

Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças

Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in vegetables

RIALA6/1120

Lísia S. HUBER¹, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}, Maria I. RODRIGUES²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862, Campinas, SP. Telefone:(19) 3521 4013. E-mail: delia@fea.unicamp.br

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Recebido: 29/05/2007 – Aceito para publicação: 23/08/2007

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em hortaliças. A hidrólise foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise. Essa etapa foi realizada simultaneamente com a extração por metanol aquoso 50%, em refluxo a 90°C. Foi utilizado cromatógrafo líquido Waters com coluna Nova-Pak C18 e detector de arranjo de diodos. Os compostos estudados foram miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), luteolina (L) e apigenina (A). As condições ótimas encontradas para hidrólise de cada hortaliça foram: 1,0M HCl/6 horas para espinafre e couve, 1,6M HCl/5 horas para rúcula, 1,2M HCl/2 horas para alface, 1,7M HCl/4,3 horas para salsa e 0,8M HCl/2,5 horas para cebola. O melhor gradiente para separação (CLAE) dos flavonóides das hortaliças em estudo foi constituído de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e voltando a 20:80 em 20 minutos. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Os limites de detecção foram de 0,5, 0,4, 0,5, 0,6 e 1,0µg/mL, respectivamente, para M, Q, L, K e A.

Palavras-chave. flavonóides, análise por CLAE, hortaliças.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to optimize the analytical methodology for determining flavonols and flavones in vegetables. The hydrolysis procedure was optimized using Central Composite Rotational Design (CCRD) to investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time. This step was carried out simultaneously with extraction with 50% aqueous methanol, and refluxing at 90°C. A Waters liquid chromatograph, with Nova-Pak C18 column and photodiode array detector, was used. The analyzed compounds were myricetin (M), quercetin (Q), kaempferol (K), luteolin (L), and apigenin (A). The optimum conditions found for hydrolysis for each vegetable were: 1.0M HCl for 6 hours for spinach and kale, 1.6M HCl for 5 hours for rocket, 1.2M HCl for 2 hours for lettuce, 1.7M HCl for 4.3 hours for parsley, and 0.8M HCL for 2.5 hours for onion. The best gradient (HPLC) for separating flavonoids from these vegetables consisted of methanol:water (acidified with 0.03% formic acid) 20:80, changing to 45:55 in 5 minutes, 48:52 in 17 minutes, returning to 20:80 in 20 minutes. The standard curves of the flavonoids had coefficients of correlation higher than 0.99. The detection limits were 0.5, 0.4, 0.5, 0.6 and 1.0µg/mL for M, Q, L, K, and A, respectively.

Key words. flavonoids, HPLC analysis, vegetables.

INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal. Classificados em grandes grupos, como as antocianinas, isoflavonas, flavonas, flavanóis, flavonóis e flavanonas, estes compostos vêm despertando um crescente interesse devido aos estudos que mostram uma relação inversa entre o seu consumo e o risco de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares¹⁻⁷. Esta possível proteção pelos flavonóides é atribuída à sua ação como antioxidantes, devido a suas propriedades como seqüestradores de oxigênio singlete, quelantes de metais ou doadores de hidrogênio, sendo potentes seqüestradores de radicais livres⁸⁻¹¹. São também anti-trombóticos, através da redução da agregação plaquetária^{12,13}; moduladores da síntese de óxido nítrico pelo endotélio vascular, levando ao vaso-relaxamento¹²; anti-mutagênicos, interrompendo vários estágios do processo de câncer¹⁴⁻¹⁶; e mediadores da transdução celular¹⁷.

As fontes alimentares de flavonóides são analisadas principalmente em relação a três flavonóis, quercetina, miricetina e kaempferol, e duas flavonas, apigenina e luteolina¹⁸⁻²³. Estes são também os flavonóides mais investigados em estudos sobre compostos anticarcinogênicos.

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

Os métodos por CLAE para flavonóides envolvem, na maioria das análises, colunas de fase reversa e detector de arranjo de diodos²⁴.

Em plantas, com exceção das catequinas, os flavonóides ocorrem na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcar²⁵⁻²⁷. A determinação quantitativa de flavonóides na forma glicosídica é difícil devido ao grande número de glicosídeos diferentes existentes para cada flavonóide e a dificuldade de adquirir padrões. A hidrólise das diversas formas de glicosídeos para liberar as agliconas oferece um método mais prático, porém, pode provocar a degradação dos flavonóides. Glicosídeos são hidrolisados usando-se normalmente HCl em metanol aquoso^{18,19,21}. A hidrólise dos glicosídeos requer concentrações relativamente altas de ácidos minerais (1-2M), em condições de refluxo, numa mistura de metanol e água (50:50, v/v)²¹.

O procedimento utilizado na maioria das pesquisas é o estabelecido por Hertog et al.²¹, que emprega refluxo das amostras por 2 horas a 90°C com HCl 1,2M em solução aquosa de metanol 50%. Estes autores estabeleceram as melhores condições de hidrólise para alimentos contendo flavonóis glicuronídeos (2,0M de HCl por 2 horas, ou ainda 1,6M de HCl por 4 horas), flavonóis glicosídeos (1,2M de HCl por no máximo 2 horas) e flavonas (2,0M de HCl por 4 horas).

Häkkinen et al.²⁸, utilizando uma mistura de padrões de flavonóis e ácidos fenólicos, compararam o procedimento estabelecido por Hertog et al.²¹, 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas, com outras condições de hidrólise, utilizando 0,6M ou 1,2M de HCl em metanol 50%, com tempo de 16h a 21°C ou 35°C sob atmosfera de nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas e 0,6M de HCl a 35°C por 16 horas. Posteriormente, estes dois procedimentos foram comparados, utilizando-se amostras de "blackcurrant" e morango. A melhor condição para quercetina e miricetina em "blackcurrant" foi com 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas, porém, kaempferol não foi detectado nesta condição de hidrólise. Nas amostras de morango, esta temperatura também foi mais eficiente para quercetina, porém miricetina e kaempferol não foram detectados. O método de escolha foi hidrólise a 35°C por 16 horas usando 1,2M de HCl. Ácido ascórbico e *t*-butil-hidroquinona (TBHQ) foram testados como antioxidantes, sendo que o primeiro foi escolhido, já que TBHQ interferiu na identificação da quercetina.

Mais recentemente, Nuutila et al.²⁹ compararam os métodos de Hertog et al.²¹ e Häkkinen et al.²⁸, utilizando soluções de padrão e misturas de padrões (ácidos fenólicos, flavonóis, flavonas e catequinas) e também padrões separados. Os melhores resultados, para a maioria dos compostos, foram obtidos utilizando-se refluxo a 90°C por 2 horas com 1,2M de HCl (Hertog et al.²¹) sem adição de antioxidante. Porém, na ausência de antioxidante, a miricetina era extensivamente degradada. Ácido ascórbico e TBHQ foram comparados, obtendo-se os mesmos resultados de Häkkinen et al.²⁸. A quantidade ideal de antioxidante foi estabelecida em 2mg para 5mL de solução, em amostras de cebola e espinafre.

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

No geral, a otimização de processos pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos. Os tradicionais processos que otimizam um fator de cada vez demandam maior tempo, e podem ignorar as interações entre os vários fatores, sendo que o resultado da otimização pode não refletir o modelo real, uma vez que as atuais respostas aos processos, resultam da influência das interações entre as variáveis. Os processos estatísticos de otimização permitem que sejam levadas em consideração estas interações³⁰. A Análise por Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.³¹, é um dos métodos que permite a avaliação dos efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas, São Paulo. Foram determinadas as condições ótimas de extração/hidrólise e análise cromatográfica dos flavonóides presentes em alface (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleraceae*), espinafre (*Tetragonia expansa*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*) e cebola (*Allium cepa*).

As amostras submetidas às análises foram retiradas de um mesmo lote homogeneizado para cada aspecto avaliado (um lote para otimização das condições de hidrólise, um para avaliação da precisão e outro para avaliação da exatidão) para que as variações naturais não fossem atribuídas a variações analíticas.

Reagentes e padrões

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

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

Equipamento e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690), Milford, EUA, equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), controlado por Software Millennium 32. Foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18, (4µm, 3,9 x 150mm) e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e o volume de injeção foi 20µL.

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

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e dos 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 após hidrólise das hortaliças. Aliquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q contendo ácido ascórbico (0,04% na solução de injeção). A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M (equivalente a 1,2M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5mL com metanol.

Extração e hidrólise dos flavonóides

Para se obter a máxima eficiência de extração e hidrólise sem promover degradação, a hidrólise de cada hortaliça foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)³².

As hortaliças foram lavadas, secas com papel absorvente, e após remoção das partes não comestíveis, cortadas em porções menores que foram trituradas em processador de alimentos. As cebolas foram descascadas e trituradas em processador de alimentos. Sub-amostras de cada amostra foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (variando conforme o tipo de amostra, em proporções de 1:0,5 a 1:2) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. As soluções de extração assim obtidas consistiram-se de diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Estes extratos foram levados a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, foram resfriados e filtrados em funil sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e as soluções foram colocadas em ultra-som por 5 minutos. Aliquotas médias de 2mL foram filtradas em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) Millipore de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

Planejamento experimental e Análise de Superfície de Resposta

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

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

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

^aconcentração molar de HCl na solução de hidrólise; ^btempo de hidrólise.

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

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

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

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

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

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

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Equação(1)

Onde b₀, b₁, b₂, b₁₁, b₂₂ e b₁₂ representam os coeficientes de regressão, X₁ a concentração molar de HCl e X₂ o tempo de hidrólise.

Validação da extração e método cromatográfico

A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas. A avaliação dos limites de detecção do equipamento (LD) foi feita pelo método da relação sinal-ruído 3:1, por diluições sucessivas dos padrões, onde determinou-se a menor quantidade detectável para cada um deles como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído. O limite de quantificação instrumental foi considerado como sendo três vezes o LD^{33,34}.

Para verificar a precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para cada hortaliça e para avaliação da exatidão, triplicatas de recuperações com adição de padrão em um nível de concentração foram obtidas para cada hortaliça. 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 a extração/hidrólise otimizadas neste estudo.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Com a fase móvel água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de quercetina e luteolina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo, com água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético, porém os picos apresentaram cauda. Água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico,

proporcionaram boa separação dos compostos em estudo, sendo que os picos não apresentaram cauda. Esta foi a fase móvel escolhida, e extratos hidrolisados das amostras, com e sem acréscimo de padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo-se os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos. O gradiente que melhor separou os flavonóides das amostras investigadas foi o mesmo conseguido para a separação dos padrões: iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear. O tempo de condicionamento da coluna foi de 10-15 minutos.

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

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

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

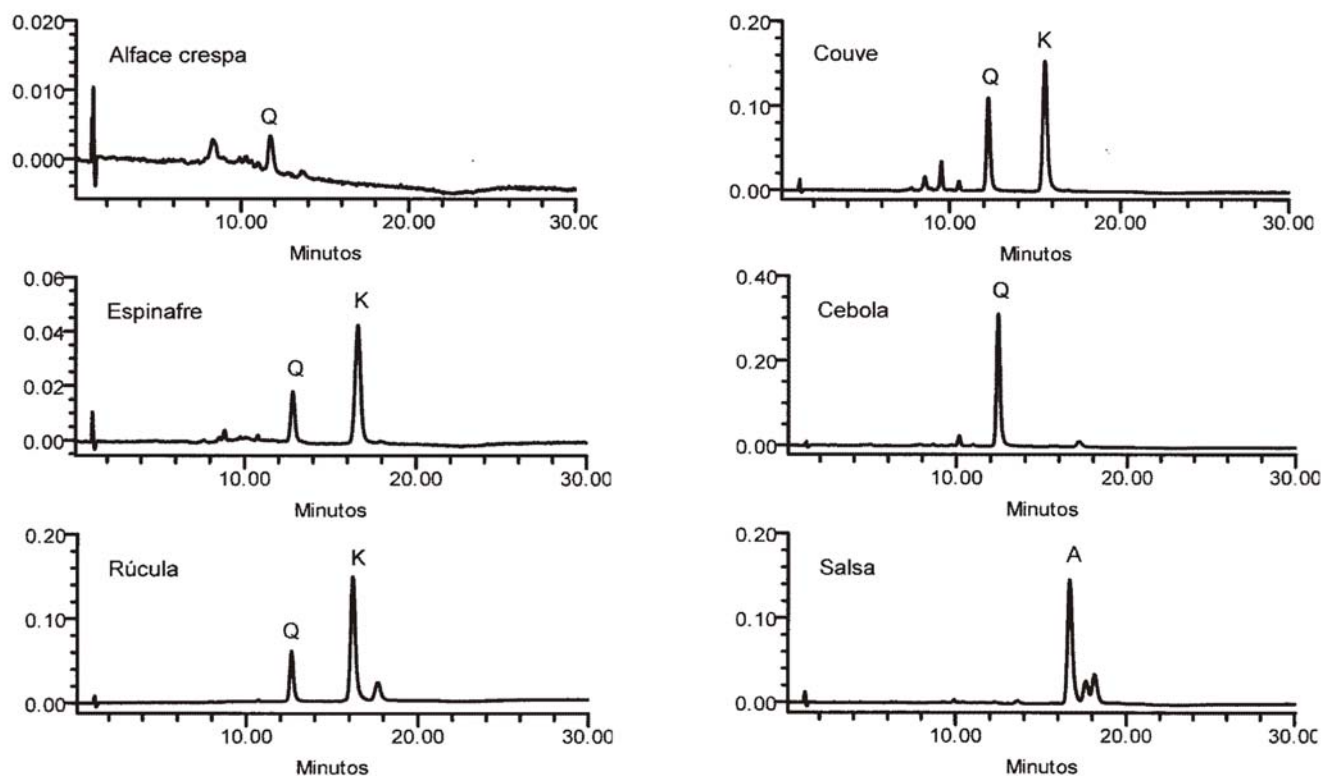


Figura 1. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de alface crespa, couve, espinafre, cebola, rúcula e salsa. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C18; fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear, detecção fixada a 370nm.

Na etapa de hidrólise/extração, o objetivo é liberar os açúcares ligados às agliconas, para que estas sejam mais facilmente identificadas e quantificadas. Essa etapa deve ser eficaz na quebra das ligações glicosídicas, porém sem degradar as agliconas liberadas. Assim, considera-se que se utilizarmos uma concentração muito alta de ácido por um longo período, podemos liberar completamente as agliconas, porém acelerar sua degradação. Se utilizarmos uma concentração de ácido baixa por curto período, a liberação das agliconas pode não ser completa. Desta maneira, a interação que pode ocorrer no efeito destas duas variáveis, indica que as melhores

condições devem ser alcançadas quando utilizamos uma baixa concentração de ácido por um período mais longo, ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Estas diferentes condições dependerão dos tipos de glicosídeos presentes na amostra, bem como do tipo de matriz analisada.

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

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

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

*p-valor < 0,05

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

Pelos coeficientes de determinação (R^2) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um excelente ajuste aos modelos obtidos (R^2 entre 0,85 e 0,98), com exceção da extração/

hidrólise de quercetina em alface e kaempferol em rúcula, com R^2 de 0,74 e 0,77, respectivamente, apresentando valores mais baixos, porém estatisticamente aceitáveis³².

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

Tabela 4. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (X_1) e tempo de hidrólise (X_2) presentes nas hortaliças estudadas.

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

R^2 = coeficiente de determinação; $F_{\text{Calc}} = (QM_{\text{Regressão}}/QM_{\text{Resíduo}})$; Q=quercetina; K=kaempferol; A=apigenina.
 α = nível de significância (5%); v_R =graus de liberdade da regressão; v_r =graus de liberdade dos resíduos

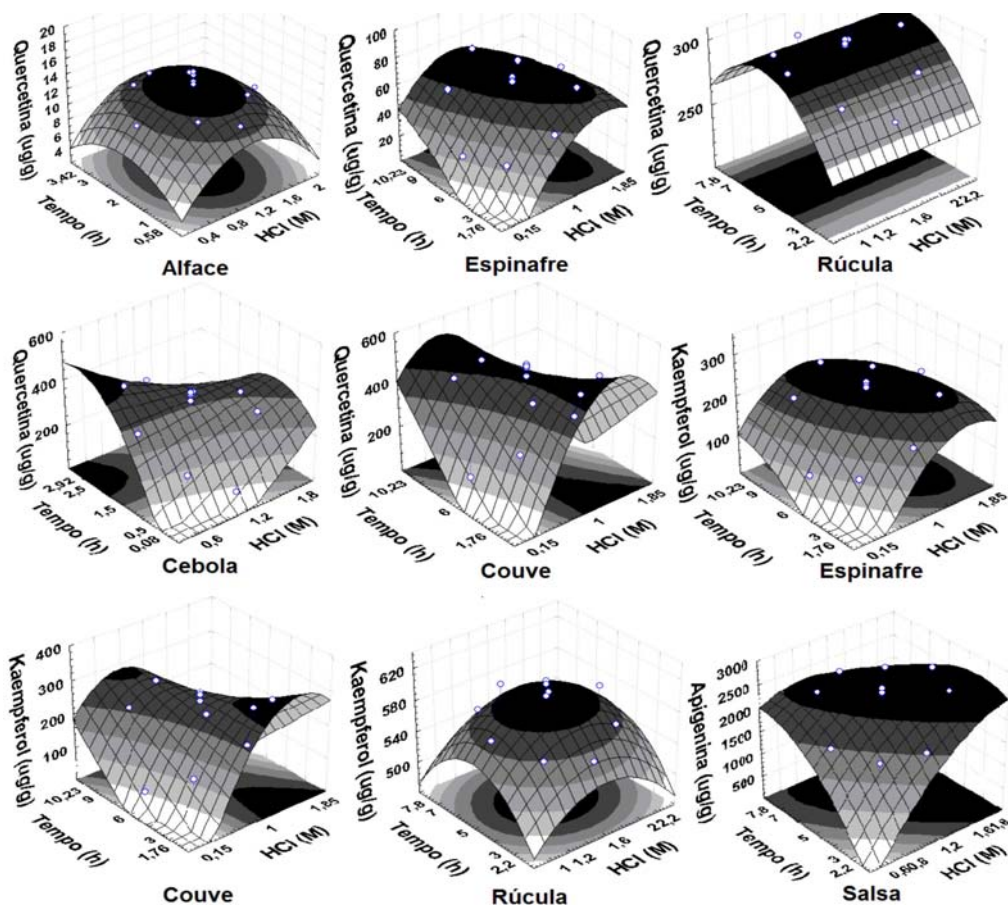


Figura 2. Superfícies de resposta para a determinação das agliconas quercetina, kaempferol e apigenina.

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

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

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

Tabela 5. Propriedades das curvas padrão.

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

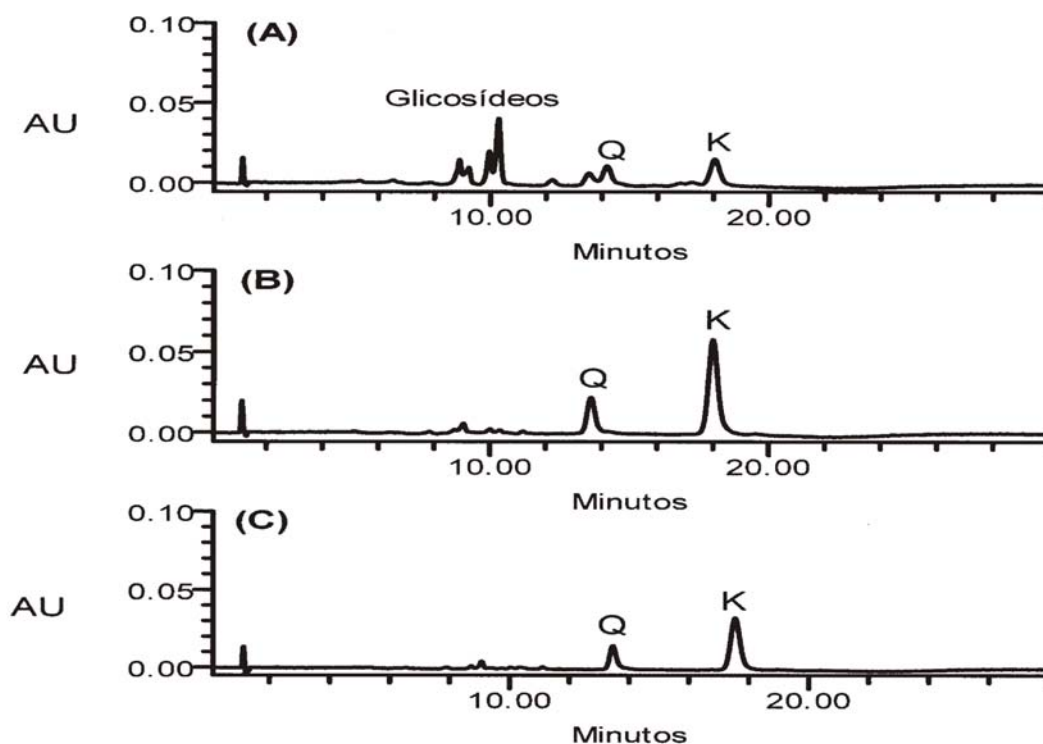


Figura 3. Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de espinafre, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) com HCl 0,15M por 6 horas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas e (C) com HCl 1,0 M por 10,23 horas. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C18; fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear, detecção fixada a 370nm.

Avaliação da metodologia analítica

As curvas padrão passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (Tabela 5). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99. Os limites de detecção obtidos para M, Q, L, K e A foram, respectivamente, 0,5; 0,4; 0,5; 0,6 e 1,0 µg/mL. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação das replicatas (Tabela 6), que variaram de 0,75 para cebola a 5,0 para alface. As taxas de recuperação para os flavonóides das diferentes hortaliças analisadas estão apresentadas na Tabela 7, variando de 89,9% para quercetina em rúcula a 102,1% para quercetina em alface. Essas características comprovam o excelente desempenho do método analítico.

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

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

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

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

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

^amédia de três determinações, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina. CV= coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras estudadas, foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Nova-Pak (4µm, 3,9 x 150mm), utilizando-se como fase móvel metanol e água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear,

iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, com fluxo de 1mL/min e volume de injeção de 20µL.

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

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

REFERÊNCIAS

- Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Rad Res* 2000; 33: 91-103.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
- Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 785-9.
- Hollman PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J Sci Food Agric* 2001; 81: 842-52.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit Med J* 1996; 312: 478-81.
- Middleton Jr E, Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1167-79.
- Middleton Jr E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall; 1994.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Febs Lett* 1995; 368: 188-92.
- Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 351-76.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell GP, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res* 1995; 22: 375-83.
- Rice-Evans CA, Miller, NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-56.
- Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V et al. Select flavonoids and whole juice from purple

- grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001; 103: 2792-98.
13. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res* 1991; 64: 91-100.
 14. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Clin Nutr* 1999; 38: 133-42.
 15. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3823-31.
 16. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 381-406.
 17. Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 861-80.
 18. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 590-5.
 19. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2379-83.
 20. Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 1242-6.
 21. 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.
 22. McDonald M, Hughes M, Burns J, Lean MEJ, Matthews D, Crozier A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 368-75.
 23. Vries J, Janssen K, Hollman PCH, Van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett* 1997; 114: 141-4.
 24. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 577-99.
 25. DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999; 65(4): 337-53.
 26. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 2004; 24: 851-74.
 27. Hermann K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1988; 186: 1-5.
 28. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric* 1998; 77:543-51.
 29. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem* 2002; 76: 519-25.
 30. Haaland PO. *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1989.
 31. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
 32. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. Campinas: Casa do Pão Editora; 2005.
 33. Caulett R, Boddy R. *Statistic for analytical chemists*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1983.
 34. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova* 2004; 27: 771-80.

AGRADECIMENTOS

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