

Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta

Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in bee pollen by surface methodology

RIALA6/1353

Márcia Cristina Teixeira MARTINS^{1,2*}, Delia RODRIGUEZ-AMAYA², Marcelo Antonio MORGANO³, Maria Isabel RODRIGUES⁴

*Endereço para correspondência: ¹Centro Universitário Adventista de São Paulo, Estr. Itapecerica, 5.898, São Paulo/SP, Brasil. CEP 05858-001. Tel.: 11 2128-8000. E-mail: marciactm@yahoo.com.br.

²Laboratório de Carotenoides, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

³Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos.

⁴Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Recebido: 04.02.2011 – Aceito para publicação: 01.06.2011

RESUMO

Foi otimizada a metodologia analítica para determinar quatro flavonóis: miricetina (M), quercetina (Q), kanferol (K) e isoramnetina (I); e duas flavonas: luteolina (L) e apigenina (A) em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em três estados brasileiros: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC). Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise sobre a concentração de cada flavonoide. A condição ótima encontrada para extração/hidrólise dos flavonoides estudados foi: 1,0M HCl/30 minutos. A melhor separação dos flavonoides foi conseguida com a coluna de fase reversa Symmetry C18 e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática (CLAE). As curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os limites de detecção foram de 1,04, 0,88, 0,89, 1,64, 0,82 e 1,19 µg/mL respectivamente para M, L, Q, A, I e K.

Palavras-chave. flavonoides, pólen apícola, CLAE, delineamento estatístico de experimentos.

ABSTRACT

The analytical methodology for the determination of four flavonols: myricetin (M), quercetin (Q), kanferol (K), isoramnetin (I); and two flavones: luteolin (L) and apigenin (A) in samples of dehydrated bee pollen produced in three Brazilian states: Bahia (BA), São Paulo (SP) and Santa Catarina (SC) was optimized. Central Composite Rotational Design was used to investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time on the concentration of each flavonoid. The optimum condition found for extraction/hydrolysis of the flavonoids studied was 1.0M HCl/30 minutes. The best separation of the flavonoids was achieved with a reverse phase Symmetry C18 column with methanol:tetrahydrofuran:water (26:57:17) acidified with 0.3% formic acid as mobile phase in isocratic elution (HPLC). The standard curves presented coefficients of correlation superior to 0.99. The limits of detection were 1.04, 0.88, 0.89, 1.64, 0.82 and 1.19 µg/mL for L, Q, A, I and K, respectively.

Keywords. flavonoids, bee pollen, HPLC analysis, statistical experimental design.

INTRODUÇÃO

O pólen apícola tem atraído a atenção de pesquisadores devido às suas propriedades bioativas e às possibilidades do seu emprego medicinal na prevenção e tratamento de algumas patologias¹. Estudos têm apontado para as propriedades bioativas do pólen apícola, bem como de seus extratos, devido ao considerável conteúdo de compostos fenólicos (tais como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos)²⁻⁴, que, dentre outras propriedades biológicas, possuem ação antioxidante investigada em experimentos realizados *in vitro*³⁻⁵, em culturas de células⁶ e em animais de laboratório⁷.

Flavonoides estão presentes em pólen apícola na forma livre ou como glicosídeos e são em geral altamente hidroxilados, tal como o kanferol^{1,8}. Esses compostos são reconhecidos como potenciais marcadores taxonômicos^{9,10}. Assim, diversos estudos relacionam o conteúdo de flavonoides do pólen com a sua origem floral⁹⁻¹⁵.

Sete agliconas (isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina, selagina e tricetina) e ao redor de quarenta glicosídeos já foram identificados no pólen apícola^{2,10,11,13-19}.

Poucos trabalhos investigaram o teor de flavonoides no pólen apícola. Campos et al.²⁰ observaram que o conteúdo de flavonoides alcançou 5.000 µg/g, enquanto Serra-Bonvehi et al.² encontraram valores médios de 5.100 µg/g de flavonoides totais em 11 amostras de pólen espanhol. Oitenta e dois por cento das amostras de pólen apícola analisadas por Serra-Bonvehi et al.² continham no mínimo 14 componentes fenólicos, primariamente rutina, quercetina, miricetina e ácidos cinâmicos. Recentemente, LeBlanc et al.⁵ determinaram o teor de flavonóis e flavonas (expresso em equivalentes de quercetina) em 6 amostras de pólen apícola coletadas no deserto de Sonora (Arizona, EUA), tendo encontrado valores entre 2.660 e 5.480 µg/g. Analisando amostras de pólen apícola provenientes da Romênia, Marghitas et al.²¹ encontraram teores de flavonoides totais (expressos em equivalentes de quercetina) que variaram entre 600 e 13.600 µg/g.

Três trabalhos estudaram os flavonoides presentes em amostras de pólen apícola brasileiras^{4,17,22}. Freire et al.¹⁷ avaliaram o perfil cromatográfico de flavonoides e sua correlação com a origem botânica de amostras do nordeste brasileiro. Carpes et al.²² determinaram o teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos de pólen apícola por método espectrofotométrico, tendo encontrado níveis superiores a 10.000 µg/g em extratos a

60, 70 e 80%. Em outro estudo, Carpes et al.⁴ encontraram teores de compostos fenólicos totais variando entre 19.280 e 48.900 µg/g (expressos em equivalente de ácido gálico) em extratos etanólicos a 70% preparados com amostras de pólen da região sul do Brasil. O teor de rutina foi determinado em duas amostras (841 e 991 µg/g) e o teor de miricetina em uma amostra (695 µg/g).

Nos primeiros estudos realizados com o objetivo de identificar os flavonoides presentes em pólen os compostos geralmente extraídos com metanol foram isolados e purificados por técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia em camada delgada, cromatografia dimensional em papel, cromatografia de coluna aberta e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) semipreparativa. A identificação foi realizada por métodos clássicos de espectrofotometria de UV ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), com ou sem hidrólise prévia. A identificação também foi feita por comparações com padrões e por reações químicas específicas^{10,11,14,15,20}.

Serra Bonvehí et al.² identificaram e quantificaram agliconas livres presentes em amostras de pólen apícola espanhol por CLAE/DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos). Freire et al.¹⁷ também identificaram os flavonoides por CLAE/DAD. Um pico desconhecido foi isolado por cromatografia de coluna e identificado por RMN. No trabalho de Arráez-Román et al.¹⁶ os compostos foram isolados e identificados por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e nos trabalhos de Carpes et al.^{4,22} e Guo et al.¹⁸ os compostos foram isolados e identificados por CLAE/DAD. Mais recentemente, Ferreres et al.¹⁹ empregaram CLAE/DAD associada a um espectrômetro de massas acoplado a um *ion trap* com interface de ionização por *eletrospray* para identificação dos flavonoides não coloridos de pólen apícola unifloral.

A determinação quantitativa de glicosídeos de flavonoides individuais em materiais vegetais é difícil devido ao seu grande número e pela dificuldade de obter todos os seus padrões. Foram descritos mais de cinquenta diferentes glicosídeos dos flavonoides mais comuns²³. Por esse motivo, na maior parte dos procedimentos analíticos desenvolvidos para quantificar os flavonoides, os glicosídeos são hidrolisados e as agliconas resultantes são identificadas e quantificadas. A hidrólise dos glicosídeos oferece um método prático empregado principalmente quando se requer dados para um grande número de flavonoides²⁴ ou quando se deseja quantificar um grande

número de amostras. Essa estratégia já foi empregada no nosso laboratório para alimentos, como frutas e hortaliças *in natura* e processadas, chás, erva-mate e bebidas²⁵⁻²⁸.

Os glicosídeos são hidrolisados por concentrações relativamente altas de ácidos (geralmente HCl) numa mistura de metanol aquoso (50:50, V/V)^{29,30}. Esforços têm sido realizados para desenvolver ou otimizar procedimentos de hidrólise e extração que garantam uma extração eficiente sem resultar na degradação de agliconas, a fim de obter uma recuperação quantitativa desses compostos^{26,27,31}.

Embora seja possível otimizar processos (tais como as condições de extração e hidrólise dos flavonoides) por métodos empíricos que avaliam um fator de cada vez, estes demandam muito tempo e podem ignorar as interações entre os fatores. Por outro lado, os métodos estatísticos de otimização consideram as interações entre os fatores estudadas³². Um dos métodos que permite avaliar os efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta é a Análise de Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.³³ e empregada com êxito em nosso laboratório para análise de flavonoides em frutas e hortaliças *in natura* e processadas^{26,27}.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada maciçamente para quantificação das agliconas dos flavonoides. A eletroforese capilar apresenta resultados promissores, mas o número de trabalhos é muito menor em relação à CLAE. A separação dos flavonoides por CLAE emprega, na maior parte das análises, colunas de fase reversa e detector de arranjo de diodos²⁴.

Diante desse contexto e considerando a necessidade de maior informação sobre os flavonoides do pólen apícola nacional, o objetivo do presente estudo foi otimizar através de delineamento estatístico as condições para extração e hidrólise, bem como estabelecer as melhores condições cromatográficas para separação de quatro flavonóis (miricetina, quercetina, kanferol e isoramnetina) e duas flavonas (luteolina e apigenina) usando CLAE/DAD em amostras de pólen apícola brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram realizados três estudos de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para amostras de pólen apícola adquiridas diretamente dos produtores e provenientes de três estados brasileiros (Bahia, Santa Catarina e São Paulo). Foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada estado. As amostras estavam prontas

para serem comercializadas (produto desidratado, limpo e embalado). O estado de São Paulo é um dos principais estados consumidores de pólen no Brasil no qual o preço de venda do produto é mais elevado. Os estados de Santa Catarina e Bahia representam dois importantes polos produtores de pólen no Brasil, além de distintas condições climáticas, a saber: clima mesotérmico (subtropical úmido) em Santa Catarina e tropical ou tropical semiárido na Bahia³⁴. A região do município de Canavieiras (BA) produz mensalmente até uma tonelada de pólen desidratado para consumo no mercado nacional¹⁷.

As amostras (com peso variando entre 200 e 300 g) foram enviadas no mesmo mês da coleta em sacos plásticos, sendo que todas se apresentavam granuladas. Imediatamente ao receber as amostras, essas foram seladas a vácuo usando um filme de poliamida e polietileno para evitar absorção de umidade e oxigênio e armazenadas em freezer a -16 °C até o momento das análises, quando foram quarteadas em quarteador de inox e, em seguida, trituradas em moinho refrigerado, com hélice de tungstênio (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Em seguida, as amostras foram tamisadas usando-se malhas de 30 mesh (600 µm) para padronizar o tamanho das partículas de pólen.

Reagentes e Padrões

As fases móveis e as amostras foram preparadas utilizando-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bellerica, EUA). Os solventes metanol e tetrahidrofurano (THF) grau cromatográfico foram adquiridos da Mallinckrodt (Philipsburg, EUA). Ácido ascórbico, ácido fórmico 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 (Bellerica, EUA), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kanferol (K), apigenina (A) e isoramnetina (I) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonoide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 500 µg/mL e conservadas a -18 °C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nessas condições.

Equipamento e condições cromatográficas

As condições de análise cromatográfica foram desenvolvidas com base em trabalhos anteriores^{25-27,35} e adaptadas ao pólen apícola. As análises foram conduzidas

em um módulo de separação a líquido Waters (modelo 2690), (Milford, EUA), equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), DAD da Waters (modelo 996), controlado pelo Software Millennium 32 (Scientific Equipment Source, Pickering, Canada). A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção de 5 µL. A quantificação foi fixada em 370 nm.

Para separação dos flavonoides agliconas foi empregada uma coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) da Waters. As condições cromatográficas foram definidas após a realização de testes com uma mistura de padrões dos seis compostos em estudo, M, Q, L, K, A e I, dissolvidos em metanol, adicionado de ácido clorídrico e ácido ascórbico, conforme o procedimento empregado para as amostras. Neste estudo, duas combinações de fases móveis foram testadas em várias proporções, em gradientes diversos e em corridas isocráticas: 1) água e metanol e 2) água, metanol e THF, ambas acidificadas com 0,3% de ácido fórmico. Posteriormente, extratos hidrolisados das amostras de pólen, com ou sem cocromatografia com padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos.

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

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções-padrão em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições de hidrólise. Alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5 mL de água purificada em Mili-Q com ácido ascórbico (0,04% na solução de injeção). A esta solução foi adicionado 1 mL de HCl 5M (equivalente a 1,0 M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5 mL com metanol.

Extração e hidrólise dos flavonoides

A extração e a hidrólise dos flavonoides foram baseadas no método de Hertog et al.²⁹ que empregou solução aquosa a 50% de metanol em meio acidificado com HCl em condições de refluxo. Ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante, conforme a recomendação de Häkkinen et al.³⁶ para prevenir a degradação de miricetina.

Amostras homogêneas de pólen foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (em proporções de 1:3,5) e ácido ascórbico e homogeneizadas

durante 2 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5 g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5 mL de metanol e 5 mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. As soluções de extração assim obtidas consistiram-se em diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante (ácido ascórbico). Esses extratos foram levados a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, foram resfriados e filtrados em funil de Buchner com placa porosa de vidro sinterizado, número 2. O volume foi completado a 50 mL com metanol e as soluções foram homogeneizadas manualmente. Alíquotas médias de 2 mL foram filtradas em filtro de PTFE (Millipore, Bellerica, EUA) de 0,45 µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

A otimização das condições de extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas de três amostras de pólen (uma amostra de cada estado – Bahia, São Paulo e Santa Catarina) foi realizada por meio da Análise de Superfície de Resposta, com o objetivo de obter eficiência máxima de extração e hidrólise sem promover degradação dos flavonoides. A avaliação dos efeitos da concentração do ácido (0 a 2 M) e do tempo de hidrólise (0 a 60 minutos) sobre a eficiência da extração e hidrólise dos flavonoides foi realizada através de três DCCRs³⁷, ou seja, planejamentos 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 experimentos conduzidos aleatoriamente.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento com as distintas condições de hidrólise para determinação das concentrações de flavonoides nas amostras de pólen estudadas. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote *Statistics for Windows*, versão 6.0 da Statsoft South America (São Caetano do Sul, Brasil). Verificou-se a possibilidade de ajuste de modelos codificados de segunda ordem através da Equação 1.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada flavonoide extraído das amostras de pólen, verificando-se a adequação dos modelos para obtenção e análise das superfícies de resposta:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22} + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação (1)}$$

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 nos valores codificados.

Validação da extração e método cromatográfico

A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas estudados. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$, respectivamente, sendo SD o desvio-padrão do branco e S a inclinação da curva analítica³⁸. Para comprovação prática dos valores calculados, estes foram injetados nas condições estabelecidas para a análise por CLAE.

Para verificar precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para uma amostra de pólen apícola contendo cinco dos seis flavonoides estudados. Esse experimento foi realizado na condição ótima de hidrólise: 1,0 M de HCl, durante 30 minutos.

Para verificar a exatidão do método, foram realizados testes de recuperação (em triplicata) com adição de padrão em níveis de concentração de 250, 350, 470, 280, 360 e 260 $\mu\text{g/g}$ de pólen para os flavonoides M, L, Q, I, K e A, respectivamente. Esses níveis correspondem a respectivamente 14%, 34%, 46%, 46% e 30% dos valores médios dos flavonoides M, L, Q, I e K, obtidos nas amostras de pólen estudadas. Para as amostras fortificadas, o padrão foi adicionado à amostra homogeneizada, que foi misturada e deixada por 20 minutos para acomodação do padrão na matriz. As amostras sem ou com adição de padrões foram, então, submetidas à extração/hidrólise otimizadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Com a fase móvel água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de isoramnetina e apigenina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo adicionando-se o solvente THF à fase móvel. Para facilitar e sistematizar a otimização da separação cromatográfica, inicialmente a força cromatográfica ótima para a separação dos compostos foi selecionada empiricamente, por tentativa e erro até a obtenção de uma fase móvel de força cromatográfica elevada, de modo que todos os componentes eluíram com tempo de retenção semelhante ao de um composto não retido (Figura 1-A). A composição dessa fase móvel foi 50:33:17 (v/v) de metanol:THF:água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico. A seguir, sucessivamente, a composição da fase móvel foi modificada de modo a diminuir a força cromatográfica até conseguir a separação dos compostos

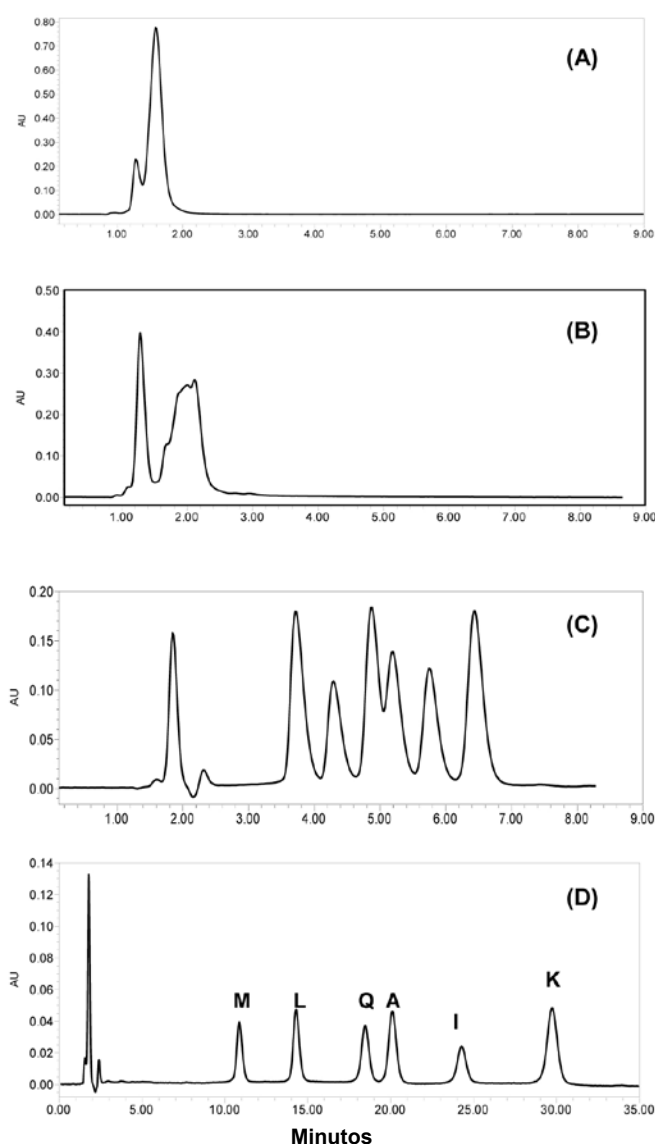


Figura 1. Método empírico para obtenção de fase móvel com a força cromatográfica ótima para separação de flavonoides agliconas (M: miricetina, L: luteolina, Q: quercetina, A: apigenina, I: isoramnetina e K: kanferol): (A) Fase móvel (FM): Metanol:THF:H₂O 50:33:17, (B) FM: Metanol:THF:H₂O 42:28:30, (C): FM: Metanol:THF:H₂O 35:23:42; (D) FM: Metanol:THF:H₂O 26:17:57. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm). FMs acidificadas com 0,3% de ácido fórmico), Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μL ; detecção: UV, 370 nm

no intervalo de tempo desejado, sempre com corrida isocrática (Figuras 1-B, C e D). O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção foi de 5 μL . O cromatograma típico dos flavonoides agliconas obtidos (fase móvel: Metanol:THF:H₂O 26:17:57) (Figura 1-D) mostra que os flavonoides M, L, Q, A, I e K eluíram nesta

sequência nos tempos de retenção de 10,9 minutos, 14,3 minutos, 18,5 minutos, 20,1 minutos, 24,3 minutos e 29,8 minutos, respectivamente.

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

Observa-se na Tabela 1 que as três amostras revelaram diferenças qualitativas e quantitativas nos flavonoides estudados. A amostra do estado da Bahia apresentou os flavonóis quercetina, isoramnetina e miricetina. A amostra do estado de São Paulo teve os flavonóis quercetina, isoramnetina e kanferol, enquanto que a amostra do estado de Santa Catarina continha os flavonóis quercetina, miricetina e kanferol, além da flavona luteolina. Apigenina não foi encontrada em nenhuma das amostras investigadas. Analisando as respostas de cada flavonoide, há uma grande amplitude de concentrações nas amostras estudadas, o que dificulta o estabelecimento de uma condição única (de concentração de ácido e de tempo de hidrólise) que otimize a extração e hidrólise simultânea de todos os flavonoides e garanta respostas máximas. A concentração de quercetina, por exemplo, variou de menor que LD a $60,6 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$, de 422 a 2640

$\pm 50 \mu\text{g/g}$ e de 36 a $2715 \pm 30 \mu\text{g/g}$, respectivamente, nas amostras dos estados da BA, SP e SC.

Na etapa de hidrólise e extração, os açúcares devem ser liberados para identificação e quantificação das agliconas. Para tanto, as condições de hidrólise devem proporcionar a ruptura completa das ligações glicosídicas, mas ao mesmo tempo ser suficientemente brandas de modo a evitar a degradação das agliconas. Altas concentrações de ácido durante um longo período podem promover uma hidrólise completa, porém podem acelerar degradação. Baixas concentrações de ácido por curto período de tempo, por outro lado, podem resultar na hidrólise incompleta. Deste modo, as melhores condições devem ser alcançadas quando se utiliza uma baixa concentração de ácido durante maior período de tempo ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Essas condições dependem dos tipos de glicosídeos presentes na amostra e do tipo de matriz analisada^{27,28}.

Tais considerações foram confirmadas no presente trabalho, como se observa na Figura 2 contendo os cromatogramas obtidos da amostra de pólen do estado da Bahia submetida a diferentes condições de extração/

Tabela 1. Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonoides analisados nas amostras de pólen apícola

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Concentração de flavonoides ($\mu\text{g/g}$)									
	x_1	x_2	X_1	X_2	Pólen BA			Pólen SP			Pólen SC			
					Q	I	M	Q	I	K	M	L	Q	K
			(M)	(min.)										
1	-1	-1	0,3	9	nd	45,50	3796,17	996,42	nd	nd	602,82	392,18	235,75	nd
2	-1	+1	0,3	51	54,40	1408,13	2983,41	2468,98	88,51	159,39	546,39	408,48	575,71	81,36
3	+1	-1	1,7	9	27,02	608,66	3733,97	2442,32	55,77	91,17	1025,19	577,37	2297,28	910,13
4	+1	+1	1,7	51	22,34	921,99	1891,86	1610,50	103,26	124,13	447,21	560,88	1627,68	737,91
5	-1,41	0	0	30	nd	<LD	3332,08	481,20	nd	nd	734,05	504,25	36,03	nd
6	+1,41	0	2,0	30	48,48	1157,13	871,28	758,81	57,67	84,12	493,24	551,02	1558,80	693,07
7	0	-1,41	1,0	0	nd	nd	2952,10	422,16	nd	nd	675,32	527,97	185,49	nd
8	0	+1,41	1,0	60	62,11	1567,88	3074,06	2483,47	156,33	216,49	876,61	639,92	2431,68	1112,81
9	0	0	1,0	30	65,16	1378,13	3366,07	2697,17	128,91	245,42	971,60	612,85	2695,66	1210,95
10	0	0	1,0	30	59,69	1404,21	3373,10	2661,01	136,86	232,12	943,06	627,94	2689,27	1245,52
11	0	0	1,0	30	61,73	1405,53	3434,53	2622,65	128,41	248,57	977,83	622,38	2721,35	1234,82
12	0	0	1,0	30	55,66	1325,22	2972,44	2580,94	141,28	218,63	1012,56	605,24	2754,21	1208,98
Média \pm Desvio-padrão das condições dos pontos centrais					60,56	1378,27	3286,54	2640,44	133,87	236,19	976,26	617,10	2715,12	1225,07
					$\pm 3,97$	$\pm 37,55$	$\pm 211,64$	$\pm 49,99$	$\pm 6,28$	$\pm 13,70$	$\pm 28,54$	$\pm 10,07$	$\pm 29,52$	$\pm 18,00$

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo. X_1 = concentração molar de HCl, X_2 = tempo de hidrólise (minutos), M = miricetina, L = luteolina, Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol, nd = não detectado (>LD); LD = Limite de Detecção: miricetina = 1,04; luteolina = 0,88; quercetina = 0,89; isoramnetina = 0,82; kanferol = 1,19 $\mu\text{g/mL}$, LQ = Limite de Quantificação: miricetina = 3,70; luteolina = 3,16; quercetina = 3,19; isoramnetina = 2,95; kanferol = 4,25 $\mu\text{g/mL}$

Tabela 2. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (x_1) e tempo de hidrólise (x_2) presentes nas amostras de pólen analisadas

Origem	EQUAÇÃO Y = (μg Flavonoide aglicona / g pólen)		R^2	F_{CAL}	F_{TAB}
	(Valores de x_1 e x_2 codificados)				
BA	Q	$Y = 60,56 + 14,79 x_1 - 18,59 x_1^2 + 10,35 x_2 - 15,18 x_2^2 - 14,7 x_1 x_2$	0,85	6,70	3,11
	I	$Y = 1378,27 + 414,05 x_1 - 383,65 x_1^2 + 286,79 x_2 - 280,96 x_2^2 - 262,32 x_1 x_2$	0,86	7,22	3,11
	M	$Y = 3285,95 - 766,87 x_1 - 456,28 x_1^2$	0,81	19,35	3,01
SP	Q	$Y = 2640,44 - 799,43 x_1^2 + 437,82 x_2 - 383,03 x_2^2 - 576,10 x_1 x_2$	0,76	5,67	2,96
	I	$Y = 133,87 + 27,20 x_1 - 50,42 x_1^2 + 36,45 x_2 - 25,76 x_2^2$	0,90	15,50	2,96
	K	$Y = 236,19 + 38,91 x_1 - 92,43 x_1^2 + 45,26 x_2 - 59,34 x_2^2$	0,87	12,01	2,96
SC	M	$Y = 976,26 - 121,87 x_1 - 191,16 x_1^2 + 75,98 x_2 - 109,99 x_2^2 - 130,39 x_1 x_2$	0,90	10,65	3,11
	L	$Y = 617,10 - 62,5 x_1^2 + 61,99 x_2 - 34,34 x_2^2$	0,79	9,95	2,92
	Q	$Y = 2715,12 + 227,99 x_1 - 926,08 x_1^2 + 786,26 x_2 - 670,49 x_2^2$	0,92	20,45	2,96
	K	$Y = 1225,07 + 111,16 x_1 - 444,05 x_1^2 + 392,55 x_2 - 339,11 x_2^2$	0,95	32,70	2,96

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; R^2 =coeficiente de determinação; $F_{\text{CAL}} = (QM_{\text{Regressão}}/QM_{\text{Resíduo}})$; M = miricetina, L = luteolina, Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol, α = nível de significância (15%); VR = graus de liberdade da regressão; vr = graus de liberdade dos resíduos

hidrólise: (A) sem HCl por 30 minutos, onde pode-se observar a presença de glicosídeos, indicando a ausência de hidrólise dos mesmos a agliconas; (B) com HCl 1,0M por 30 minutos, condição ótima, obtida a partir das superfícies de resposta, onde pode-se verificar que os glicosídeos foram hidrolisados; e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos, condição na qual os compostos de interesse já sofreram degradação, apresentando teores menores ou inexistentes. Para algumas amostras e condições de hidrólise observou-se a presença de picos de degradação.

A Tabela 2 apresenta as equações codificadas com os parâmetros estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação (R^2), F calculados e F tabelados obtidos para as agliconas extraídas de amostras de pólen dos estados da Bahia, São Paulo e Santa Catarina. Para elaboração dos modelos, em função das variáveis estudadas, adotou-se 15% de significância na avaliação estatística dos coeficientes de regressão obtidos, devido à variabilidade da amostra em estudo.

Pelos coeficientes de determinação (R^2) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um bom ajuste aos modelos propostos (R^2 entre 0,85 e 0,95) com exceção da extração/hidrólise de quercetina em pólen do estado de São Paulo, luteolina em pólen do estado de Santa Catarina e miricetina em pólen do estado de São Paulo com R^2 de 0,76; 0,79 e 0,81. Estes valores mais baixos podem ser considerados estatisticamente aceitáveis, tendo-se em vista a heterogeneidade das amostras de pólen. Assim, as análises

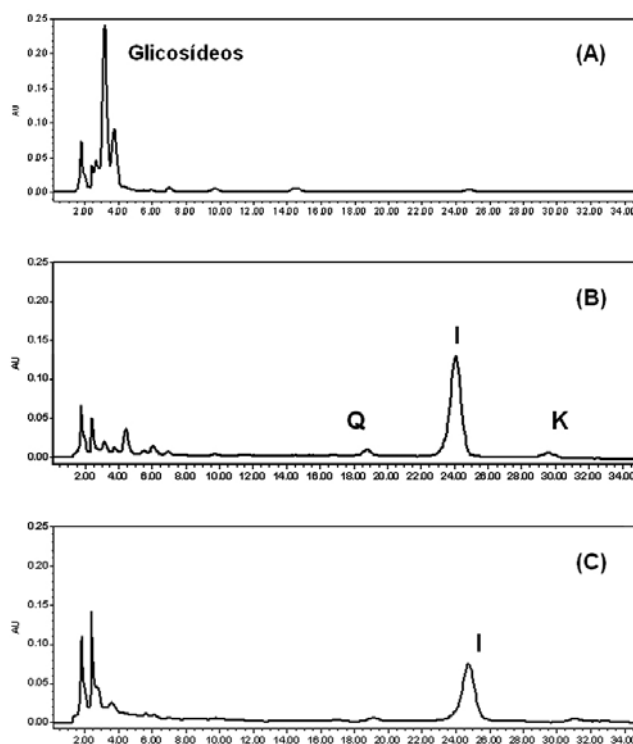


Figura 2. Cromatogramas dos flavonoides agliconas Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol dos extratos hidrolisados de pólen do estado da Bahia, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) sem HCl por 30 minutos, (B) com HCl 1,0M por 30 minutos e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm), fase móvel Metanol:THF:H₂O 26:17:57 (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) em corrida isocrática. Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μL ; detecção: UV, 370 nm

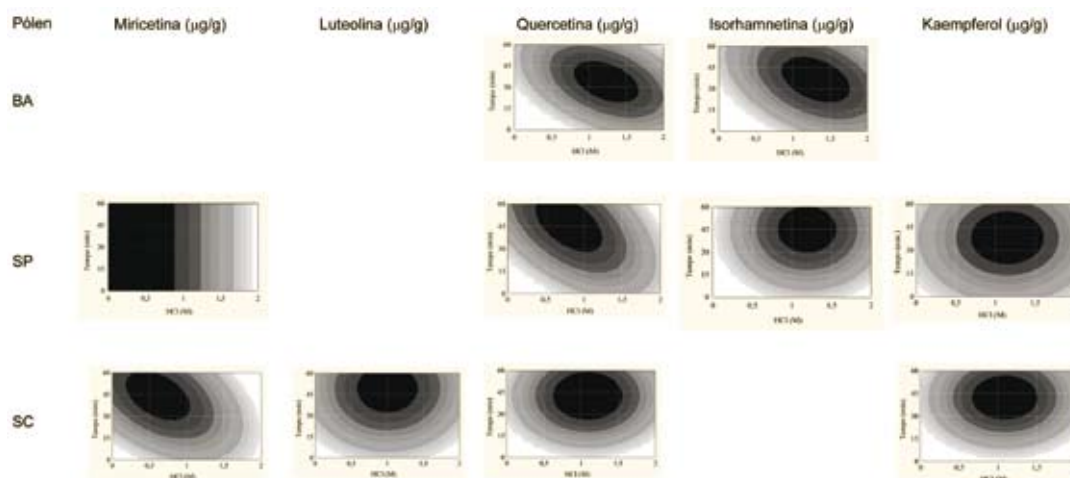


Figura 3. Curvas de contorno para a concentração das agliconas miricetina, luteolina, quercetina, isorhamnetina e kanferol como uma função do tempo (minutos) e da concentração de ácido clorídrico (M) em amostras de pólen apícola provenientes dos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC)

de superfície de resposta foram realizadas e apresentadas pelas curvas de contorno da Figura 3 para se determinar as faixas da concentração molar de HCl e tempos de hidrólise e obter a indicação das condições ideais de hidrólise.

A condição que maximiza a quantificação de todas as agliconas presentes nas amostras estudadas simultaneamente é 1,0M de HCl por 30 minutos, que corresponde aos valores definidos no ponto central do planejamento experimental, condição esta realizada em quadruplicata para cada amostra de pólen. Assim, as concentrações máximas de flavonoides em $\mu\text{g/g}$ obtidas para as três amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 1, com os valores médios e seus respectivos erros-padrão.

Nos estudos qualitativos, visando ao isolamento e à identificação dos flavonoides presentes em pólen apícola, foram usadas distintas condições de tempo, concentração de ácido e temperatura para hidrólise dos mesmos. Tomás-Barberán et al.⁹ e Tomás-Lorente et al.¹⁵ procederam com a hidrólise em HCl 2M a 85 °C, durante 45 min, enquanto Dauguet et al.¹⁴ utilizaram H_2SO_4 2M a 100 °C, durante 30 min. Outros autores empregaram metanol:HCl 3M 1:1, a 100 °C durante 10 min¹³ ou 15 min.¹¹ Nestes trabalhos a hidrólise foi feita como parte do método de identificação dos flavonoides e sem investigação da melhor condição do binômio tempo/concentração de ácido para maximizar a hidrólise dos glicosídeos. Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de proceder com tal análise para

obter valores confiáveis destes compostos em trabalhos quantitativos, confirmando a observação dos autores que avaliaram o teor de flavonoides em outras matrizes^{26,27}.

Avaliação da metodologia analítica

As curvas-padrão passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (M: 5,3 – 159 $\mu\text{g/mL}$; L: 0,9 – 141 $\mu\text{g/mL}$; Q: 1,1 – 106 $\mu\text{g/mL}$; A: 4,7 – 94 $\mu\text{g/mL}$; I: 0,3 – 75 $\mu\text{g/mL}$; K: 0,4 – 38 $\mu\text{g/mL}$). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99 (M = 0,9962; L = 0,9996; Q = 0,9985; A = 0,9991; I = 0,9992; K = 0,9878) e os coeficientes de variação entre as triplicatas foram inferiores a 2,4 (M = 1,4; L = 1,1; Q = 1,0; A = 2,4; I = 2,4; K = 2,4). Os limites de detecção obtidos para M, L, Q, A, I e K foram de 1,04; 0,88; 0,89; 1,64; 0,82 e 1,19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação de sete replicatas de uma amostra de pólen do estado de São Paulo (M: 2,33%, L: 1,77%; Q: 1,97%; I: 1,45%; K: 1,36%). As quantidades adicionadas de flavonoides para o estudo de recuperação foram: M = 246,95 $\mu\text{g/g}$, L = 350,39 $\mu\text{g/g}$, Q = 468,74 $\mu\text{g/g}$; A = 262,79 $\mu\text{g/g}$; I = 279,56 $\mu\text{g/g}$ e K = 363,43 $\mu\text{g/g}$. As taxas de recuperação para os diferentes flavonoides presentes em uma amostra de pólen do estado da Bahia foram: M: 99% (CV = 4,7%), L: 98% (CV = 0,8%), Q: 95% (CV = 3,5%), A: 97% (CV = 0,4%), I: 90% (CV = 5%), K: 90% (CV = 3,3%). Essas características comprovam o bom desempenho do método analítico.

CONCLUSÃO

A análise por superfície de resposta foi imprescindível na otimização do método de extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas, sendo possível estabelecer as condições ótimas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise para amostras de pólen apícola (1,0 M durante 30 minutos). A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras de pólen estudadas foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17) acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática. As condições estabelecidas para a determinação de flavonóis e flavonas em pólen apícola permitiram uma quantificação rápida e confiável dos flavonoides miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol das amostras estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Adventista de São Paulo (UNASP) pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS

- Margaoan R, Marghitas LAI, Dezmirean D, Mihai CM, Bobis O. Bee collected pollen – General aspects and chemical composition. *Bull UASVM Animal Sci Biotechnol*. 2010;67:254-9.
- Serra-Bonvehí J, Soliva-Torrentó M, Centelles-Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric Food Chem*. 2001;49:1848-53.
- Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem*. 2007;100: 237-40.
- Carpes ST, Prado A, Moreno IAM, Mourão GB, Alencar SM, Masson ML. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Quím Nova*. 2008;31:1660-4.
- LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLuca A, Deeby T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem*. 2009;115:1299-305.
- Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y et al. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory Bursa for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:1652-7.
- Saric A, Balog T, Sobocanec S, Kusic B, Sverko V, Rusak G et al. Antioxidant effects of flavonoids from Croatian *Cystus incannus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol*. 2008;47:547-54.
- Ferreres F, Ortiz A, Silva C, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – A study of their botanical origin. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1992;194:139-43.
- Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Ferreres F, Garcia-Viguera C. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *J Sci Food Agric*. 1989;47:337-40.
- Campos M, Markham KR, Mitchell KA, Cunha APD. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal*. 1997;8:181-85.
- Markham KR, Campos M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochem*. 1996;43:763-7.
- Ferreres F, Juan T, Pérez-Arquillué C, Herrera-Martache A, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA. Evaluation of pollen as a source of kanferol in rosemary honey. *J Sci Food Agric*. 1998;77:506-10.
- Markham KR, Mitchell KA, Campos M. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochem*. 1997;45:203-4.
- Dauguet JC, Bert M, Dolley J, Bekaert A, Lewin G. 8-Methoxikanferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochem*. 1993;33:1503-5.
- Tomás-Lorente F, Garcia-Grau MM, Nieto JL, Tomás-Barberán FA. Flavonoids from *Cistus Ladanifer* bee pollen. *Phytochem*. 1992;31:2027-9.
- Arráez-Román D, Zurek G, Bäßmann C, Almaraz-Abarca N, Quirantes R, Segura-Carretero A, et al. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:1909-7.
- Freire KRL, Silva TMS, Santos FAR, Dórea MC, Câmara CA. Estudo químico de pólen apícola (*Apis mellifera*) do nordeste brasileiro. In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (CD-Rom). Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química; 2007.
- Guo J, Zhang P, Zhang Z. Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009;34:1235-7.
- Ferreres F, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. First report of non-coloured flavonoids in *Echium plantagineum* bee pollen: differentiation of isomers by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24:801-6.
- Campos M, Sabatier S, Amiot MJ, Aubert S. Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey. *Planta Med*. 1990;56:580-1.
- Marghitas LA, Oltica GS, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O, Bogdanov S, Campos MG. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem*. 2009;115:878-3.
- Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Cienc Agrotec*. 2007;31(6):1818-25.
- Herrmann K. On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988;186:1-5.
- Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem*. 2000;48:577-99.
- Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Conteúdo de miricetina, quercetina e kanferol em chás comercializados no Brasil. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26:380-5.

26. Huber LS, Rodriguez-Amaya DB, Rodrigues MI. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66:143-52.
27. Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. 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. *Quim Nova*. 2008;31:1378-84.
28. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian sources of flavonols and flavones. *Food Chem*. 2009;113:1278-82.
29. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem*. 1992;40:1591-8.
30. Crozier A, Jensen E, Lean MEJ, McDonald MS. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatog A*. 1997;761:315-21.
31. Nuutila AM, Kammiorvirta K, Oksman-Caldentey K-M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76:519-25.
32. Haaland PO. *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1989.
33. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
34. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. *In: Anais do I Congresso de Apicultura del Mercosur*. Punta del Este; 2005. Disponível em: [<http://www.culturaapicola.com.ar>].
35. Tonin FG. *Análise de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – otimização de separação e aplicações tecnológicas* [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
36. Häkkinen S, Kärenlampi S, Heinonen M, Mykkänen HM, Törrönen AR. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric*. 1998;77:543-51.
37. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2ª edição. Campinas: Cárita Editora Espírita; 2009.
38. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.