	3,7	n.d.	
Cultivar Gala	5	n.d.	5,6	tr.	
Mamão					
Cultivar Formosa, Golden, solo	3	n.d.	n.d.	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Manga					
Cultivar Haden, Palmer, Tommy, Atkins	3	n.d.	n.d.	n.d.	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Morango					
Cultivar Kamarossa	3	n.d.	0,8	0,7	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
Cultivar Oso Grande	5	n.d.	1,1	0,9	
Cultivar Sweet Charlie	2	n.d.	0,9	0,8	
Morango					
Cultivar Dover	1	n.d.	5,3	2,1	Cordenunsi <i>et al.</i> (2005)
Cultivar Campineiro	1	n.d.	6,8	1,4	
Cultivar Oso Grande	1	n.d.	3,9	1,3	
Murici	5	n.d.	5,8	n.d.	Drago <i>et al.</i> (2008)
Pitanga					
<i>In natura</i>					
De quintal (variedade indefinida)	3	3,7	6,2	0,4	Hoffmann-Ribani <i>et al.</i> (2009)
De supermercado (variedade indefinida)	4	3,1	5,5	0,4	
Processada					
Suco concentrado (2 marcas)	10	1,4	2,2	tr.	
Polpa congelada	5	1,6	2,5	0,2	
Taperebá	5	3,4	9,2	n.d.	Drago <i>et al.</i> (2008)

N = número de lotes analisados individualmente; n.d. = não detectado; tr. = traços (<LQ).

Tabela 2. Teores de flavonóis e flavonas em hortaliças brasileiras *in natura* e processadas.

Hortaliças	N	Concentração (mg/100g parte comestível)		Referência
		Quercetina	Kaempferol	
Alface lisa crespa roxa	2	2,7	n.d.	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
	2	19,5	n.d.	
	2	41,2	n.d.	
Alface lisa inverno verão	5	0,7	n.d.	Huber <i>et al.</i> (2009)
	5	1,0	n.d.	
Alface crespa inverno verão	5	0,7	n.d.	Huber <i>et al.</i> (2009)
	5	3,1	n.d.	
Almeirão	2	14,4	7,4	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
Cebola branca <i>In natura</i> Processada Desidratada (3 marcas)	5	32,3	n.d.	Huber <i>et al.</i> (2009)
	15	n.d.-125	n.d.	
Cebola Branca Roxa	2	51,9	n.d.	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
	2	66,0	n.d.	
Cebola roxa inverno verão	5	39,0	n.d.	Huber <i>et al.</i> (2009)
	5	42,3	n.d.	
Couve inverno verão	5	25,6	33,3	Huber <i>et al.</i> (2009)
	5	39,9	33,9	
Espinafre inverno verão	5	5,3	14,5	Huber <i>et al.</i> (2009)
	5	6,2	17,0	

Pimentão amarelo verde vermelho	2 2 2	1,4 3,0 0,8	n.d. n.d. n.d.	Arabbi et al. (2004)
Rúcula (arugula)	2	n.d.-13,9	72,4	Arabbi et al. (2004)
Rúcula inverno verão	5 5	13,7 14,3	50,1 40,2	Huber et al. (2009)
Salsa <i>In natura</i> inverno verão	5 5	n.d. n.d.	n.d. n.d.	Huber et al. (2009)
Processada Desidratada (4 marcas)	20	n.d.	n.d.	
Tomate de salada Caqui cultivar Momotaro "cherry"	1 1 1	0,5 1,3 4,2	n.d. n.d. n.d.	Arabbi et al. (2004)

N = número de lotes analisados individualmente; n.d. = não detectado; tr. = traços (<LQ).

5- REFERÊNCIAS

- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v.18, p.75-81, 2002.
- 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.
- ARTS, I. C. M.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.81, p.317S-325S, 2005.
- CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I.; DO NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; DOS SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effects of the temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, v.91, p.113-121, 2005.
- CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.590-595, 1997.
- DICARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v.65, p.337-353, 1999.
- DE STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; DENEIO-PELLEGRINI, H.; MENDILAHARSU, M.; CARZOGLIO, J. C.; RONCO, A.; OLIVEIRA, L. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a casecontrol study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, v.34, p.100-110, 1999.
- DRAGO, I. S.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. The Amazonian fruits taperebá (*Spondias mombin*) and murici (*Byrsonima crassifolia*) have higher levels of quercetin than commercial fruits. Trabalho apresentado no International Food Data Conference, 7th, São Paulo, 2008.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetina, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, v.24, p.851-874, 2004.
- FRANKE, A. A.; CUSTER, L. J.; ARAKAKI, C.; MURPHY, S. P. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.17, p.1-35, 2004.

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 and Control*, v.10, p.71-75, 1999.

HERMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavones glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. v.186, p.1-5, 1988.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, v.349, p.699, 1997.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.2379-2383, 1992a.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Food Chemistry*, v.41, p.1242-1246, 1993.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.1591-1598, 1992b.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.263-268, 2009.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoid: intake, health effects and bioavailability. *Food Chemistry and Toxicology*, v.37, p.937-942, 1999.

HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, p.842-852, 2001.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chemistry*, v.113, p.1278-1282, 2009.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, v.312, p.478-481, 1996.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; SEPPÄNEN, R.; HELLIÖVAARA, M.; TEPPÖ, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, v.146, p.223-230, 1997.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, v.113, p.71S-88S, 2002.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoid and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, v.50, p.1-7, 2004.

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

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *The American Society for Horticultural Science*, v.35, p.588-592, 2000.

RICE EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, v.45, p.287-306, 2005.

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. *Nutrition*, v.15, p.790-791, 1999.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, v.126, p.485-493, 2001.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, v.21, p.381-406, 2001.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, v.149, p.943-949, 1999.

CAPÍTULO 2

TEORES DE FLAVONÓIS EM HORTALIÇAS COZIDAS DE RESTAURANTES

TEORES DE FLAVONÓIS EM HORTALIÇAS COZIDAS DE RESTAURANTES

RESUMO

As bases de dados de alimentos devem ser na forma em que estes são consumidos e neste sentido informações a respeito de flavonóides em alimentos cozidos são limitadas. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de extração/hidrólise e determinar os teores de flavonóis em hortaliças cozidas de restaurantes. Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência com coluna Nova Pak C18 (4µm, 3,9x150mm) e detector de arranjo de diodos. Miricetina não foi detectada em nenhuma amostra. Vagem apresentou apenas quercetina e somente kaempferol foi encontrado em chicória crua. Foram observadas variações nos teores de flavonóis de cada hortaliça entre amostras de um mesmo restaurante e entre os restaurantes. Couve refogada foi a hortaliça que apresentou os maiores teores médios de quercetina (454-670µg/g) e de kaempferol (169-207µg/g) e brócolis ninja cozido o que apresentou os menores teores, chegando até a não serem detectados em algumas amostras devido, provavelmente, ao uso de brócolis congelados industrialmente, já com perdas por lixiviação e degradação térmica. Chicória refogada apresentou quercetina além de kaempferol que pode ser devido à adição de cebola (rica em quercetina) durante o preparo da hortaliça.

Palavras-chave: flavonóis, análise por CLAE, hortaliças, alimentos de restaurantes, efeito do cozimento.

SUMMARY

Databases on food composition should be in the form of foods as eaten and in this sense information about flavonoid contents in cooked foods is limited. The objective of the present work is to optimize the conditions for extraction/hydrolysis and determine the levels of flavonols in cooked vegetables from restaurants. High performance liquid chromatography, with a Nova Pack C18 (4 µm, 3.9 x 150 mm) column and a photodiode array detector, was used. Myricetin was not detected in any of the samples. Green beans presented only quercetin and only kaempferol was found in raw endive. Between-sample

and between-restaurant variations were observed in each vegetable. Stir-fried kale was the cooked vegetable with the highest concentrations of quercetin (454-670 µg/g) and kaempferol (169-207 µg/g). Boiled broccoli Ninja had the lowest levels, probably because commercial frozen broccoli, which could have already suffered losses due to leaching and thermal degradation, was used as starting material for cooking. Stir-fried endive had quercetin aside from kaempferol, which could have been due to the addition of onion (rich in quercetin) during the preparation of the vegetable.

Keywords: flavonols, HPLC analysis, vegetables, restaurant food, cooking effects

1 - INTRODUÇÃO

O consumo regular de frutas e hortaliças está associado à redução de doenças como as cardiovasculares (Hertog *et al.*, 1993, 1995, 1997; Knekt *et al.*, 1996) e câncer (Block *et al.*, 1992; Franke *et al.*, 1998; Knekt *et al.*, 1997; Neuhouser, 2004). Compostos bioativos presentes nestes alimentos, como, por exemplo, os flavonóides, apresentam atividade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1995), modulam a atividade de algumas enzimas (Fiander & Schneider, 2000) e afetam o comportamento de sistemas celulares (Wenzel *et al.*, 2000), propriedades que justificariam os efeitos benéficos à saúde.

Dentre os flavonóides, os flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) predominam em frutas e hortaliças e são os compostos alvo dos estudos (Hertog *et al.*, 1992a,b; Merken & Beecher, 2000). Estes compostos ocorrem na forma glicosilada e, por essa razão, a determinação quantitativa é dificultada, pois existe um grande número de diferentes glicosídeos para cada flavonóide e também padrões destes compostos não estão disponíveis para comercialização. Assim, a determinação dos flavonóides através da análise das agliconas, liberadas dos glicosídeos, é mais prática. Hertog *et al.* (1992a) empregaram ácido clorídrico em solução aquosa de metanol 50% para a hidrólise e extração simultânea de flavonóis. Entretanto, é necessário otimizar as condições de hidrólise para cada vegetal de interesse (Huber *et al.*, 2007) para garantir uma extração eficiente dos glicosídeos e ao mesmo tempo evitar a degradação das agliconas liberadas. Essa otimização pode ser feita por procedimentos estatísticos empregando análise de

superfície de resposta (ASR), com avaliação simultânea das variáveis do processo e as interações entre elas (Box *et al.*, 1978).

Entre os profissionais que elaboram bancos de dados, há um consenso que os dados de composição de alimentos devem ser em relação à forma em que os alimentos são consumidos, pois o processamento de vegetais pode influenciar os teores de flavonóis (Hertog *et al.*, 1992a; Sikora *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2009). Vegetais cozidos podem ter variações em suas composições causadas pelas condições de cozimento (por exemplo, tempo e temperatura), mas também por diferenças na composição do produto cru, devido a fatores como estágio de maturação, cultivar, parte da planta utilizada, clima ou efeito sazonal, práticas agrícolas e manejo pós-colheita.

Hortaliças são produzidas o ano todo e compõem a dieta da população brasileira. A avaliação de alimentos preparados em restaurantes ao invés de alimentos cozidos em domicílio é mais adequada visto que uma grande parte da população se alimenta diariamente em restaurantes; há carência de informações sobre alimentos de restaurantes; e permitem uma ampla amostragem e ainda representam o modo de preparo doméstico típico do Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi estabelecer as condições ótimas de extração/hidrólise dos flavonóis das hortaliças estudadas e quantificar seus teores em amostras preparadas por restaurantes.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Amostras

Para estabelecer as condições ótimas de extração/hidrólise dos flavonóis foram analisadas as seguintes hortaliças *in natura*: brócolis ninja (*Brassica oleracea* var. *italica*), brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), vagem (*Phaseolus vulgaris*); e as seguintes hortaliças cozidas: couve refogada (*Brassica oleracea* var. *acephala*), brócolis ninja cozido, vagem cozida e chicória refogada (*Chicorium endivia*). Amostras *in natura* foram adquiridas em um varejão de hortifrutícolas de Campinas, São Paulo, Brasil; e as amostras preparadas foram provenientes de restaurantes da mesma cidade.

Os alimentos preparados por restaurantes comerciais e analisados quanto aos teores de flavonóis foram: brócolis ninja cozido, couve refogada, vagem cozida e chicória refogada. Foram analisados três lotes de cada hortaliça de três restaurantes, totalizando

36 lotes. Estes, preparados a partir de aproximadamente 4-6kg de hortaliças cruas, foram adquiridos em dias diferentes conforme disponibilidade nos restaurantes e constituídos de 300g de hortaliça cozida por lote. Em relação ao brócolis, somente brócolis ninja foi utilizado pelos restaurantes e estes eram adquiridos na forma congelada após branqueamento do produto por processamento industrial. Os restaurantes 1 e 3 colocavam o produto ainda congelado em água fervente por alguns minutos, enquanto o restaurante 2, somente imergia o produto em água à temperatura ambiente até completo descongelamento. As determinações analíticas se deram logo após a coleta das amostras.

2.2 - Reagentes e padrões

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

Padrões de flavonóis (quercetina (Q) e kaempferol (K)) 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 500µg/mL e foram conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nestas condições.

2.3 - Extração e hidrólise dos flavonóis

Para a otimização da extração/hidrólise dos flavonóis de cada hortaliça, um lote foi triturado em processador doméstico de alimentos. A hortaliça triturada foi pesada, adicionada de quantidade conhecida de água (em proporções de 1:1) e ácido ascórbico, homogeneizada durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). A seguir, 7,5g desse homogeneizado foi pesado em balão de fundo chato (125mL), acrescido de 12,5mL de metanol e 5mL de ácido clorídrico (HCl) em diferentes concentrações molares iniciais. Assim, a solução de

extração obtida apresentou diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. A amostra foi levada a refluxo a 90°C durante diferentes intervalos de tempo. Os extratos foram então resfriados e filtrados em funil de placa sinterizada com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e a solução foi colocada em ultra-som por 5 minutos. Uma alíquota média de 2mL foi filtrada em filtro (PTFE) da Millipore de 0,22µm de diâmetro, antes da análise cromatográfica.

Cada lote de hortaliça proveniente dos restaurantes foi preparado conforme descrito acima. A hidrólise das amostras foi realizada nas condições ótimas de tempo e concentração de ácido clorídrico estabelecidas no presente estudo para cada hortaliça. As análises foram conduzidas em duplicata.

Posteriormente, as hortaliças cozidas foram submetidas às condições ótimas de extração/hidrólise dos flavonóis obtidas pelos delineamentos estatísticos de composição central rotacional (DCCR) para hortaliças cruas e para cozidas. As amostras foram analisadas em triplicata e os teores de flavonóis obtidos foram avaliados estatisticamente em nível de 5% de significância ($p < 0,05$), com exceção de 2 amostras que foram avaliadas em $p < 0,10$.

2.4 - Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a líquido Waters (modelo 2690) (Milford, EUA), controlado por Software Millenium 32, com bomba quaternária, injetor manual Rheodyne (modelo 7725i) e detector de arranjo de diodos (Waters 996) com detecção fixada em 370nm. Foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18 (4µm, 3,9x150mm). O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e o volume injetado de 20µL. A fase móvel foi constituída de metanol:água acidificados com 0,3% de ácido fórmico, iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos, mantida até os 25 minutos e devolvido a 20:80 em 28 minutos, sempre com gradiente linear.

A identificação dos flavonóis foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões autênticos, co-cromatografia e análise dos espectros obtidos pelo detector de arranjo de diodos.

A quantificação foi feita por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas num mesmo dia pela injeção, em triplicata, de soluções de padrões em cinco

concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras. As soluções padrão foram preparadas em balões de 5mL. À quantidade de padrão necessária para obter a concentração desejada, acrescentaram-se 1,5mL de água purificada, adicionada de ácido ascórbico (concentração 0,04% na solução de injeção) e 1mL de HCl 6M, completando-se o volume com metanol.

A linearidade do método de análise foi verificada para os flavonóis. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, $LD = 3,3 \times (s / S)$ e $LQ = 10 \times (s / S)$, onde s é a estimativa do desvio da equação da linha de regressão e S , o coeficiente angular da curva analítica. A determinação utilizou o programa computacional Microsoft Office Excel 2003. Para verificar a precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para cada hortaliça. Ensaio de recuperação já foram realizados anteriormente em amostras de frutas e hortaliças (Huber *et al.*, 2009; Hoffmann-Ribani *et al.*, 2009; Drago *et al.*, 2007), utilizando o mesmo método de extração de flavonóis e mesmo cromatógrafo empregado neste trabalho, resultando em níveis de recuperação em torno de 100%.

2.5 - Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

A otimização da extração/hidrólise dos flavonóis das hortaliças analisadas foi realizada através da Análise de Superfície de Resposta (ASR). Um DCCR foi utilizado para avaliação da concentração de ácido e tempo de hidrólise na eficiência da extração dos flavonóis. Os valores estudados estão apresentados na Tabela 1. As Tabelas 2 e 3 mostram a matriz do planejamento com as respectivas condições de hidrólise e as respostas que são as concentrações de flavonóis nas hortaliças estudadas. O planejamento consistiu de 12 experimentos, sendo 4 pontos centrais e 4 pontos axiais, executados em ordem aleatória.

Tabela 1 – Condições utilizadas no DCCR para otimização das condições de hidrólise de flavonóis.

Hortaliça	Fatores (M ^a / h;min ^b)				
	Ponto axial inferior (-α)	Nível inferior (-1)	Nível intermediário (0)	Nível superior (+1)	Ponto axial superior (+α)
Brócolis	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h15min
Brócolis ninja	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h15min
Vagem	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h15min
Brócolis ninja cozido	0,15M/11min	0,4M/1h	1M/3h	1,6M/5h	1,85M/5h49min
Chicória refogada	0,6M/11min	0,8M/1h	1,2M/3h	1,6M/5h	1,8M/5h49min
Couve refogada	0,15M/11min	0,4M/1h	1M/3h	1,6M/5h	1,85M/5h49min
Vagem cozida	0,15M/11min	0,4M/1h	1M/3h	1,6M/5h	1,85M/5h49min

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

Tabela 2 – Matriz do delineamento experimental e respostas quanto a concentração de flavonóides em hortaliças cruas.

Ensaio	Concentração de flavonóides (µg/g)									
	Brócolis			Brócolis ninja				Vagem		
	X ₁	X ₂	K	Q	Q	Q	K	Q	K	Q
1	-1	-1	18,39	40,04	10,98	11,04	11,04	40,04	11,04	40,04
2	+1	-1	41,02	53,65	20,26	18,73	18,73	53,65	18,73	53,65
3	-1	+1	24,73	36,07	16,68	15,11	15,11	36,07	15,11	36,07
4	+1	+1	50,17	31,08	4,75	5,66	5,66	31,08	5,66	31,08
5	-1,41	0	14,82	35,76	8,84	9,77	9,77	35,76	9,77	35,76
6	+1,41	0	49,28	29,51	6,99	7,90	7,90	29,51	7,90	29,51
7	0	-1,41	21,82	52,08	19,91	17,33	17,33	52,08	17,33	52,08
8	0	+1,41	45,09	54,53	16,05	13,97	13,97	54,53	13,97	54,53
9	0	0	32,10	61,60	18,43	16,23	16,23	61,60	16,23	61,60
10	0	0	29,81	67,21	16,86	14,00	14,00	67,21	14,00	67,21
11	0	0	34,96	48,75	18,96	16,94	16,94	48,75	16,94	48,75
12	0	0	30,52	64,55	20,45	18,58	18,58	64,55	18,58	64,55

X₁ – concentração molar de HCl; X₂ – tempo de hidrólise; Q – quercetina; K – kaempferol.

Tabela 3. Matriz do delineamento experimental e respostas quanto a concentração de flavonóides em hortaliças cozidas.

Ensaio	Concentração de flavonóides (µg/g)									
	Brócolis		Couve		Chicória		Vagem			
	ninjabr	cozido	refogada	cozida	refogada	cozida	refogada	cozida	refogada	cozida
	X ₁	X ₂	Q	K	Q	K	Q	K	Q	K
1	-1	-1	0,00	11,87	66,67	50,11	70,52	38,38		
2	+1	-1	10,36	23,78	275,59	354,46	125,84	67,68		
3	-1	+1	7,08	22,23	216,64	255,70	134,42	60,81		
4	+1	+1	9,43	19,89	213,55	283,87	89,74	63,54		
5	-1,41	0	0,00	10,10	56,54	42,35	104,05	36,08		
6	+1,41	0	9,51	21,77	281,62	375,02	110,89	65,16		
7	0	-1,41	0,00	6,28	39,18	20,60	31,31	32,92		
8	0	+1,41	13,54	27,11	303,73	393,62	114,52	79,60		
9	0	0	10,41	26,24	311,47	382,60	143,80	79,67		
10	0	0	10,34	25,85	321,29	409,16	139,52	79,40		
11	0	0	11,13	27,19	314,37	398,01	140,06	81,74		
12	0	0	9,98	24,66	320,19	402,08	136,16	75,44		

X₁ – concentração molar de HCl; X₂ – tempo de hidrólise; Q – quercetina; K – kaempferol.

Os resultados obtidos nas Tabelas 2 e 3 foram analisados estatisticamente através do pacote STATISTICA for Windows para computador, versão 6.0 da STATSOFT.

As superfícies de resposta geradas a partir dos fatores experimentais podem ser representadas pelo modelo matemático abaixo (equação 1):

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

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

3 - RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1 - Análise dos resultados dos DCCR utilizados na otimização da extração/hidrólise de agliconas

Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas para cada hortaliça crua são apresentados na Figura 1 e hortaliças cozidas estão apresentados na Figura 2. Os flavonóis quercetina (Q) e kaempferol (K) eluíram nesta sequência nos tempos de retenção de 15 e 20 minutos, respectivamente.

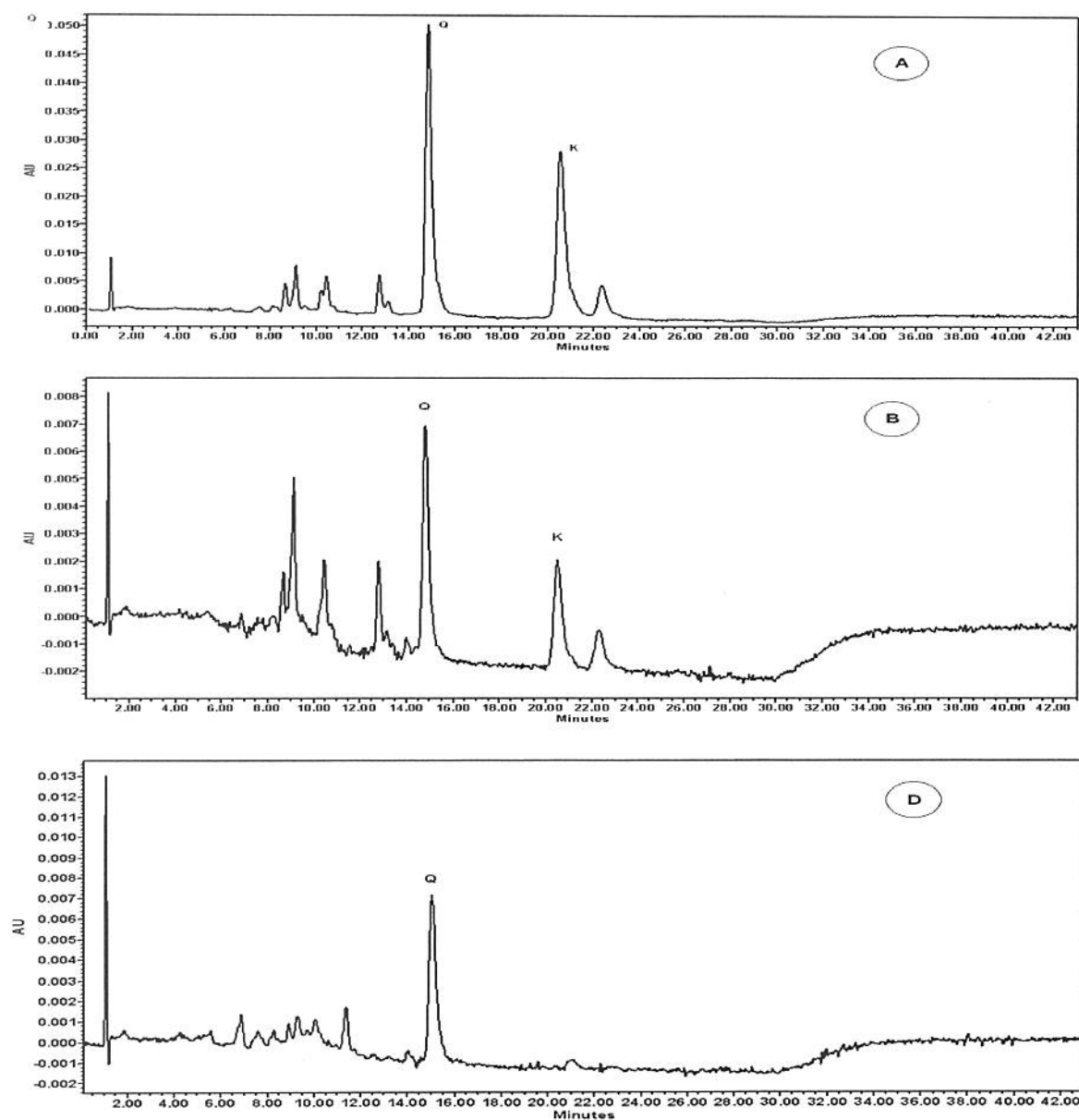


Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóis agliconas Q – quercetina, K – kaempferol, dos extratos hidrolisados na condição ótima de extração para brócolis cru (A), brócolis ninja cru (B) e vagem cru (D), usando coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos, mantido até os 25 minutos e 20:80 em 28 minutos, sempre em gradiente linear.

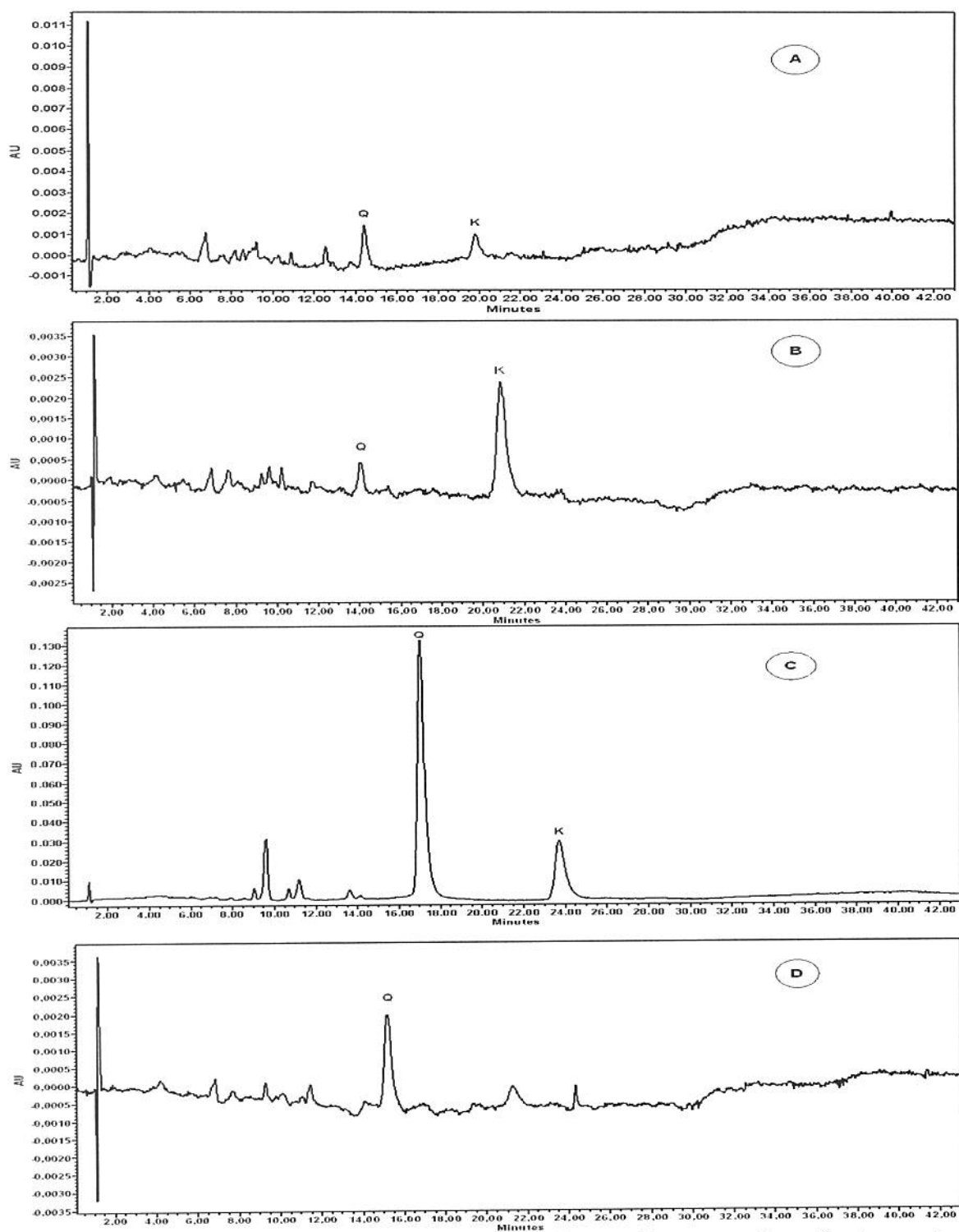


Figura 2. Cromatogramas típicos dos flavonóis agliconas Q – quercetina, K – kaempferol, dos extratos hidrolisados na condição ótima de extração para brócolis ninja cozido (A), chicória refogada (B), couve refogada (C) e vagem cozida (D), usando coluna Nova-Pak C18, fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos, mantido até os 25 minutos e 20:80 em 28 minutos, sempre em gradiente linear.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os coeficientes de regressão para as hortaliças cruas e cozidas analisadas, respectivamente. As equações codificadas com os coeficientes estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação (R^2), F calculados e F tabelados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados experimentais apresentaram um bom ajuste aos modelos obtidos; os valores de F calculados e R^2 obtidos foram satisfatórios, portanto, foi possível gerar as superfícies de respostas apresentadas nas Figuras 3 e 4.

Tabela 4 – Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para a concentração de flavonóis agliconas em hortaliças cruas.

BRÓCOLIS				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B0	112,8747	0,0000	157,9432	0,0000
B1	10,9229	0,0101	17,6061	0,0016
B11	-25,2350	0,0005	-37,5968	0,0000
B2	0,6701	0,8150	2,4110	0,4875
B22	-11,2462	0,0177	-17,5900	0,0029
B12	-19,3260	0,0040	-25,3509	0,0015
BRÓCOLIS NINJA				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B0	48,5468	0,0000	43,4392	0,0000
B1	-1,6555	0,1115	-1,3911	0,1990
B11	-14,1717	0,0000	-10,3489	0,0002
B2	-4,8054	0,0025	-4,3258	0,0058
B22	-1,4920	0,2039	-1,7663	0,1752
B12	-13,3531	0,0001	-10,7834	0,0004
VAGEM				
	Quercetina			
	Coeficientes	p-valor		
B0	64,4540	0,0000		
B1	-0,0271	0,9903		
B11	-16,6003	0,0012		
B2	-2,8840	0,2338		
B22	-6,2628	0,0565		
B12	-4,6508	0,1833		

p-valor <0,05, exceto para vagem cujo p-valor<0,10.

Tabela 5 – Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para a concentração de flavonóis agliconas em hortaliças cozidas.

BRÓCOLIS NINJA COZIDO				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B0	10,4666	0,0000	25,9816	0,0000
B1	3,2709	0,0035	3,2601	0,0596
B11	-2,6160	0,0158	-4,2403	0,0357
B2	3,1613	0,0041	4,4909	0,0187
B22	-1,6100	0,0864	-3,8612	0,0494
B12	-2,0038	0,0904	-3,5636	0,1233
COUVE REFOGADA				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B0	316,8310	0,0000	397,9641	0,0000
B1	65,5171	0,0072	100,3729	0,0040
B11	-68,1637	0,0099	-87,6041	0,0123
B2	57,7590	0,0125	82,8175	0,0097
B22	-66,9774	0,0107	-88,3938	0,0118
B12	-53,0039	0,0625	-69,0439	0,0700
VAGEM COZIDA				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B0	79,0626	0,0000	139,8856	0,0000
B1	9,1439	0,0148	2,5408	0,6639
B11	-13,1799	0,0047	-12,4727	0,0917
B2	10,5387	0,0080	18,1851	0,0170
B22	-10,3613	0,0140	-29,7513	0,0030
B12	-6,6418	0,1329	-25,0016	0,0191

p-valor <0,05, exceto para brócolis ninja cozido cujo p-valor<0,10.

Tabela 6 – Equações dos modelos refinados que representam os teores de flavonóis agliconas das hortaliças em relação à concentração de HCl e ao tempo de hidrólise.

Hortaliza		Equação (μg flavonol/g hortaliza)	R^2	F_{CALC}	F_{TAB} (α , VR, Vr)
Brócolis cru	Q	$Y = 112,87 + 10,92 X_1 - 25,24 X_1^2 - 11,25 X_2^2 - 19,33 X_1 X_2$	0,95	30,75	4,53
	K	$Y = 157,94 + 17,61 X_1 - 37,60 X_1^2 - 17,59 X_2^2 - 25,35 X_1 X_2$	0,96	61,90	4,35
Brócolis ninja cru	Q	$Y = 47,14 - 13,73 X_1^2 - 4,81 X_2 - 13,35 X_1 X_2$	0,97	75,30	4,35
	K	$Y = 41,78 - 9,83 X_1^2 - 4,33 X_2 - 10,78 X_1 X_2$	0,95	41,32	4,35
Vagem crua	Q	$Y = 64,45 - 16,60 X_1^2 - 6,26 X_2^2$	0,82	18,74	3,11
Brócolis ninja cozido	Q	$Y = 10,47 + 3,27 X_1 - 2,61 X_1^2 + 3,16 X_2 - 1,61 X_2^2 - 2,00 X_1 X_2$	0,91	11,80	3,11
	K	$Y = 25,98 + 3,26 X_1 - 4,24 X_1^2 + 4,49 X_2 - 3,86 X_2^2$	0,74	5,07	2,96
Chicória refogada	K	$Y = 129,58 + 18,59 X_2 - 26,61 X_2^2 - 25,92 X_1 X_2$	0,80	10,63	4,07
Couve	Q	$Y = 316,83 + 65,52 X_1 - 68,16 X_1^2 + 57,76 X_2 - 66,98 X_2^2$	0,82	7,95	4,12
	K	$Y = 397,96 + 100,37 X_1 - 87,60 X_1^2 + 82,82 X_2 - 88,39 X_2^2$	0,84	8,94	4,12
Vagem cozida	Q	$Y = 79,06 + 9,14 X_1 - 13,18 X_1^2 + 10,54 X_2 - 10,36 X_2^2$	0,84	7,85	4,53

R^2 = coeficiente de determinação; F_{calc} – (QM regressão/QM resíduo); Y = teores de flavonóis agliconas das hortaliças; X_1 = concentração de HCl; X_2 = tempo de hidrólise; Q – quercetina; K – kaempferol.

α - Nível de significância (5%), exceto para vagem crua e brócolis ninja cozido cujo nível de significância é 10%; VR – graus de liberdade da regressão; Vr – graus de liberdade dos resíduos.

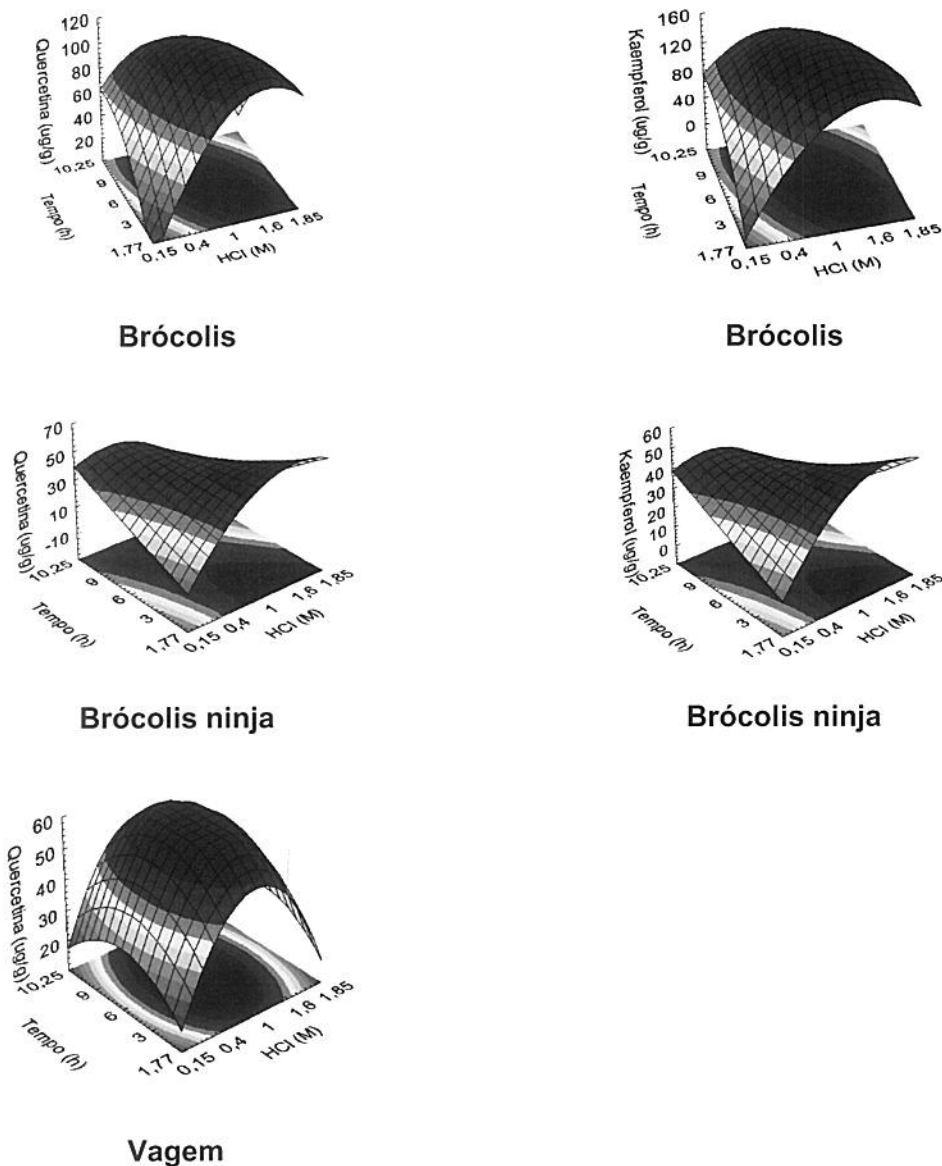
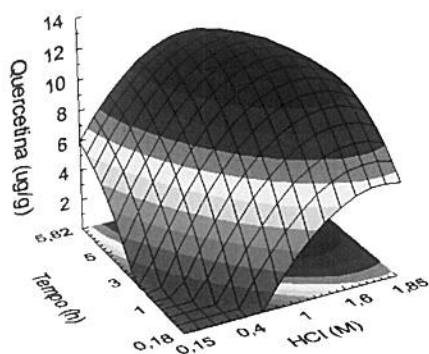
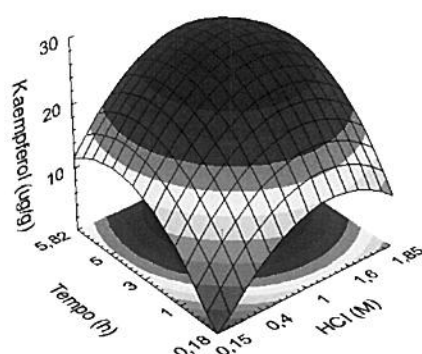


Figura 3. Superfícies de resposta geradas na determinação de flavonóis agliconas quercetina e kaempferol das hortaliças cruas.

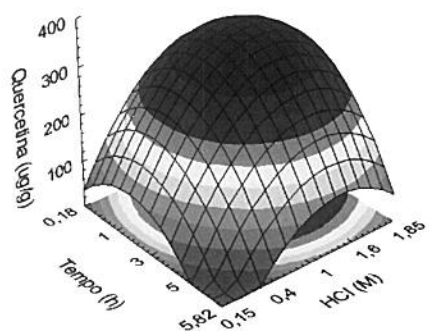
Através das superfícies geradas foram estabelecidas as condições ótimas de concentração molar de ácido e tempo de hidrólise para determinação dos flavonóis agliconas das hortaliças. As melhores respostas experimentais para hortaliça *in natura* foram: 1,4M de HCl por 2 horas para brócolis ninja; 1,2M de HCl por 6 horas para brócolis; e 1M de HCl por 6 horas para vagem.



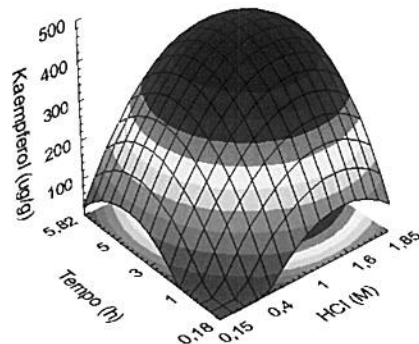
Brócolis ninja cozido



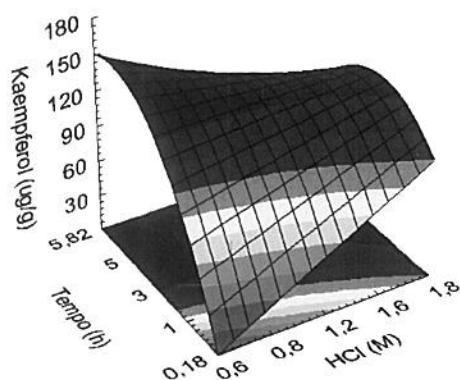
Brócolis ninja cozido



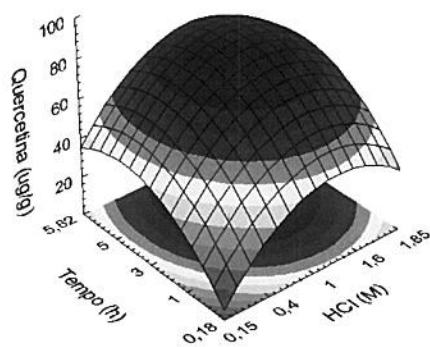
Couve refogada



Couve refogada



Chicória refogada



Vagem cozida

Figura 4. Superfícies de resposta geradas na determinação de flavonóis quercetina e kaempferol agliconas das hortaliças cozidas.

As melhores respostas experimentais para cada hortaliça cozida foram: 1,6M de HCl por 3 horas para brócolis ninja cozido; 0,6M de HCl por 4,5 horas para chicória refogada; 1,5M de HCl por 3 horas para couve refogada e 1,3M de HCl por 4 horas para vagem cozida.

3.2 - Avaliação da metodologia analítica

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração utilizadas para Q (0,32 a 62µg/mL) e K (0,38 a 18,09µg/mL). O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,9990 para ambos os flavonóis; e, os limites de detecção foram 1,0 e 0,8µg/mL, respectivamente, para Q e K. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação das replicatas (Tabela 7). Essas características comprovam o bom desempenho do método analítico.

Tabela 7. Teores de flavonóis nas amostras e seus respectivos coeficientes de variação

Amostra	Concentração (µg/g)*	Coeficiente de variação (%)
Brócolis ninja cru	Q 32 ± 1	4
	K 23 ± 1	3
Brócolis comum cru	Q 193 ± 10	5
	K 158 ± 8	5
Vagem crua	Q 34 ± 2	5
Brócolis ninja cozido	Q 31 ± 1	2
	K 18 ± 1	3
Chicória refogada	K 53 ± 3	5
Couve refogada	Q 168 ± 6	4
	K 381 ± 18	5
Vagem cozida	Q 50 ± 1	2

*média de sete repetições, Q – quercetina, K – kaempferol; tr. – traços.

3.3 – Comparação entre as condições ótimas de extração/hidrólise de flavonóis de hortaliças cruas e cozidas

A otimização das condições de extração/hidrólise para cada alimento é uma tarefa demorada e trabalhosa mas necessária como foi demonstrado por Huber *et al.* (2009) e Hoffmann-Ribani *et al.* (2009). Estes autores, porém utilizaram as condições otimizadas para hortaliças e frutas cruas para os respectivos produtos processados. Como o tratamento térmico amolece o tecido vegetal, pode ser alegado que as condições ótimas para os alimentos crus podem ser muito drásticas para os processados e isso poderia ser o responsável, pelo menos em parte, dos baixos teores de flavonóis em produtos processados. Portanto, os níveis de flavonóis de hortaliças cozidas foram determinados por análises realizadas sob condições ótimas para as hortaliças cruas e cozidas (Tabela 8). A condição ótima de 1M de HCl por 6 horas para couve crua foi estabelecida por Huber *et al.* (2009).

Tabela 8. Comparação entre extração/hidrólise de flavonóis de hortaliças cozidas quando submetidas às condições ótimas estabelecidas pelo DCCR para hortaliças cruas e cozidas.

Condição de hidrólise	Brócolis ninja cozido	
	Quercetina (µg/g)*	Kaempferol (µg/g)*
1,4M/2horas**	31±1a	15±1a
1,3M/4horas***	31±1a	17±1b
	Couve refogada	
	Quercetina (µg/g)*	Kaempferol (µg/g)*
1M/6horas**	168±2a	383±7a
1,5M/3horas***	167±6a	378±11a
	Vagem cozida	
	Quercetina (µg/g)*	
1M/6horas**	50±2a	
1,3M/4horas***	50±1a	

*média ± desvio padrão, média de triplicatas; **condição ótima para o vegetal cru; ***condição ótima para o vegetal cozido. Para cada tipo de amostra em cada condição de hidrólise, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Não houve diferença significativa nos teores de quercetina e kaempferol de hortaliças cozidas quando submetidas às duas condições de extração/hidrólise dos flavonóis, com exceção somente de kaempferol em brócolis ninja cozido, cujos teores

foram maiores na condição ótima estabelecida para a amostra cozida. Mesmo para este caso a diferença é mínima, a significância estatística foi decorrente da ótima repetibilidade com desvio de apenas 1 µg/g. Portanto, a otimização das condições de extração/hidrólise do alimento cru pode servir também para o alimento cozido ou processado. Estes resultados indicam que o amolecimento do tecido vegetal facilitando a liberação dos glicosídeos de flavonóis da matriz alimentícia, não é o fator limitante na eficiência da extração/hidrólise mas sim, a liberação da aglicona do glicosídeo. Adicionalmente, pode ser notado nas condições ótimas que uma maior concentração de ácido é compensada por um tempo menor de hidrólise.

3.4 - Teores de flavonóis em alimentos de restaurantes

Os teores de flavonóis encontrados nas amostras preparadas por restaurantes estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Teor de flavonóis em alimentos preparados por restaurantes da cidade de Campinas-SP.

Amostra	Quercetina ($\mu\text{g/g}$)*	Kaempferol ($\mu\text{g/g}$)*
Brócolis ninja cozido		
Restaurante 1	n.d.	n.d. – 14
Restaurante 2	n.d. – 16	n.d. – 18
Restaurante 3	n.d. – 16	n.d. – 20
Chicória refogada		
Restaurante 1	n.d.	99 – 130 (117 $\pm$ 16)
Restaurante 2	16 – 53 (37 $\pm$ 19)	51 – 82 (62 $\pm$ 18)
Restaurante 3	n.d. – 32 (15 $\pm$ 15)	19 – 44 (32 $\pm$ 12)
Couve refogado		
Restaurante 1	401 – 558 (454 $\pm$ 90)	156 – 208 (189 $\pm$ 29)
Restaurante 2	607 – 763 (670 $\pm$ 82)	194 – 222 (207 $\pm$ 14)
Restaurante 3	395 – 562 (470 $\pm$ 85)	155 – 196 (169 $\pm$ 23)
Vagem cozida		
Restaurante 1	(17 – 69) (40 $\pm$ 26)	n.d.
Restaurante 2	17 – 27 (22 $\pm$ 5)	n.d.
Restaurante 3	36 – 41 (39 $\pm$ 2)	n.d.

*faixa (média $\pm$ desvio padrão), média de três lotes. n.d.= não detectado; Limite de Detecção (LD): 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para quercetina; 0,8 $\mu\text{g/mL}$ para kaempferol.

Miricetina não foi detectada em nenhuma das amostras e kaempferol não foi encontrado em vagem (Tabela 9).

Grandes variações nos teores de flavonóis podem ser notadas, tanto entre amostras do mesmo vegetal compradas do mesmo restaurante como entre amostras do mesmo vegetal de restaurantes diferentes. Isso pode ser explicado pela variação natural na composição da matéria-prima, ou mesmo, por condições de temperatura e tempo de cozimento, exposição ao ar pelo corte, entre outras.

Os maiores teores médios de quercetina e kaempferol foram constatados em couve refogada (454-670µg/g e 169-207µg/g, respectivamente) (Tabela 9). Chicória refogada apresentou a segunda maior concentração de kaempferol (32-117µg/g). Já em brócolis ninja cozido, quercetina e kaempferol apresentaram os menores teores (n.d.-16µg/g e n.d.-20µg/g, respectivamente). Em pelo menos um de cada três lotes analisados de brócolis ninja cozido para um mesmo restaurante, os flavonóis não foram detectados (Tabela 9).

Os baixos teores encontrados em brócolis ninja cozidos provavelmente se devem ao fato destes vegetais passarem por um pré-preparo (branqueamento e congelamento), causando perdas por lixiviação e degradação térmica, antes de serem fervidos pelos restaurantes. Na amostra cozida analisada na comparação das condições ótimas (Tabela 8), proveniente de outro restaurante, os teores aproximaram-se dos de brócolis cru (Tabela 7). Neste caso, brócolis ninja foi adquirido ainda *in natura* e em seguida, cozido no restaurante.

Price *et al.* (1998) analisaram o efeito do processamento no teor de flavonóis em brócolis e verificaram que apenas 14-28% dos glicosídeos ficaram retidos no tecido cozido do brócolis, o remanescente passou para a água de cozimento com uma pequena perda atribuída à formação das respectivas agliconas.

A Tabela 7 demonstra que o brócolis comum cru tem teores muito maiores de quercetina e kaempferol que o brócolis ninja. Em termos de flavonóis, portanto, o brócolis comum seria uma matéria-prima melhor que o brócolis ninja.

Embora a chicória crua não possua quercetina, esta foi detectada no vegetal refogado dos restaurantes 2 e 3. É possível que esta tenha sido proveniente da cebola adicionada como tempero, durante o preparo da hortaliça. De acordo com Huber *et al.* (2009), a cebola é uma fonte rica deste flavonol, contendo 323±35µg/g. Por outro lado, o maior teor de kaempferol foi encontrado nas amostras do restaurante 1 (99-130µg/g) e os menores, do restaurante 3 (19-44µg/g).

Em média, os teores de quercetina em vagem obtidos de amostras do restaurante 3 são similares aos do restaurante 1, porém, verifica-se que os teores dos lotes do

restaurante 3 não variaram tanto quanto os do restaurante 1. Ewald *et al.* (1999) encontraram kaempferol, além de quercetina, em vagem. Não encontraram diferenças nos teores destes flavonóis sob diversos tratamentos térmicos empregados.

4 - CONCLUSÃO

As condições otimizadas para as hortaliças cruas podem ser utilizadas para as hortaliças cozidas. Miricetina não foi detectada em nenhuma das amostras. Vagem cozida apresentou somente quercetina. Os teores de flavonóis em hortaliças de restaurantes variaram muito entre os lotes do mesmo restaurante e entre os diferentes restaurantes. Couve refogada apresentou os maiores teores de quercetina e kaempferol e brócolis ninja cozido os menores.

5 - REFERÊNCIAS

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.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building. New York, Wiley, 1978.

DRAGO, I.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. The Amazonian fruits Taperebá (*Spondias mombin*) and Murici (*Byrsonima crassifolia*) have higher levels of quercetin than commercial fruits. Trabalho apresentado no Seventh International Food Data Conference, São Paulo, 2007.

EWALD, C.; FJELKNER-MODIG, S.; JOHANSSON, K.; SJÖHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoid in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, v.64, p.231-235, 1999.

FIANDER, H. & SCHNEIDER, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione Stransferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potencial cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Letters*, v.156, p.17-24, 2000.

FRANKE, A. A.; COONEY, R. V.; CUSTER, L. J.; MORDAN, L. J.; TANAKA, Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. In: Manthey, J. A., Buslig, B. S. *Flavonoids in the living system*. New York, Plenum, 1998.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, v.342, p.1007-1011, 1993.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, v.349, p.699-699, 1997.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.2379-2383, 1992a.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.1591-1598, 1992b.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H. & KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, v.155, p.381-386, 1995.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.263-268, 2009.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUEZ, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, p.143-152, 2007.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chemistry*, v.113, p.1278-1282, 2009.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research ed.)*, v.312, p.478-481, 1996.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; HELIOVAARA, M.; TEPPONEN, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, v.146, p.223-230, 1997.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.577-599, 2000.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, v.50, p.1-7, 2004.

PRICE, K. R.; CASUSCELLI, F.; COLQUHOUN, I. J.; RHODES, M. J. C. Composition and Content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica olearacea*) and their fate during cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.77, p.468-472, 1998.

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.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A.; PISULEWSKI, P. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, v.107, p.55-59, 2008.

WENZEL, U.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, v.60, p.3823-3831, 2000.

CAPÍTULO 3

FLAVONÓIS DE FRUTAS RICAS EM CAROTENÓIDES DO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

FLAVONÓIS DE FRUTAS RICAS EM CAROTENÓIDES DO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

RESUMO

Flavonóis são substâncias importantes da dieta humana tendo ação preventiva contra doenças degenerativas. O Brasil possui uma diversidade de frutas tropicais, com destaque atualmente para as da região amazônica, fontes potenciais de flavonóides, mas ainda pouco estudadas quanto aos teores desses compostos. O objetivo deste trabalho foi determinar flavonóis em buriti, pupunha e tucumã, frutas provenientes da Região Norte e polpa de pitanga congelada do Nordeste do Brasil. Um delineamento estatístico de composição central rotacional e análise de superfície de resposta foram realizados para otimizar as condições de extração/hidrólise dos flavonóis de buriti. A análise utilizou cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Não foram detectados flavonóis nas amostras de tucumã e pupunha, baixos teores de quercetina e kaempferol foram obtidos em buriti e níveis de miricetina e quercetina mais baixos que os relatados pela literatura foram encontrados em polpa de pitanga congelada.

Palavras-chave: flavonóis, análise por CLAE, frutas.

SUMMARY

Flavonols are important substances in the human diet, having preventive action against degenerative diseases. Brazil has a diversity of tropical fruits, the current attention being directed towards those of the Amazonian region, which are potential sources of flavonoids, but there are few studies on the levels of these compounds. The objective of this work was to determine the flavonols in carotenoid-rich buriti pupunha and tucuma of the northern region and frozen pitanga pulp of the northeastern region. Central composite rotational design and response surface analysis were used to optimize the conditions for extraction/hydrolysis for buriti. High performance liquid chromatography with a photodiode array detector was used for the analysis. Flavonols were not detected in pupunha and tucuma, low levels of quercetin and kaempferol were found in buriti, and lower levels of myricetin and quercetin (with no kaempferol) than previously reported were encountered in frozen pitanga.

Keywords: flavonols, HPLC analysis, tropical fruits

1 - INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e hortaliças está associado ao baixo risco à doenças como câncer e cardiovasculares (Knekt et al., 1997; Neuhouwer, 2004; Hertog et al., 1993; 1995; 1997; Knekt et al., 1996; Yochum et al., 1999). Frutas são ricas fontes de flavonóis, compostos fenólicos sintetizados pelas plantas com atividade antioxidante (Castelluccio et al., 1995; Rice-Evans et al., 1995; DiSilvestro, 2001), entre outras ações.

O Nordeste do Brasil se destaca na produção de frutas, sendo que grande parte é exportada. Frutas de palmeiras da região amazônica como buriti, tucumã e pupunha são mais conhecidas pela população local, sendo comercializadas em pequena escala e consumidas na forma de sorvetes, cremes e doces. Buriti e tucumã são frutas ricas em carotenóides precursores de vitamina A (Rodriguez-Amaya et al., 2007). São também fontes promissoras de óleo vegetal com altos valores nutricionais (França & Meireles, 1997), porém, estudos caracterizando essas frutas quanto a flavonóides não foram relatados na literatura.

Drago et al. (2007) investigaram taperebá e murici, frutas provenientes de Belém, Pará (Amazônia). Taperebá se destacou pelo conteúdo de quercetina, muito maior do que o citado para maçã e pitanga, frutas brasileiras com os maiores teores já relatados para esse flavonol. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de flavonóis em frutas amazônicas como o buriti, tucumã e pupunha; e em polpa congelada de pitanga proveniente do nordeste do Brasil.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Amostras

Amostras de buriti (*Mauritia flexuosa*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), provenientes de 3 locais diferentes da Região Norte do Brasil nas quantidades totais de 6,5kg, 8kg e 7kg, respectivamente; e polpa congelada de pitanga, de três marcas comerciais provenientes do Nordeste do Brasil, num total de 800g, adquiridas para análises dos alimentos que compõem a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), foram analisadas quanto ao teor de flavonóis.

Buriti e tucumã foram descascadas, a polpa foi retirada e homogeneizada. Uma parte da pupunha foi analisada crua, sendo descascada, quarteada, separando-se as

metades opostas e trituradas em processador de alimentos; a outra parte foi cozida por uma hora em água e sal, forma como é consumida. Após o resfriamento, as pupunhas cozidas foram descascadas, quarteadas e trituradas. Polpa congelada de pitanga foi descongelada e homogeneizada.

2.2 - Reagentes e padrões

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

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

2.3 - Determinação de flavonóis

Flavonóis foram determinados segundo metodologia descrita por Hoffmann-Ribani & Rodriguez-Amaya (2008), empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com parâmetros já otimizados para pitanga. Buriti, tucumã e pupunha são frutas muito similares (são cocos, fibrosas e muito oleosas). Dessa forma, um teste inicial em condição 1,2M de ácido clorídrico (HCl) por 2 horas em refluxo a 90°C foi efetuado nas frutas para verificar presença dos flavonóis a serem estudados. A partir dos resultados obtidos decidiu-se fazer uma otimização de extração/hidrólise dos flavonóis para a amostra de buriti, através de delineamento experimental de composição central rotacional e análise de superfície de resposta, e empregar a condição ótima resultante para analisar as amostras de pupunha e tucumã, pois no teste inicial verificou-se ausência de flavonóis nestas frutas.

Para a otimização de extração/hidrólise dos flavonóis em buriti, 7,5g foram pesados, adicionados de 0,01g de ácido ascórbico, em balão de fundo chato (125mL), acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de ácido clorídrico (HCl) em diferentes

concentrações molares iniciais. Assim, a solução de extração obtida apresentou diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. A amostra foi levada a refluxo a 90°C durante diferentes tempos. Os extratos foram então resfriados e filtrados em funil de fundo sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e a solução foi colocada em ultra-som por 5 minutos. A amostra foi filtrada em filtro (PTFE) da Millipore de 0,22µm de diâmetro, antes de ser submetida a CLAE. As análises foram conduzidas em triplicata.

Para a polpa congelada de pitanga, em balão de fundo chato pesou-se 15g de amostra, adicionou-se 25mL de metanol e 10mL de HCl que foram levados a refluxo a 90°C por tempo pré estabelecido para extração/hidrólise dos flavonóis (agliconas). Ácido ascórbico (0,04%) foi adicionado, minimizando a degradação da amostra. O extrato hidrolisado foi resfriado, filtrado em peneira de 130 mesh e o volume completado para 50mL com metanol. A amostra foi filtrada em filtro PTFE de 0,22µm de diâmetro antes de ser submetida à CLAE.

As análises foram conduzidas em cromatógrafo a líquido Waters com injetor manual Rheodyne, com volume de "loop" fixo de 10µL, bomba quaternária e detector de arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna Symmetry C18 (2,1 x 150mm, 3,5µm) de fase reversa (Waters). A fase móvel constituiu-se de metanol e água acidificados com 0,3% de ácido fórmico em gradiente linear iniciando com a proporção de 20:80 passando para 52:48 em 6 minutos, mantida até os 29 minutos e alterada para 72:28 em 2 minutos, permanecendo até os 40 minutos, alterada aos 43 minutos para 20:80 e mantida até os 60 minutos. O fluxo foi de 0,2µL/min. Os analitos foram monitorados em 200-600nm, a detecção fixada em 370nm.

A identificação dos flavonóis foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos dos padrões, co-cromatografia e análise dos espectros obtidos do detector do sistema.

A quantificação foi feita por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção de 10µL em triplicata de soluções de padrões em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras. As soluções de padrões foram preparadas em balão de 5mL com 1,5mL de água purificada com adição de ácido ascórbico para obter 0,04% na solução de injeção, 1mL de HCl 6M e o volume completado com metanol.

2.4 - Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

A otimização da extração/hidrólise dos flavonóis das frutas analisadas foi feita através da Análise de Superfície de Resposta (ASR). Um delineamento estatístico de composição central rotacional (DCCR) foi utilizado para avaliação da concentração de ácido e tempo de hidrólise na eficiência da extração dos flavonóis. Os valores estudados estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 mostra a matriz do planejamento com as respectivas condições de hidrólise e as respostas que são as concentrações de flavonóis nas amostras estudadas. O planejamento consistiu de 12 experimentos, sendo 4 pontos centrais e 4 pontos axiais, executados em ordem aleatória.

Tabela 1 – Valores utilizados no DCCR para otimização das condições de hidrólise de flavonóis.

Amostra	Fatores (M ^a /min ^b)				
	Ponto axial inferior (-α)	Nível inferior (-1)	Nível intermediário (0)	Nível superior (+1)	Ponto axial superior (+α)
Buriti	0,2M/35min	0,4M/60min	1M/120min	1,6M/180min	1,8M/205min

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

Tabela 2 – Matriz do delineamento experimental e resposta quanto à concentração de quercetina em buriti.

Ensaio	Concentração de flavonóis (µg/g)		
	X ₁	X ₂	Q
1	-1	-1	4,72
2	+1	-1	8,50
3	-1	+1	5,22
4	+1	+1	9,96
5	-1,41	0	3,35
6	+1,41	0	8,21
7	0	-1,41	6,05
8	0	+1,41	7,24
9	0	0	7,14
10	0	0	7,63
11	0	0	7,61
12	0	0	7,60

X₁ – concentração molar de HCl; X₂ – tempo

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Análise dos resultados dos DCCR utilizado na otimização da extração/hidrólise das agliconas

A seguir são apresentados os cromatogramas das amostras analisadas (Figura 1 e 2). Miricetina, quercetina e kaempferol eluíram na sequência 31, 37 e 47 minutos, respectivamente.

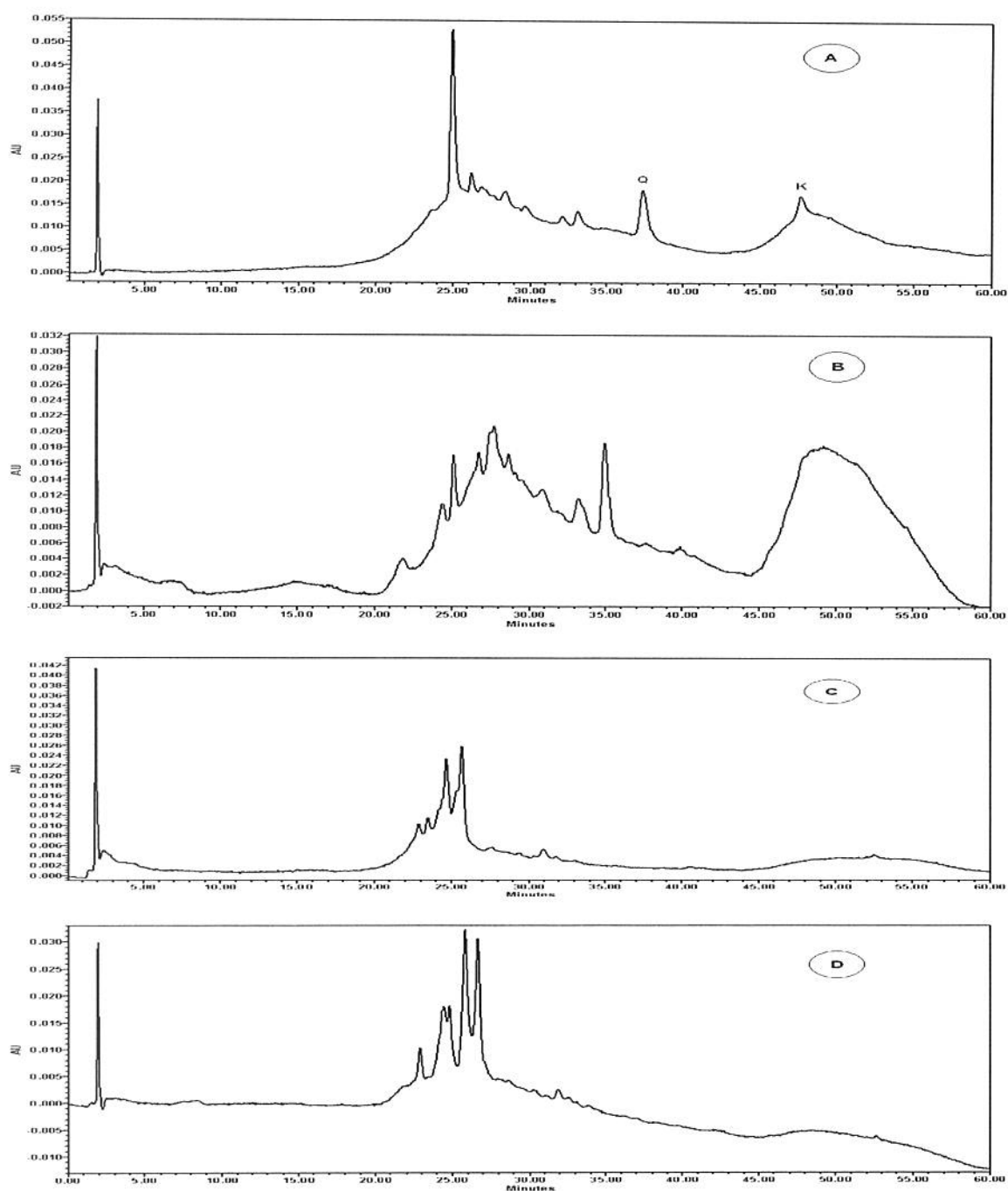


Figura 1. Cromatogramas dos extratos hidrolisados de buriti (A), tucumã (B), pupunha crua (C) e pupunha cozida (D). Q = Quercetina, K = Kaempferol. Coluna Symmetry C18 (3,5 μ m, 2,1x150mm), fase móvel 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, sempre em gradiente linear.

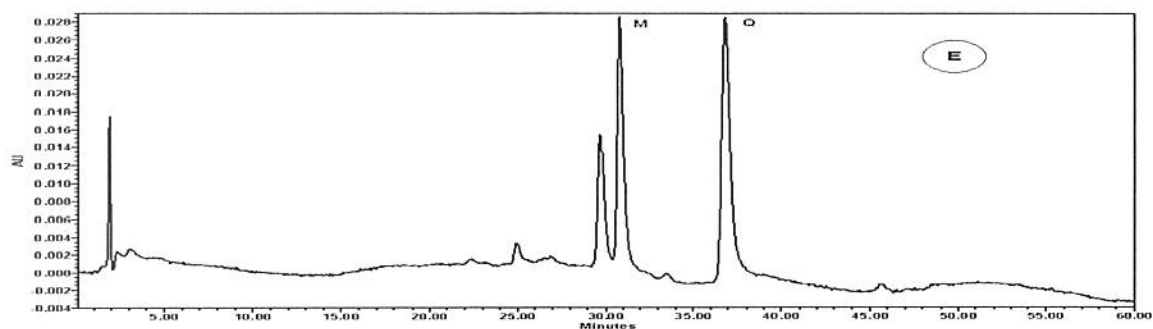


Figura 2. Cromatograma do extrato hidrolisado de polpa congelada de pitanga (E). M = Miricetina, Q = Quercetina. Coluna Symmetry C18 (3,5 μ m, 2,1x150mm), fase móvel 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos, até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, sempre em gradiente linear.

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão e a Tabela 4 apresenta a equação do modelo refinado com coeficientes estatisticamente significativos, o coeficiente de determinação, F calculado e F tabelado para buriti.

Tabela 3 – Coeficientes de regressão e significância (p-valor) para a concentração de flavonol aglicona.

	Buriti	
	Quercetina	
	Coeficientes	p-valor
B0	7,4960	0,0000
B1	1,9251	0,0000
B11	-0,6355	0,0344
B2	0,4553	0,0717
B22	-0,2061	0,4107
B12	0,2398	0,4472

p-valor <0,10.

Tabela 4 – Equação que representa o teor de flavonol aglicona (quercetina) do buriti em relação a concentração de HCl e ao tempo de hidrólise.

Fruta	Equação (μ g flavonol/g fruta)	R ²	F _{CALC}	F _{TAB} (α , VR, Vr)
Buriti	$Y = 7,33 + 1,92 X_1 - 0,59 X_1^2 + 0,45 X_2$	0,93	34,66	4,07

R² = coeficiente de determinação; F calc – (QM regressão/QM resíduo); Q – quercetina; K – kaempferol; X1 – concentração de HCl; X2 – tempo de hidrólise; Y – teor de flavonol aglicona.

α - Nível de significância (10%); VR – graus de liberdade da regressão; Vr – graus de liberdade dos resíduos.

Um bom ajuste ao modelo obtido foi determinado pelos resultados experimentais; o valor de F calculado e R^2 obtidos foram satisfatórios e permitiram gerar a superfície de resposta mostrada na Figura 3.

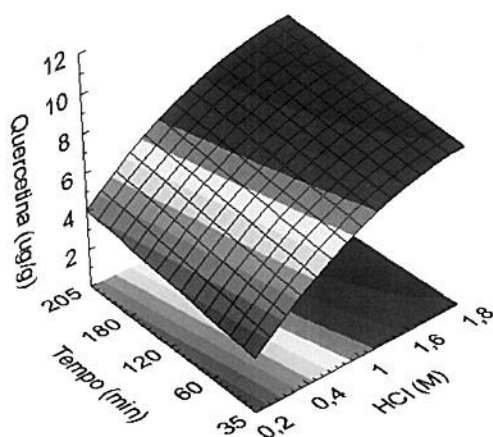


Figura 3. Superfície de resposta gerada na determinação de quercetina de buriti.

A melhor resposta para a condição de concentração molar de ácido e tempo de hidrólise para extração de quercetina de buriti foi 1,8M de HCl por 160 minutos.

3.2 - Avaliação da metodologia analítica

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas para miricetina (0,13 a 9,18 $\mu\text{g/mL}$), quercetina (0,13 a 10,92 $\mu\text{g/mL}$) e kaempferol (0,13 a 4,5 $\mu\text{g/mL}$). Os coeficientes de determinação obtidos foram 0,9970, 0,9990 e 0,9920; e, os limites de detecção foram 0,3, 0,2 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para M, Q e K. A precisão (repetitividade) do método para buriti foi verificada pelo coeficiente de variação das replicatas obtido. Essas características comprovam o bom desempenho do método analítico. Ensaio de recuperação já foram realizados anteriormente em amostras de frutas (Hoffmann-Ribani *et al.*, 2009; Drago *et al.*, 2007), utilizando o mesmo método de extração de flavonóis e mesmo cromatógrafo empregado neste trabalho, resultando em níveis de recuperação em torno de 100%.

3.3 – Teores de flavonóis em frutas

Os teores de flavonóis das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Teores de flavonóis nas amostras analisadas.

Amostra	Miricetina ($\mu\text{g/g}$)	Quercetina ($\mu\text{g/g}$)	Kaempferol ($\mu\text{g/g}$)
Buriti	n.d.	11 $\pm$ 1	tr.
Pupunha	n.d.	n.d.	n.d.
Tucumã	n.d.	n.d.	n.d.
Polpa congelada de Pitanga	12 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	n.d.

*faixa (média $\pm$ desvio padrão), teores em $\mu\text{g/g}$, média de triplicatas. n.d. = não detectado; tr. = traços (teores $< \text{LQ}$). LD: 0,3 $\mu\text{g/mL}$ para miricetina, 0,2 $\mu\text{g/mL}$ para quercetina e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para kaempferol.

Ao contrário do relatado por Drago *et al.* (2007) quanto ao teor de flavonóis em frutas amazônicas, os baixos níveis obtidos no presente trabalho foram decepcionantes.

Os flavonóis não foram detectados em tucumã e pupunha. Miricetina foi encontrada somente em pitanga e kaempferol foi detectado apenas em buriti. Quercetina foi encontrada em ambas as frutas.

Em buriti foram obtidos teores médios de 11 $\pm$ 1 $\mu\text{g/g}$ para quercetina e traços de kaempferol. Buriti é considerado a maior fonte de β -caroteno, apresentando 364 $\mu\text{g/g}$, além de 82 $\mu\text{g/g}$ de α -caroteno (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1995). Tucumã e pupunha também são fontes de carotenóides, apresentando 99 $\mu\text{g/g}$ e 22 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno e 2,5 $\mu\text{g/g}$ e 3,2 $\mu\text{g/g}$ de α -caroteno, respectivamente (Rodriguez-Amaya, 1999; Marinho & Castro, 2002).

A polpa de pitanga congelada analisada apresentou 12 $\pm$ 1 $\mu\text{g/g}$ de miricetina e 15 $\pm$ 1 $\mu\text{g/g}$ de quercetina. Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) analisaram pitanga *in natura* e polpa de pitanga congelada. Os autores relataram teores médios de 42 $\pm$ 2 $\mu\text{g/g}$ de miricetina, 67 $\pm$ 2 $\mu\text{g/g}$ de quercetina e 4,1 $\pm$ 1 $\mu\text{g/g}$ de kaempferol em pitanga fresca e 16 $\pm$ 5 $\mu\text{g/g}$ para miricetina, 25 $\pm$ 5 $\mu\text{g/g}$ para quercetina e 2 $\pm$ 0 $\mu\text{g/g}$ para kaempferol em polpa de pitanga congelada e chamaram a atenção à grande perda de flavonóis no processamento. O presente estudo apresentou teores ainda menores que os encontrados pelos autores citados.

Cabe lembrar que Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) não encontraram flavonóis em frutas carotenogênicas como manga cultivar Haden, Palmer e Tommy Atkins e mamão

cultivar Formosa, Golden e Solo. O estudo de frutas do Norte e Nordeste deve ser continuado especialmente nestas frutas, nas quais os flavonóis são nitidamente mais baixos ou inexistentes, para se ter um perfil mais claro de compostos bioativos de frutas tropicais.

4- CONCLUSÃO

Flavonóis não foram detectados em tucumã e pupunha. Buriti apresentou baixos teores de quercetina e kaempferol. Baixas concentrações de miricetina e quercetina foram também constatadas na polpa de pitanga congelada.

5- REFERÊNCIAS

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.

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

DRAGO, I.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. The Amazonian fruits Taperebá (*Spondias mombin*) and Murici (*Byrsonima crassifolia*) have higher levels of quercetin than commercial fruits. Trabalho apresentado no Seventh International Food Fata Conference, São Paulo, 2007.

FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of oil from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, p.384, 1997.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Buriti (*Mauritia vinifera* Mart), uma fonte riquíssima de pró-vitamina A. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.38, p.109-120, 1995.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, v.342, p.1007-1011, 1993.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, v.349, p.699, 1997.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Archives of Internal Medicine*, v.155, p.381-386, 1995.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.263-268, 2009.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Química Nova*, v.31, p.1378-1384, 2008.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, v.312, p.478-481, 1996.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; SEPPANEN, R.; HELIOVAARA, M.; TEPPONEN, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology*, v.146, p.223-230, 1997.

MARINHO, H. A.; CASTRO, J. S. Carotenóides e valor de pró vitamina A em frutos da região Amazônica: Pajurá, piquiá, tucumã e umari. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 27., 2002. Anais... Belém, Brasil, 2002.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, v.50, p.1-7, 2004.

RICE EVANS, C. A.; 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.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., AMAYA-FARFAN, J. AND KIMURA, M. Carotenoid Composition of Brazilian Fruits and Vegetables. I International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables, ISHS Acta Horticulturae, v.744, p.409-416, 2007.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, v.149, p.943-949, 1999.

CAPÍTULO 4

COMPORTAMENTO DE FLAVONÓIS DURANTE MICROFILTRAÇÃO DE POLPA DE CAJU

COMPORTAMENTO DE FLAVONÓIS DURANTE MICROFILTRAÇÃO DE POLPA DE CAJU

RESUMO

Microfiltração é uma tecnologia recente, usada como opção de clarificação do suco e para esterilização a frio, ao invés de processamento térmico. Flavonóis são substâncias bioativas com efeitos benéficos à saúde humana, mas podem ser perdidas durante processamento e estocagem de alimentos. No presente trabalho, a polpa de caju foi submetida à microfiltração, com e sem tratamento enzimático prévio, e as concentrações de flavonóis e ácido ascórbico foram determinadas na polpa inicial, no permeado e no retentado. Os resultados mostraram que é possível obter suco clarificado através deste processamento a frio, com boas retenções de compostos bioativos. Houve menor redução nos teores de flavonóis e ácido ascórbico quando empregou-se o tratamento enzimático na polpa de caju.

Palavras-chave: flavonóis, vitamina C, polpa de fruta, microfiltração.

SUMMARY

Microfiltration is a recent technology that is used as an option for clarifying juices and for cold sterilization, instead of thermal processing. Flavonols are bioactive substances with beneficial effects on human health, but can be lost during processing and storage of foods. In this work cashew-apple pulp were submitted to microfiltration, with or without previous enzymatic treatment, and the flavonol and ascorbic acid concentrations were determined in the initial pulp, the permeate and the retentate. The results showed that it is possible to obtain clarified juice with this nonthermal process, with good retention of the bioactive compounds. Greater levels of flavonols and ascorbic acid were found in the permeate when enzymatic treatment was carried out in cashew-apple.

Key-words: flavonols, vitamin C, fruit pulp, microfiltration.

1 – INTRODUÇÃO

O caju é uma fruta muito apreciada no país e se destaca como uma das suas principais culturas, produzido principalmente no Nordeste. O caju é fonte de vitamina C (3 a 5 vezes mais vitamina C que a laranja) (Paiva *et al.*, 2000) e flavonóis (Hoffmann-Ribani *et al.*, 2009).

Os efeitos benéficos dos flavonóis à saúde são atribuídos à sua atividade antioxidante, seqüestrando radicais livres e quelando metais (Rice-Evans *et al.*, 1996; Prior & Cao, 2000). Ainda podem atuar de várias maneiras: desativando carcinógenos, inibindo a expressão de genes mutantes e a atividade de enzimas que promovem câncer, e desintoxicando xenobióticos (Kris-Etherton *et al.*, 2002). A vitamina C também é um antioxidante que atua seqüestrando radicais livres e quelando metais. Ela estimula a síntese de colágeno, fortalece o sistema imunológico, neutraliza substâncias carcinógenas e atua na desintoxicação do organismo por algumas drogas quimioterápicas, entre outras funções (Calvino & Levine, 2001).

O processamento de sucos de frutas usando microfiltração como meio de clarificação e conservação remove microrganismos a frio resultando num produto microbiologicamente estável (Girard & Fukumoto, 2000). Vem sendo proposto como alternativa a tratamentos térmicos que acarretam alterações nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos. A técnica emprega membrana filtrante: o que permeia a membrana é o clarificado e o que fica retido, o retentado.

Vários trabalhos já investigaram a aplicação de microfiltração em suco de caju (Campos *et al.*, 2002; Castro, 2005; Cianci *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007). A avaliação do produto tem sido realizada através de análises físico-químicas como pH, acidez titulável, sólidos solúveis, cor, teor de polpa, teor de taninos, turbidez, viscosidade, além de análises microbiológicas e variáveis do processo como fluxo de permeado, fator de concentração volumétrica e pressão transmembrana. Estes autores determinaram vitamina C, mas nenhum estudo quantificou flavonóides.

O efeito do tratamento enzimático da polpa de caju antes da microfiltração foi avaliado por Campos *et al.* (2002), Castro (2005), Cianci *et al.* (2005), Castro *et al.* (2007). A ação da enzima reduz a viscosidade e o teor de polpa (Ushikubo *et al.*, 2007) pela quebra de moléculas de pectina e outras substâncias como amido, celulose e hemicelulose que causam fenômeno da polarização da concentração e formação da camada gel durante o processo de passagem pela membrana (Chiang & Yu, 1987).

O objetivo deste trabalho foi determinar os teores de flavonóis e vitamina C em polpa de caju microfiltrada, visando obter um clarificado com altos teores destes compostos.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente pensou-se em incluir polpas de frutas ricas em carotenóides na avaliação dos efeitos da microfiltração. Em estudos preliminares com acerola e melancia foi observado que a maior parte dos carotenóides ficava no retentado. A microfiltração, portanto, não atingiria o objetivo de obter sucos clarificados com altos teores de carotenóides. O caju foi escolhido por ser uma boa fonte de vitamina C e de flavonóis.

Frutas frescas de caju foram adquiridas no CEASA – Campinas – SP. As frutas foram selecionadas e lavadas em água corrente. Em seguida foram despulpadas em despulpadeira comercial e submetidas, ou não, ao tratamento enzimático para então serem microfiltradas a 40°C em equipamento Tia micropilote (*Techniques Industrielles Appliquées*, França) operando com membrana tubular cerâmica de 0,2µm de diâmetro de poro (Figura 1). As condições de operação foram: área total de permeação-0,02m²; fator de concentração volumétrica-2; pressão transmembrana-1,5bar. Para o tratamento enzimático, 250ppm de enzima *Peelzym* (*Novozymes*) foi adicionada à polpa de caju, seguida de agitação manual durante 1 hora a 40°C para redução da viscosidade. A polpa sem tratamento enzimático foi somente ajustada à temperatura de 40°C. A enzima *Peelzym* é produzida por linhagem selecionada de *Aspergillus aculeatus* e consiste numa mistura de enzimas pectinolíticas sendo a beta-glucanase a principal. Ela também contém pequenas quantidades de xilanases, hemicelulases e celulase. A polpa de alimentação, o clarificado e o retentado foram analisados em relação aos teores de flavonóis e vitamina C.

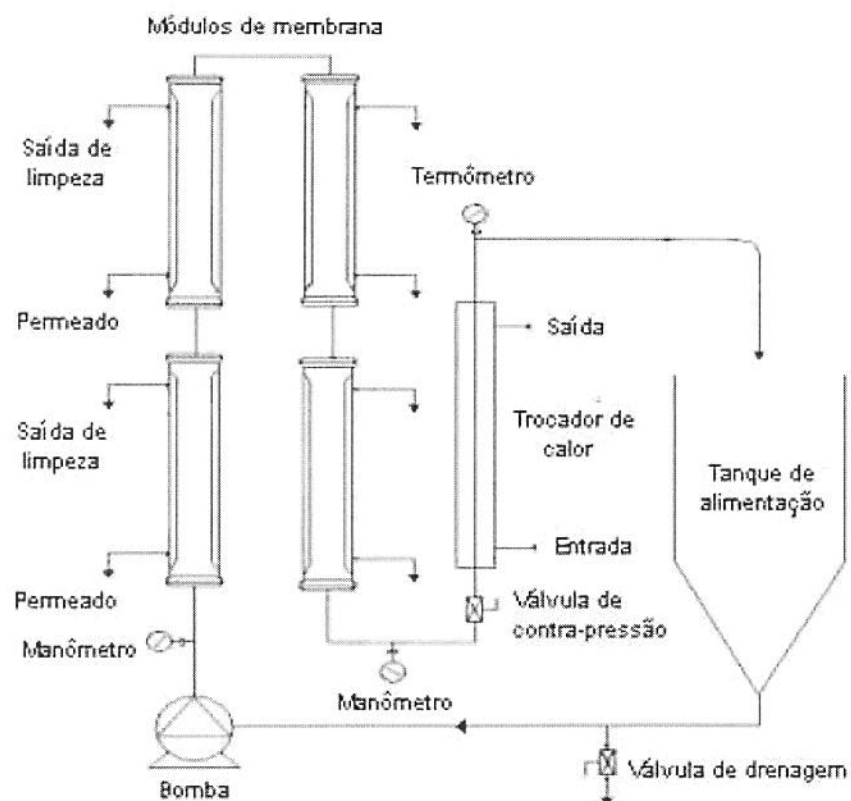


Figura 1. Esquema do equipamento de microfiltração (Clareto, 2007)

2.1 - Determinação de flavonóis e vitamina C

Flavonóis foram determinados segundo a metodologia de Hoffmann-Ribani (2006), empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com parâmetros já otimizados para caju e acerola. Foi utilizada uma coluna Symmetry C18 (3,5 μ m, 2,1x150mm), o fluxo da fase móvel foi de 0,2mL/min e o volume de injeção 10 μ L. A fase móvel em gradiente linear consistiu de proporção 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 52:48 em 6 minutos e mantido até 29 minutos, 72:28 aos 31 minutos até 40 minutos e 20:80 aos 43 minutos, mantido até o final da corrida. A quantificação foi realizada por padronização externa com injeção de soluções padrões em cinco concentrações diferentes, em triplicata, cobrindo a faixa de concentração esperada das amostras para construção das curvas de calibração. Para cada ponto da curva de calibração, a solução padrão foi diluída em 1,5mL de água purificada em Milli-Q com ácido ascórbico (0,04%), 1mL de HCl 6M e o volume completado a 5mL com metanol. Os

coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 e os coeficientes de variação das replicatas inferiores a 5%.

Para a determinação do teor de vitamina C foi utilizado o método padrão da AOAC (1984) modificado por Benassi & Antunes (1988). A análise foi realizada por titulação da amostra, adicionada de ácido oxálico 2%, com 2,6 dicloroindofenol. O cálculo da concentração de vitamina C foi realizado através da titulação de solução referência de ácido ascórbico (1mg/mL).

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância ($p < 0.05$), com comparação das médias (Teste de Tukey) em programa GraphPad Prism (versão 2.01).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de flavonóis e vitamina C encontrados nas amostras de caju analisadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de flavonóis (ug/g) e vitamina C (mg/100g) em polpa, clarificado e retentado de caju^a

Amostra	Miricetina	Quercetina	Vitamina C
<i>Com tratamento enzimático</i>			
Polpa inicial	1,98±0,01b	1,24±0,03b	143±0,02a
Clarificado	1,91±0,04b (-3,5%)	1,27±0,02b,a (+2,4%)	140±0,01b (-2,1%)
Retentado	2,12±0,06a (+7,1%)	1,40±0,06a (+12,9%)	139±0,00b (-2,8%)
<i>Sem tratamento enzimático</i>			
Polpa inicial	1,92±0,13b	1,59±0,02b	154±0,01a
Clarificado	1,72±0,08c (-10,4%)	1,34±0,04c (-15,7%)	147±0,02b (-4,5%)
Retentado	2,10±0,09a (+9,4%)	1,68±0,02a (-5,7%)	146±0,01b (-5,2%)

^amédia±desvio padrão de análises em triplicata. Para cada tipo de amostra em cada tratamento, letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). As porcentagens em relação a polpa inicial estão entre parênteses. Limite de detecção: 0,5ug/mL para miricetina e 0,4ug/mL para quercetina.

No presente trabalho encontraram-se flavonóis em concentrações menores do que as relatadas por Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) para caju.

No tratamento enzimático da polpa, os teores de miricetina e quercetina no clarificado não diferiram significativamente ao da polpa inicial. Sem o tratamento enzimático da polpa houve diferenças significativas entre a polpa original, clarificado e retentado. Foram encontrados teores reduzidos em 10,4% de miricetina e 15,7% de quercetina no clarificado em relação aos teores da polpa inicial.

Teores maiores de flavonóis foram encontrados no retentado. Vale lembrar, porém, que no processamento térmico de sucos de frutas, uma boa parte dos flavonóis fica com a polpa descartada, contribuindo para a perda durante o processamento além da degradação. Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) encontraram teores de flavonóis muito variáveis em 3 marcas comerciais de suco de caju termicamente processados, variando de traços a 2µg/g de miricetina e quercetina.

Os teores de vitamina C foram significativamente menores no permeado e retentado em comparação com as polpas originais, com ou sem tratamento enzimático. Castro (2005) não encontrou diferença significativa para vitamina C quando realizadas análises no clarificado de caju com e sem tratamento enzimático da polpa. Já Campos *et al.* (2002) e Cianci *et al.* (2005) verificaram redução no teor de vitamina C no clarificado de polpa de caju tratada enzimaticamente e microfiltrada. Perdas podem ser justificadas pela interação dos componentes da polpa com a membrana, resultado do entupimento da membrana, e pela incorporação de oxigênio à polpa durante a microfiltração. Sistemas industriais podem minimizar esse efeito quando comparado ao realizado em bancada, com grande exposição ao ar.

Cajuína, uma bebida muito consumida no nordeste do país, é elaborada a partir do suco de caju clarificado (não apresenta sólidos solúveis em suspensão) e esterilizada a 100°C por 50 minutos. Lima *et al.* (2007) encontraram perdas de 15% e 55% no teor de vitamina C após a clarificação e após tratamento térmico, respectivamente, em relação ao suco integral de caju, demonstrando que o tratamento térmico resulta na degradação da vitamina C.

4 – CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que é possível empregar uma tecnologia de esterilização a frio e obter um clarificado de caju preservando flavonóis e vitamina C em

relação à fruta *in natura*. Os teores encontrados para estes compostos foram melhores na polpa com tratamento enzimático prévio por apresentarem a menor retenção pela membrana.

5 – REFERÊNCIAS

AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., p. 844-845, 1984.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.31, n.4, p.507-513, 1988.

CALVINO, N.; LEVINE, S. Vitamin C & câncer - Storm of controversy. Positive Health Magazine, v. 71, 2001.

CAMPOS, D. C. P.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. Desalination, v.148, p.61-65, 2002.

CASTRO, T. R. Estudo do processo de clarificação de suco de caju (*Anacardium occidentale*, L.) utilizando membranas. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2005.

CASTRO, T. R.; ABREU, F. A. P.; CARIOCA, J. O. B. Obtenção de suco clarificado de caju (*Anacardium occidentale*, L.) utilizando processos de separação por membranas. Revista Ciência Agronômica, v.38, n.2, p.164-168, 2007.

CHIANG, B. H.; YU, Z. R. Fouling and flux restoration on ultrafiltration of passion fruit juice. Journal of Food Science, v.52, n.2, p.369-371, 1987.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.25, n.3, p.579-583, 2005.

CLARETO, S. S. Estudo da concentração de licopeno da polpa de goiaba utilizando o processo de microfiltração. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2007.

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.40, n.2, p.91-157, 2000.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.22, p.263-268, 2009.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. *American Journal of Medicine*, v.113, p.71S-88S, 2002.

LIMA, E. S.; SILVA, E. G.; NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) industrializado e cajuína. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1143-1146, 2007.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTTI, D. S.; NETO, R. M. S. Aproveitamento industrial do caju. Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE, Fortaleza, 2000.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *HortScience*, v.35, p.588-592, 2000.

RICE EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.933, 1996.

USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa Arr. Cam.*) juice. *Journal of Membrane Science*, v.288, p.61-66, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As condições ótimas de extração/hidrólise de flavonóis devem ser estabelecidas para cada alimentos, mas as condições para hortaliças cruas podem ser utilizadas para as hortaliças cozidas.
2. Houve grande variação nos teores de flavonóis em lotes da mesma hortaliças de um mesmo restaurante e entre os diferentes restaurantes.
3. Entre as hortaliças analisadas (brócolis ninja cozido, chicória refogada, couve refogada e vagem cozida), couve refogada apresentou os maiores teores de quercetina e kaempferol e brócolis ninja cozido, os menores.
4. Flavonóis não foram detectados em tucumã e pupunha e buriti apresentou baixos teores de quercetina e traços de kaempferol.
5. Polpa de pitanga congelada fabricada no Nordeste apresentou baixas concentrações de miricetina e quercetina.
6. A microfiltração é uma tecnologia de esterilização a frio e pode ser utilizada para obter um suco clarificado de caju com teores satisfatórios de flavonóis e vitamina C. Os teores de flavonóis foram melhores na polpa tratada enzimaticamente por apresentar menor retenção pela membrana.