

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Análise de ácido clorogênico em amostras de pêssego – *Prunus persica* (L.) Batsch:  
otimização e validação de método.

DIMAS HENRIQUE DE SOUZA JÚNIOR

PORTO ALEGRE, 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Análise de ácido clorogênico em amostras de pêsego – *Prunus persica* (L.) Batsch:  
otimização e validação de método.

Dissertação apresentada por **Dimas Henrique de  
Souza Júnior** para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo S. Zuanazzi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.8.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Márcia Vizzotto

EMBRAPA Clima Temperado

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S729a Souza Júnior, Dimas Henrique de  
Análise de ácido clorogênico em amostras de pêssego – *Prunus persica* (L.) Batsch: otimização e validação de método / Dimas Henrique de Souza Júnior – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxiv, 144 p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Prunus persica*. 2. Ácido clorogênico. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Zuanazzi, José Ângelo Silveira. II. Título.

CDU: 615.322:582.734

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.



Nunca se vence uma guerra lutando sozinho  
É claro que a gente precisa entrar em contato  
Com toda esta força contida que vive guardada  
O eco de suas palavras não repercutem em nada

É sempre mais fácil achar que a culpa é do outro  
Evita o aperto de mão de um possível aliado  
Convence as paredes do quarto e dorme tranquilo  
Sabendo no fundo do peito que não era nada daquilo

Coragem, coragem, se o que você quer é aquilo que tenta e faz,  
Coragem, coragem, eu sei que você pode mais

**Por quem os sinos dobram, Raul Seixas**





## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi, pelo seu apoio, incentivo e educação, que me foram muito importantes neste período de convívio.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Raseira, que incentivou a pesquisa, auxiliou e forneceu as amostras que foram utilizadas.

Ao prof. Dr. Pedro E. Froëhlich, que com suas dicas sobre validação, acrescentaram um grande valor a este trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Clarice Azevedo Machado, que com muita amizade, apoio, carinho e exemplo me incentivou e ajudou a aumentar o meu amor pelas plantas medicinais.

Às prof<sup>as</sup>. Dra. Amélia T. Henriques, prof<sup>a</sup>. Dra. Miriam Apel, prof<sup>a</sup>. MSc. Marina Scopel e a MSc. Ana Lúcia Aboy pela ajuda nos momentos mais conturbados, e pelos tantos momentos de diversão. Aos colegas MSc. Eduardo Konrath, Jean P. Andrade, Maria T. Kreinecker, Letícia B. Pagliosa, Grazielle Ramos, Raquel Giordani, Tiago Souza, Rafaela Marin e Carolina Passos, às bolsistas Larissa Giardin, Mariana Dicki Freitas, Juliana Andrade, Renata Biegelmeier, que contribuíram com diversos *insights* e alegrias.

À Comunidade Osho Rachana, local de tamanha beleza onde moram tantos amigos que me incentivaram com amor, paciência e *feed-backs* sobre o meu trabalho, mas principalmente pessoalmente. Com certeza sem este auxílio, este trabalho não teria sido possível.

Ao Namastê incluindo todos os terapeutas, clientes, amigos e frequentadores, que me ajudaram com muita energia, e onde sei que posso encontrar um “algo a mais”.

À Utara, que me fez chegar mais próximo do meu amor e me ajudou a confiar.

Aos meus grandes amigos da banda Jacksoul, que tem um grande “SIM” para a vida, e sei que sempre posso contar e confiar.

À minha família pelo seu incentivo e apoio. À minha mãe, pai, tias, tios, madrinha, padrinho e avós: muito obrigado.



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE ESQUEMAS .....	17
LISTA DE ANEXOS .....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	21
RESUMO.....	23
ABSTRACT .....	25

LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE ESQUEMAS .....	17
LISTA DE ANEXOS .....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	21
RESUMO.....	23
ABSTRACT .....	25
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS .....	30
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>32</b>
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	34
<b>3.1 HISTÓRICO.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 BOTÂNICA .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Cultivares.....	39
3.2.2 Cultivares de Dupla Finalidade .....	40
<b>3.3 CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4. ECONOMIA .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Pólo de Persicultura do Rio Grande do Sul .....	43
<b>3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....</b>	<b>44</b>
3.5.1 Compostos Fenólicos.....	44
3.5.3 Proteína Pru p 3 .....	54
3.5.4 Polifenoloxidase .....	57
3.5.5 Glicosídeos Cianogênicos .....	59
<b>3.6 ASPECTOS NUTRICIONAIS .....</b>	<b>61</b>
3.6.1 Fibras .....	61
3.6.2 Carotenóides .....	63
3.6.3 Ácido Ascórbico .....	64
3.6.4 Minerais.....	64
3.6.5 Semente .....	64
3.6.6 Alimento Funcional.....	65
<b>3.7 PATOLOGIAS .....</b>	<b>67</b>
3.7.1 Radicais Livres .....	69

3.7.3 Outras atividades .....	70
<b>3.8 VALIDAÇÃO .....</b>	<b>70</b>
3.8.1 Especificidade .....	71
3.8.2 Linearidade .....	72
3.8.3 Precisão .....	72
3.8.4 Limite de Detecção .....	73
3.8.5 Limite de Quantificação .....	74
3.8.6 Exatidão .....	75
3.8.7 Recuperação .....	75
3.8.8 Robustez .....	76
<b>3.9 ANÁLISES REALIZADAS COM PÊSSEGOS.....</b>	<b>76</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 MATERIAIS.....</b>	<b>80</b>
4.1.1 Amostras Vegetais .....	81
4.1.2 Materiais .....	81
4.1.3 Equipamentos .....	82
<b>4.2 MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
4.2.1 Otimização .....	83
4.2.2 Validação .....	92
4.2.3 Análise das Amostras .....	97
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>98</b>
5.1.1 Análise em CLAE-UV .....	100
5.1.2 Resultados da Otimização do Sistema CLAE.....	102
5.1.2 Condições de Extração .....	102
5.1.3 Resultados da Otimização da Extração.....	110
<b>5.2 VALIDAÇÃO .....</b>	<b>110</b>
5.2.1 Curva de Calibração para a Substância Química de Referência.....	110
5.2.2 Intervalo .....	113
5.2.3 Seletividade .....	114
5.2.4 Especificidade .....	115
5.2.5 Precisão .....	116
5.2.6 Exatidão .....	117
5.2.7 Recuperação .....	117
5.2.8 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	118
5.2.8 Robustez .....	119
<b>5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>119</b>
5.3.1 Perda por Dessecação .....	119
5.3.2 Quantificação de Ácido Clorogênico.....	119
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>6.1 OTIMIZAÇÃO .....</b>	<b>124</b>
6.1.1 Sistema CLAE .....	124
6.1.2 Condições de Extração .....	128
<b>6.2 VALIDAÇÃO .....</b>	<b>132</b>
<b>6.3 ANÁLISE DE CULTIVARES.....</b>	<b>136</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>140</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>142</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomes triviais para isômeros dos ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico. ....	19
Tabela 2: Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez. ....	71
Tabela 3: Composição do eluente que apresentou melhor resolução cromatográfica. ....	73
Tabela 4: Sistema de eluição definido como ótimo. ....	74
Tabela 5: Comprimentos de onda testados para o pico do ácido clorogênico. ....	75
Tabela 6: Parâmetros de eficiência cromatográfica. ....	75
Tabela 7: Sistema CLAE otimizado. ....	76
Tabela 8: Resultados do teste de determinação da proporção entre planta e solvente extrator. ....	77
Tabela 9: Resultados do teste da composição do solvente extrator entre etanol 96 % e água deionizada. ....	77
Tabela 10: Resultados do teste da composição do solvente extrator entre metanol P.A. e água deionizada. ....	78
Tabela 11: Resultados do teste de extração por sonicação. ....	79
Tabela 12: Resultados do teste de extração por maceração. ....	80
Tabela 13: Resultados do teste de extração por turbólise. ....	80
Tabela 14: Resultados do teste de conservação com adição de fluoreto de sódio. ....	83
Tabela 15. Teor da substância química de referência para o teste de acondicionamento com papel alumínio. ....	83
Tabela 16: Resultados do teste de conservação por armazenamento na geladeira. ....	84
Tabela 17: Parâmetros ótimos para o método de extração. ....	84
Tabela 18: Valores experimentais obtidos para curva analítica do ácido clorogênico por CLAE. ....	86
Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) para a curva de calibração do ácido clorogênico. ....	86
Tabela 20: Análise de variância dos resultados do teste de linearidade. ....	88
Tabela 21: Resultados obtidos para o teste de repetibilidade. ....	91
Tabela 22: Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária. ....	91
Tabela 23: Resultados obtidos para o teste de exatidão. ....	92
Tabela 24: Resultados obtidos para o teste de recuperação. ....	92
Tabela 25: Resultados obtidos com o ensaio de robustez. ....	93
Tabela 26: Resultados obtidos pelo teste de perda por dessecação. ....	94
Tabela 27: Teores de ácido clorogênico em cultivares de pêssego. ....	95



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos isômeros do ácido cafeoilquínico e feruloilquínico.....	18
Figura 2: Estrutura do ácido clorogênico. ....	19
Figura 3: Núcleo Fundamental dos Flavonóides.....	25
Figura 4: Quercetina.....	26
Figura 5: Rutina.....	27
Figura 6: Representação gráfica da curva de calibração de ácido clorogênico obtido por CLAE, equação da reta e coeficiente de regressão.....	85
Figura 7: Curva de linearidade apresentando as equações da reta e os coeficientes de regressão para as amostras de <i>Prunus persica</i> cv. Morro Redondo.....	87
Figura 8: Cromatograma e espectros de absorção obtidos a partir da coinjeção de uma mistura das soluções referência de ácidos clorogênico e caféico.....	88
Figura 9: Cromatograma e espectros de absorção do pico do ácido clorogênico obtido no teste de especificidade.....	89





## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Quelação do ácido clorogênico.....	22
Esquema 2: Reações catalisadas pelas polifenoloxidasas .....	30
Esquema 3: Degradação enzimática da amigdalina.....	33
Esquema 4: Formação de radical carbono, peroxidação e entrecruzamento.....	43



## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Informações nutricionais do pêssego.....	128
Anexo 2: Teores de açúcares do pêssego.....	128
Anexo 3: Teores de minerais do pêssego.....	128
Anexo 4: Teores de vitaminas do pêssego.....	129
Anexo 5: Teores de ácidos graxos do pêssego.....	129
Anexo 6: Teores de aminoácidos do pêssego.....	130
Anexo 7: Cromatograma da cultivar Ametista.....	130
Anexo 8: Cromatograma da cultivar Aurora 1.....	131
Anexo 9: Cromatograma da cultivar Aurora 2.....	131
Anexo 10: Cromatograma da cultivar Conserva 594.....	132
Anexo 11: Cromatograma da cultivar Dourado.....	132
Anexo 12: Cromatograma da cultivar Granada.....	133
Anexo 13: Cromatograma da cultivar Precocinho.....	133
Anexo 14: Cromatograma da cultivar Sensação.....	134
Anexo 15: Cromatograma da cultivar Sunblaze.....	134
Anexo 16: Cromatograma da cultivar Tropic Beauty.....	135
Anexo 17: Cromatograma da cultivar Tropic Blush.....	135
Anexo 18: Cromatograma da cultivar Turmalina.....	136



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ATF – Ácido trifluoroacético

BPM – Boas práticas de manufatura

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

E1 – Extrato otimizado 1

E1 – Solução extrativa 1

E2 – Extrato com o dobro da concentração de E1

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EP1 – Extrato Preliminar 1

Ex1 – Solução E1 adicionada de 10 µg de SQR para teste de exatidão

Ex2 – Solução E1 adicionada de 20 µg de SQR para teste de exatidão

Ex3 – Solução E1 adicionada de 30 µg de SQR para teste de exatidão

FDA – Food and Drug Administration

FEIA - Imunoensaio enzimático fluorescente

ICH - Conferência internacional de harmonização

IDR – Ingestão Diária Recomendada

LTP – Proteína de transferencia de lipídeos

PVDF- Difluoreto de polivinilideno

R1 – Solução E1 adicionada de 10 µg de SQR para teste de recuperação

R2 – Solução E1 adicionada de 20 µg de SQR para teste de recuperação

R3 – Solução E1 adicionada de 30 µg de SQR para teste de recuperação

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SQR – Substância química de referência

USDA – United States Department of Agriculture



## RESUMO

O pêssego é o nome popular do fruto produzido por *Prunus persica* (L.) Batsch, e é amplamente cultivado na região sul do Brasil. Seu cultivo é economicamente muito importante para o local, e o desenvolvimento de técnicas que garantam o controle de qualidade desta matéria-prima e seus produtos industriais são interessantes. No presente trabalho foi feita uma revisão de literatura acerca de análises realizadas por CLAE-UV com o pêssego, realizada uma otimização das técnicas de extração do ácido clorogênico e do sistema cromatográfico, validado este método e utilizado para quantificar 13 diferentes cultivares de pêssegos fornecidos pela EMBRAPA Clima Temperado, cultivados em Pelotas, RS. O resultado é um método rápido, econômico e prático que foi otimizado e validado, excelente para análises rotineiras de controle de qualidade deste material. As quantidades de ácido clorogênico foram comparadas entre si, e identificou-se que as cultivares Morro Redondo e Sunblaze apresentaram os maiores teores desta substância, sendo promissoras para serem empregadas pela indústria como alimento funcional.

Palavras-chave: *Prunus persica*, ácido clorogênico, CLAE, otimização e validação.





## **ABSTRACT**

Chlorogenic acid analysis in peach – *Prunus persica* (L.) Batsch: method optimization and validation.

Peach is the common name of the fruit produced by *Prunus persica* (L.) Batsch, widely cultivated in the southern of Brazil. Its cultivation is economically important to the local market, and the development of techniques that assure the quality control of the raw material as well as the industrial products made of this fruit are very useful. In this work, a literature review of the HPLC-UV analysis of peach was done, a technique of extraction and chromatographic system were optimized and validated, and 13 cultivar varieties supplied by EMBRAPA Clima Temperado, grown in Pelotas, RS were analyzed. The result is an optimized and validated method of HPLC-UV to quantify chlorogenic acid in peaches, excellent for routine analysis. The average amount of this phenolic compound in the selected cultivars was quantified and compared among them. It was identified that Morro Rendondo and Sunblaze varieties presents the highest amounts of this substance, and both are promising cultivars to be explored by the industry as functional food.

Key-words: *Prunus persica*, chlorogenic acid, HPLC, optimization and validation.



## **1 INTRODUÇÃO**

Os alimentos funcionais emergiram nos últimos anos como a maior palavra da indústria de alimentos. Existe uma força significativa no mercado destes produtos que é a demanda do consumidor, à medida que estes consumidores querem aumentar a sua saúde através da alimentação. Um alimento pode ser considerado “funcional” se for demonstrado afetar benéficamente uma ou mais funções do corpo, além dos efeitos nutricionais adequados, de forma que consiga aumentar um estado de saúde e bem estar e/ou reduzir o risco de uma doença. Os componentes ativos dos alimentos funcionais mais comuns são fibras, ácidos graxos ômega-3, fitoesteróis e antioxidantes (ARNOLDI, 2005).

A categoria dos antioxidantes é designada para compostos essenciais necessários para controlar as reações de degeneração oxidativa causada por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em tecidos vivos, inclusive prevenindo a lipoperoxidação das gorduras em alimentos. Estes radicais livres estão associados com o envelhecimento e doenças relacionadas, como câncer e aterosclerose. Produtos antioxidantes derivados de plantas como a vitamina E, a vitamina C e os polifenóis estão se tornando fatores dietéticos cada vez mais importantes. Isto tem facilitado o aumento da pesquisa de frutos e vegetais comerciais e plantas indígenas pelas suas propriedades antioxidantes, como o mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), milho-roxo-do-Peru (*Zea mays* L.) e batata-doce-vermelha (*Ipomoea batatas* L.) (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2003).

Um elemento fundamental do sistema de garantia da qualidade em uma indústria são as Boas Práticas de Manufatura (BPM), que são constituídas por um conjunto de ações as quais têm o propósito de manter o controle técnico dos procedimentos envolvidos na produção. Em geral, as ações envolvidas nas BPM se referem à definição sistemática e clara dos processos utilizados na produção, às facilidades necessárias tais quais espaço físico, equipamento apropriado, armazenamento, distribuição, pessoal qualificado e ao controle de qualidade (WHO, 2007).

O controle de qualidade é o setor encarregado no desenvolvimento de documentação, procedimentos e amostragem dos testes a serem realizados para assegurar a integridade física e química de materiais e fármacos utilizados na produção, assim como também participa na pesquisa e desenvolvimento de qualquer atividade que possa influenciar a qualidade do produto (KOROLKOVAS, 1984).

A confiança no método analítico é assegurada através do processo de validação, o qual permite comprovar que o método utilizado é adequado para o fim pelo qual foi desenvolvido, ou seja, é capaz de prever resultados consistentes e com credibilidade (ERMER, 2001).

As principais agências reguladoras da fabricação e qualidade dos alimentos têm empreendido a tarefa de uniformizar os procedimentos para validação de métodos analíticos dentro da indústria alimentícia através das guias da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), sendo mundialmente aceitas estas como referências nesta área do controle de qualidade (SHARP, 2000).

*Prunus persica* (L.) Batsch (pessegueiro) é a espécie dentre os frutos de caroço com maior expressão mundial, e possui em sua composição diversos antioxidantes da classe dos compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, antocianos e flavonóis. Esta composição desperta o interesse no mercado de alimentos funcionais (VERSARI *et al.*, 2002; TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001; BYRNE *et al.*, 2001; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

A importância de desenvolver e validar um método de análise CLAE para o pêssego é justificado pelo seu potencial antioxidante, carência de estudos aprofundando o seu controle de qualidade e a agregação de valor que um alimento funcional possui.

## **2 OBJETIVOS**



## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho visa otimizar e validar um método analítico de quantificação de ácido clorogênico em pêssegos por CLAE.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Definir e otimizar o método de análise do ácido clorogênico por CLAE;

Comparar este método com os encontrados em literatura;

Validar este método;

Determinar o teor de ácido clorogênico em 13 cultivares de pêssego, utilizando este método.





### **3 REVISÃO DA LITERATURA**



### 3.1 HISTÓRICO

O pessegueiro, *Prunus persica* (L.) Batsch, tem como sinónimas *Amygdalus persica* L., *Prunus vulgaris* Miller e *Prunus persica* Sieb. et Zucc. O fruto é conhecido como *peach* (inglês), *durazno* e *melocotón* (espanhol), *pesco* e *persico* (italiano), *firsik* (árabe), *pecher* (francês), *pfirichbaum* (alemão) e *persik* (russo) (ALTAVISTA, 2005; CORRÊA, 1974) O fruto é comido fresco e em conserva. Dele fabricam-se doces, geléias, sucos e licores (REITZ, 1996).

O pessegueiro é nativo da China, onde se encontra a maior diversidade dessa espécie (mais de mil cultivares). O nome científico, entretanto, é originário da Pérsia (atual Irã), onde foi inicial e erroneamente tomado como seu país de origem (RASEIRA; QUEZADA, 2000). *Prunus* é o gênero também da ameixeira (*Prunus domestica* L.) e da cerejeira (*Prunus avium* L.) (REITZ, 1996).

A cultura do pessegueiro data de quatro mil anos. Essa espécie foi levada para o Mediterrâneo, através da Pérsia. Aparentemente, foi introduzida na cultura grega, 400 a 300 anos a.C., e na romana, no primeiro século d.C. Embora os mouros tenham possivelmente introduzido esta espécie no norte da África e na Espanha, a disseminação da mesma pelos países mediterrâneos deve-se principalmente, aos romanos, que o chamavam de “maçã-persa” (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

Na América o pessegueiro foi introduzido pelos conquistadores espanhóis do México, e na Flórida em 1565, pela fundação St. Augustine. Pelo fato desta espécie ser autofértil, *land races* (i.e. cultivares nativas) de pessegueiros desenvolveram-se por toda América do Norte e do Sul. Exemplos incluem os pessegueiros mexicanos conhecidos como *evergreen* que necessitam pouco ou nenhum frio hibernal ou aqueles cultivados pelos índios Navajos em áreas remotas do Arizona (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

No Brasil, o pessegueiro foi introduzido em 1532, por Martim Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas na Capitania de São Vicente, que corresponde ao atual Estado de São Paulo, segundo maior produtor do Brasil, precedido apenas pelo Rio Grande do Sul (RASEIRA; QUEZADA, 2000; SACHS; CAMPOS, 1998).

Na região Sul, em particular no Rio Grande do Sul, a cultura do pessegueiro só passou a ter importância a partir da década de 60. Antes disto, mais de 80 % do pêssego consumido era importado, sobretudo da Argentina. Foi, provavelmente na década de 50, que um agricultor notou que o pessegueiro oriundo de caroços jogados ao solo apresentava boa adaptação e produção. Esta planta foi multiplicada, recebendo o nome de “Aldrighi”, cultivar que deu grande impulso à expansão da espécie (SACHS; CAMPOS, 1998).

### 3.2 BOTÂNICA

Taxonomicamente, o pessegueiro pertence à família Rosacea, subfamília Prunoidea, gênero *Prunus*, e subgênero *Amygdalus*. As cultivares comerciais pertencem à espécie *Prunus persica* (L.) Batsch. São reconhecidas cinco espécies: *Prunus davidiana* (Carr.) Franch., *P. ferganensis* (Kost & Rjab) Kov. & Kost., *P. kansuensis* Rehd., *P. mira* Koehne e *P. persica* (L.) Batsch. Em geral, quando se menciona apenas pêssego ou pessegueiro, se refere à espécie *P. persica* (L.) Batsch (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

*Prunus davidiana* (Carr.) Franch. na China, tem sido utilizado como porta-enxerto, também sendo cultivada como planta ornamental. *Prunus ferganensis* (Kost & Rjab) Kov. & Kost. às vezes é classificada como *Prunus persica* (L.) Batsch, mas difere desta principalmente pelas nervuras alongadas e paralelas. *Prunus kansuensis* Rehd. também é utilizado como porta-enxerto na China. *Prunus mira* Koehne também é utilizada com esta finalidade em algumas regiões da China e distingue-se das outras por suas flores brancas e caroço liso (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

São conhecidas três variedades botânicas pertencentes à espécie *Prunus persica* (L.) Batsch: *vulgaris*, *nucipersica* e *platicarpa*. A variedade *vulgaris* inclui a maioria das cultivares de valor econômico, pode apresentar polpa branca ou amarela, ter uma consistência fibrosa e serve para conserva, consumo fresco ou dupla finalidade. A variedade *nucipersica* produz frutos com epiderme glabra e, geralmente, muito colorida. São as nectarineiras. A variedade *platicarpa* produz frutos de forma achatada, conhecidas por pêssegos chatos ou "peentoo" (RASEIRA; QUEZADA, 2000). Esta variedade é comprimida no sentido do eixo que

passa do pedúnculo ao ápice, sendo que devido a um fator genético dominante, toma a forma de um pequeno prato. É raramente explorada (SACHS; CAMPOS, 1998).

A família Rosaceae contempla aproximadamente 100 gêneros com 3.000 espécies, estando dispersa principalmente no hemisfério Norte do globo terrestre. O nome desta família tem base no gênero *Rosa* L., proveniente do nome latino para a flor da roseira. Apresenta muitas espécies ornamentais e produtoras de frutos comestíveis. No Estado de Santa Catarina crescem 17 gêneros, entre nativos, espontâneos e cultivados (REITZ, 1996).

O gênero *Prunus* conta ao redor de 200 espécies, alguns híbridos, inúmeras variedades, a maior parte situada no hemisfério norte, de zona temperada, tendo 8 variedades no Brasil, sendo que 6 somente no Estado de Santa Catarina. *P. persica* é uma árvoreta com até 6m, que floresce na primavera e frutifica na primavera e verão (REITZ, 1996).

Os ramos do pessegueiro são, em princípio, verdes, passando a ter, à medida que envelhecem uma coloração marrom. De acordo com a distribuição das gemas de flor, eles são classificados em mistos, brindilas, dardos ou ladrões. Os ramos mistos, de comprimento variável, entre 20 e 100 cm, são portadores de gemas de flor e lenho, terminando, geralmente, em gema de lenho. As folhas são oblongas, lanceoladas, têm pecíolos curtos e são distribuídas alternadamente. Medem, geralmente, de 40 a 50 mm de largura e de 140 a 180 mm de comprimento. As margens da lâmina foliar podem ser serrilhadas, crenadas ou dentadas. As folhas são, normalmente, de coloração verde durante o período de crescimento, havendo cultivares com folhas purpúreas ou variegadas. A coloração amarela que a folha adquire no outono é relacionada à cor da polpa do fruto. Nas cultivares de polpa amarela, as folhas possuem uma coloração de amarelo-intensa a alaranjada, enquanto, nas de polpa branca, exibem coloração amarelo clara (RASEIRA; QUEZADA, 2000, SACHS; CAMPOS, 1998). Segundo CORRÊA (1974), é uma árvore pequena, com folhas simples, alternas, lanceoladas, serreadas glabras; flores roxas brotando anteriormente às folhas; fruto tipo drupa pubescente, comestível que possui uma semente.

*Prunus persica* (L) Batsch é uma espécie importante de uma família que contém diversas árvores frutíferas como macieira (*Malus domestica* Borkh.) e a pereira (*Pyrus communis* L.), além do morangueiro (*Fragaria vesca* L.), das roseiras (*Rosa* sp. L.) e das ornamentais. Por ser diplóide com  $2n = 16$  cromossomos e um tamanho genômico relativamente pequeno (290 Mb), tornou-se a planta de escolha para ser utilizada como modelo no estudo genômico da família Rosaceae. Além disto, possui um período juvenil relativamente curto, de 2 a 3 anos, e é uma das espécies melhor caracterizadas geneticamente nesta família. Existe um consórcio entre laboratórios trabalhando em mapear o genoma de Rosaceae, com dois principais projetos em andamento (NCBI, 2005). Um deles é o Genoma Estrutural, para descobrir o mapa genético do pêssego e o outro é o Genoma Funcional, para gerar e seqüenciar em grande escala metabólitos de vários tecidos e integrá-los no mapa físico e genético do pêssego. Até o momento três trabalhos foram publicados (JUNG *et al.*, 2004; DIRLEWANGER *et al.*, 2004; DETTORI *et al.*, 2001).

### **3.2.1 Cultivares**

A cultivar é um dos componentes mais importantes do sistema de produção e um dos poucos que podem ser modificados, sem que se altere o custo de implantação do pomar. O custo é o mesmo para plantar uma cultivar bem adaptada, produtora de frutos de boa qualidade e com boa resistência a doenças, e outra cultivar sem essas características. O retorno econômico, entretanto, será, certamente, bem distinto (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

De modo geral, as cultivares de pessegueiro mais plantadas no Brasil são originárias dos programas de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em São Paulo, e da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS. Existem ainda cultivares criadas pela Estação Experimental de Taquari - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul, pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A. (EPAGRI) e pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), além de algumas cultivares de maturação precoce, criadas pela Universidade da Flórida, nos Estados Unidos, como, por

exemplo, Maravilha, San Pedro, Flordaprince e Flordasun (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

### **3.2.2 Cultivares de Dupla Finalidade**

Os preços de mercado são diretamente dependentes das oscilações de oferta e demanda dos produtos. Em períodos de supersafras normalmente obtêm-se preços muito baixos. Visando a oferecer, aos persicutores, alternativas de comercialização, a Embrapa Clima Temperado iniciou, há alguns anos, trabalhos de hibridação e seleção, objetivando a obtenção de cultivares que servissem ao duplo propósito: comercialização para consumo *in natura* e para fins industriais. Para isso, os frutos precisam ter polpa não fundente à semente, rica em sólidos solúveis, com boa aparência e com certa porcentagem de coloração vermelha na epiderme. Frutos desse tipo têm uma vantagem extra, mesmo para consumo *in natura*: a polpa não fundente, firme, resiste melhor ao transporte à distância. Como resultado do trabalho, foram desenvolvidas quatro cultivares: Eldorado, Maciel, Riograndense e Leonense (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

O sucesso na exploração de um pomar de pessegueiro depende muito de sua localização. A seguir, serão apresentados alguns aspectos a serem observados (HERTER *et al.*, 1998).

### **3.3 CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS**

As condições edafo-climáticas devem ser observadas na instalação do pomar, como clima, solo, topografia e fenômenos climáticos. O clima temperado é o ideal para o pessegueiro, sendo que os mais importantes centros comerciais situam-se entre as latitudes de 25° N e 45° S (HERTER *et al.*, 1998).

As melhores temperaturas para o pêssego no verão, durante a fase vegetativa (próxima à colheita) devem ser altas durante o dia e amenas à noite, pois estimula o aumento do teor de açúcares. Muitas cultivares produzem frutos adstringentes quando se tem um verão fresco. Grandes quantidades e qualidade de luz são necessárias para aumentar a quantidade e qualidade da produção, principalmente com relação à sua coloração. Durante a fase de repouso, o crescimento cessa, e inicia-se a



dormência, onde a planta se prepara para resistir às condições adversas de temperaturas inverniais. A planta deve passar por uma quantidade mínima de horas de frio (abaixo de 7,2° C), ou então poderá ter um florescimento desuniforme, causando o erratismo. Geralmente a necessidade fica entre 600 e 1.000 horas de frio. Geadas durante o crescimento das gemas, na floração ou na 1ª fase de desenvolvimento do fruto, constituem um dos riscos mais sérios com relação ao cultivo do pessegueiro. O florescimento acontece de acordo com a cultivar e a região, geralmente ficando entre junho e setembro, período em que as ondas de frio que seguem as frentes frias são muito freqüentes. O frio persistente poderá causar graves distúrbios tanto à polinização quanto ao processo de desenvolvimento do tubo polínico e à fusão dos núcleos (HERTER *et al.*, 1998; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

Outro ponto importante a ser considerado é a topografia do terreno, pois áreas onduladas ou encostas com declive não muito acentuado são as mais convenientes para instalação do pomar. É de grande importância uma boa exposição ao sol e elevação favorável (RASEIRA; QUEZADA, 2000; HERTER *et al.*, 1998).

O pessegueiro desenvolve-se bem em solos profundos, permeáveis e bem drenados. As raízes necessitam de boa aeração para desenvolverem suas atividades metabólicas, por isto, a drenagem é um dos principais aspectos a serem considerados na escolha do local para se produzir um pomar. O pH mais favorável está ao redor de seis, embora tenha uma boa tolerância dentro de uma faixa mais ampla (RASEIRA; QUEZADA, 2000; HERTER *et al.*, 1998). O hidrogênio protonado e o cátion alumínio são os que mais contribuem para aumentar a acidez no solo (GRAHAM, 2002). DUTRA *et al.*, (1999) verificaram que o ácido indolbutírico é eficaz para aumentar o enraizamento de estacas de pessegueiro.

Um estudo de CHIBILITI e BYRNE (1990) demonstraram que soluções com concentrações mais elevadas de alumínio (100 ou 125 mg.l<sup>-1</sup>) diminuem o acúmulo de outros elementos como o Ca, Zn, Cu, Fe e Mo, mas não afetam Mg, K e Mn em mudas de pessegueiro cultivadas em areia. Além disto, diminuem o peso seco das raízes, o comprimento dos brotos, o número de ramificações, o calibre do caule e o número de folhas. GRAHAM (2002) conduziu outro experimento, tratando ao longo

de oito semanas, mudas de pessegueiro cultivar Nemaguard com soluções de alumínio 1 mM e diferentes proporções de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$ ). O alumínio na raiz foi capaz de reduzir a concentração de glicose, frutose e de açúcares totais, mas aumentou a concentração de sacarose, embora este aumento tenha sido provavelmente devido à diminuição na biomassa das raízes, já que as concentrações de sacarose não diferiram entre si (peso seco e teor de sacarose). No caule diminuiu a concentração de glicose e frutose, e aumentou significativamente a de amido. Nas folhas as concentrações de glicose, sorbitol e de carboidratos solúveis totais diminuíram, mas a de sacarose aumentou. O alumínio aumentou o teor de prunasina na raiz, mas não teve efeito significativo no caule e nas folhas. Em suma foi verificado que o alumínio induziu a redução do crescimento vegetativo e alterou a proporção de biomassa, fazendo com que a parte aérea crescesse menos que as raízes. Também induziu uma diminuição na concentração de açúcares totais e um aumento do teor de amido. A produção de prunasina na raízes foi aumentada, e de acordo com a proporção crescente da concentração de  $\text{NH}_4^+$ , também foi aumentada no caule e nas folhas.

### **3.4. ECONOMIA**

O pessegueiro *Prunus persica* (L.) Batsch, é uma das espécies frutíferas de clima temperado que mais tem sido trabalhada e adaptada às condições de clima temperado quente ou subtropical. Ela tem hoje grandes áreas de produção comercial, principalmente entre 30 e 45° de latitude Norte e Sul e, entre as espécies de frutas de caroço, é a de maior expressão econômica mundial (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

A principal forma de comércio do pêssego é como conserva. Também é comercializado *in natura*, polpa congelada e como suco (RASEIRA; QUEZADA, 2000). Pêssego em calda, segundo a legislação alimentar brasileira, é um produto coberto com calda, depois de colocado na embalagem e, após, submetido a um tratamento térmico adequado. Também conhecido popularmente como “compota”, entretanto, compota é um produto cozido na calda e posteriormente embalado (BRASIL, 1983).

O Brasil possui um consumo anual *per capita* de 700 a 800 g de pêssego. Do total produzido anualmente (215 mil toneladas em 2004), cerca de 50 mil toneladas destinam-se à fabricação de conservas. O consumo de pêssego em conserva situa-se ao redor de 50 a 60 milhões de latas de um kg. Portanto, para atender a demanda interna, tem-se importado pêssegos *in natura* da Argentina e do Chile e pêssegos em conserva da Grécia (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

A existência de variedades criadas e adaptadas às condições climáticas do Brasil, cuja produção precoce ocorre de setembro a dezembro, poderia tornar-se importante fator econômico, pois permitiria exportação vantajosa para grandes mercados consumidores. O período de colheita das regiões produtoras do Hemisfério Norte se dá de maio a setembro, e o período das demais regiões produtoras do Hemisfério Sul inicia-se após o término das colheitas brasileiras, particularmente dos pomares localizados em São Paulo (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

Os Estados do Sul e Sudeste apresentam condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo dessa espécie, sendo fundamental a escolha de cultivares com adaptação a diferentes locais ou regiões. Entre 1997 e 2001 tem se verificado uma significativa expansão dessa cultura considerando que mais de 3,5 milhões de mudas foram comercializadas. O Rio Grande do Sul é o principal produtor do país, com cerca de 46 % da produção nacional, ocupando uma área superior a 10 mil hectares (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

#### **3.4.1 Pólo de Persicultura do Rio Grande do Sul**

O pólo de persicultura do Rio Grande do Sul é composto por três regiões: Região da Metade Sul do Rio Grande do Sul, que compreende 29 municípios e concentra mais de 90 % da produção de pêssegos destinados ao processamento no país, a Região da Grande Porto Alegre, composta por nove municípios, que produz parte da oferta de pêssegos para consumo *in natura*; e a Região da Serra Gaúcha, com 32 municípios onde o pêssego é produzido com certa expressão com tendência a expansão (RASEIRA; QUEZADA, 2000).

O Rio Grande do Sul possui uma área plantada de 19.000 ha, área em produção de 13.000 ha, produtividade de 6,15 kg/ha e produção de 80.000 toneladas. As principais cultivares são: Precocinho, Diamante, Esmeralda, Granada, Jade, Maciel, Eldorado, BR2, Chimarrita, Marli, Chiripá, Maciel, Eldorado, Jade, Leonense, Esmeralda, Granada, Cerrito, Coral e Riograndense. A época de plantio é entre junho e julho e a época de colheita entre novembro e final de janeiro (EMBRAPA, 2005; RASEIRA; QUEZADA, 2000).

Na cidade de Porto Alegre, anualmente é celebrada a colheita do pêssego com a Festa do Pêssego, sendo que em 2004 aconteceu sua 20ª edição. É uma integração de fomento do Plano de Desenvolvimento Econômico da Prefeitura, sendo promovida pela Secretaria Municipal da Produção, Indústria e Comércio (SMIC), Sindicato Rural de Porto Alegre e Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-RS). Em 2003 somente na festa foram comercializadas 75 toneladas do fruto, com um faturamento de R\$ 141.589,00 e um público de 36 mil pessoas (DIÁRIO OFICIAL DE PORTO ALEGRE, 2004).

### **3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

O pêssego contém diversos tipos de compostos fenólicos, como ácidos clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoil quínico), neoclorogênico (ácido 3-*O*-cafeoil quínico) e caféico (ácidos fenólicos), catequina, epicatequina (proantocianidinas diméricas), procianidina B1, procianidina B4, isoquercetina, quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-rutinosídeo (flavonóis) e cianidina-3-glicosídeo (antocianos) (VERSARI *et al.*, 2002; TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001; BYRNE, 2001). Também possui ácido ascórbico e betacarotenos (GIL *et al.*, 2002).

#### **3.5.1 Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários que incluem uma grande diversidade de estruturas químicas, possuindo pelo menos um anel aromático, onde ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, sendo considerados parte integral das dietas animal e humana. Dentre estes

compostos são encontradas estruturas tão variadas quanto os ácidos fenólicos, os derivados da cumarina, os pigmentos hidrossolúveis, ligninas e taninos. As estruturas fenólicas ainda são encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (ANDJELKOVIC' *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2003).

A maioria dos fenóis simples é biossinteticamente derivada da fenilalanina chegando ao ácido cinâmico (que vai originar os fenilpropanóides) ou a partir do ácido benzóico, que também é originado dos fenilpropanóides (PALIYATH, 2005). O ácido clorogênico é um dos compostos mais encontrados em espécies vegetais (HYNES e O'COINCEANAINN, 2004).

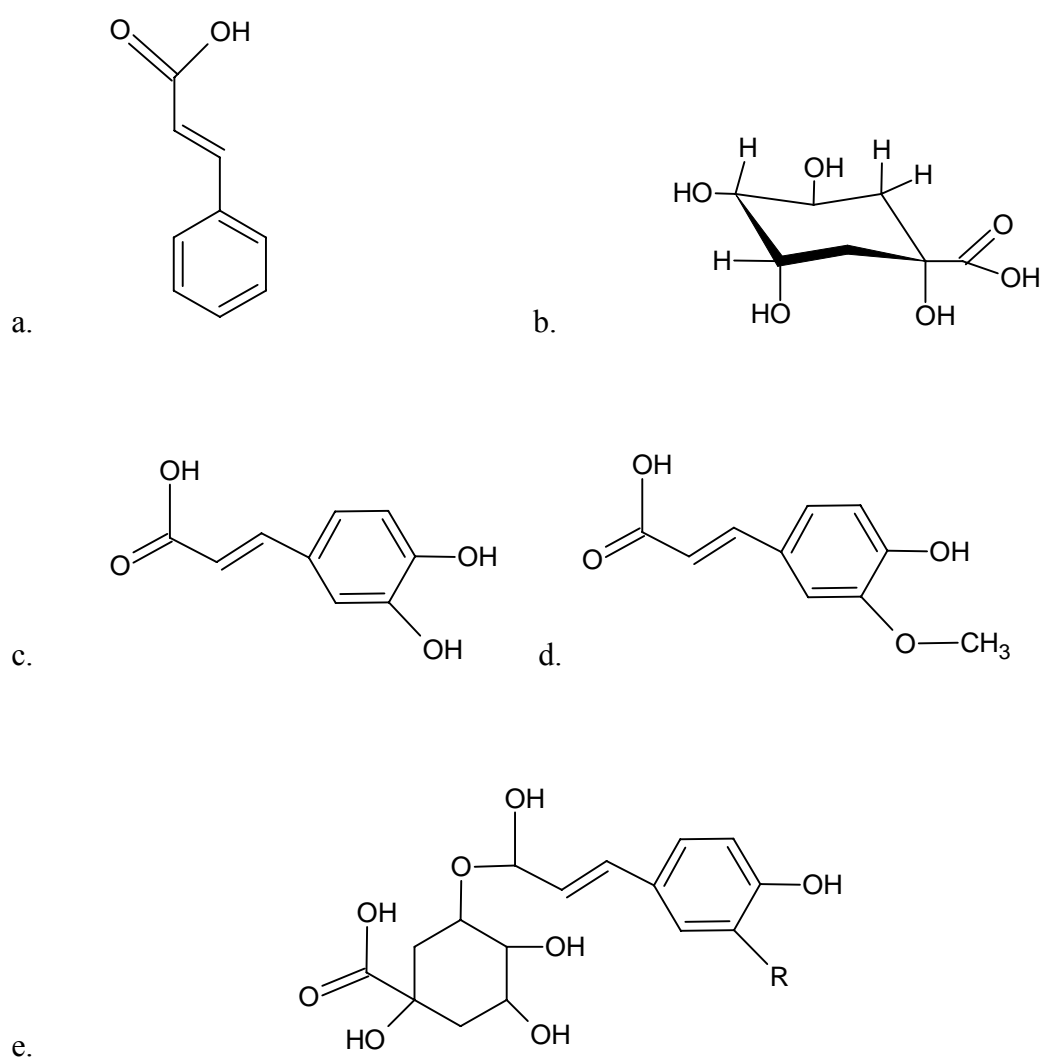
### **3.5.1.1 Ácidos Fenólicos**

Os ácidos fenólicos são estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Os ácidos fenólicos estão presentes principalmente sob duas formas em alimentos de origem vegetal: na forma livre ou forma conjugada. A conjugada é a mais comum, e pode apresentar-se como ésteres, glicosídeos e complexos conjugados (ANDJELKOVIC' *et al.*, 2006). Os ésteres são formados entre os ácidos trans-cinâmicos e ácido quínico (ácido 1 L-1(OH), 3,4/5-tetrahidroxiciclo- hexanocarboxílico) (CLIFFORD, 2003). Na figura 1 estão apresentadas as estruturas químicas de alguns de seus representantes, e na tabela 1 está apresentada a nomenclatura da IUPAC com seus correspondentes triviais.

#### **3.5.1.1.1 Ácido Clorogênico**

O ácido clorogênico é o éster que mais possui estudos sobre sua bioatividade. UN-HO *et al.* (2005) demonstraram que ele possui um efeito inibidor da metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), que é uma enzima envolvida diretamente em metástases e gênese tumoral hepática. Ela promove a proteólise principalmente do colágeno da matriz extracelular e da membrana de base, e sua expressão está diretamente ligada à evolução e invasão de células do hepatocarcinoma. Vários quimioterápicos foram desenvolvidos tendo como base a inibição desta enzima, como o BAY12-9566, o KB-R7785, o ácido hidroxiâmico da N-

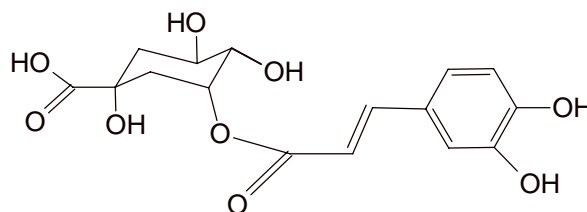
bifenilsulfonilfenilalanina (BPHA) e o MMI-166, mas apresentando severos efeitos adversos. Foi realizado ensaio *in vitro* em cultura de células de carcinoma hepatocelular, e demonstrado que o ácido clorogênico consegue uma significativa diminuição da atividade desta enzima.



**Figura 1:** Estrutura dos isômeros do ácido cafeoilquínico e feruloilquínico: a) ácido trans-cinâmico; b) D-(-)-ácido quínico; c) ácido caféico; d) ácido ferúlico; e) R = OH: ácido 5-cafeoilquínico, R=OCH<sub>3</sub>: ácido 5-feruloilquínico. A esterificação também é possível nos átomos de carbono 3,4 do ácido quínico. FONTE: MARIA e MOREIRA, 2004.

**Tabela 1:** Nomes triviais para isômeros dos ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico. FONTE: MARIA e MOREIRA, 2004.

NOMES	
IUPAC	TRIVIAL
Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	Ácido Clorogênico
Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquínico	Ácido Criptoclorogênico
Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	Ácidos Isoclorogênico, Neoclorogênico, Clorogênico (ainda bastante usado)
Mistura dos isômeros dos ácidos: 3,4-; 3,5-; 4,5- <i>O</i> -Dicafeoilquínico	Ácido Isoclorogênico



Ácido Clorogênico

**Figura 2:** Estrutura do ácido clorogênico. Fonte: CLIFFORD, 2003.

KISS *et al.* (1989) demonstraram a atividade antioxidante do ácido clorogênico ao proteger proteínas do ataque de radicais livres. Estas espécies reativas podem atacar proteínas, levando à diversas mudanças em seus aminoácidos, a sua fragmentação, agregação e conseqüente diminuição de sua atividade biológica. Como o composto fenólico tem a capacidade de quelar-se com  $\text{Cu}^{2+}$ , este mecanismo promoveria a ação antioxidante, já que o íon  $\text{Cu}^{2+}$  é um importante catalisador da formação de radicais livres.

As reações do tipo Fenton são importantes geradoras de radicais livres endógenos, e podem ser impedidas pela capacidade do ácido clorogênico de quelar-se com o íon de ferro (MORAN *et al.*, 1997). O ferro é o metal de transição mais abundante no corpo humano, é essencial para o transporte de oxigênio e diversas reações de redox (HYNES; O'COINCEANAINN, 2004). Compostos fenólicos são capazes de formar complexos com  $\text{Fe}^{3+}$ , e estão associados com uma diminuição na

absorção de ferro pelo trato digestivo (LAYRISSE *et al.*, 2000). BOYER *et al.* (1988) compararam a redução do complexo  $\text{Fe(ferrozina)}_3^{2+}$ , medindo a liberação de ferro espectrofotometricamente, por uma série de *O*-difenóis, como os ácidos caféico, clorogênico, diidrocáféico, 3,4-diidroxibenzóico e outros análogos. Foi observada uma correlação direta entre o poder de redução dos *O*-difenóis e a liberação de ferro. A superóxido dismutase, a catalase, o manitol, e os captadores de radicais em geral não tiveram efeito na proporção de remoção do ferro, entretanto, o EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e o oxalato inibiram a liberação do ferro. Foi proposto um mecanismo de redução do ferro da ferritina pelos *O*-difenóis, consistente com o observado nos experimentos.

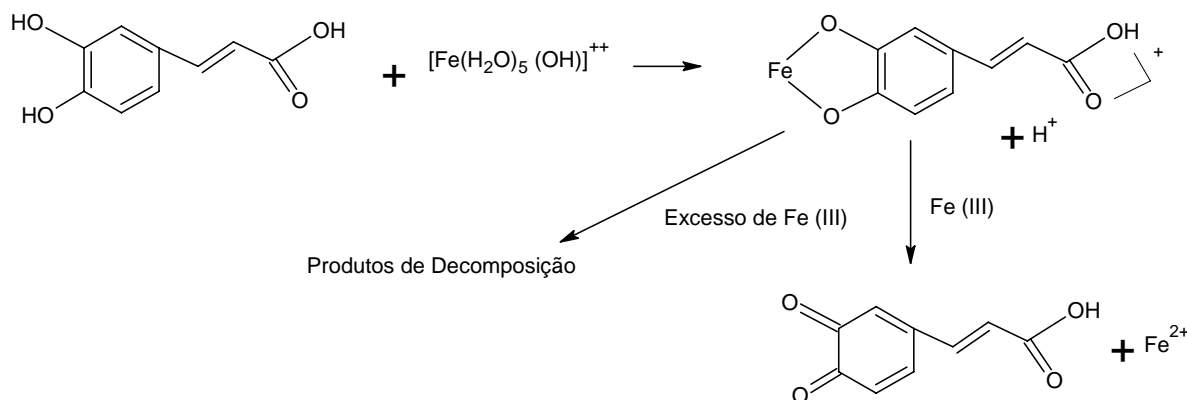
A quelação de ácidos fenólicos foi estudada por ANDJELKOVIC' *et al.*, 2006, analisando por espectrofotometria a sua quelação com ferro. Foram testados os ácidos caféico, clorogênico, gálico, protocatéuico, siríngico, vanílico e ferúlico. Todos os ácidos apresentaram capacidade quelante significativa, embora bem inferior comparada ao padrão de EDTA. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentaram uma maior quelação que os ácidos hidroxibenzóicos. Dentre o primeiro grupo, o ácido clorogênico foi o composto que apresentou a maior capacidade de formação de complexo, seguido pelo ácido caféico. No segundo grupo, o ácido gálico foi o mais forte quelador em função de seu grupamento galoil, seguido pelo ácido protocatéuico, por seu grupamento catecol.

O ácido clorogênico nos microsossomos foi capaz de inibir a peroxidação lipídica dependente de metais, sendo que seu mecanismo foi diferenciado dos flavonóides que também apresentam esta atividade. YOSHINO e MURAKAMI (1998) compararam as atividades antioxidantes de ácidos fenólicos e de flavonóides. Os ácidos clorogênico e protocatéuico (ácidos fenólicos), a baicaleína, baicalina (glicosídeo da baicaleína), quercetina e rutina (flavonóides) foram analisados incubando-se microsossomos de fígado de rato com ferro, o que levou a produção de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, que foram empregadas como marcadores da lipoperoxidação local. Os flavonóides impediram a formação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, sendo que a baicalina se mostrou o mais potente



agente antioxidante e baicaleína em uma menor proporção. A quercetina impediu a lipoperoxidação lipídica e a rutina também em menor proporção. Os ácidos fenólicos também impediram a lipoperoxidação lipídica. A substância referência de ação antioxidante empregada no estudo foi o ácido ascórbico, que apresentou a mais elevada capacidade de redução do ferro. Sabe-se que esta vitamina pode às vezes agir como um pró-oxidante *in vivo* e *in vitro* iniciando a lipoperoxidação lipídica, pela ação de seu intermediário oxidado, o ascorbato, ao reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$ . A redução do ferro também foi comparada, e foi verificado que a baicaleína e quercetina inibem significativamente esta redução, e os seus glicosídeos em menor proporção. Verificou-se que o ferro reduzido pelo ácido ascórbico foi reoxidado pelos flavonóides. Por outro lado, os ácidos fenólicos inibiram completamente a autooxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ , e também mostraram um potente efeito redutor do ferro. Assim a diferença entre os efeitos dos flavonóides dos ácidos fenólicos na sua capacidade redutora foi evidenciada, embora ambos impeçam significativamente a lipoperoxidação lipídica nos microsossomos.

HYNES e O'COINCEANAINN (2004) estudaram a cinética de ligação de ácidos fenólicos com o ferro. Verificou-se que o ácido caféico e o ácido clorogênico têm uma cinética de complexação de 2.560 e 2.559  $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivamente, e que são maiores que ácido ferúlico, naringina, ácido sinápico, ácido protocatéquico e dopamina, mas inferiores às do ácido gálico, adrenalina e catecol, com valores de 2.955, 3.130 e 3.100, respectivamente. As medições foram feitas em espectrofotômetro UV-visível, e alguns resultados confrontados em sistema CLAE-ESI-MS. Quando os ácidos caféico e clorogênico foram adicionados em excesso, a cinética da reação foi de segunda ordem, e o complexo molecular formado principalmente por transferência de elétron intracelular. Quando foi adicionado excesso de ferro, a cinética da reação foi de primeira ordem e levou à formação de produtos de decomposição, sendo que *O*-quinona foi a maior constituinte. O esquema 1 representa a quelação do ácido caféico com ferro.



**Esquema 1:** Quelação do ácido caféico. Fonte: HYNES e O'COINCEANAINN, 2004.

### 3.5.1.1.2 Análise Química

O ácido clorogênico já foi analisado por diversos métodos, como gravimetria, espectrofotometria, eletroforese capilar e cromatografias em papel, adsorção, camada delgada, gasosa com detecção por ionização de chama e espectrometria de massas e líquida de alta eficiência com detecção por UV, índice de refração e espectro de massas (MARIA; MOREIRA, 2004).

Com o desenvolvimento do sistema CLAE-UV, a partir da metade da década de 70, houve um grande avanço na análise de isômeros individuais do ácido clorogênico em extratos vegetais. As primeiras colunas utilizadas eram preenchidas com fase reversa (apolar) contendo sílica, com partículas de 40  $\mu\text{m}$ , parcialmente modificada pela ligação covalente com octadecilsilano. Essa fase estacionária confere apolaridade ao suporte, porém como a ligação química não ocorre em toda a sua extensão, uma quantidade razoável de sítios silanol permanece inalterada, permitindo a melhor separação dos isômeros dos ácidos 3-feruloilquínico e 4-cafeoilquínico. Com o desenvolvimento de fases estacionárias contendo micropartículas (5  $\mu\text{m}$ ), houve um grande avanço na análise do ácido clorogênico por CLAE. Esse tipo de fase estacionária permitiu a separação completa de todos os seus isômeros (MARIA; MOREIRA, 2004).

VAN DER STEGEN e VAN DUIJN (1980) utilizaram uma coluna de fase apolar contendo octadecilsílica, composta de micropartículas e conseguiram quantificar todos os isômeros do ácido clorogênico, dicafeoilquínico e

feruloilquínico, em extratos de café, numa única análise cromatográfica. Esses autores empregaram um gradiente de metanol em solução aquosa de citrato de tripotássio (pH = 2,5) como fase móvel. TRUGO; MACRAE apud MARIA; MOREIRA (2004) usaram condições cromatográficas similares às de VAN DER STEGEN; VAN DUIJN (1980), porém descreveram que a extração com metanol : água (40 : 60, v/v), seguida pela clarificação do extrato com reagente de Carrez (ferrocianeto de potássio + acetato de zinco), foi o método mais adequado para a extração dos isômeros do ACG em cafés torrado e solúvel. De fato, KY *et al.* (1997), comparando cinco métodos de extração de ACG presente em café, concluíram que o método de TRUGO; MACRAE *apud* MARIA; MOREIRA (2004) foi o mais adequado no que diz respeito aos parâmetros repetibilidade, precisão, rapidez e baixo custo da análise. Eles verificaram que o uso de extrações sucessivas com éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila aumentou as perdas de ácido clorogênico e não foi adequado para a análise de rotina. O uso de cartucho Sep-Pak para extração em fase sólida causou uma imprecisão na análise, já que os isômeros individuais do ácido clorogênico e ácido feruloilquínico ficaram fortemente

---

TRUGO, L. C; MACRAE, R. *Analyst*, n. 109, p. 263, 1984. *apud* MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for chlorogenic acid. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

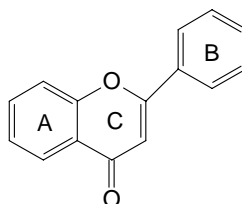
adsorvidos na matriz de octadecilsilica. Já a extração com água quente produziu a perda parcial de isômeros do grupo do ácido dicafeoilquínico.

KY *et al.* (1997) também constataram que o uso do reagente de Carrez foi fundamental para a precipitação de material coloidal, particularmente proteínas e polissacarídeos, que formam complexos com o ácido clorogênico em pH ácido. TRUGO; MACRAE *apud* MARIA; MOREIRA (2004) usaram o coeficiente de absorvidade molar de cada isômero do ácido clorogênico para determinar a concentração de cada isômero no café, baseado no fator de resposta de um padrão autêntico de ácido 5-cafeoilquínico. Esse artifício é importante, já que os isômeros puros do ácido dicafeoilquínico, feruloilquínico, 3-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico não são comercializados. O comprimento máximo de absorção para todos os

isômeros ficou entre 325-330 nm, portanto, o uso do comprimento de onda de 325 nm produziu um erro aceitável (máximo de 2%). WANG *et al.* (2004) utilizaram um comprimento de onda de 330 nm para identificar ácido caféico.

### 3.5.1.2 Flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados de origem natural. Podem encontrar-se sob diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas, ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Figura 3). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos por uma linha (‘) para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonóides por 8 a e 4 a, respectivamente (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).



**Figura 3:** Núcleo Fundamental dos Flavonóides. Fonte: ZUANAZZI; MONTANHA, 2003.

Estas substâncias são uma classe de polifenóis que possuem diversas funções nas plantas, das quais pode-se citar: proteção contra raios ultravioleta; proteção contra fungos, insetos; atraente de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios; inibição de enzimas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Ecologicamente são responsáveis pela coloração nas flores, e portanto como guia para a polinização e néctar. Alguns flavonóides só são visíveis para insetos; em Orquidaceae a marcação flavonóidica desaparece após a visita do inseto, incitando ao inseto que visite as flores não polinizadas. Outros funcionam como fitoalexinas, e outros estão envolvidos em mecanismos alelopáticos (BRUNETON, 1991).

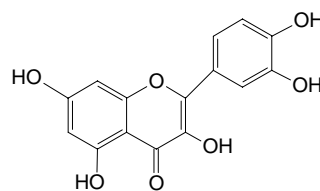
Alguns representantes da classe possuem atividades farmacológicas, como anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais e outros. Alguns medicamentos contêm flavonóides e são indicados principalmente para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão, e como cofator da vitamina C. (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003;). Podem apresentar atividade antioxidante pelo mecanismo de quelação com metais (BRUNETON, 1991).

Pode-se afirmar que os seres humanos ingerem grande quantidade de flavonóides diariamente na sua dieta. Estes metabólitos são encontrados com freqüência em frutas, em diversas espécies vegetais, no vinho, em cereais e ocasionalmente em corantes alimentares. Entretanto não há até o momento, comprovação de que estes metabólitos sejam imprescindíveis para a alimentação humana (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

RICE-EVANS *et al.* (1996), compararam relação estrutura-atividade dos flavonóides com sua ação antioxidante, demonstrando estarem associadas. HOLLMAN (1999) mostrou que flavonóides podem bloquear em grande escala efeitos enzimáticos, inclusive os que são associados à divisão celular. AMIN (2006) estudou as relações entre o conteúdo de substâncias fenólicas e sua atividade antioxidante, demonstrando sua relação. KANASHIRO *et al.* (2005) estudaram a da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos polimorfonucleados por flavonóides, evidenciando a relação estrutura-atividade.

#### 3.5.2.1.1 Quercetina

A quercetina foi obtida primeiramente da aglicona da quercetrina, e é o flavonol livre de ocorrência mais comum. Pode ocorrer nos estados livre ou ligada a diversos glicosídeos. É a aglicona da rutina (GEISSMAN, 1962; TRINGALI, 2001).

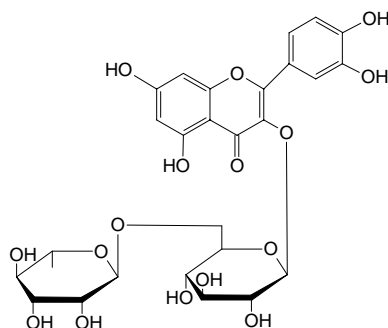


**Figura 4:** Quercetina. Fonte: TRINGALI, 2001.

É estimada uma ingestão diária entre 16 a 25 mg por pessoa (HERTOG *et al.*, 1992). KORKINA e AFANAS'EV (1996) demonstraram uma atividade inibidora de tumores. COTELLE *et al.*, (1996) demonstrou atividade antioxidante. SAIJA *et al.* (1995) demonstrou atividade *scavenger* de eletrófilos e espécies reativas de oxigênio. BALASUBRAMANIAM e GOVINDASAMY (1996) relatou a sua capacidade de inibir a incidência de papilomas e tumores bucais.

#### 3.5.2.1.2 Rutina

A rutina foi encontrada primeiramente em *Ruta graveolens* L. em 1842, e seu nome tem origem neste fato. Desde então em muitas plantas foi encontrado este flavonol. Provavelmente é o glicosídeo mais abundante, sendo constituído por quercetina glicosilada com  $\beta$ -glicose e  $\beta$ -ramnose. Suas atividades bioativas são semelhantes às da quercetina (GEISSMAN, 1962; TRINGALI, 2001). A figura 5 ilustra sua estrutura.



**Figura 5:** Rutina. Fonte: TRINGALI, 2001.

#### 3.5.3 Proteína Pru p 3

O pêsego possui diversas proteínas alergênicas, conhecidas como proteínas de transferência de lipídeos (LTP), sendo a que aparece em maior proporção a Pru p 3 (GARCIA-CASADO *et al.*, 2003; BOTTON *et al.*, 2002; PASTORELLO *et al.*, 2002). Basicamente as LTPs são polipeptídeos com aproximadamente 9 kD (90 a 95 aminoácidos) tendo um resíduo de 8 cisteínas, e uma seqüência de identidade com homologia entre 30 a 95% entre os diferentes membros. A conformação espacial caracteriza-se por uma  $\alpha$ -estrutura compacta, com 4  $\alpha$ -hélices, uma cadeia em forma

de mola terminal sendo estabilizadas por quatro pontes de dissulfeto (DÍAZ-PERALES *et al.*, 2003).

Sua função na planta ainda não está clara, mas devido à sua capacidade de transferência de lipídeos, algumas atividades foram sugeridas, dentre elas o seu envolvimento em processos abióticos, na embriogênese e na defesa, sendo que o último foi comprovado em modelos transgênicos pela interação dela com receptores elicitores, na membrana plasmática (BOTTON *et al.*, 2002). O seu mecanismo de ação se dá por meio de uma ligação com os lipídeos da membrana celular e formação de grandes agregados (BRIETENEDER; MILLS, 2005). A Pru p 3 demonstrou ser um protótipo ideal para investigação da classe LTPs em diversos estudos, em função da sua quantidade e por apresentar 90 % de indução alérgica *in vivo*, sendo um bom marcador para alergias de Rosaceae (GARCIA-CASADO *et al.*, 2003).

GARCIA-CASADO *et al.*, (2003) determinaram os epítopos da Pru p 3 no sítio de ligação com a Imunoglobulina E (IgE) e verificou que existem 3 pontos de ligação com resíduos polares distintos. Para isto foi produzida uma Pru p 3 recombinante, que demonstrou a mesma capacidade alérgica da proteína extraída da natural.

Diversos estudos sobre a hipersensibilidade cruzada entre o pêssego e outros membros da família Rosaceae foram feitos, indicando a Pru p 3 como maior responsável por estas alergias. M'RAD *et al.* (2005) compararam cinco casos clínicos de alergia associada ao pêssego em pacientes de diversas idades. Foi verificada hipersensibilidade cruzada entre o pêssego, maçã, pêra, cereja, damasco, morango, framboesa, amêndoa e avelã, cujos pacientes apresentavam em crise sintomatologias como eczema, rinoconjutivite, erupção peribucal pruriginosa, urticária generalizada, erupção eritematosa generalizada. Todos os pacientes apresentaram um aumento significativo na taxa de IgE sérica, tendo sido tomadas medidas farmacológicas paliativas para controlar os casos, à base de corticóides e anti-histamínicos. Foi sugerido que a Pru p 3 fosse a responsável pelo cruzamento de hipersensibilidade.

GIOVANINNI *et al.* (2004) estudaram vinte e dois casos clínicos de crianças com alergia ao pêssego e outros 54 frutos, com idades entre 10 e 18 anos. Foi utilizado o teste Prick cutâneo, e como referências positivas as soluções de fosfato de codeína a 9 % e cloridrato de histamina a 10 mg/ml, e como referência negativa a solução de glicerina a 50 %. A IgE dos pacientes foi doseada por método rádio-imunológico. Foi verificado que o grupo de pacientes que não era alérgico ao pêssego, geralmente não apresentava reações alérgicas a outros frutos, e os que apresentavam quadro alérgico positivo, geralmente tinham uma média de sensibilidade a outros frutos mais elevada. Foi sugerido que as LTPs são as responsáveis por este cruzamento de hipersensibilidade.

RODRIGUEZ *et al.* (2000) verificou um aumento crescente em hipersensibilidade a Rosaceae, e investigou a reatividade cruzada entre pêssego, apricot, ameixa, morango, maçã e pêra. Foram investigados 34 pacientes com histórico de alergia à família Rosaceae, utilizando o teste Prick cutâneo, *CAP system* para imunoensaio enzimático fluorescente (FEIA) e desafio alimentar aberto, sendo que para estes resultados positivos, foram feitos desafios alimentares duplo-cego e controlados com placebo. Vinte e seis pacientes reagiram positivamente ao teste Prick, e 24 reagiram positivamente a FEIA. Foram feitos 226 desafios alimentares, e verificou-se que as reações mais frequentes foram com pêssego (vinte e dois pacientes), seguidos por maçã (seis pacientes) e apricot (cinco pacientes). Dez pacientes (46 %) foram alérgicos ao pêssego e a outras Rosaceae.

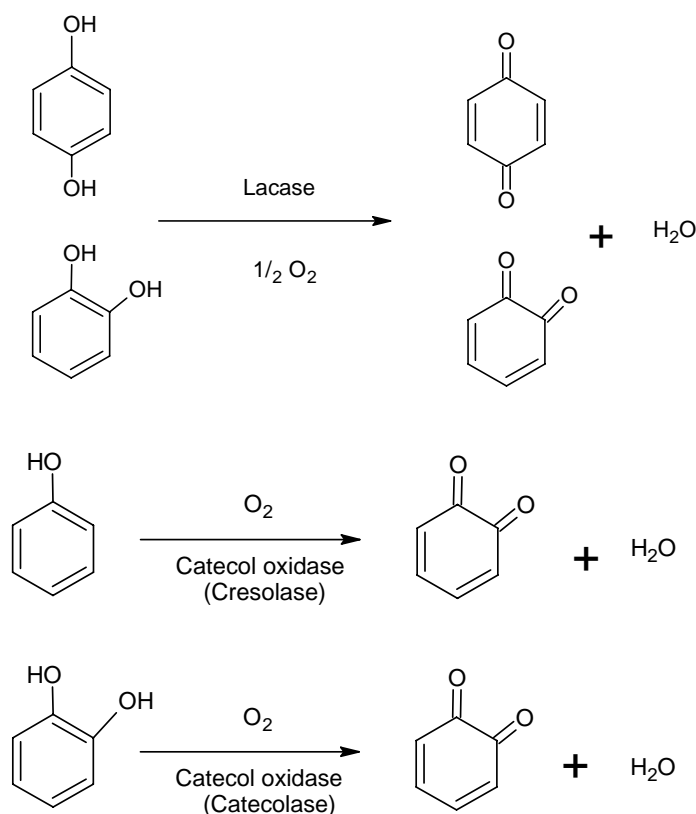
PASTORELLO *et al.* (2002) verificaram que a hipersensibilidade a *Artemisia vulgaris*, da família Asteraceae, em pacientes que possuem hipersensibilidade ao pêssego é devida a uma LTP com 64 % de homologia a Pru p 3. Para isto, foram feitos testes cutâneos de Prick com pêssego e com o extrato comercial de *Artemisia vulgaris*, teste *CAP-Rast* para anticorpos específicos IgE e desafios alimentares abertos. Foi feito um ensaio de *immunoblotting* para extrair as proteínas do pêssego e *Artemisia*, seguido por uma separação por CLAE-UV. Após identificação dos picos com alergenicidade, foi feito o seqüenciamento de aminoácidos e comparados em pesquisa de base de dados, verificando suas homologias.



### 3.5.4 Polifenoloxidase

Outra proteína relevante no pêssego é a polifenoloxidase, que é a enzima responsável pela oxidação de seus componentes fenólicos, causando o escurecimento característico de sua degradação. Ela possui dois átomos de cobre no seu sítio ativo, que são responsáveis pela catálise de fenóis a quinonas, que rapidamente são polimerizadas aos pigmentos marrons. É responsável pela defesa do fruto a herbivoria (RAPEANU *et al.*, 2006; TORALLES *et al.*, 2004; GOMES-LOPEZ, 2002; CARBONARO; MATTERA, 2001; HARUTA *et al.*, 1999).

Esta enzima existe dentro de plastídeos de vegetais superiores, geralmente ligada à membrana tilacóide de cloroplastos, embora haja uma evidência de uma forma mitocondrial, não ligada à membrana. Os compostos fenólicos são rapidamente oxidados principalmente após um dano mecânico no tecido, sugerindo que ela funcione como enzima de defesa (CARBONARO; MATTERA, 2001).



**Esquema 2:** Reações catalisadas pelas polifenoloxidases. Fonte: FRIEND e RHODES, 1981.

As polifenoloxidasas são classificadas de duas formas. A primeira divide dois grupos, as lacases (*p*-difenoil: oxigênio oxidoredutases) e as catecol oxidases (*o*-difenoil: oxigênio oxidoredutases). Ambos os grupos são chamados de monofenol monooxigenases. A segunda forma também diferencia as lacases das catecol oxidases, sendo que a diferença é que estas últimas catalisam dois tipos de reações distintas (FRIEND; RHODES, 1981). A seqüência de degradação dos compostos fenólicos geralmente se dá em duas etapas. Primeiro a *o*-hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois ou atividade cresolase (monofenol monooxigenase) e a subsequente oxidação dos *o*-difenois a *o*-quinonas ou atividade catecolase (difenoiloxigênio oxidoredutase) (RAPEANU *et al.*, 2006). Acima, no esquema 2, estão representadas as reações catalisadas pelas enzimas, de acordo com a segunda classificação.

Industrialmente é interessante o desenvolvimento de substâncias que sejam capazes de inibir esta enzima, assim prevenindo o escurecimento do produto e melhorando sua apresentação. GOMES-LOPEZ (2002) utilizou a polifenol oxidase de abacate para verificar suas propriedades bioquímicas, e verificou que as substâncias que apresentaram inibição, em ordem decrescente foram l-cisteína, ácido ascórbico, resorcinol, glicina e NaCl, e da especificidade dos seus substratos, em ordem decrescente foi 4-metilcatecol, ácido clorogênico, pirogalol, ácido caféico, catecol, dl-DOPA e ácido procatéquico. TOMÁZ-BARBERÁN *et al* (2001) mediram o teor de compostos fenólicos em pêssego, e utilizou o fluoreto de sódio como inibidor desta enzima. RAPEANU *et al.* (2006) verificou que a polifenol oxidase extraída de uvas tem como melhor substrato o catecol, e os seus melhores inibidores são o ácido ascórbico, a l-cisteína e o metabissulfito de sódio.

CARBONARA e MATTERA (2001) compararam a atividade de polifenol oxidases e o teor de ácido clorogênico e ácido caféico em pêssegos cultivados organicamente e convencionalmente. Como resultado foi encontrada uma diferença significativa, sendo que o cultivado organicamente apresentou maior atividade enzimática e teor de ácidos fenólicos, indicando que este método estimulou uma maior expressão destes compostos no fruto. A não-adição de agrotóxicos na plantação é uma prática que estimula a produção das defesas naturais da planta, e

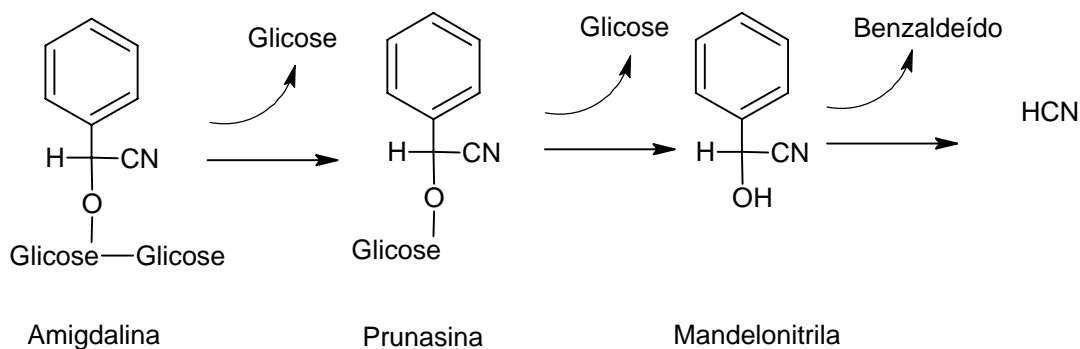
provavelmente justificaria estes teores mais elevados. Outros testes são necessários para comprovar esta hipótese, como o mesmo estudo em longo prazo e análise de outros compostos endógenos com mecanismos antioxidantes diferentes.

HARUTA *et al.* (1999) compararam as polifenoloxidasas de algumas espécies de Rosaceae (maçã, pêra e pêssego), ao clonar fragmentos de seus sítios ativos e comparar sua estrutura primária. Verificaram que são muito parecidas tanto quimicamente quanto imunologicamente, tendo uma homologia estrutural entre 85,3 e 97,5 %. Foi feita a análise imunológica por *Southern Blot*, e medida a catálise enzimática por espectrofotometria na região do ultravioleta, sendo que a atividade enzimática se mostrou mais intensa no pH 4,0 do que no 6,0.

### **3.5.5 Glicosídeos Cianogênicos**

Glicosídeos cianogênicos são metabólitos secundários definidos quimicamente como glicosídeos de  $\alpha$ -hidroxinitrilas. Originados biossinteticamente de aminoácidos, estão presentes em mais de 2.500 espécies de plantas. Sua síntese ocorre provavelmente no tonoplasto. Ao serem hidrolisados liberam o ácido cianídrico e na hidrólise enzimática liberam a aglicona e o grupamento açúcar conjugado. São classificados segundo a natureza de seus substituintes, como alifáticos, aromáticos e glicosídeos com  $\alpha$ -hidroxinitrilas livre (VETTER, 2000).

Os glicosídeos cianogênicos são substâncias que agem na defesa da planta, através da liberação de ácido cianídrico. Para que isto ocorra é necessário uma ruptura no tecido, tendo em vista que os glicosídeos e as enzimas responsáveis pela sua hidrólise se encontram em compartimentos diferentes da célula. O gênero *Prunus* é caracterizado pela produção de prunasina e amigdalina, glicosídeos cianogênicos aromáticos, que são originadas a partir da L-fenilalanina (VETTER, 2000). A toxicidade do ácido cianídrico é bem conhecida, e *Prunus* tem a capacidade de liberar uma quantidade deste ácido a partir da prunasina muito superior às necessárias para inibir processos fisiológicos (GRAHAM, 2002). Localizam-se principalmente na semente. No esquema 3 está representada a estrutura da prunasina e amigdalina.



**Esquema 3:** Degradação enzimática da amigdalina. Fonte: TUNÇEL, 1995.

A degradação destes glicosídeos origina mandelonitrila e posteriormente ácido cianídrico (TUNÇEL, 1998). Os glicosídeos cianogênicos são instáveis, podendo sofrer degradação pelo calor, enzimas vegetais e ácidos digestivos. O ácido cianídrico em animais age inibindo a respiração celular através da sua reação com o ferro trivalente das citocromo oxidases nas mitocôndrias. É considerado um dos venenos de ação mais rápida, sendo que a dose letal para o homem em cianeto de potássio está em torno de 1 mg /kg. Entretanto a intoxicação em seres humanos não ocorre de forma tão rápida em geral, já que o teor dos glicosídeos cianogênicos é reduzido pelo processamento dos alimentos, e o organismo possui mecanismos de desintoxicação como o catalisado pela rodanese, uma enzima capaz de promover a formação de tiocianato que será então eliminado pela urina e saliva (SCHENKEL *et al.*, 2003).

SANTAMOUR JUNIOR (1998) verificou a presença de dois glicosídeos cianogênicos em diversos tecidos de *Prunus*. Até o momento, sabia-se que a prunasina era encontrada em diversas partes cianogênicas da planta e também em outros gêneros e famílias, mas a amigdalina era restrita somente a semente. Verificou-se a presença em folhas de diversas espécies do gênero como *P. serotina* Ehrh e *P. virginiana* L. cv. Schubert do subgênero *Padus* e *P. ilicifolia* (Nutt. ex Hook. & Arn.) D. Dietr. e *P. lyonii* (Eastw.) Sarg. do subgênero *Laurocerasus*. A produção de amigdalina foi herdada pelos híbridos de *P. padus* L. cv. Grandiflorus e *P. virginiana* cv. Schubert.

### **3.6 ASPECTOS NUTRICIONAIS**

Em 1991, o FDA (Food and Drug Administration) publicou uma norma de rotulagem para o registro federal dos 20 frutos mais consumidos nos Estados Unidos. Neste trabalho foi descrito para um pêsego de 93 g, 40 calorias, 290 mg de potássio, 10 g de carboidrato total e 2 g de fibras dietéticas. Foi determinado que esta tabela deveria ser revisada pelo menos a cada dois anos (FDA, 2005; PENNINGTON; WILKENINGS, 1997). Já na sua revisão mais atual, um pêsego de 147 g contém 60 calorias, 0,5 g de gorduras totais, 230 mg de potássio, 15 g de carboidratos totais, 13 g de açúcares e 6 % da IDR (Ingestão Diária Recomendada) de Vitamina A (USDA, 2005).

Diversos estudos sugerem que o consumo de frutos e vegetais é benéfico para a saúde em diversos aspectos (DUYN; PYVONKA, 2000). Sabe-se que o odor e o sabor dos alimentos são fatores que influenciam na sua escolha. BABICZ-ZIELINSKA (1999) mediu a aceitação de alguns alimentos por jovens adultos poloneses e o pêsego foi um dos frutos que foi mais consumido, junto com maçã, uva, morango e cereja. Os principais fatores que influenciaram na escolha destes frutos foram identificados como o frescor, o gosto, o benefício à saúde e o preço, sendo que outros fatores como a moda, a propaganda e a conveniência para armazenagem foram os menos influentes.

#### **3.6.1 Fibras**

As fibras dietéticas são um dos componentes mais abundantes no pêsego, sendo caracterizadas por substâncias que resistem à ação das enzimas digestivas. É composta principalmente por parede celular (celulose, hemicelulose, lignina e substâncias pécicas) e componentes não-estruturais (gomas e mucilagens) (JOHNSON, 1990). As substâncias pécicas compõem até um terço da estrutura da parede celular, sendo que quimicamente são compostas por uma mistura de unidades de ácido galacturônico (PAGÁN; IBARZ, 1999).

Dietas ricas em fibras estão associadas à prevenção e tratamento de complicações como constipação, diverticulite, câncer colônico, doenças coronarianas e diabetes. A maioria da população dos países desenvolvidos consome entre 11 e 12 g de fibras diariamente, sendo que uma ingestão ideal seria entre 30 a 45 g (RAUPP *et al.*, 2004).

A fibra dietética é classificada quanto a sua dispersão em água: solúvel ou insolúvel. Cada fração possui efeitos fisiológicos diferentes. A parte insolúvel está relacionada com a absorção de água e regulação intestinal, e a parte solúvel está associada à diminuição do colesterol do sangue e diminuição da absorção intestinal de glicose. Uma proporção balanceada entre as duas seria de  $70 \pm 50$  % de insolúvel e  $30 \pm 50$  % de solúvel (GRIGELMO-MIGUEL *et al.*, 1999).

GRIGELMO-MIGUEL *et al.* (1999) estudaram pêssegos da cultivar Sudanell (Espanha) colhidos entre agosto e outubro de 1998, e verificaram a proporção 66/34 entre fibras insolúveis/solúveis. Estas apresentaram características pseudoplásticas, pela análise em viscosímetro de cilindro. A substância péctica em ambas as frações era composta de açúcares neutros, principalmente compostos de celulose e hemicelulose e ácidos urônicos. O conteúdo de minerais foi de 2,8 a 3,0 % do total de fibras dietéticas. Apresentou um baixo valor energético (de 3,494 a 3,723 kcal/g), sendo indicado para dietas com restrição calórica. O teor de proteínas estava situado entre  $5,44 \pm 0,12$  e  $6,29 \pm 0,07$  %. O teor de gorduras variou de 1,478 a 1,477 %.

PAGÁN e IBARZ (1999) estudaram as características reológicas da pectina de pêssegos de diferentes cultivares. Apresentou uma capacidade de armazenar óleos de 1 g de óleo/g de fibra, o que é uma característica interessante para aplicação funcional na indústria alimentícia, para alimentos que contenham altos teores de gordura ou como estabilizante de emulsões (KUNTZ, 1994). O gel produzido em condições onde a extração foi a mais eficiente (80° C, pH 1,2 e 60 min) apresentou comportamento Newtoniano e tixotrópico baixo, e maior facilidade de produção.

### 3.6.2 Carotenóides

Muitos alimentos são consumidos devido a presença de carotenóides, sobretudo em função de suas cores, que melhoram a aceitação do produto. São fisiologicamente importantes devido à sua atividade pró-vitamina A. A vitamina A é o nome como é conhecido o retinol, que é um álcool primário contendo um anel  $\beta$ -ionona com cadeia lateral insaturada. Quando os carotenóides são ingeridos, são clivados oxidativamente no intestino, originando duas moléculas de retinal que são absorvidas e serão convertidas em retinol. Suas funções metabólicas incluem o ciclo visual, pois a rodopsina (11-cis-retinal) é um dos componentes dos pigmentos dos cones e bastonetes. Age na diferenciação normal dos tecidos epiteliais e secreção mucosa. Nos homens ele mantém a espermatogênese e nas mulheres inibe a reabsorção fetal (CHAMPE; HARVEY, 1996). Outras funções recentemente têm sido atribuídas a eles, como inibição do câncer, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças cardiovasculares. Ao contrário de frutos tropicais nos quais os carotenóides predominam, os de clima temperado geralmente são pobres neles, com exceção de pêssego, damasco, nectarina e nêspera (GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Um estudo realizado no Instituto Adolfo Lutz (GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA 1998), caracterizou a composição de carotenóides em nectarinas e sua atividade pró-vitamina A pela 1ª vez no Brasil. Foram identificados 11 carotenóides, sendo que entre parênteses está a sua respectiva atividade pró-vitamina A: 13-cis- $\beta$ -caroteno (53 %), trans- $\beta$ -caroteno (100 %), 9-cis- $\beta$ -caroteno (38 %),  $\zeta$ -caroteno, neocriptoxantina (59 %), trans- $\beta$ -criptoxantina (57 %), luteína, zeaxantina, violaxantina, mutatoxantina, auroxantina e um não identificado. O carotenóide que estava em maior concentração foi a trans- $\beta$ -criptoxantina, com concentração total de  $3,9 \pm 0,7$   $\mu\text{g/g}$  de fruto. O conteúdo médio encontrado foi de  $9,6 \pm 0,7$   $\mu\text{g/g}$  de fruto, com uma atividade pró vitamina-A de  $54 \pm 5$  equivalentes de Retinol/100g. BUREAU e BUSHWAY (1986) encontraram  $0,5$   $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno e  $0,3$   $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -criptoxantina em nectarinas. Como estes autores não saponificaram as amostras, os

ésteres de  $\beta$ -criptoxantina, que são a forma predominante em frutas, não foram quantificados, o que pode explicar a diferença entre os dois ensaios.

### **3.6.3 Ácido Ascórbico**

O ácido ascórbico é conhecido popularmente como vitamina C, e possui atividade metabólica de coenzima de reações de hidroxilação e principalmente como antioxidante (CHAMPE; HARVEY, 1996). BEHRENS e MADÈRE (1994) determinaram a presença do ácido ascórbico e derivados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), em um estudo que abrangeu diversos alimentos comerciais, como pêssegos enlatados, sucos de frutas, marmeladas de pêssego e alguns alimentos para bebês. O conteúdo nos pêssegos enlatados variou de 1,1 a 28,5 mg/100 g. As marmeladas de pêssego variaram de não detectado a 49,0 mg/100g. Sucos apresentaram de 33,5 a 43,0 mg/100 g. Em alimentos para bebês, variou de 39,7 a 48,0 mg/100 g. Foram encontrados os ácidos ascórbico, desidroascórbico e D-isoascórbico nos produtos pesquisados.

### **3.6.4 Minerais**

O pêssego contém diversos minerais, de acordo com o estudo de BAŞAR (2006). Nas cultivares Redhaven, Glohaven e J. H. Hale, que representaram maturações no início, meio e fim de temporada respectivamente, foram encontrados em diferentes concentrações N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Cr, Ni, Co e Pb. Os teores foram mais elevados nas folhas do que no fruto.

### **3.6.5 Semente**

RAHMA e EL-AAL (1988) verificaram que a semente do pêssego contém 54,5 % de óleo e 27,5 % de proteínas. Na fração lipídica total, 98 % dela é constituída de triglicerídeos, 1,1 % de lipídeos polares e 0,41 % de esteróis. Destes ácidos graxos, o ácido oléico (63,8 %) foi o mais abundante, o linoléico (15,4 %) e os restantes 20,7 % com ácidos graxos saturados. Na fração protéica, a principal proteína encontrada foi a albumina (60 %), compostos não protéicos nitrogenados (17 %), globulinas (9,5 %), gluteínas (8,2 %) e prolaminas (6,0 %).



Um estudo da composição nutricional do pêssego *in natura* feito pelo USDA (United States Department of Agriculture) foi incluído no *National Nutrient Database for Standard Reference* em 2005 (USDA, 2005), e está apresentado nos Anexos 1 a 6.

### **3.6.6 Alimento Funcional**

Nos últimos anos, a ciência da nutrição, que tradicionalmente vem se concentrando em identificar uma dieta balanceada, tem enfatizado uma dieta com nutrição “otimizada”, maximizando a expectativa de vida e qualidade, ao identificar componentes em alimentos que, quando adicionados a uma dieta balanceada, aumentam a capacidade de resistência às doenças e promoção da saúde (ALZAMORA *et al.*, 2001). Um documento da Comissão Europeia Concentrada em Ação à Ciência de Alimentos Funcionais (FUFOSE) propôs a seguinte descrição: “um alimento pode ser utilizado como funcional se demonstrado afetar satisfatoriamente uma ou mais funções do corpo, além dos efeitos da nutrição adequada, de forma que seja relevante, tanto para melhorar o estado de saúde ou para reduzir o risco de doenças. Um alimento funcional deve permanecer alimento e demonstrar seu efeito em quantidades que normalmente seriam consumidas na dieta, não em cápsula ou em pílula, mas na forma de um alimento normal” (DIPLOCK *et al.*, 1999).

De acordo com a Resolução nº 19 de 30 de Abril de 1999 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sobre o registro de alimentos funcionais está proposto que “alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999). Existem outras definições, mas em geral podem abranger comidas e bebidas, às quais algum componente funcional é encontrado ou adicionado. Este componente possui um papel fisiológico específico no corpo, o qual tem o potencial para conferir benefício à saúde (RANSLEY *et al.*, 2001).

Os primeiros alimentos funcionais foram desenvolvidos no Japão na metade da década de 1980, onde o crescimento demográfico voltado a uma população com mais idosos gerou uma maior ênfase na prevenção de doenças crônicas. Existem vários destes produtos à venda, entre eles podem-se citar pães enriquecidos com ácido fólico ou com óleo de primula, ovos ricos em ácidos graxos ômega-3, iogurtes contendo esteróis ou enriquecidos com *Lactobacillus* e vinhos com maiores quantidades de resveratrol (RANSLEY *et al.*, 2001).

O mercado mundial de alimentos funcionais foi estimado em 47,6 bilhões de dólares, sendo os Estados Unidos o maior mercado, seguido da Europa e Japão (SLOAN, 2005). Em 2000, estimou-se em mais de 300 milhões de libras as vendas do Reino Unido. Existe a expectativa de contínuo crescimento deste mercado com novos produtos e ingredientes funcionais (RANSLEY *et al.*, 2001).

SLOAN (2005) define 10 aspectos desejáveis para alimentos funcionais, tendo em vista que o mercado de alimentos funcionais ser o que mais se expande no mundo. A rapidez do preparo, facilidade de comprar e transportar para consumir em outro local (casa, trabalho), ser saudável, atraente, ter um bom sabor entre outros. Citou produtos como o iogurte enriquecido com esteróis de plantas que regulam a pressão arterial, o cereal de café da manhã que diminui a pressão arterial e o colesterol, o chocolate enriquecido com um mínimo de 100 mg de flavonóides do cacau e leite com o dobro de cálcio que o normal que estão sendo comercializados e nos Estados Unidos.

Algumas estratégias de desenvolvimento de alimentos funcionais atualmente estão sendo desenvolvidas. ALZAMORA *et al.* (2005) estudaram a aplicação de matrizes vegetais impregnadas com compostos biologicamente ativos, em matrizes relativamente porosas. O processo de impregnação foi feito à pressão atmosférica, à vácuo e a uma combinação dos dois intercalados. Utilizando pressão atmosférica, o composto foi transferido para dentro da célula através de uma solução concentrada, em um processo conhecido como difusão dirigida, onde a estrutura celular funcionou como uma membrana semipermeável. Utilizando o vácuo, o ar foi extraído dos

poros, e quando voltou à pressão normal, a solução de impregnação penetrou nas células por capilaridade e pelo gradiente de pressão.

Um exemplo de aplicação desta técnica seria a impregnação de maçã com o probiótico *Bifidobacterium* Bb12 à vácuo (MAGUIÑA *et al.*, 2002). O fruto foi impregnado com uma solução de sacarose isotônica contendo aproximadamente  $7,95 \log_{10}$  UFC/g do microorganismo com cinco níveis diferentes de vácuo (101, 125, 225, 325 e 425 mmHg). As melhores incorporações verificadas foram com 101 e 125 mmHg, mas em todos os casos os microorganismos foram incorporados com um nível mínimo de  $10^7$  células/g.

Outro exemplo seria o estudo da incorporação de minerais feito por ALZAMORA *et al.* (2001). A impregnação de cálcio no tecido parenquimatoso de maçãs foi feita, utilizando pedaços de maçã cilíndricos com diâmetro e comprimento padronizados. Estes foram imersos por convecção forçada à temperatura ambiente, com uma solução contendo 5,24 % de sais de  $\text{Ca}^{2+}$  e isotônica com glicose, variando o tempo de imersão e a pressão submetida (vácuo e pressão atmosférica). Foi verificado que as técnicas de impregnação foram válidas para a impregnação do  $\text{Ca}^{2+}$  nas maçãs, sendo promissoras formas de produzir alimentos funcionais.

Os antioxidantes são considerados uma categoria de substâncias não nutrientes, mas com papel fisiológico na manutenção de funções normais do organismo. Os alimentos que contém substâncias antioxidantes são promissores de uma qualificação como alimento funcional (RANSLEY *et al.*, 2001).

### **3.7 PATOLOGIAS**

A carcinogênese pode ter etiologia em danos específicos ao DNA (ácido desoxirribonucléico). Estima-se que as espécies reativas de oxigênio causem cerca de 10.000 modificações de base no DNA diariamente em cada célula. Os mecanismos do ataque dos radicais livres no DNA são muito complexos. Citam-se lesões na cromatina, modificações nas bases nitrogenadas, açúcares, *cross-links* de nucleoproteínas e lesões básicas estruturais. O radical hidroxila reage com as bases

do DNA por adição ou abstração de elétrons. Pode reagir com purinas e pirimidinas gerando diversos produtos de adição. A detecção dos produtos de degradação específicos de metabólitos do DNA é provavelmente a melhor evidência da formação da OH<sup>•</sup> *in vivo* (WCRF, 2005; RANSLEY *et al.*, 2001).

VIZZOTO (2005) verificou a atividade de inibição do crescimento invasivo de células de câncer de mama a partir de antioxidantes fenólicos selecionados de pêssego e ameixa. Foi verificado que um extrato contendo ácidos fenólicos como o clorogênico e o caféico foi o mais efetivo para reduzir a viabilidade celular nas linhagens cancerosas, comparando com outros extratos contendo antocianos monoméricos, flavonóides e compostos polimerizados.

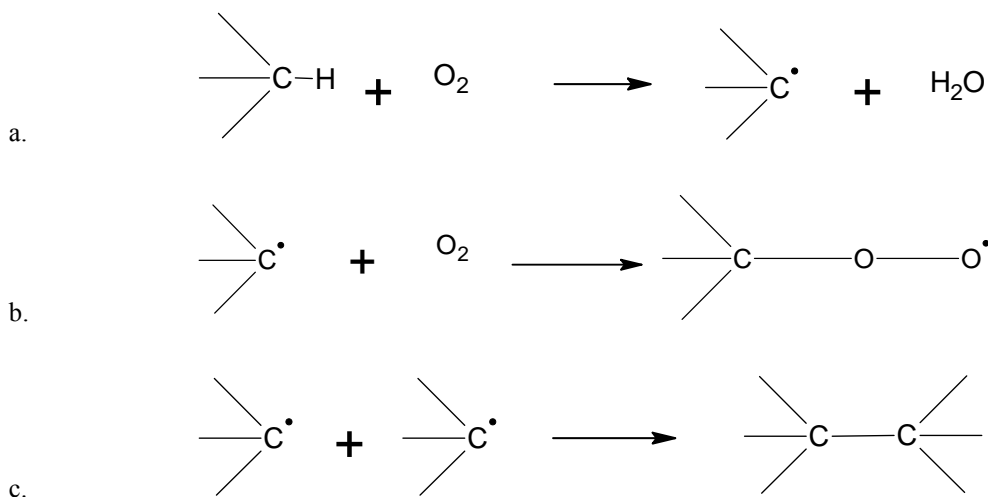
UN-HO *et al.* (2005) verificaram que o ácido clorogênico seria um elemento de grande importância contra estes mecanismos. Foi visto que ele inibe fortemente a metaloproteinase-9, que é uma enzima proteolítica diretamente relacionada com o avanço de metástases. Ela age degradando o colágeno da matriz extracelular e a membrana de base, tendo em vista que é o principal componente destas barreiras. Alguns fármacos foram desenvolvidos com a finalidade de inibir esta enzima, como o Batimastat/BB-94 e Marimastat/BB-2516, mas todos contam com efeitos adversos graves no músculo esquelético, tornando necessário o uso de uma associação medicamentosa que os diminua. O ácido clorogênico induz a apoptose em células de câncer oral e tumor nas glândulas salivares, e carcinogênese induzida por metilazoximetanol.

SOTILLO *et al.* (2006) estudaram a interação do ácido clorogênico com o metabolismo da glicose. A diabetes mellitus tipo II é caracterizada pela elevação na glicose sérica, caracterizada por perturbações no metabolismo da insulina, distribuição mineral e atividade enzimática, como da glicose-6-fosfatase. Foi investigada a interação do ácido clorogênico com esta enzima. Em células microsossomais hepáticas ela apresentou uma inibição significativa, ao ser incubada com o ácido clorogênico. Os resultados indicam que haveria um sinergismo entre o ácido fenólico com a insulina, embora estes sejam estudos preliminares.

### 3.7.1 Radicais Livres

O radical livre é uma molécula de existência independente ao sistema em que se inclui e que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Isto acontece quando um elétron ocupa sozinho um orbital molecular. São formados quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron de cada par dividido permanece em cada átomo, ficando desemparelhados, em um processo conhecido como cisão homolítica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Quando este radical livre entra em contato com uma molécula que não é um radical, inicia-se uma reação em cadeia, geralmente tendo um efeito deletério *in vivo* (Esquema 4). Por exemplo, quando há um ataque nas cadeias laterais de ácidos graxos estruturais de membrana ou de lipoproteínas, eles podem perder um hidrogênio, formando um radical carbono. Geralmente reagem com O<sub>2</sub> para produzir os radicais peróxidos que propagam a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Na ausência de O<sub>2</sub> os radicais carbonos podem se entrecruzar formando uma ligação covalente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



**Esquema 4:** Formação de radical carbono (a), peroxidação (b) e entrecruzamento (c). Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999.

Normalmente os radicais livres são produzidos pelo organismo em diversos níveis, como no transporte mitocondrial de elétrons, no retículo endoplasmático, na

membrana nuclear e no sistema imunológico. Estima-se que uma pessoa de 70 kg produza durante um ano o equivalente a 1,7 kg do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Em função disto existe a necessidade de um equilíbrio entre a sua produção e sua eliminação, e isto acontece com os sistemas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

### 3.7.3 Outras atividades

Algumas outras atividades farmacológicas para *Prunus persica* (L.) Batsch foram estudadas. ANWAR *et al.* (2000) relataram que no Paquistão suas flores são utilizadas como purgativas e o decocto das folhas é utilizado como antihelmíntico e sedativo, sendo conhecido localmente como *Aaroo*. Foi testada a atividade farmacológica de extratos das folhas para estimular espasmodicamente a musculatura intestinal *in vivo* em coelhos e porcos da guiné e *ex vivo* utilizando segmentos de jejuno de coelhos e íleo de porcos da guiné e com  $K^+$ , para verificar se esta atividade não seria derivada de um bloqueio nos canais de  $Ca^{2+}$ . Os resultados indicaram a presença de dois componentes nas folhas, sendo que um com atividade espasmogênica (colinomimética) e um com atividade espasmolítica (antagonista do cálcio), sendo que a primeira é dominante sobre a segunda. Foi demonstrado que as folhas têm atividade laxativa, para a qual a planta tem sido utilizada tradicionalmente.

MISHRA e DUBEY (1990) estudaram 15 plantas para suas atividades antifúngicas, e o óleo das folhas de *Prunus persica* (L.) Batsch foi capaz de inibir completamente o crescimento do micélio de *Aspergillus flavus*. Este óleo foi extraído como óleo essencial e teve atividade com uma concentração mínima de 0,1 %. Não apresentou fitotoxicidade para linhagens de trigo.

## 3.8 VALIDAÇÃO

A validação tem como objetivo demonstrar que um método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou

quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003). Os testes mais comumente validados são qualitativos, quantitativos para impurezas, ensaio-limite para impurezas e quantitativos para substâncias ativas em medicamentos (FDA, 2001; ICH, 1996).

São necessários os seguintes parâmetros para que se defina um método como validado: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez. Para métodos bioanalíticos também deve ser incluída a análise de recuperação (BRASIL, 2003).

### **3.8.1 Especificidade**

A especificidade é um parâmetro utilizado no processo de validação para demonstrar a capacidade do método de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para validação de uma análise qualitativa é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos, preferivelmente em relação ao material de referência conhecido.

Para validação de análises quantitativas e análises de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiver disponível, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado.

Para validar um método cromatográfico devem ser tomadas as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (como por exemplo, a utilização de detector de arranjo de

fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

### **3.8.2 Linearidade**

A linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deve-se realizar a transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99. Deve-se apresentar as curvas obtidas experimentalmente e a resultante do tratamento matemático (BRASIL, 2003).

### **3.8.3 Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

#### **3.8.3.1 Repetibilidade**

A repetibilidade também é conhecida como precisão intra-corrída, e avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.



### **3.8.3.2 Precisão intermediária**

A precisão intermediária também é conhecida como precisão inter-corridas, e avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária é recomendado um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

### **3.8.3.3 Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade também é conhecida como precisão inter-laboratorial, e avalia a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \text{DP/CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com o método empregado, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

### **3.8.4 Limite de Detecção**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor

de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc.). No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LD = DP_a \times 3 / IC$$

em que  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

### 3.8.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado principalmente para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas, e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

$$LD = DP_a \times 10 / IC$$

em que:  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo três curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração. Também pode ser determinado por

meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003).

### **3.8.6 Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Vários métodos para a determinação da exatidão estão disponíveis, como para análise de fármaco, de forma farmacêutica e das impurezas.

#### **3.8.6.1 Fármaco**

Para analisar um fármaco, aplica-se o método analítico proposto na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência). No caso de não haver este padrão referência, compara-se com os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (CME) e a concentração teórica (CT) correspondente (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = \text{CME} / \text{CT} \times 100$$

#### **3.8.7 Recuperação**

É o parâmetro que mensura a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da

comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (CME) e a concentração teórica (CT) correspondente (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = \text{CME} / \text{CT} \times 100$$

### 3.8.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento do método, deve-se considerar a sua avaliação. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

## 3.9 ANÁLISES REALIZADAS COM PÊSSEGOS

O método utilizado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) em seus estudos foi um sistema de CLAE acoplado com detector DAD, com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (150 × 4,6 mm d.i.; tamanho de partícula 5 µm) contendo pré-coluna preenchida com a mesma fase estacionária. Utilizou-se quatro módulos de gradiente de baixa pressão para misturar as fases móveis, compostas de metanol 5 % + água 95 % (A), metanol 12 % + água 88 % (B), metanol 20 % + água 80 % (C) e metanol (D), com ácido fórmico 5 % adicionado tanto na água quanto no metanol para aumentar a resolução do pico. A eluição iniciou com 100% de A isocrático por 5 min, então um gradiente linear foi aplicado para chegar até 100% de B em 10 min, que permaneceu isocrático por mais 3 minutos. Dos 13 aos 35 min foi utilizado um gradiente linear para atingir 75% de B e 25 % de C, e então dos 35 aos 50 min outro gradiente para atingir 50 % de B e 50 % de C, e 100 % de C até 52 min, que se manteve isocrático até 57 min. A coluna era finalmente lavada com 100 % D em 60 min. A velocidade de fluxo utilizada foi de 1 ml/min, e os cromatogramas foram gravados com 510, 340

e 280 nm. Estas condições foram comparadas com algumas variações, de sorte a estabelecer um método ótimo para ser aplicado no laboratório.

Outro método de quantificação de ácido clorogênico em pêssegos por CLAE foi o de VIZZOTTO (2005), que utilizou um sistema CLAE acoplado com detector DAD com coluna em fase reversa C<sub>18</sub> (Atlantis® 150 × 4.6 mm d.i.; tamanho de partícula 5 µm) contendo uma pré-coluna preenchida com a mesma fase estacionária, utilizando um gradiente de eluição com fluxo 1 ml.min<sup>-1</sup> por 30 min. A fase móvel consistia em água ultrapura acidificada até pH 2,3 com HCl (solução A) e acetonitrila grau CLAE (solução B). A eluição foi isocrática entre 0 e 5 min com 85 % A e 15 % B. O gradiente foi dos 5 aos 30 min e terminou com 100 % B, seguido por eluição isocrática entre 30 e 35 min com 100 % A e 0 % B para reequilibrar a coluna. A temperatura da coluna foi mantida a 35° C e o volume injetado de 10 µL.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

## **4.1 MATERIALS**



#### **4.1.1 Amostras Vegetais**

Foram empregadas 13 cultivares de pêssegos descritos a seguir.

- Ametista
- Aurora 1
- Aurora 2
- Conserva 594
- Dourado
- Granada
- Morro redondo
- Precocinho
- Sensação
- Sunblaze
- Tropic Beauty
- Tropic Blush
- Turmalina

#### **4.1.2 Materiais**

- Etanol 96 %;
- Metanol P.A.;
- Membrana PVDF (Difluoreto de polivinilideno) - 0,45  $\mu\text{m}$  de 13 e 33 mm (Millipore);

- Metanol grau CLAE (MERCK®);
- Água destilada;
- Água ultrapura;
- Acetonitrila grau CLAE (MERCK®);
- Ácido trifluoroacético (ATF);
- Coluna em fase reversa (Waters®, Nova-Pak C<sub>18</sub>, 3,9 x 150 mm; lotes: W90181F059 e T60952957);
- Solução referência de ácido clorogênico (Biomedical®);
- Solução referência de ácido caféico (Fluka®);
- Solução aquosa de hexacianeto de ferro 15 %;
- Solução aquosa de sulfato de sódio 30 %;

#### **4.1.3 Equipamentos**

- Balança de precisão (Marte® AS 500 C);
- Balança de precisão (Bel Mark® U 210 A);
- Balança de precisão (Crystal® 200 Gibertini);
- Balança de secagem por infravermelho (Bel Mark® Top Ray Page);
- Mixer (Braun® 4169);
- Centrífuga (Excelsa® 206 BL);
- Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Waters® 2695 – Separations Module)
- Detector de Absorção Ultravioleta Dual (Waters® 2487);

- Detector de Absorção Ultravioleta por Arranjo de Fotodiodos (Waters® 996);
- Ultrassom (Elma® Transsonic T460).

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Otimização**

Os métodos utilizados por VIZZOTTO (2005) e TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) foram otimizados, testando-se seus parâmetros principais frente a variações e condições disponíveis no laboratório. Foram modificadas as condições de extração e o sistema CLAE-UV.

#### **4.2.1.1 Amostras**

Os frutos foram obtidos da EMBRAPA Clima Temperado, de Pelotas, RS. Após colheita, identificação quanto a cultivar, foram triturados em liquidificador, ensacados em cinco pacotes com cinco frutos cada, congelados a  $-18^{\circ}$  C e transportados até Porto Alegre. O transporte foi feito por carro (cerca de 3 h), dentro de recipientes com gelo.

#### **4.2.1.2 Extração Preliminar**

O método utilizado por VIZZOTTO (2005) foi feito pesando-se exatamente, cerca de 100 g de pêssego fresco e adicionando-se 300,0 ml de metanol P.A., posteriormente homogeneizando-se com auxílio de misturador ultraturrax. Os tubos foram tampados e colocados em geladeira entre 2 a  $4^{\circ}$  C *overnight* e, em seguida centrifugados por 20 minutos a 15.000 rpm a  $2^{\circ}$  C. O sobrenadante foi evaporado em rotavapor a  $40^{\circ}$  C e 240 mbar de pressão até a secura completa e então ressuspenso em água ultrapura. As amostras foram então congeladas a  $-80^{\circ}$  C e *freeze-dried* a  $-50^{\circ}$  C com 200  $\mu$ Hg de pressão.

O método utilizado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) em seus estudos empregou extratos metanólicos de pêssego, para serem injetados no sistema

cromatográfico. Consistia em pesar as amostras de pêssego recebidas congeladas, exatamente, cerca de 5,0 g e adicionar 10,0 ml de uma solução contendo água deionizada e metanol P.A. 2:8, contendo 2 mM de fluoreto de sódio deixando-se macerando em gelo até centrifugação. Os extratos eram então centrifugados por 15 minutos a 11.500 rpm, de 2 – 5° C. O sobrenadante era retirado cuidadosamente para evitar contaminação, e uma porção de aproximadamente 1 ml deste extrato era filtrado em membrana hidrofílica 0,45 µm, e diretamente introduzido em sistema CLAE-UV, não excedendo um máximo de 24 h até o momento da análise.

As embalagens após serem recebidas no laboratório foram pesadas, numerados e homogeneizadas com auxílio do Mixer por 2 minutos. Para a otimização deste método, foi empregado um extrato preliminar denominado de **solução EP1**, que foi produzido pesando-se exatamente, cerca de 1,0 g de *Prunus persica* cv. Morro Redondo em 10,0 ml de metanol P.A.

#### **4.2.1.3 Análise em CLAE**

Com base nos métodos encontrados em literatura descritos no item 3.9, foram realizados diversos testes, para se obter um sistema otimizado. Os parâmetros analisados foram: composição do eluente, sistema de eluição, velocidade do fluxo e comprimento de onda.

##### 4.2.1.3.1 Composição do Eluente

Para testar a composição do eluente que melhor separasse as substâncias presentes no extrato preliminar EP1, conforme descrito no item 4.2.1.2, foram feitas análises no sistema CLAE-UV com diversas composições de solventes. Foram testados acetonitrila e metanol com grau HPLC, como solventes orgânicos, água deionizada ultra-pura e ácido trifluoroacético. Esta análise foi feita em conjunto com a definição do sistema cromatográfico.

##### 4.2.1.3.2 Sistema Cromatográfico

Para definir qual o melhor sistema cromatográfico para separar os compostos presentes no extrato preliminar EP1, testou-se o sistema utilizado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001), observando-se parâmetros como resolução cromatográfica, tempo de análise e quantidade de fase móvel utilizada. Testou-se sistemas com eluição isocrática e gradiente linear.

#### 4.2.1.3.3 Velocidade do Fluxo

Durante a seleção do sistema cromatográfico, tornou-se necessária a definição da velocidade de fluxo da fase móvel. O critério utilizado para definir esta velocidade foi obter a melhor resolução cromatográfica com a menor velocidade possível. Utilizou-se o sistema de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) como padrão, que determinava um fluxo de 1 ml/min, e testou-se de 0,5 a 1 ml/min.

#### 4.2.1.3.4 Comprimento de Onda

Para determinar o comprimento de onda ideal para quantificar a substância química de referência, utilizou-se a solução referência de ácido clorogênico 1 mg/ml em sistema CLAE-DAD, de forma que o pico cromatográfico fosse analisado em comprimentos de onda variados. O método de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) utilizou comprimentos de onda de 325 e 340 nm para quantificar o ácido clorogênico, e VIZZOTTO (2005) empregou 280 nm para quantificar compostos fenólicos em geral. Com base nestes dados, uma amostra foi testada alterando-se os comprimentos de onda entre 320 e 335 nm.

#### 4.2.1.3.5 Parâmetros de Eficiência Cromatográficos

Para verificar a adequação e eficiência do sistema cromatográfico, foi realizado uma análise da solução EP1 e, em seguida, calculados os seguintes parâmetros de acordo com suas fórmulas:

##### 4.1.2.3.5.1 Tempo de retenção

É o tempo onde o pico da substância em análise aparece. É característico da substância analisada, pode ser considerada como indicativo da identidade da substância, mas é insuficiente para garantir a total caracterização da amostra.

#### 4.1.2.3.5.2 Número de pratos teóricos

É indicativo da eficiência da coluna. Expressa em número de pratos teóricos por coluna, foi calculada segundo a expressão:

$$N = 16 \times (t/W)^2$$

Onde:  $t$  = tempo de retenção da substância analisada;

$W$  = largura do pico na linha de base.

#### 4.1.2.3.5.3 Fator cauda

É indicativo da assimetria do pico, apresenta valor igual a um quando o pico é perfeitamente simétrico. Este valor aumenta à medida que ocorre arrastamento do pico, e valores inferiores a um também podem ser observados. Foi calculado segundo a expressão:

$$T = W_{0,05}/2f$$

Onde:  $W_{0,05}$  = largura do pico a 5 % da altura;

$f$  = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5 % da altura.

### **4.2.1.4 Condições de Extração**

#### 4.2.1.4.1 Preparo das Soluções Extrativas

Após a definição da melhor técnica de análise cromatográfica com um extrato preliminar, foram realizados alguns testes para a verificação dos seguintes itens:

- proporção entre material vegetal e solvente;
- solvente extrator (proporção de solvente orgânico);

- método de extração, testando-se diferentes extrações por maceração em geladeira, sonicação e turbólise;
- purificação do extrato, utilizando-se um método químico (reagente de carrez) e dois físicos (centrifugação e pré-filtração);
- conservação dos extratos, utilizando um método químico (fluoreto de sódio) e dois físicos (papel alumínio e geladeira).

As condições de extração foram definidas utilizando apenas amostras de *Prunus persica* (L.) Batsch cv. Morro Redondo fornecidas pela EMBRAPA Clima Temperado. Todas as soluções a serem testadas, antes de serem injetadas em triplicata no sistema cromatográfico de CLAE-UV que já havia sido previamente otimizado, foram filtradas com membrana de PVDF (0,45 µm).

#### 4.2.1.4.1.1 Proporção entre planta e solvente extator

Para verificar a melhor proporção entre as quantidades de amostra vegetal e a de solvente, foram pesadas diferentes quantidades do material vegetal (1 a 5 g) mantendo-se constante o valor do solvente extrator (20,0 ml), deixando-se macerar em geladeira entre 8 e 12 h, sendo posteriormente centrifugado a 2.000 rpm por 15 min, com 30 segundos de aceleração e 30 segundos de frenagem. Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF com 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. Foi definida como ótima quando o teor da substância química de referência não aumentava, a medida que aumentava a concentração pesada.

#### 4.2.1.4.1.2 Composição do Solvente Extrator

Para avaliar qual a mistura de solventes que melhor extraía o analito, foram comparados dois sistemas: um composto por metanol P.A. e água destilada e outro

composto por etanol 96 % e água destilada, em diversas proporções. Utilizou-se o extrato preliminar EP1, sendo extraído deixando-se macerar em geladeira entre 8 e 12 h, e posteriormente centrifugado a 2.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. Foi definida como ótima a proporção que mais extraía o analito.

#### 4.2.1.4.1.3 Método de Extração

Para a verificação de qual método de extração é capaz de extrair mais ácido clorogênico das amostras, foram comparados três métodos de extração diferentes: sonicação, maceração em geladeira e turboextração.

##### 4.2.1.4.1.3.1 Sonicação

A extração por sonicação baseia-se na utilização de ondas ultrassônicas para romper as paredes celulares de amostras vegetais presentes em uma solução extrativa. Este método foi testado ao colocar-se amostras com o extrato preliminar EP1 no equipamento de ultrassom durante tempos variados, variando entre 0 e 60 min. Após este tempo, deixou-se os extratos macerarem em geladeira entre 8 e 12 h, sendo posteriormente centrifugados a 2.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. A avaliação deste método de extração foi feita verificando-se qual o tempo de extração apresentou maior teor do analito.

##### 4.2.1.4.1.3.2 Maceração em geladeira

A maceração em geladeira foi um método de extração utilizado nas referências (TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001; VIZZOTTO, 2005), utilizando-se um máximo de 24 h e *overnight*, respectivamente. Este método utiliza o tempo de contato entre o



material vegetal e a solução extrativa, de forma que aconteça uma dissolução das substâncias no veículo. Este tempo foi testado, deixando-se amostras das soluções preliminares EP1 na geladeira entre 1 e 48 h, sendo posteriormente centrifugadas a 2.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. A avaliação deste método de extração foi feita verificando-se qual o tempo de extração apresentou maior teor do analito.

#### 4.2.1.4.1.3.3 Turboextração

A turbólise é um método de extração que utiliza a agitação mecânica e o impacto das partículas produzido pela alta velocidade de rotação para romper as paredes de amostras vegetais presentes em uma solução extrativa. Neste método, a solução EP1 foi agitada em Ultraturrax entre 1 e 3 min, na velocidade 1 (10.000 rpm) e logo após colocada em geladeira entre 8 e 12h sendo posteriormente centrifugada a 2.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. A avaliação deste método foi feita verificando-se qual tempo de agitação turbidimétrica é capaz de extrair um maior teor do analito.

#### 4.2.1.3.1.4 Purificação do Extrato

A purificação dos extratos é uma etapa importante, tendo em vista que o equipamento de CLAE é muito sensível a partículas em suspensão nas soluções a serem analisadas. Por isto que independente do método de purificação utilizado, foi empregada em todas as análises a microfiltração em membrana PVDF (0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro) terminal, pois é a única forma que assegura que nenhuma partícula vegetal com granulometria maior que sua malha tenha a possibilidade de ser introduzida dentro do sistema CLAE.

Para definir um sistema de produção de um extrato que inclua a melhor purificação possível, testou-se três métodos diferentes: um químico (adição do reagente de Carrez) e dois físicos (centrifugação e pré-filtração).

#### 4.2.1.3.1.4.1 Adição do Reagente de Carrez

O Reagente de Carrez é indicado para precipitar substâncias protéicas, e é comumente empregado em análises laboratoriais. É composto por uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio com sulfato de zinco, e possui uma capacidade de remover até 85 % destas substâncias em amostras (SUN *et al.*, 2003, ASSUMPCÃO; MORITA, 1968). Na meta-análise de MARIA e MOREIRA (2004), verificou-se que este reagente foi utilizado na purificação de um extrato de café para quantificação de ácido clorogênico. Para verificar a capacidade de purificação dos extratos, foi feita uma análise qualitativa da solução após ser purificada, e verificadas as condições de utilização no CLAE.

#### 4.2.1.3.1.4.2 Centrifugação

A centrifugação utiliza a velocidade centrífuga de um acelerador circular para decantação das partículas de uma solução, e foi empregado nos métodos utilizados por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005), sendo que ambas utilizam uma velocidade de rotação de 15.000 rpm. Foi testado rotações com velocidades inferiores e com tempos de centrifugação distintos, comparando a decantação do extrato.

#### 4.2.1.3.1.4.3 Pré-filtração

A filtração é um método de purificação físico, onde a solução extrativa é passada por um filtro, pela qual as partículas são retidas. Para testar-se este método, comparou-se dois tipos de filtração, a simples e a facilitada por vácuo, utilizando-se os extratos que foram obtidos nos testes de extração: turbidimetria, maceração e sonicação.

#### 4.2.1.3.1.4 Conservação do Extrato

Outra característica desejável em um extrato que será analisado é a capacidade de preservação das substâncias presentes nele. Existem diversas formas para obter-se esta conservação, como a adição de produtos químicos, como antioxidantes e antifúngicos, adição de produtos biológicos, como enzimas ou sistemas físicos, como armazenamento a baixas temperaturas.

#### 4.2.1.3.1.4.1 Adição do fluoreto de sódio

O fluoreto de sódio tem a capacidade de inativar a ação das enzimas polifenol oxidases, que são catalisadoras da degradação do ácido clorogênico. Este processo é observado pelo escurecimento das soluções (TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001). Testou-se a adição de 2 mM de NaF nos extratos preliminares EP1, comparando-se as concentrações do ácido clorogênico nas amostras em que foram adicionadas este sal com soluções em branco. As soluções em análise foram armazenadas por 48 h em geladeira e a temperatura ambiente.

#### 4.2.1.3.1.4.2 Acondicionamento com papel alumínio

Alguns compostos fenólicos são conhecidos por serem facilmente decompostos pela ação da luz. Uma forma de evitar este efeito deletério é impedir que a luz chegue ao extrato, armazenando-o em locais escuros ou em embalagens opacas. Este método de preservação foi testado através do acondicionamento de doze extratos preliminares EP1 em tubos de ensaio, agitados em Ultraturrax durante 1 min e 30 s, na velocidade 1 (10.000 rpm). Seis foram protegidos com papel alumínio, sendo que metade foi colocada em geladeira a 8° C, e metade deixada à temperatura ambiente. Os seis restantes foram divididos igualmente nos mesmos locais, para serem utilizados como referência. Após 48 h, os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF (0,45 µm). 10 µl foram injetados no sistema CLAE previamente otimizado. A avaliação deste método foi feita verificando-se qual destas formas foi capaz de manter o teor do analito.

#### 4.2.1.3.1.4.3 Armazenamento em geladeira

A estocagem em geladeira foi um método utilizado nos trabalhos de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005). A baixa temperatura impede que as polifenol oxidases sejam capazes de degradar os compostos fenólicos presentes nos extratos. Testou-se este método colocando-se o extrato preliminar EP1 sob agitação turbidimérica em Ultraturrax durante 1 min e 30 s, na velocidade 1 (10.000 rpm) e colocando logo após uma amostra em geladeira a 8° C por 48 h, e outra amostra sendo deixada a temperatura ambiente. Após este período os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 min, com 30 s de aceleração e 30 s de frenagem. Em seguida o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm de malha e injetados 10 µl no sistema CLAE previamente otimizado. A avaliação deste método foi feita verificando-se qual destas formas foi capaz de manter o teor do analito.

#### 4.2.2 Validação

A validação deste método foi feita segundo a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que estabelece o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Foram realizados os ensaios de especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. A curva de calibração foi feita com base nas soluções de referência do ácido clorogênico (BRASIL, 2003).

Para a validação do método de análise cromatográfica para as soluções extrativas de pêssgo, foram utilizados os parâmetros cromatográficos estabelecidos pela otimização do método, porém fazendo-se uso do cromatógrafo Waters® Alliance 2695 com detector Dual Waters® 2487.

A identificação e quantificação do ácido clorogênico foram feitas por comparação com padrões autênticos. A concentração foi expressa em mg/kg de fruta fresca. Foram feitas cinco replicatas com cinco frutos cada, para cada cultivar, sendo que somente foram analisadas três destas; as outras duas seriam utilizadas apenas no

caso de haver uma excessiva variação entre os resultados (TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001). As amostras utilizadas foram obtidas após a realização da otimização da extração, e empregada a solução E1, conforme descrito no item 5.1.3.

#### **4.2.2.1 Curva de Calibração da Substância Química de Referência/ Linearidade**

As amostras da SQR foram preparadas a partir de uma solução-estoque de ácido clorogênico em metanol P.A. na concentração de 1,0 mg/ml, diluídas no referido solvente de modo a resultarem soluções com concentrações teóricas de 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; e 50,0 µg/ml. Com base nos resultados obtidos foi feita a análise de variância destes (ANOVA) e a sua análise de regressão, tendo um critério mínimo para aceitação um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual ou superior a 0,98.

#### **4.2.2.2 Intervalo**

O intervalo foi testado calculando-se o coeficiente de correlação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo da curva obtida pela análise de amostras contendo de 80, 90, 100, 110 e 120 % do teor do ácido clorogênico, sendo o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) = 0,98.

Estas amostras foram obtidas a partir da solução extrativa E1, conforme descrito no item 5.1.3, para amostras com 80 e 90 % da concentração do ácido clorogênico, e a própria solução E1 para amostra a 100 %. Para as amostras com 110 e 120 %, foi preparada uma solução com o dobro da concentração da solução E1, denominada E2. A partir desta solução foram feitas diluições até obterem-se as concentrações determinadas.

#### **4.2.2.3 Seletividade**

A seletividade foi testada através da co-injeção do ácido clorogênico (substância de referência) com o ácido caféico (substância de degradação). O critério de aceitação foi a apresentação de dois picos cromatográficos separados cuja resolução fosse igual ou superior a dois e que as análises dos espectros de absorção

demonstrem que os picos não se misturem. A fórmula utilizada para calcular-se a resolução foi:

$$R = 1,18(t_2 - t_1)/(W_{1, h/2} + W_{2, h/2})$$

Onde:  $t_1$  e  $t_2$ : tempos de retenção para o primeiro e segundo picos, respectivamente;

$W_{1, h/2}$  e  $W_{2, h/2}$ : largura à meia altura para o primeiro e segundo picos, respectivamente.

#### **4.2.2.4 Especificidade**

A especificidade foi testada através da análise do pico obtido para o ácido clorogênico proveniente de um extrato vegetal, com um detector com arranjo de fotodiodos. Foram selecionadas três regiões do espectro para a análise, no pico e nos vales do pico (início e fim).

#### **4.2.2.5 Limites de Detecção e Quantificação**

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos após a construção da curva de calibração para a substância de referência, utilizando-se as fórmulas:

$$LD = (3 \cdot DP) / I \quad \text{e} \quad LQ = (10 \cdot DP) / I$$

Onde: DP = Desvio padrão médio do intercepto;

I = inclinação da curva de calibração.

#### **4.2.2.6 Precisão**

A precisão do método foi testada por dois parâmetros, a repetibilidade e a precisão intermediária.

##### **4.2.2.6.1 Repetibilidade**

Este teste foi realizado por nove soluções a 100 % injetadas três vezes, preparando-se soluções E1 em triplicata, previamente filtradas com membrana PVDF

(0,45 µm), e injetadas em um mesmo dia. O valor deste resultado também pode ser considerado como a avaliação da precisão intermediária intra-dia, onde a média e o DP foram calculados, avaliando finalmente o DPR entre as diluições.

#### 4.2.2.6.2 Precisão Intermediária

Também é conhecida como precisão entre-corridas, e foi verificada a partir dos resultados da repetibilidade, calculando-se uma média geral, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

Este procedimento foi realizado durante cinco dias consecutivos onde, a cada dia, foram preparadas três soluções E1. Estas soluções foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata. Para a obtenção dos resultados para a precisão intra-dia (avaliado também com a repetibilidade), a média, o DP e o DPR foram calculados. Para a avaliação dos valores das médias dos resultados para cada dia da precisão intra-dia, obteve-se uma média geral e calculou-se o DP, obtendo-se também o DPR.

#### 4.2.2.7 Exatidão

A exatidão do método consiste no percentual do analito que foi quantificado experimentalmente em uma solução extrativa já produzida, adicionada desta SQR imediatamente antes de ser analisada. As amostras foram feitas adicionando-se ácido clorogênico em três concentrações diferentes (10, 20 e 30 µg/ml) na solução, denominadas Ex1, Ex2 e Ex3, respectivamente, analisando-se em triplicata e calculando-se o seu percentual através da fórmula:

$$E\% = CE/CT \cdot 100$$

Onde: CE = concentração da SQR obtida experimentalmente após a adição da SQR;

CT = concentração teórica da SQR.

#### 4.2.2.8 Recuperação

O teste de recuperação determina a eficiência de extração do método, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida da SQR que foi obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de amostras não acrescidas de padrão, divididos pela sua concentração teórica total. Estas soluções foram feitas adicionando-se ácido clorogênico em três quantidades diferentes (10, 20 e 30 µg/ml) denominadas R1, R2 e R3, respectivamente, e analisando-se três vezes, calculando-se a sua recuperação através da fórmula:

$$R\% = CE/CT \cdot 100$$

Onde: CE = concentração da SQR obtida experimentalmente após a adição da SQR;

CT = concentração teórica da SQR.

#### 4.2.2.9 Robustez

A robustez foi testada preparando-se as soluções extrativas E1, que foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm) e injetadas em triplicata. Os parâmetros avaliados para constatar susceptibilidade do método frente a variações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa do marcador químico estão dispostos na tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>NORMAL</b>	<b>ALTERADO</b>
Coluna	Nova-Pak® C <sub>18</sub> 3.9 X 150 mm;	Nova-Pak® C <sub>18</sub> 3.9 X 150 mm;



Cromatográfica	Lote W90181f059	Lote T60952957
Fluxo	0,7 ml/min	1,0 E 0,9 ml/min
Fase Móvel	Sol. A – ACN 5%, H <sub>2</sub> O 95%, ATF 0,05 %	Sol. A – ACN 5%, H <sub>2</sub> O 95%

### 4.2.3 Análise das Amostras

As 10 amostras de *Prunus persica* L. (Batsch) fornecidas pela EMBRAPA – Clima Temperado de Pelotas, RS, descritas no item 3.1 e foram analisadas quanto a perda por dessecação e concentração do marcador químico presente por CLAE. Os resultados foram comparados estatisticamente por ANOVA.

#### 4.2.3.1 Determinação de Perda por Dessecação

Para esta análise foi utilizado o método de secagem com balança de infravermelho. Pesou-se cerca de 1,0 g do material vegetal triturado e descongelado, em pratos de alumínio previamente dessecados (105° C / 1 h). Foi colocado em uma balança acoplada ao sistema de secagem por irradiação infravermelha com rampa de aquecimento para 105° C, até o peso permanecer constante no tempo de 10 s. As análises foram feitas em triplicata e o resultado foi fornecido automaticamente pela balança, em perda de massa percentual.

#### 4.2.3.2 Quantificação das Amostras

As cultivares de pêsego foram submetidas à extração otimizada, e após injetadas no sistema CLAE otimizado e validado. O teor de ácido clorogênico foi quantificado através da equação da reta obtida. Com este resultado foi incluído o teor de umidade de cada cultivar, de forma a obter um teor de ácido clorogênico proporcional ao peso seco do fruto.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 OTIMIZAÇÃO

Alguns parâmetros dos métodos utilizados por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005) foram testados, e um método foi otimizado com base nestes resultados. Foram verificados o sistema CLAE-UV e as condições de extração.

## 5.1.1 Análise em CLAE-UV

### 5.1.1.1 Composição do Eluente

Para a otimização deste método, foram testadas diferentes composições de solventes para serem utilizados como eluente, utilizando-se acetonitrila, metanol, água ultra-pura e ácido trifluoroacético, até que se obtivesse um cromatograma com melhor separação de picos. Utilizou-se as amostras EP1 para testar esta composição.

A composição das fases móveis do sistema eluente cuja separação apresentou melhor resolução está representada na Tabela 3.

**Tabela 3:** Composição do eluente que apresentou melhor resolução cromatográfica.

<b>Solução</b>	<b>Composição</b>	<b>Proporção (ml)</b>
Solução A	Acetonitrila : Água : ATF	5 : 95 : 0,05
Solução B	Acetonitrila	100

### 5.1.1.2 Sistema cromatográfico

O sistema de eluição definido por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) foi testado e apresentou 1 h de análise. Para se tentar diminuir este tempo, alguns sistemas de eluição foram testados, em modo isocrático e gradiente linear. Foram modificados os tempos de eluição até que se obtivesse um cromatograma com melhor separação de picos. Foram utilizadas amostras EP1 neste ensaio.

O sistema de eluição com melhor resolução cromatográfica encontrada foi o gradiente linear. O sistema isocrático não foi capaz de separar os compostos satisfatoriamente. Na Tabela 4 estão apresentados os tempos de eluição do sistema selecionado.

**Tabela 4:** Sistema de eluição definido como ótimo.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solução A (%)</b>	<b>Solução B (%)</b>
0	100	0
9	80	20
10	0	100

12	0	100
13	100	0
18	100	0

### 5.1.1.3 Fluxo

Durante a seleção do sistema cromatográfico, diversos fluxos foram testados, de forma que os constituintes da amostra pudessem ser separados da melhor maneira possível, e observando-se a pressão interna da coluna, de forma que ela não ultrapasse o seu máximo.

O fluxo que melhor se adaptou ao sistema definido como ótimo foi 0,7 ml/min.

### 5.1.1.4 Comprimentos de Onda

O comprimento de onda foi determinado fazendo-se uma injeção do analito com concentração de 25 µg/ml no sistema CLAE acoplado ao detector PDA, e testando-se diversos comprimentos de onda até que se obtivesse uma maior área no pico da substância referência. De acordo com a revisão bibliográfica, diversos estudos utilizaram comprimentos de onda diferentes para quantificar o ácido clorogênico, e definiu-se uma faixa entre 325 e 340 nm para determinar qual seria utilizado no método. O resultado está apresentado na Tabela 5.

Com base nos resultados obtidos, foi selecionado o comprimento de onda com 327 nm para quantificar o pico cromatográfico do ácido clorogênico por apresentar uma maior área, indicando haver uma melhor resposta do detector para a quantificação do analito neste ponto.

**Tabela 5:** Comprimentos de onda testados para o pico do ácido clorogênico.

Comprimento de Onda (nm)	Área (mV.s)
320	595267,3
325	622483,0

326	622772,3
327	623128,3
328	623051,0
329	618488,2
330	618124,5
335	580731,7

### 5.1.1.5 Parâmetros de Eficiência Cromatográficos

O sistema cromatográfico foi avaliado quanto a sua eficiência, verificando-se seus parâmetros cromatográficos básicos. O resultado está apresentado na tabela 6.

**Tabela 6:** Parâmetros de eficiência cromatográfica.

Substância	TR (min)	N	T
Ácido clorogênico	7,179	1018,04	0,9

TR: Tempo de retenção; N: Número de pratos teóricos; T: Fator de cauda.

### 5.1.2 Resultados da Otimização do Sistema CLAE

Com base nestes resultados, definiu-se como otimizado o sistema cromatográfico que está apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Sistema CLAE otimizado.

Parâmetro	Valor
Composição do Eluente	Solução A: Acetonitrila 5 %, H <sub>2</sub> O 95 %, ATF 0,005 %; Solução B: Acetonitrila 100 %
Sistema Cromatográfico	Gradiente linear
Fluxo de Fase Móvel	0,7 ml/min
Comprimento de Onda	327 nm

### 5.1.2 Condições de Extração

#### 5.1.2.1 Preparo das Soluções Extrativas

Após a definição da técnica de análise cromatográfica com um extrato preliminar, foram realizados alguns testes para a verificação da melhor proporção entre fruta e solvente, da melhor composição do solvente extrator e do melhor

método de extração, utilizando amostras de *Prunus persica* cv. Morro Redondo, visando a obtenção de amostras padronizadas. Todas as soluções finais preparadas a seguir foram filtradas com membrana em PVDF (0,45 µm), injetadas em triplicata no cromatógrafo, utilizando o sistema cromatográfico definido no item 5.1.1.2.

### 5.1.2.2 Proporção Entre Planta e Solvente Extrator

Para verificar a melhor proporção entre as quantidades de amostra vegetal e a de solvente, foram pesadas diferentes quantidades do material vegetal mantendo-se constante o valor do solvente extrator (20,0 ml). Os extratos foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm, e após filtrados em membrana de PVDF 0,45 µm de poro, injetados diretamente no sistema de CLAE-UV previamente determinado. Foram injetados no sistema CLAE e definida como melhor a concentração a partir da qual o extrato passou a apresentar uma saturação do teor do analito, a medida aumentava a concentração de matéria vegetal pesada. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Resultados do teste de determinação da proporção entre planta e solvente extrator.

<b>Quantidade</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
1,0	56683,67 ± 218,04
2,0	87916,00 ± 277,75
2,5	102525,67 ± 197,86
3,0	102382,67 ± 317,63
4,0	102462,00 ± 158,95
5,0	102583,33 ± 142,70

### 5.1.2.3 Composição do Solvente Extrator

Quanto a avaliação do solvente extrator, foram testadas diferentes proporções entre etanol/água e metanol/água, colocando-se 20,0 ml desta mistura em contato com 2,5 g do material vegetal e procedendo a extração conforme descrito no item acima. Os resultados estão dispostos nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9:** Resultados do teste da composição do solvente extrator entre etanol 96 % e água deionizada.

<b>Etanol 96% (%)</b>	<b>Água Deionizada (%)</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
100	0	91662,00 ± 1292,37
90	10	93355,67 ± 1115,85
80	20	97258,00 ± 1593,52
70	30	92622,00 ± 1044,84
60	40	88072,33 ± 1278,48
50	50	83998,33 ± 1052,02
40	60	79474,67 ± 1262,04
30	70	75964,00 ± 1291,64
20	80	73225,00 ± 789,91
10	90	69451,33 ± 452,82
0	100	67587,00 ± 804,13

**Tabela 10:** Resultados do teste da composição do solvente extrator entre metanol P.A. e água deionizada.

<b>Metanol P.A. (%)</b>	<b>Água Deionizada (%)</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
100	0	102080,33 ± 934,76
90	10	97882,00 ± 509,71
80	20	93915,67 ± 119,83
70	30	89318,00 ± 318,43
60	40	87582,33 ± 629,11
50	50	84456,00 ± 608,28
40	60	79836,67 ± 856,27
30	70	75944,67 ± 444,20
20	80	73505,67 ± 581,72
10	90	71367,33 ± 886,48
0	100	69011,67 ± 577,35

#### 5.1.2.4 Método de Extração

Para a verificação de qual método de extração é capaz de extrair uma maior quantidade de ácido clorogênico das amostras, foram comparados os métodos de extração por turboextração, sonicação e maceração em geladeira.

Todos os testes de método de extração empregaram a solução EP1, e foram analisados através das áreas do pico do ácido clorogênico, bem como pela



comparação dos teores encontrados para esta substância, utilizando a equação da reta da curva de calibração construída com a SQR.

#### 5.1.2.4.1 Sonicação

A sonicação é um método bastante empregado para a extração de frutos. Este método foi testado colocando-se a solução EP1 no aparelho de ultrassom por 0, 15, 30, 45 e 60 min. Os extratos foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm, e após filtrados em membrana de PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, injetados diretamente no sistema de CLAE-UV previamente determinado. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Resultados do teste de extração por sonicação.

<b>Tempo de sonicação (min)</b>	<b>Área (mV.s) <math>\pm</math> DP</b>
0	76293,33 $\pm$ 564,76
15	88141,00 $\pm$ 557,25
30	90538,33 $\pm$ 448,46
45	88393,00 $\pm$ 438,36
60	83696,67 $\pm$ 466,96

O tempo de extração que mais extraíu o ácido clorogênico foi obtido com 30 minutos de sonicação.

#### 5.1.2.4.2 Maceração

Os extratos foram testados deixando-se a solução EP1 macerar em geladeira, de 1 à 48 h. Os extratos foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm, e após filtrados em membrana de PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, injetados diretamente no sistema de CLAE-UV previamente determinado. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

#### 5.1.2.4.3 Turbólise

Os extratos foram obtidos colocando-se a solução EP1 para ser agitada em Ultraturrax entre 1 e 3 min, na velocidade 1 (10.000 rpm) e logo após sendo colocados em geladeira entre 8 e 12h. Os extratos foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm, e após filtrados em membrana de PVDF (0,45  $\mu\text{m}$ ), e injetados diretamente no sistema de CLAE-UV previamente determinado. O resultado está apresentado na Tabela 13.

**Tabela 12:** Resultados do teste de extração por maceração.

<b>Tempo de Maceração (h)</b>	<b>Área (mV.s) <math>\pm</math> DP</b>
1	102924,67 $\pm$ 553,57
2	102496,00 $\pm$ 651,66
3	102305,33 $\pm$ 567,90
4	103124,67 $\pm$ 448,84
5	102528,33 $\pm$ 524,30
6	103190,33 $\pm$ 566,86
7	102832,67 $\pm$ 546,81
8	102725,00 $\pm$ 291,24
9	102204,00 $\pm$ 464,34
10	102017,67 $\pm$ 245,13
11	102594,00 $\pm$ 215,90
12	102196,67 $\pm$ 242,32
13	103201,33 $\pm$ 625,04
14	103123,00 $\pm$ 360,56
15	101705,00 $\pm$ 168,65
16	102480,67 $\pm$ 637,71
17	102204,67 $\pm$ 556,84
18	102268,67 $\pm$ 581,46
19	103049,00 $\pm$ 266,15
20	102586,67 $\pm$ 560,09
21	102080,67 $\pm$ 343,10
22	102182,33 $\pm$ 579,97
23	102425,00 $\pm$ 483,50
24	103213,00 $\pm$ 556,51
48	102223,67 $\pm$ 545,23
<b>Média</b>	<b>102555,3 <math>\pm</math> 429,2</b>

**Tabela 13:** Resultados do teste de extração por turbólise.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
0,5	96053,67 ± 6701,64
1,0	97430,00 ± 3658,14
1,5	102833,67 ± 139,79
2,0	102781,67 ± 149,11
2,5	102615,67 ± 115,28
3,0	102789,33 ± 92,95

### **5.1.2.5 Purificação do Extrato**

Os resultados para as análises de purificação dos extratos foram qualitativos, tendo como critérios de aceitação a observação qualitativa da turbidez do extrato após ser purificado. Independente do método de purificação utilizado, sempre foi empregada uma microfiltração em membrana PVDF (0,45 µm, 13 mm,) terminal.

O extrato empregado para os testes de purificação foi sempre a mesma solução EP1, seguida de turbólise por 1 min e 30 s e deixando-se macerar em geladeira entre 8 e 12 h.

#### **5.1.2.5.1 Reagente de Carrez**

O Reagente de Carrez é indicado para precipitar substâncias protéicas, e é comumente empregado em análises laboratoriais. É composto por uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio com sulfato de zinco e possui uma capacidade de remover até 85 % das proteínas em amostras (SUN *et al.*, 2003).

O resultado deste teste foi uma solução clara e transparente, que formou um precipitado floculado imediatamente após a adição deste reagente, e não houve a necessidade do processo de centrifugação para separar o sobrenadante da amostra. A filtração em membrana de PVDF (0,45 µm, 13 mm) terminal foi facilitada, sendo a que apresentou um melhor fluxo de passagem entre os métodos de purificação testados.

#### **5.1.2.5.2 Centrifugação**

Foram testadas velocidades de rotação de 1000, 2000 e 3000 rpm durante um tempo de centrifugação de 10, 15 e 20 minutos para as amostras. Os resultados obtidos demonstram decantação significativa apenas nas velocidades de 2000 rpm por 20 minutos e 3000 rpm por 15 e 20 minutos. Aplicando-se velocidades de 1000 rpm por 10, 15 e 20 minutos, 2000 rpm por 10 e 15 minutos e 3000 rpm por 10 minutos, ainda havia a presença de partículas em suspensão.

#### 5.1.2.5.3 Pré-filtração

A pré-filtração foi testada utilizando-se os extratos obtidos com os testes de extração, empregando papel de filtro comum com suporte de funil comum e funil à vácuo com kitazato. Verificou-se que nenhuma das formas de filtração foi eficiente para a purificação dos extratos produzidos.

#### 5.1.2.6 Conservação dos Extratos

Os extratos foram testados para verificar a preservação do teor do analito. Foram comparadas a adição de fluoreto de sódio para evitar a ação da polifenol oxidase, e acondicionamento com papel alumínio para proteger da fotólise e armazenamento dentro e fora da geladeira durante a maceração.

O extrato empregado nos testes de conservação foi a solução EP1, seguida por turbólise durante 1 min e 30 s em velocidade 10000 rpm, armazenado em geladeira a 8° C durante 8 a 12h. Após este período, os extratos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos, retirado cuidadosamente o sobrenadante, filtrado em membrana PVDF (0,45 µm, 13 mm) e injetado em sistema CLAE – UV.

##### 5.1.2.6.1 Adição de Fluoreto de Sódio

TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) adicionaram 2,0 mM de NaF para inibir a degradação enzimática do ácido clorogênico promovido pelas polifenol oxidases. Testou-se esta preservação, adicionando-se a mesma quantidade deste sal nas soluções EP1, comparando-se com soluções em branco a área dos picos da substância química de referência. As soluções foram armazenadas em geladeira por um período

de 48 h, e após, injetadas em sistema CLAE-UV. O resultado encontra-se na Tabela 14.

**Tabela 14:** Resultados do teste de conservação com adição de fluoreto de sódio.

<b>Amostra</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
Branco	102791,33 ± 333,53
2,0 mM NaF	102725,00 ± 291,24

#### 5.1.2.6.2 Acondicionamento com papel alumínio

Testou-se a proteção das soluções extrativas em tubos de ensaio, recobertas por papel alumínio, para verificar a ação da luz. Foi verificado que as amostras que foram armazenadas à temperatura ambiente, já com 24 horas de armazenamento apresentavam um escurecimento maior nas que não foram recobertas pelo papel alumínio do que as que foram, ao compará-las contra um fundo claro. Com 48 horas de armazenamento, o escurecimento era ainda mais pronunciado. Já nas amostras que foram armazenadas na geladeira, após 48 horas, não houve diferença no escurecimento entre as que foram recobertas com papel alumínio e as que não foram. Os teores do analito estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Teor da substância química de referência para o teste de acondicionamento com papel alumínio.

<b>Armazenamento</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
Geladeira sem papel alumínio	102228,67 ± 143,51
Geladeira com papel alumínio	102132,00 ± 255,36
Bancada sem papel alumínio	78855,00 ± 203,27
Bancada com papel alumínio	81926,33 ± 153,83

#### 5.1.2.6.3 Armazenamento na geladeira

Testou-se a proteção das soluções extrativas em tubos de ensaio dentro e fora da geladeira a 8° C por 48 h. Os resultados estão descritos na Tabela 16.

**Tabela 16:** Resultados do teste de conservação por armazenamento na geladeira.

<b>Armazenamento</b>	<b>Área (mV.s) ± DP</b>
Na Geladeira	102185,33 ± 144,14
Temperatura Ambiente	88871,67 ± 210,72

### 5.1.3 Resultados da Otimização da Extração

Como resultado da otimização do extrato definiu-se o método de extração que está apresentado na Tabela 17. Este extrato otimizado denominou-se **solução E1**, e foi utilizado para realizar os testes de validação.

**Tabela 17:** Parâmetros ótimos para o método de extração.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Proporção Entre Planta e Solvente	2,5 g de planta e 20,0 ml de solvente
Composição do Solvente Extrator	Metanol P.A.
Método de Extração	Turbólise por 1,5 min associada com maceração em geladeira entre 8 a 12 h
Purificação do Extrato	Centrifugação a 3.000 rpm por 15 min
Conservação do Extrato	Geladeira

Com base nos resultados obtidos nos testes de otimização da extração, definiu-se um extrato padrão ótimo denominado solução E1 com a cultivar Morro Redondo, que foi utilizado nos testes de validação.

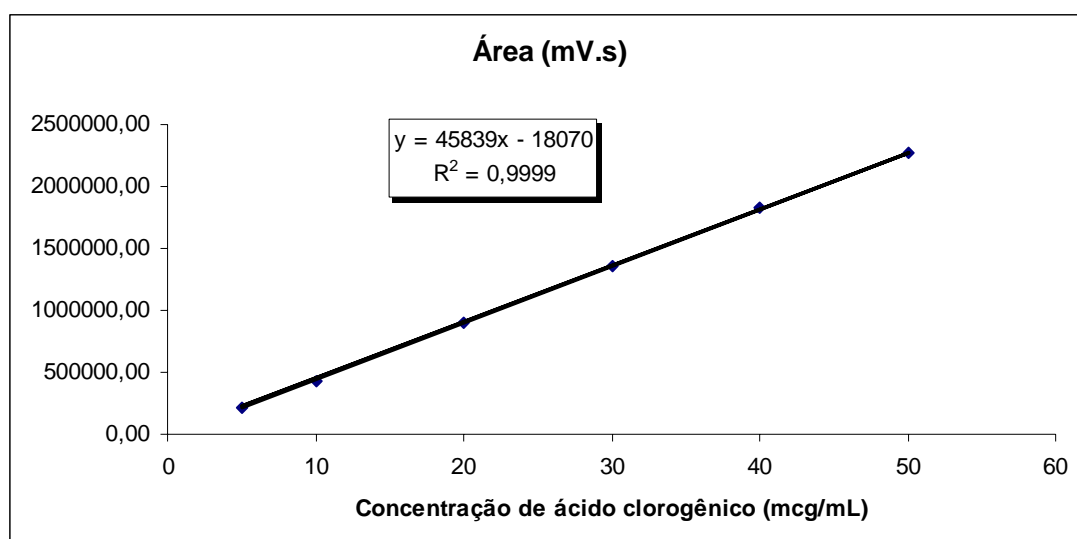
## 5.2 VALIDAÇÃO

### 5.2.1 Curva de Calibração para a Substância Química de Referência

Após a avaliação qualitativa das soluções extrativa, três curvas de calibração foram preparadas a partir da solução-mãe (1 mg/ml). As diluições propostas apresentaram concentrações finais de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml.

Encontra-se na Tabela abaixo os valores da análise de variância para a média das três curvas obtidas. O gráfico das curvas de calibração está representado na Figura 6, bem como o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados. A Tabela 18 apresenta os valores obtidos na elaboração da curva de calibração utilizando o ácido clorogênico.

A validade do modelo de regressão linear e a significância estatística da reta foram testadas por meio da análise de variância (ANOVA), e os resultados estão apresentados na Tabela 19.



**Figura 6:** Representação gráfica da curva de calibração de ácido clorogênico obtido por CLAE, equação da reta e coeficiente de determinação.

**Tabela 18:** Valores experimentais obtidos para curva analítica do ácido clorogênico por CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas Absolutas (mV.s)*	Média	DP	DPR (%)

5	202977 224648 216813	214813	10972	5,11
10	411746 441248 434250	429082	15415	3,59
20	946032 900827 872352	906404	37155	4,10
30	1412364 1323130 1328863	1354785	49946	3,69
40	1907783 1759473 1809119	1825458	75492	4,14
50	2355620 2179094 2263676	2266130	88288	3,90

\* Média de três soluções.

**Tabela 19:** Análise de variância (ANOVA) para a curva de calibração do ácido clorogênico.

	GL	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1,00	$1,13 \times 10^{13}$	$1,13 \times 10^{13}$	59346*	$1,53 \times 10^{-7}$
Resíduo	4,00	$7,62 \times 10^8$	$1,91 \times 10^8$		
Total	5,00	$1,13 \times 10^{13}$			

\* Significativo para  $p < 0,05$ ; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; MQ = média quadrada da soma dos quadrados.

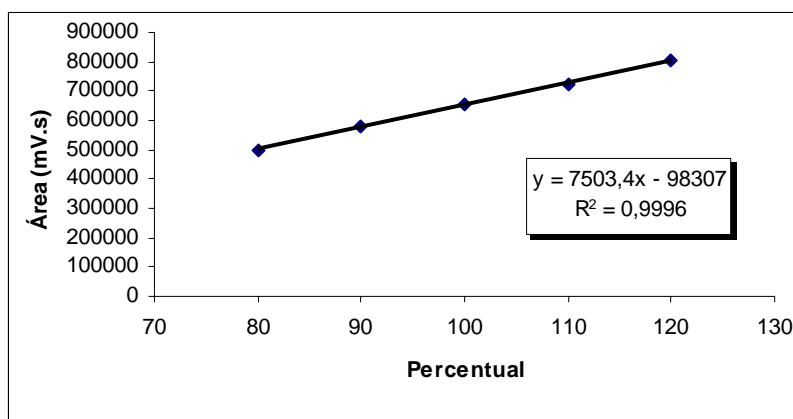
Com base nestes dados pode-se afirmar que a regressão foi bastante significativa, com  $F = 59346$ , demonstrando que existe regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e que o desvio de linearidade não foi significativo na faixa de concentração analisada. Isto significa que com o aumento das concentrações do analito tem-se uma resposta crescente e proporcional nas áreas encontradas. Sendo assim, foi possível, através da equação da reta, a realização da análise quantitativa do teor de ácido clorogênico no sistema cromatográfico otimizado.



### 5.2.2 Intervalo

O estudo de linearidade foi realizado com diluições feitas a partir do extrato otimizado, atingindo concentrações teóricas de 80 a 120 %, que foram analisadas em triplicata. O valor do coeficiente de determinação, bem como a equação da reta e o gráfico de linearidade estão apresentados na Figura 7.

A análise de variância dos resultados do estudo de linearidade para as amostras de *Prunus persica* cv. Morro Redondo está representado na tabela 20. A faixa de concentração frente às áreas obtidas demonstra linearidade, com regressão significativa ( $p < 0,05$ ), e ausência de desvios de linearidade, além de permitir a verificação da integridade do ácido clorogênico, isto é, não houve interferência de outros constituintes no sinal principal.



**Figura 7:** Curva de linearidade apresentando as equações da reta e os coeficientes de determinação para as amostras de *Prunus persica* cv. Morro Redondo.

**Tabela 20:** Análise de variância dos resultados do teste de linearidade.

	GL	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	$1,93 \times 10^{12}$	$1,93 \times 10^{12}$	15792*	$6,33 \times 10^{-5}$
Resíduo	3	$3,67 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$		
Total	4	$1,93 \times 10^{12}$			

\* Significativo para  $p < 0,05$ ; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; MQ = média quadrada da soma dos quadrados.

### 5.2.3 Seletividade

O cromatograma obtido ao injetar-se no sistema CLAE otimizado, acoplado com detector de arranjo de fotodiodos, uma mistura das soluções referência de ácido clorogênico e ácido caféico está apresentado na figura 8. Foi verificado que os dois picos foram separados e que cada um estava puro, pelo espectro de absorção nos vales e no ápice.

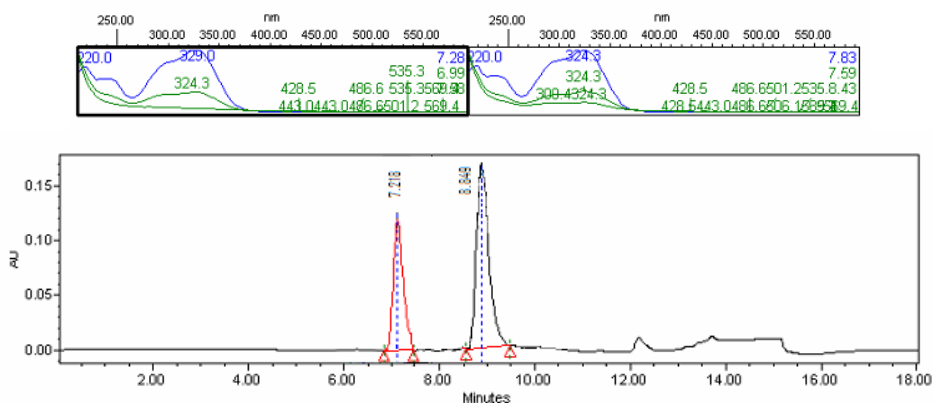
A resolução cromatográfica foi calculada a partir dos tempos de retenção dos picos do ácido clorogênico e ácido caféico 7,218 e 8,849 min e larguras dos picos à meia altura 0,3 e 0,4 cm respectivamente, conforme apresentado abaixo.

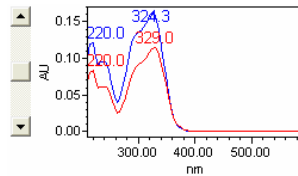
$$R = 1,18 \times (t_2 - t_1) / (W_{1, h/2} + W_{2, h/2})$$

$$R = 1,18 \times (7,218 - 8,849) / (0,3 + 0,4)$$

$$R = 2,75$$

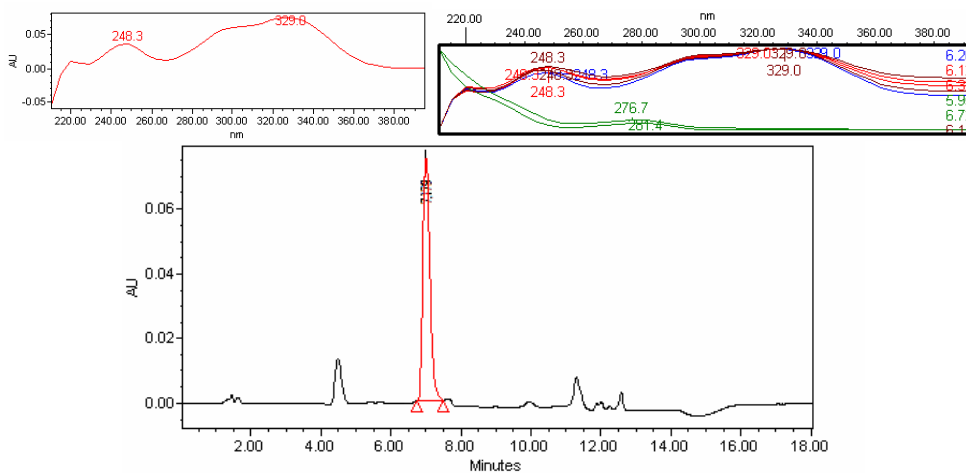
Obteve-se um  $R = 2,75$ , indicando que o sistema apresenta uma boa resolução, pois ela foi maior que o mínimo especificado em 2.





**Figura 8:** Cromatograma e espectros de absorção obtidos a partir da coinjeção de uma mistura das soluções referência de ácidos caféico e clorogênico (TR 7,218 e 8,849; espectros em vermelho e azul, respectivamente).

## 5.2.4 Especificidade



**Figura 9:** Cromatograma e espectros de absorção do pico do ácido clorogênico obtido no teste de especificidade.

Uma vez que as amostras são consideradas matrizes complexas por possuírem inúmeros constituintes, a especificidade do método foi determinada pela análise da pureza do pico verificada nos cromatogramas obtidos utilizando o cromatógrafo a líquido acoplado com detector de arranjo de fotodiodos.

Foi feita uma solução E1 que foi injetada utilizando-se o método CLAE otimizado. O cromatograma está apresentado na Figura 9, sendo observados também os espectros de absorção do pico majoritário na região do ultravioleta (327 nm) e a ausência de interferentes no pico em três regiões diferentes, nos vales, no ápice e no meio.

Foi verificado que o sistema cromatográfico separou satisfatoriamente os compostos, pois o pico do ácido clorogênico não apresentou interferentes na sua absorção.

### 5.2.5 Precisão

A precisão do método analítico empregado foi verificada através das análises de repetibilidade e precisão intermediária. A análise da média das nove determinações para a repetibilidade estão apresentadas na tabela 21, e na tabela 22 estão os resultados da precisão intermediária.

O método se mostrou ser preciso, ao apresentar uma boa repetibilidade e boa precisão intermediária, por apresentarem baixos valores do desvio padrão relativo.

**Tabela 21:** Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.

<b>Amostra</b>	<b>Teor de ácido clorogênico (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
1	23,73
2	23,56
3	23,63
4	23,49
5	23,70
6	23,68
7	23,59
8	23,67
9	23,55
<b>Média</b>	<b>23,62</b>
<b>DPR %</b>	<b>0,08</b>

**Tabela 22:** Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária.

<b>Dia</b>	<b>Teor de ácido clorogênico (µg/ml)*</b>	<b>DPR %</b>
1	23,83	0,42
2	23,87	0,77
3	23,42	0,25
4	22,80	1,10
5	23,47	0,33
<b>Média</b>	<b>23,48</b>	<b>0,43</b>

\* Média obtida de três determinações.

### 5.2.6 Exatidão

O estudo da exatidão foi feito a partir de extratos obtidos da solução E1, acrescidos da SQR em três quantidades diferentes (10, 20 e 30 µg) imediatamente antes de serem analisados no sistema CLAE. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 23.

**Tabela 23:** Resultados obtidos para o teste de exatidão.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade adicionada (µg)</b>	<b>Recuperado (µg)</b>			<b>Média (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
		<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>		
Ex1	10	9,83	9,79	9,70	97,73	0,68
Ex2	20	19,67	29,59	19,80	98,43	0,54
Ex3	30	29,69	29,85	29,79	99,29	0,29
<b>Teor Médio da Exatidão</b>					<b>98,49</b>	<b>0,09</b>

### 5.2.7 Recuperação

Para a verificação da eficiência de extração deste método, foi verificada a recuperação da SQR, sendo estabelecida uma faixa de concentração específica para o procedimento empregado, uma vez que os parâmetros de precisão, linearidade e especificidade do método já foram determinados (ICH, 1996).

Foram feitos extratos com a cv. Morro Redondo, e neles acrescentadas quantidades de 10, 20 e 30 µg da solução referência de ácido clorogênico preparada anteriormente (1 mg/ml). A equação da reta foi utilizada para obtenção dos teores das amostras para posterior cálculo dos percentuais de recuperação da SQR e os resultados estão apresentados na tabela 24.

O método de extração mostrou ter uma boa recuperação quanto ao teor de ácido clorogênico, recuperando um valor médio de 97,32 % com um desvio padrão relativo de 1,96 para *Prunus persica* cv. Morro Redondo.

**Tabela 24:** Resultados obtidos para o teste de recuperação.

Solução	Quantidade adicionada (µg)	Recuperado (µg)			Média (%)	DPR (%)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3		
R1	10	10,44	9,31	9,99	99,39	5,26
R2	20	19,38	20,22	18,90	95,60	3,10
R3	30	28,02	29,09	29,09	96,44	3,67
<b>Teor Médio da Recuperação</b>					<b>97,32</b>	<b>1,96</b>

### 5.2.8 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a substância utilizada como referência, de acordo com os parâmetros obtidos com as equações das retas, foram calculados com o desvio padrão médio do intercepto (45839) e com a inclinação da curva, 5,317655.

$$LD = DP \times 3 / I$$

$$LD = 45839 \times 3 / 5,317655$$

$$LD = 0,026 \mu\text{g/mL}$$

$$LQ = DP \times 10 / I$$

$$LQ = 45839 \times 10 / 5,317655$$

$$LQ = 0,086 \mu\text{g/ml}$$

Os resultados obtidos indicam que o método cromatográfico utilizado apresenta boa sensibilidade por apresentar baixos valores de LD (0,026 µg/ml) e LQ (0,086 µg/ml).

### 5.2.8 Robustez

O ensaio de robustez foi realizado comparando-se alterações na velocidade de fluxo, variação de lote de coluna e ausência de ácido trifluoroacético na composição da fase móvel. Os resultados do teor médio de ácido clorogênico obtidos estão apresentados na tabela 25, bem como DP e DPR e os tempos de retenção.

**Tabela 25:** Resultados obtidos com o ensaio de robustez.

<b>Parâmetro</b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Teor (µg/ml)*</b>	<b>DPR%</b>
Troca de Coluna	7,199	23,59	1,34
Fluxo 1 ml/min	6,386	23,54	1,98
Fluxo 0,9 ml/min	6,723	23,53	0,36
Sistema sem ATF	5,713	21,22	3,26

\* Relativo a planta *in natura*.

O método se mostrou robusto ao manter constante a concentração da substância química de referência frente a variações calculadas no sistema, excetuando-se ao sistema eluente sem adição de ATF, que apresentou uma diminuição em torno de 10 % do teor de SQR.

## 5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

### 5.3.1 Perda por Dessecação

As amostras de cultivares de pêssego foram submetidas ao ensaio de perda por dessecação, por balança de irradiação infravermelha. Os resultados de cada cultivar estão apresentados na tabela 26.

### 5.3.2 Quantificação de Ácido Clorogênico

A partir dos resultados obtidos com os teores de umidade de cada cultivar, e juntamente com eles fazendo-se os extratos da forma otimizada e injetando-se no sistema cromatográfico, foi possível calcular a quantidade de ácido clorogênico

presente em cada variedade de pêssego. Os resultados estão apresentados na tabela 27.

**Tabela 26:** Resultados obtidos pelo teste de perda por dessecação.

<b>Cultivar</b>	<b>Teor de Umidade (%) ± DPR %</b>
Ametista	73,90 ± 0,46
Aurora 1	77,33 ± 0,52
Aurora 2	73,96 ± 0,80
Conserva 594	73,90 ± 0,46
Dourado	68,09 ± 0,29
Granada	70,72 ± 0,29
Morro Redondo	71,78 ± 1,95
Precocinho	70,50 ± 0,10
Sensação	72,90 ± 1,14
Sunblaze	68,70 ± 0,91
Tropic Beauty	76,07 ± 0,78
Tropic Blush	73,43 ± 1,29
Turmalina	73,90 ± 0,46

**Tabela 27:** Teores de ácido clorogênico em cultivares de pêssego.

<b>Cultivar</b>	<b>Teor De Ácido Clorogênico (Mg/Kg) ± Dpr (%)</b>
Ametista	1,54 ± 2,10
Aurora 1	0,88 ± 3,99
Aurora 2	0,18 ± 2,07
Conserva 594	0,18 ± 0,91
Dourado	3,05 ± 7,65
Granada	0,44 ± 5,55
Morro Redondo	6,63 ± 3,16
Precocinho	2,04 ± 7,30
Sensação	1,40 ± 1,81
Sunblaze	6,44 ± 1,80
Tropic Beauty	0,86 ± 5,35
Tropic Blush	2,09 ± 4,00
Turmalina	4,06 ± 0,16







## **6 DISCUSSÃO**

O controle de qualidade de produtos vegetais se apresenta hoje em dia como um item de grande importância na indústria farmacêutica e de alimentos, apresentando diversas ferramentas para a sua correta aplicação. O emprego das

técnicas de controle de qualidade associadas é a melhor forma de determinar se um produto está apto a ser utilizado ou não, verificando se o mesmo está dentro das suas especificações.

Um método validado significa que este foi testado frente a diversas situações, e os resultados apresentaram uma variação dentro de um limite permitido, garantindo um nível de confiança ao método. Isto significa que ele é adequado ao seu propósito. Cada técnica de um laboratório de controle de qualidade deve ser validada, e com isto aumenta-se a confiabilidade dos resultados do laboratório.

A automatização dos equipamentos de controle de qualidade, como cromatógrafos a líquido, se mostrou como um avanço organizacional na rotina de um laboratório de controle de qualidade, a qual permitiu que fossem feitas análises em série sem a presença direta do operador.

Estudos prévios sobre compostos fenólicos em pêssegos mostraram que o ácido clorogênico (3-*O*-cafeoil-quínico) foi o composto majoritário, com menores quantidades de neoclorogênico (5-*O*-cafeoil-quínico) e criptoclorogênico (4-*O*-cafeoil-quínico) (TOMÁZ-BARBERÁN *et al.*, 2001; VERSARI *et al.*, 2002). Os resultados deste estudo confirmam que o ácido clorogênico esteve sempre presente nas cultivares analisadas. Como somente o método de detecção por ultravioleta é insuficiente para identificação completa de uma substância, não foi possível identificar os isômeros do ácido cafeoilquínico. A cromatografia acoplada a espectrometria de massas é a que possui a melhor capacidade de identificar cada um destes compostos. Sugere-se que para uma análise mais completa, utilize-se este método para identificar estes compostos, mas para análises de rotina em controle de qualidade, isto não se faz necessário.

## **6.1 OTIMIZAÇÃO**

### **6.1.1 Sistema CLAE**

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais comumente utilizado na análise nutracêutica. A combinação desta técnica cromatográfica com o

monitoramento através da detecção espectroscópica na região do ultravioleta fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos, tornando-se um padrão para a indústria farmacêutica e alimentícia (WATSON, 1999).

A otimização de um método que previamente havia sido empregado para analisar pêssegos de outras cultivares foi importante pois representou uma economia de tempo e de material para o laboratório, já que o tempo gasto para fazer uma análise pelo método empregado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) foi de 1 h, e pelo método empregado por VIZZOTTO (2005) foi de 30 min. O tempo gasto para fazer uma análise com esta otimização foi de 18 min, incluindo o reequilíbrio. Isto triplicou a capacidade de análise de dados do método comparado ao 1º método, e pelo fato de ter sido empregado um sistema cromatográfico com injeção automática, este sistema mostrou-se ideal para um laboratório de controle de qualidade que faz análises rotineiras.

Com esta redução de tempo obteve-se uma direta redução do volume dos solventes utilizados como fase móvel, e reduziu-se ainda mais com a diminuição da velocidade de fluxo. Os métodos de BARBERAN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005) utilizaram uma velocidade de 1 ml/min, consumindo 60 ml e 30 ml respectivamente, e o método apresentado neste trabalho empregou 0,7 ml/min, o que durante 18 min utilizou 12,6 ml de solvente, gerando uma redução de praticamente 5 vezes, comparado ao primeiro método, e de 2 vezes comparado ao segundo. Isto representa uma economia financeira para o laboratório e redução na quantidade de resíduo produzido, o qual necessita de um descarte apropriado. Os resíduos gerados por este trabalho foram encaminhados para a Central de Resíduos da UFRGS.

A velocidade de fluxo do sistema cromatográfico determina a velocidade em que as amostras serão analisadas. Uma velocidade mais alta faz com que as substâncias da amostra sejam mais carregadas pela fase móvel, e uma mais lenta, faz com que as substâncias da amostra fiquem mais retidas na coluna. O ajuste ideal dela deve ser obtido por testes e repetições, até que se obtenha uma boa resolução

cromatográfica. As velocidades de fluxo do eluente foram testadas até que se obtivesse um cromatograma com melhor separação de picos, e cuja pressão do sistema ficasse dentro da capacidade especificada para a coluna. A velocidade de fluxo selecionada foi 0,7 ml/min.

O solvente utilizado nos métodos de referência foi o metanol, mas optou-se por utilizar a acetonitrila porque o cromatograma obtido com este solvente foi melhor resolvido. Isto se dá provavelmente devido a polaridade da acetonitrila ser de 6,2 e do metanol ser 6,6, o que faz com que o composto de pico não identificado ao lado do pico do ácido clorogênico fique um pouco menos retido, e mais afastado do pico da substância química de referência, causando uma melhor resolução.

O comprimento de onda para quantificação do ácido clorogênico tem apresentado variações a cada estudo, mas geralmente mostrando uma tendência de 280 nm para quantificar compostos fenólicos em geral e de 325 a 340 nm mais especificamente para o ácido clorogênico. Foi feito então um ensaio para verificar qual o comprimento de onda seria o mais apropriado para quantificar a substância química de referência, e este foi determinado em 327 nm.

Os parâmetros de eficiência do sistema cromatográfico quantificados se mostraram satisfatórios. O tempo de retenção da SQR em 7,179 serve como referência para encontrar o ácido clorogênico em outros cromatogramas, mas não deve ser utilizado como única forma de caracterização da amostra, outros parâmetros devem ser incluídos, como o espectro de absorção ultravioleta. O número de pratos teóricos indica a eficiência da coluna, e foi obtido um valor de 1018,04. O fator cauda foi calculado com um valor 0,9, indicando que o pico não é simétrico, mas não possui cauda, pois é menor que 1. Estes resultados indicam que o sistema otimizado foi eficiente para quantificar o ácido clorogênico.

Para a composição das fases móveis, o método utilizado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) utilizou um sistema gradiente linear com 4 soluções, e o de VIZZOTTO (2005) utilizou também um sistema linear, com a diferença de usar 2 soluções. O segundo método mostrou-se mais racional, pois esta alteração permitiu

uma economia de solventes que, como já mencionado anteriormente, apresentou maior praticidade ao estudo. Foi escolhido um método utilizando duas soluções, pois além de mais econômico, permitiu a utilização da solução de limpeza das colunas em um dos canais livres, que foi padronizada como uma mistura de acetonitrila 65 % e água 35 %, sem adição de ácido trifluoroacético. Isto permitiu que fossem realizadas análises noturnas, ao programar o sistema de injeção automática para aplicar as amostras, seguidas de uma limpeza com esta solução. Ambos métodos iniciaram a eluição com água pura acidificada, até terminar com solvente orgânico. No método otimizado iniciou-se com uma solução de acetonitrila 5%, acidificada com ácido trifluoroacético, isto porque somente o pico do ácido clorogênico foi identificado e quantificado, não havendo a necessidade de analisar outros picos.

Quanto a acidificação da fase móvel com ácido trifluoroacético, ela mostrou-se importante provavelmente devido ao fato de que este ácido, ao ionizar-se nas soluções das fases móveis, auxilia o ácido clorogênico e os outros compostos fenólicos a manterem-se na forma conjugada, o que facilitaria sua passagem pela coluna, que por ser de fase reversa, tendo uma maior afinidade por substâncias ionizadas. No método de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) foi empregado o ácido fórmico 5 % tanto na água quanto no metanol das quatro soluções, e no método de VIZZOTTO (2005) foi empregado o ácido clorídrico até acidificar a pH 2,3 somente na solução com água. O HCl é um dos poucos ácidos que é capaz de oxidar o aço inox, e o sistema CLAE possui diversos componentes feitos deste material. Além deste motivo, o ATF foi escolhido em função de sua acidez e capacidade de ionizar substâncias presentes nas amostras, como o ácido clorogênico, mesmo quando adicionado em pequenas quantidades. Ele foi testado adicionando-se quantidades até 0,1 % nas duas soluções da fase móvel, e verificou-se que ele colaborou com o aumento da resolução do cromatograma, e com uma quantidade de 0,05 % já apresentou resultado significativo. Com base neste resultado, definiu-se o ATF como componente da fase móvel e a sua proporção estabelecida em 0,05 %.

### 6.1.2 Condições de Extração

O próximo passo após definir o sistema CLAE que melhor quantifica a substância química de referência foi definir a extração da planta que extrai em maior quantidade esta substância. Para isto testou-se qual a melhor proporção entre planta e solvente que é capaz de solubilizar esta substância, adicionando-se de forma crescente material vegetal e mantendo constante o solvente. A quantidade ideal foi de 2,5 g de planta em 20,0 ml de solvente, pois o teor da substância química de referência cresceu diretamente proporcional com o aumento da quantidade da planta até este ponto, a partir do qual ele não mais aumentou. Presume-se que houve uma saturação do solvente com o ácido clorogênico, e com este resultado pode-se definir a esta proporção como ótima para produzir um extrato para ser analisado.

O tipo de solvente utilizado é um item na produção de um extrato que possui grande importância, pois de acordo com a sua polaridade ele poderá extrair um certo tipo de substâncias, que são solúveis no mesmo. Como TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) utilizaram uma mistura de metanol e água a 80 % adicionado de NaF e VIZZOTO (2005) utilizou apenas metanol, testou-se a utilização de diversas concentrações de metanol com água e etanol com água, produzindo-se um extrato e injetando-se no sistema CLAE. Foi possível verificar que para extrair o ácido clorogênico, o extrato metanólico sem água foi a melhor alternativa, já que extraiu uma maior quantidade desta substância.

Com a proporção entre planta e solvente definida e o melhor solvente para fazer o extrato, o passo seguinte foi definir o método de extração. Existiam três possibilidades: a sonicação, a maceração ou a turbólise. O resultado do ensaio da sonicação evidencia que a extração da substância química de referência é facilitada por este método. O tempo de contato da solução extrativa com as ondas ultrassônicas teve melhor resultado em 30 min, pois até este tempo houve um crescimento da concentração deste marcador, e após este tempo, a sua concentração começa a decair. Isto provavelmente acontece devido ao fato do equipamento produzir calor a medida que gera as ondas, e a substância pode ter sofrido alguma degradação neste ponto.



Para a maceração, observou-se que a concentração extraída não variou a medida que aumentou o tempo de contato da planta com o solvente extrator. O tempo que foi utilizado nos trabalhos de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005) foi de um máximo de 24 h e *overnight*, respectivamente, e verificou-se que com este método de extração a concentração não variou significativamente entre 1 e 48 h. Já para a turbólise, o resultado encontrado mostra que esta forma de extração facilita a solubilização da substância química de referência no extrato. O tempo a partir do qual a concentração do ácido clorogênico não aumentou foi 1,5 min. Com base nestes três resultados definiu-se como forma ótima de extração a turbólise com 1,5 min de agitação a 10.000 rpm seguida de maceração em geladeira por 8 a 12 h, porque apesar de não haver diferença significativa no tempo de permanência à baixa temperatura, optou-se mantê-lo por uma questão de praticidade e de rotina laboratorial, pois quando as extrações eram feitas no final do dia, as amostras eram deixadas de um dia para o outro por este período, e quando as extrações eram feitas no início do dia, as amostras eram deixadas também por este período em geladeira para padronizar o trabalho.

Para o extrato poder ser injetado no sistema CLAE, ele deve passar por um processo de purificação; do contrário pode haver a possibilidade de alguma partícula do material vegetal de tamanho maior que o poro da coluna ser injetada junto com a amostra, e isto pode causar uma obstrução no fluxo, podendo aumentar a pressão interna da coluna e comprometer o resultado da análise. Por estes motivos, se torna necessário um processo de purificação dos extratos, que podem ser químicos, físicos ou biológicos. Com o extrato produzido, foi necessário identificar a melhor forma de purificá-lo, e para isto o critério de definição foi qualitativo, que foi observar a presença de partículas do fruto na solução, e esta foi evidenciada no momento da microfiltração, já que com a membrana utilizada, qualquer partícula acima de 0,45 µm de comprimento fica retida, obstruindo este fluxo. Para isto, três formas foram testadas: a adição do reagente de Carrez, a centrifugação e a pré-filtração.

A forma química mostrou-se muito eficiente para retirar as partículas da solução, pois o extrato produziu um precipitado floculado imediatamente após a

adição do reagente, proporcionando a obtenção de um sobrenadante claro. Foi verificado que estes extratos tinham a melhor filtração em membrana PVDA 0,45  $\mu\text{m}$ , comparado aos outros métodos, e não foi necessário utilizar a centrifugação para decantar o material péctico em suspensão nos extratos, e também não foi necessária a utilização de pré-filtro.

A centrifugação foi o método de purificação utilizado nos estudos de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) e VIZZOTTO (2005), sendo que as velocidades de rotação empregadas foram de 11.500 por 15 min e 15.000 rpm por 20 min, respectivamente. O resultado observado foi que mesmo com uma velocidade inferior (2.000 rpm por 20 min) foi possível decantar o extrato e separar o sobrenadante, mas o escolhido como ótimo foi 3.000 rpm por 15 min. Para purificar os extratos com diversos solventes extratores, foi verificado que de acordo com a crescente adição de água, a centrifugação não era tão efetiva, e a filtração em membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  ficava mais dificultada, pois havia uma maior suspensão de matérias pécticas no extrato. Com isto, foi necessária a utilização do pré-filtro antes da filtração com membrana PVDF para retirar as partículas de sujidade.

O outro método, a pré-filtração não foi eficaz para purificar os extratos que não foram bem sucedidos na centrifugação. Isto provavelmente se deu por dois motivos: pela pequena quantidade de amostra a ser filtrada (20 ml) e porque o papel de filtro é de celulose, uma substância bem polar, e como a solução era metanólica, supõe-se que houve uma saturação dos poros pelas substâncias pécticas polares do fruto que ficaram aderidas na sua superfície, e impediram a passagem da solução extrativa através dele.

A microfiltração utilizando membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  foi utilizada como a última etapa de purificação do extrato, diretamente antes de ser injetado no sistema CLAE, pois impede que passem partículas maiores que a sua malha que podem causar obstrução na coluna. Esta membrana hidrofílica tem como principal emprego o auxílio na filtração de soluções polares. As soluções extrativas testadas com etanol e metanol tiveram uma filtração facilitada com este processo, mas as soluções obtidas

dos extratos do teste de proporção dos solventes em que se adicionou água foram mais difíceis de serem filtradas, em função de ainda apresentar partículas em suspensão nela, causando uma obstrução nos poros e diminuindo o fluxo. Isto aconteceu porque as substâncias pécticas são polares, o que facilitou a dispersão delas na solução, e diminuiu o precipitado. Para estas soluções foi necessário um emprego de força maior para filtrá-las.

Para auxílio destes processos sem uma eficaz separação prévia, foi empregado o pré-filtro, obtido a partir de papel de filtro comum recortado no diâmetro do suporte da membrana. O resultado observado foi uma melhora na filtração, uma vez que as partículas que causavam obstrução na membrana de PVDF foram, na sua maior parte, retidas neste pré-filtro. Mas este processo não foi selecionado para o método otimizado porque obteve-se uma filtração muito superior em com extratos com concentração de 8:1 (solvente:soluto) e somente com centrifugação de 3000 rpm, sendo necessária uma força de pressão na seringa e tempo de filtração muito inferiores aos extratos sem uma eficaz separação prévia.

Para verificar a melhor forma de preservação do teor da substância química de referência, foram testadas três maneiras: a adição de fluoreto de sódio, o acondicionamento com papel alumínio e armazenamento dentro e fora da geladeira durante a maceração. TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) utilizou NaF para evitar a ação das polifenol oxidases sobre os compostos fenólicos associado com a armazenagem em geladeira por um máximo de 24 h. Testou-se a adição deste sal nas soluções EP1, armazenando-se em geladeira por 48 h, e o resultado indica que não houve variação no teor das amostras contendo o NaF com relação às que não continham ele. Supõe-se que devido ao fato das amostras conterem apenas a água das frutas, o teor mais elevado de metanol foi capaz de inativar estas enzimas. O método utilizado por TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) empregou uma mistura de 80 % de metanol, e talvez com isto seja necessária a adição de um conservante. Pode ter também ocorrido esta indiferença devido simplesmente a ter sido armazenado em geladeira, e isto foi o suficiente para preservar o teor do ácido clorogênico.

O acondicionamento com papel alumínio se mostrou eficaz para preservar o teor do ácido clorogênico quando as amostras foram mantidas fora da geladeira. Isto porque dentro da geladeira não há entrada de luz, e mesmo com ou sem papel alumínio não houve diferença significativa. Mas para os que foram armazenados fora da geladeira, as amostras com papel alumínio apresentaram um teor mais elevado da substância química de referência do que os que não foram protegidos por ele. Isto demonstra uma tendência do ácido clorogênico ser mais facilmente hidrolisado pela ação da luz quando em solução metanólica. Comparando ao teor das amostras que foram armazenadas dentro e fora da geladeira, evidencia que as que foram armazenadas fora da geladeira tiveram uma degradação significativa do teor.

O teste do armazenamento em geladeira demonstrou que o teor do ácido clorogênico é reduzido ao ser armazenado fora dela, e somando-se as evidências dos ensaios com papel alumínio e NaF, pode-se afirmar que o ácido clorogênico em solução metanólica é mais facilmente hidrolisado pela ação da luz. Isto vai de encontro à especificação do padrão adquirido no mercado, que permite o armazenamento à temperatura ambiente. Por este motivo armazenou-se tanto o padrão quanto as soluções-padrão congelados, a  $-4^{\circ}$  C. Sabe-se que pelo fato de estar dissolvido em metanol o torna mais propenso à oxidação, que pode ser facilitada pelo aumento da temperatura e pela exposição à luz. Em virtude destes fatos, definiu-se que o armazenamento em geladeira entre 8 e 12 h é a forma otimizada de conservação do extrato.

## **6.2 VALIDAÇÃO**

A curva de calibração foi obtida realizando-se ensaios em triplicata durante três dias diferentes. Ela apresentou uma equação da reta  $y = 45839x - 18070$  e  $r^2 = 0,9999$ , e com isto mostra excelente ajuste dos pontos à reta calculada, ficando acima do valor mínimo de aceitação de 0,98. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) demonstra forte relação verificada entre a concentração do ácido clorogênico e a resposta do equipamento (área de pico). Os valores obtidos com a análise de variância demonstraram que existe regressão linear significativa ( $P < 0,05$ ) e, que o desvio de

linearidade não foi significativo na faixa de concentração estudada. Sendo assim, foi possível, através da equação da reta, a realização da análise quantitativa do teor de ácido clorogênico nas amostras de *Prunus persica* cv. Morro Redondo.

O teste de especificidade na CLAE é projetado para detectar a presença de impureza que coelui com o pico do analito (PAPADOYANNIS; GIKA, 2001). Frequentemente, para avaliar a pureza do pico, apenas o cromatograma e a forma do pico são considerados. Uma forma elegante de acessar a pureza do pico, sem o uso de detector de massas, é a comparação de espectros gravados com o detector de arranjo de diodos durante o registro do pico cromatográfico. De acordo com os resultados deste ensaio, não se observa nenhum indício de ombro ou vale, embora haja um alongamento tipo cauda no final do pico, que se sobrepõe ao próximo pico. A banda de absorção obtida nos três pontos do pico (vales, ápice e meio) apresentou sempre as mesmas absorções, com dois picos, em 248,3 e 329 nm. Com isto, pode-se evidenciar que a substância química de referência não coelui com nenhuma outra substância, pois não apresentou sobreposições nos espectros de absorção do seu pico.

A seletividade foi obtida ao se co-injetar no sistema CLAE-DAD uma mistura das soluções referência do ácido clorogênico e do ácido caféico, e observado que o cromatograma produziu dois picos distintos, com tempos de retenção distintos (7,218 e 8,849 min respectivamente), não sobrepostos e com espectros de absorção distintos (220; 329 e 220; 324,3 nm respectivamente). Isto demonstra que o sistema foi capaz de separar a substância de referência de seu produto de degradação, conforme legislação vigente no Brasil. A resolução dos picos obtida experimentalmente foi calculada em 2,75, permanecendo acima do nível mínimo de aceitação de 2,0, indicando que os picos estão separados satisfatoriamente.

O intervalo do método foi avaliado através de uma curva padrão, na faixa de concentração entre 80 a 120 % do teor de ácido clorogênico. A linearidade apresentou uma equação da reta  $y = 7503,4x - 98307$  com  $r^2 = 0,9996$ , ficando acima do mínimo da sua especificação, que é 0,98. A faixa de concentração frente às áreas obtidas demonstra linearidade, com regressão significativa ( $P < 0,05$ ), e ausência de

desvios de linearidade, além de permitir a verificação da integridade do ácido clorogênico, isto é, não houve interferência de outros constituintes no sinal principal. Apesar de não ser exigido para métodos bioanalíticos, este estudo foi realizado em função da SQR apresentar uma ótima linearidade dentro do intervalo analisado, permitindo a sua performance dentro da especificação para métodos analíticos (BRASIL, 2003).

O teste de precisão foi feito pela realização de análises de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados demonstraram a baixa variabilidade entre os resultados obtidos no mesmo dia, obtendo-se 0,08 % de DPR, indicando que o método possui repetibilidade. A precisão intermediária é representativa da reprodutibilidade dos resultados obtidos em um mesmo laboratório e verifica se o método fornece os mesmos resultados com variações como: diferentes dias, analistas e equipamentos. O DPR, que representa a variação relativa de todos os resultados foi menor que 0,5 %, indicando que o método possui precisão intermediária. A análise dos resultados dos parâmetros repetibilidade e precisão intermediária para o extrato de *Prunus persica* cv. Morro Redondo demonstra a satisfatória reprodutibilidade do método cromatográfico, visto que variações de até 15 % são aceitas quando aplicados a matrizes biológicas (BRASIL, 2003).

A exatidão foi analisada mediante adição de alíquotas de solução referência de ácido clorogênico na solução E1 após ter sido extraídas, e analisada em sistema CLAE o percentual de quantificação da SQR, relativo a soluções não adicionadas. Com uma adição de 10 µg de SQR, quantificou-se 9,77 µg, obtendo-se um percentual de 97,73 % com DPR 0,68 %. Para uma adição de 20 µg de SQR, quantificou-se 19,69 µg, obtendo-se um percentual de 98,43 % com DPR 0,54 %. Na adição de 30 µg de SQR, quantificou-se 29,79 µg, obtendo-se um percentual de 99,29 % com DPR 0,29 %. Estes resultados geram um percentual de quantificação médio de 98,49 % e DPR 0,09 %, permanecendo bem abaixo da especificação máxima de 15 %. Isto indica que o método possui exatidão no intervalo de linearidade.

Para realizar o teste da recuperação, adicionou-se no preparo das amostras (solução E1), alíquotas de solução referência de ácido clorogênico, e analisou-se no sistema CLAE este extrato, comparando-se o teor deste com o de soluções não adicionadas, e calculando-se o valor percentual da recuperação. Observou-se que para uma adição de 10 µg da solução referência, recuperou-se 9,94 µg e obteve-se uma média de 99,39 % de recuperação, para uma adição de 20 µg da solução referência, recuperou-se 19,80 µg e obteve-se uma média de 95,64 % de recuperação e para uma adição de 30 µg da solução referência, recuperou-se 29,08 µg e obteve-se uma média de 96,44 % de recuperação. Estes resultados geram uma média de 97,32 % de recuperação da substância química de referência. Isto significa que o método de extração possui eficiência de extração.

A robustez pode ser definida como a habilidade do método analítico em reproduzir, sem diferenças não previstas, os resultados obtidos em diferentes laboratórios ou diferentes circunstâncias. As variações nos parâmetros do método são selecionadas de modo a representar a variação esperada caso o método seja executado em diferentes condições. Originalmente o teste de robustez foi introduzido para evitar problemas em estudos interlaboratoriais e para identificar os potenciais fatores responsáveis pelas variações. Isto significa que este teste era executado nos últimos estágios da validação do método, associando assim, o risco de novo desenvolvimento e otimização caso o método não apresentasse robustez. Buscando evitar o desperdício de recursos é importante que a robustez seja avaliada nas primeiras etapas do processo de validação (HEYDEN *et al.*, 2001).

Para o teste de robustez, utilizaram-se como parâmetros o aumento no fluxo da fase móvel, a substituição da coluna cromatográfica por outra da mesma marca e modelo, porém com lote diferente, e a alteração na composição da fase móvel. Os resultados apresentaram uma variação nos tempos de retenção da substância química marcadora, permanecendo inalterados os teores do mesmo, semelhantes aos encontrados para as análises de precisão, com exceção do teste do sistema sem ATF. Quando o fluxo da fase móvel foi aumentado, houve uma leve, porém notável diminuição no tempo de retenção, isto devido ao fato do ácido clorogênico possuir

afinidade pelo carreador, tendo sido mais carreado com um fluxo maior. Isto fez com que ele passasse pela coluna cromatográfica em menor tempo, e assim, sendo menos retido. O sistema sem ATF apresentou uma redução no tempo de retenção ainda mais pronunciada, e isto foi devido a capacidade do ácido clorogênico ionizar-se pela presença do ATF, o que faz com que ele tenha mais afinidade pela coluna, que é de fase reversa. Como ele teve menos afinidade pela coluna, ele foi carreado mais facilmente pela fase móvel, e com isto, teve um tempo de retenção reduzido. O pico que sai logo após o pico do ácido clorogênico apresentou-se visível, evidenciando que mesmo sem o ATF ainda houve separação da substância química marcadora. Para este teste, a concentração da SQR apresentou uma diminuição de aproximadamente 10 %, indicando que o ATF interferiu na determinação da sua concentração. Com estes resultados, pode-se afirmar que o método de análise do ácido clorogênico por CLAE é robusto em relação aos parâmetros avaliados, com restrição à variação de sistema eluente pela não adição de ATF.

### **6.3 ANÁLISE DE CULTIVARES**

Com o método otimizado e validado, a próxima etapa foi analisar as cultivares de pêssigo fornecidas pela EMBRAPA Clima Temperado. Para isto, foi necessário verificar a perda por dessecação com auxílio da balança infravermelho. O resultado evidenciou certa homogeneidade na umidade destas, cujo teor variou entre 68,70 a 77,33 %. Este percentual foi incluído no cálculo do teor de ácido clorogênico em massa seca, pois como na amostra havia um elevado teor de umidade, foi necessário para poder calcular-se o teor da substância química de referência com exatidão e compará-lo com as outras variedades.

O ácido clorogênico em cada cultivar apresentou certa variação no seu teor, que variou de 0,18 a 6,63 mg/kg em peso seco. Isto pode ser explicado porque cada variedade cultivada tem suas características metabólicas e investimento em produção de compostos fenólicos diferentes. Pode-se comprovar este dado pelo perfil cromatográfico do extrato metanólico das variedades de pêssigo, que devido a sua polaridade, é capaz de extrair a maioria dos compostos fenólicos. Os cromatogramas



mostra que diversos compostos similares, porém com sutis diferenças na sua estrutura são metabolizados pelo pêssego, e de acordo com o espectro de absorção deste outros compostos, pode-se afirmar que alguns deles são ácidos fenólicos. Estes apresentaram banda de absorção característica (aproximadamente 327 nm) e eluíram muito próximos uns dos outros devido a sua polaridade ser muito próxima (Anexos 7 a 18). Para uma identificação mais completa, é necessário utilizar um cromatógrafo acoplado ao detector de massas.

Comparando-se com outros trabalhos realizados com o pêssego, pode-se comparar semelhanças cromatográficas. O trabalho de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) com a cultivar Summer Sweet mostra um pico que elui antes do ácido clorogênico, que foi identificado como ácido neoclorogênico (ácido 5-*O*-cafeoil-quinico). Como não havia disponível padrão comercial desta substância, não foi possível fazer a comprovação, mas presume-se que seja o pico que aparece com tempo de retenção de 4,5 min na Figura 9. Uma outra substância que elui logo após o ácido clorogênico, também apresentou esta absorção característica dos ácidos fenólicos com tempo de retenção em 7 min. Comparou-se o espectro desta substância com o do ácido caféico, e verificou-se que não eram a mesma substância.

Com relação às outras substâncias que foram detectadas, testou-se comparando a padrões de quercetina, rutina, canferol e isoquercetina, mas estes não possuíam a mesma absorção nem os tempos de retenção destas substâncias. TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) identificaram quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-glicosídeo e quercetina-3-rutinosídeo. Existe a possibilidade destes compostos estarem presentes no extrato do pêssego, mas para a identificação correta deles é necessária fazer um hidrólise ácida da amostra, para que as agliconas sejam liberadas, e isto em uma análise de rotina do ácido clorogênico é possível que ele seja degradado.

Todas as cultivares metabolizam o ácido clorogênico, mas nem em todas ele foi o composto majoritário. Nas cultivares Aurora 2, Granada e Sensação, outras substâncias foram detectadas em maior quantidade. Como cada variedade foi

desenvolvida pelo programa de melhoramento genético da EMBRAPA Clima Temperado, é de se esperar que haja uma variação química entre estas cultivares. O ácido clorogênico é um composto que está presente em todas as cultivares analisadas, mas pode-se verificar outras substâncias químicas que também estão presentes em todas nestas cultivares, porém em diferentes proporções. A substância que TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001) identificaram como neoclorogênico, aparece bem evidente nestas cultivares, com área sobre a curva muito próxima à do ácido clorogênico, e no caso da cv. Sensação chega a ultrapassá-la. Isto evidencia uma variabilidade química intra-específica, mas ressalta a comprovação da validade do ácido clorogênico como marcador da espécie *Prunus persica* L., como encontrado em outros estudos.

No estudo de TOMÁZ-BARBERÁN *et al.* (2001), os pêssegos Summer Sweet, Snow King, Snow Giant, Champagne, September Snow, Flavorcrest, Spring Lady, Rich Lady, O'Henry e September Sun apresentaram uma variação entre 1,4 e 24,7 mg/kg. Já VERSARI *et al.* (2001), encontraram nas cultivares Redhaven, Maria Marta e Suncrest teores de ácido clorogênico entre 12 e 19 mg/kg. No presente estudo encontrou-se uma variação de 0,18 a 6,44 mg/kg em peso seco. Esta diferença encontrada entre estes estudos deve-se basicamente por dois motivos: o primeiro é que não foi incluída a perda por dessecação nos estudos encontrados na revisão bibliográfica, e foi incluído no presente trabalho pelo fato de proporcionar uma quantificação em relação ao peso seco. Caso não se considerasse esta perda por dessecação, os teores estariam muito próximos aos outros estudos, variando entre 0,73 e 23,66 mg/kg, que é um dado relativo ao fruto *in natura*. O outro motivo é que devido aos estudos utilizarem diferentes cultivares, é possível uma variação química, de acordo com o que foi discutido anteriormente.

As cultivares que apresentaram os maiores teores do ácido clorogênico neste estudo foram a Morro Redondo e a Sunblaze, com 6,63 e 6,44 mg/kg de massa seca do pêssego. Para que se possa afirmar que estas variedades metabolizam um teor mais elevado desta SQR periodicamente, é necessário que estas análises sejam repetidas durante um período estendido, sendo sugerido um mínimo de cinco anos, empregando-se cinco safras diferentes, devido ao fato das condições climáticas de

cada ano poderem interferir na produção metabólica de cada pessegueiro, e a aplicação de uma média estatisticamente calculada se faz necessária para obtenção de um resultado próximo da realidade. Este prazo foi sugerido em função da periodicidade das condições climáticas terem um ciclo de aproximadamente quatro anos, com a manifestação dos fenômenos El Niño e La Niña. Com base nestas análises seria possível confirmar que as cultivares Morro Redondo e Sunblaze são as que produzem a SQR com um teor mais elevado, ou verificar quais outras produziam mais esta substância, para que possam ser utilizadas em maior escala na produção alimentícia como um alimento funcional.

## 7 CONCLUSÕES

- Com base nos métodos encontrados em revisão bibliográfica, diversos parâmetros foram testados e foi encontrado um método que foi considerado otimizado para extrair, analisar e quantificar o ácido clorogênico em pêssego;
- A detecção por absorção ultravioleta foi capaz de caracterizar a substância química de referência no pêssego, o ácido clorogênico e o comprimento de onda em que foi melhor caracterizado foi 327 nm;
- A maceração em geladeira se apresentou como a melhor forma de extrair, junto com a turbólise, e de conservar as amostras de pêssego, pois ao mantê-

las resfriadas, impede que as polifenoloxidasas degradem os compostos fenólicos e também por evitar os efeitos deletérios da luz;

- O Reagente de Carrez apresentou-se como uma boa forma de purificar o extrato, mas a centrifugação foi a melhor maneira, pois evita a deposição de resíduos no cromatógrafo;
- A partir dos resultados obtidos para a validação metodológica analítica empregada pode-se afirmar que o método CLAE foi devidamente validado, apresentando linearidade, especificidade, seletividade, precisão e exatidão, com restrição a robustez do sistema eluente;
- Na avaliação do teor de umidade, não foram constatadas variações significativas entre os teores das diferentes cultivares analisadas;
- Na avaliação do teor de ácido clorogênico, observa-se uma grande variação entre as cultivares, que é devida às características genéticas e metabólicas peculiares de cada variedade desenvolvida;
- As cultivares que apresentaram os maiores teores em ácido clorogênico foram a Morro Redondo e a Sublaze, indicando um promissora utilização para produtos designados de alimentos funcionais;

## 7 REFERÊNCIAS

ALTAVISTA. **Babel fish traduções**. Disponível em < <http://www.babelfish.altavista.com> >. Acesso em 26.8.2005.

ALZAMORA, S. M.; ANINO, S.; SALVATORI, D. M. Impregnation techniques for the incorporation of calcium to apple matrix. In: **2001 IFT annual meeting**. New Orleans: Institute of Food Technologists, 2001.

ALZAMORA, S. M.; SALVATORI D.; TAPIA M. S.; LÓPEZ-MALO, A.; WELTI-CHANES J.; FITO P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 205–214, 2005.

AMIN, I. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 47-52, 2006.

ANDJELKOVIC', M.; CAMP, J. V.; MEULENAER, B. D.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 23-31, 2006.

ANWAR, H. G.; AZIZ, N.; ALI, S. M.; SAEED, M. Pharmacological basis for the use of peach leaves in the constipation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 87-93, 2000.

ARNOLDI, A. Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. In: **Carbohydrate Polymers**, n. 61, p. 480-485, 2005.

ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1968. p. 292.

BABICZ-ZIELINSKA, E. Food preferences among the Polish young adults. **Food Quality and Preference**, v. 10, p. 139-145, 1999.

BALASUBRAMANIAM, S.; GOVINDASAMY, S. Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Carcinogenesis**, n. 17, p. 877-879, 1996.

BAŞAR, H. Elemental composition of various peach cultivars [Scientia Horticulturae](#), v. 107, p. 259-263, 2006.

BEHRENS, W. A.; MADÈRE, R. Ascorbic acid, isoascorbic acid, desidroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in selected food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 7, p. 158-170, 1994.

BOTTON, A.; BEGHELDO M.; RASORI, A.; BONGHI, C.; TONUTTI, P. Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch). **Plant Science**, [v. 163, n. 5](#), p. 993-1000, 2002.

BOYER, R. F.; CLARK, H. M.; LAROCHE, A. P. Reduction and release of ferritin iron by plant phenolics. [Journal of Inorganic Biochemistry](#), [v. 32, n. 3](#), p. 171-181, 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899**, de 29.5.2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 19**, de 30.4.1999.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura. **Portaria nº 274**, de 05.12.1983.

BREITENEDER, H.; MILLS E. N. C. Plant food allergens — structural and functional aspects of allergenicity. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 395-399, 2005.

BRUNETON, Jean. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acibia, 1991. 594 p.

BUREAU, J. L.; BUSHWAY, R. J. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. **Journal of Food Science**, 51:128-130, 1986.

BYRNE, D. H.; CEVALLOS, B. A. C.; ZEVALLOS, L. C. Total phenolic and anthocyanin content in red-fleshed peaches and plums. **Acta Horticultrae** 5<sup>th</sup> International Peach Symposium, 2001.

CARBONARO M.; MATTERA, M. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). **Food Chemistry**, v. 72, p. 419-424, 2001.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003.

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants from Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweetpotato. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 3313-3319, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**, 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. p. 335-341.

CHIBILITI, G. B.; BYRNE, D. Interaction of aluminum and calcium on "Nemaguard" peach seedling nutrient contents and growth in sand culture. **Scientia Horticultrae**, v. 43, n. 1-2, p. 29-36, 1990.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900 -2911, 2003.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**: M – R. v. 5. Rio de Janeiro: J. Di Giorgio, 1974.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant proprieties of hidroxyflavones. **Free Radical. Biology and Medicine**, n.20, p. 35-43, 1996.

DETTORI, M.T.; QUARTA, R.; VERDE, I. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. **Genome**, v. 44, n. 5, p.783-790, 2001.

DIÁRIO OFICIAL DE PORTO ALEGRE. **Produção Agrícola: Colheita marca abertura da festa do pêssego**. ed. 2399. Quinta-feira, 4 de Novembro de 2004.



DÍAZ-PERALES, A.; SANZ, M.L.; GARCÍA-CASADO, G.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; GARCÍA-SELLES, F. J.; LOMBARDELO, M.; POLO, F.; GAMBOA, P. M.; BARBER, D.; SALCEDO, G. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: A new tool for the diagnosis of fruit allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 3, 2003.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, F. B.; ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional food in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 1, p. S1–S28, 1999.

DIRLEWANGER, E.; [GRAZIANO, E.](#); [JOOBEUR, T.](#); [GARRIGA-CALDERE, F.](#); [COSSON, P.](#); [HOWAD, W.](#); [ARUS, P.](#) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America](#), v. 29, n. 101, p. 9891-9896, 2004.

DUTRA, L. F.; SCHWENGBER, J. E.; TONIETTO, A.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de ramos de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 2, p. 93-95, 1999.

DUYN, M. A. S. V.; PIVONKA, E. Overview of the health benefits of fruit and vegetables consumption for the dietetic professionals: Selected literature. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 100, n. 12, 2000.

EMBRAPA. Sistemas de Produção. **Sistemas de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/index.htm>>. Acesso em 26.8.2005.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 24, p. 755-767, 2001.

FDA. Department Of Health And Human Services. **Food Labeling; Guidelines for Voluntary Nutrition Labeling of Raw Fruits, Vegetables, and Fish; Identification of the 20 Most Frequently Consumed Raw Fruits, Vegetables, and Fish; Reopening of the Comment Period**. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr05404a.html>>. Acesso em 26.08.2005.

FDA. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, Rockville: FDA, 2001.

FRIEND, J.; RHODES, M. J. C. **Recent advances on the biochemistry of fruits and vegetables**. London: Academic Press, 1981. 275 p.

GARCÍA-CASADO, G.; PACIOS, L. F.; DÍAZ-PERALES, A.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; LOMBARDELO, M.; GARCÍA-SELLES, F. J.; POLO, F.; BARBER, D.; SALCEDO, G. Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen

Pru p 3. [Journal of Allergy and Clinical Immunology](#), v. [112, n. 3](#), p. 599-605, 2003.

GEISSMAN, T.A. (ed.) **The Chemistry of Flavonoid Compounds**. New York: Macmillan, 1962. 666 p.

GIL, M. I.; TOMÁZ-BARBERÁN, F. A. T.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 50, v. 17, p. 4976-4982, 2002.

GIOVANNINI, L.; BOURRIER, T.; NOORMAHOMED, M. T.; ALBERTINI, M.; BOUTTÉ, P. L'allergie aux Rosacées chez l'enfant: à propos de vingt-deux cas. [Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique](#), v. [44, n. 8](#), p. 625-633, 2004.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Composição de carotenóides em nectarina (*Prunus persica*) brasileira. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 1, p. 73-79, 1998.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**, v. 77, p. 163–169, 2002.

GRAHAM, C. J. Nonstructural carbohydrate and prunasin composition of peach seedlings fertilized with different nitrogen sources and aluminium. **Scientia Horticulturae**, n. 94, p. 21–32, 2002.

GRIGELMO-MIGUEL, N.; GORINSTEIN, S.; BELLOSO, O. M. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient. **Food Chemistry**, v. 65, p. 175-181, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** 3<sup>rd</sup> ed. Londres: Oxford University Press, 1999. 543 p.

HARUTA, M.; MURATA, M.; KADOKURA, H.; HOMMA, S. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. **Phytochemistry**, v. 49, p. 910-914, 1999.

HERTER, F. G.; SACHS, S.; FLORES, C. A. Condições Edafoclimáticas para Instalação do Pomar. In: **A Cultura do Pessegueiro**. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, 1998

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. **Nutrition and Cancer**, v. 20, p. 21-29, 1992.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOLLMAN, P. C. H. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, 6.11.1996.

JOHNSON, I. T. Fibre sources for the food industry. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 49, p. 31-38, 1990.

JUNG, S.; [JESUDURAI, C.](#); [STATON, M.](#); [DU, Z.](#); [FICKLIN, S.](#); [CHO, I.](#); [ABBOTT, A.](#); [TOMKINS, J.](#); [MAIN, D.](#) **GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research**. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 5, p. 130, 2004.

KANASHIRO, A.; POLIZELLO, A. C. M.; LOPES, J.L.C.; VALIM, M.L. **Produção de Radicais de Oxigênio por Neutrófilos Ativados por Diferentes Estímulos: Função de Flavonóides**. Disponível em <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1150-1/>. Acesso em 26.8.2005. *Science Direct*, 2005. Resumo.

KISS, T.; NAGY, G.; PÉCSI, M.; MICERA, H. K. G.; ERRE, L. S. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives—X. Copper (II) complexes of chlorogenic acid and related compounds. **Polyhedron**, v. , p. 2345-2349, 1989.

KORKINA, L. G.; AFANAS'ES, I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In: SIES, H. (ed.) **Advances in Pharmacology**, v. 38. San Diego: Academic Press, 1996.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984.

KUNTZ, L. A. Fiber: from frustration to functionality. **Food Product Design**, v. 2, p. 91 – 108, 1994.

KY, C. L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.) **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.45, p. 786, 1997.

LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M. N.; SOLANO, L.; BARON, M. A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMIREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. Iron Bioavailability in Humans from Breakfasts Enriched with Iron Bis-Glycine Chelate, Phylates and Polyphenols. **Journal of Nutrition**, n. 130, p. 2195–2199, 2000.

MAGUIÑA, G.; TAPIA, M. S.; BRICEÑO, A. G.; RODRÍGUEZ, C.; SÁNCHEZ, D.; ROA, V.; LÓPEZ-MALO, A. Incorporación de *Bifidobacterium* spp. en una matriz porosa de fruta por el mecanismo hidrodinámico (PF-08). In: **Actas del 2º Congreso Español de Ingeniería de Alimentos**. Lleida: Universitat de Lleida, 2002. p. 1–4.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for chlorogenic acid. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Fungitoxic properties of *Prunus persica* oil. **Hindustan Antibiotic Bulletin**, v. 32, p. 91-93, 1990.

[MORAN, J. F.](#); [KLUCAS, R. V.](#); [GRAYR, R. J.](#); [ABIAN, J.](#); [BECANA, M.](#) Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 861-870, 1997.

M'RAD, S. B.; DRIDI, A.; DOGGUI, M. H.; KHOUANI, H.; TRITAR, F.; MERAI, S.; DJENAYAH, F. L'allergie alimentaire à la pêche. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 45, n. 5, p. 385-388, 2005.

NCBI. Entrez Genome Project. **Mapping project in *Prunus persica***. Disponível em <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=13301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=13301)>. Acesso em 26.08.2005. Science Direct, 2005. Resumos

PAGÁN, J.; IBARZ, A. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 193 – 201, 1999.

PALIYATH, G. Phenolics in Food and Nutraceuticals - **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 171–172, 2005.

PAPADOYANNIS, I. N.; GIKA, H. G. **Peak purity determination with diode array detector**. Encyclopedia of Chromatography. ISBN 0-8247-4123-4, 2001.

PASTORELLO, E. A.; PRAVETTONI, V.; FARIOLI, L.; RIVOLTA, F.; CONTI, A.; ISPANO, M.; FORTUNATO, D.; BENGTSSON, A.; BIANCHI, M. Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is

due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression. **Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 2, 2002.

PENNINGTON, J. A. T.; WILKENINGS, V. L. Final regulation for the nutrition labeling of raw fruits, vegetables and fish. 1997. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n. 11, 1997.

RAHMA, E. H.; EL-AAL, M. H. A. Chemical characterization of peach kernel oil and protein: Functional properties, *in vitro* digestibility and amino acids profile of the flour. **Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 31-43, 1988.

RANSLEY, J. K.; DONNELLY, J. K.; READ, N. W. **Food and nutritional supplements: their role in health and disease**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 197 p.

RAPEANU, G., LOEY, A. V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chemistry**, v. 94, p. 253–261, 2006.

RASEIRA, M. C. B.; QUEZADA, A. C. Classificação Botânica, Origem e Evolução. In: **Pêssego. Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de tecnologia, 2000. 154 p.

RAUPP, D. S.; ROSA, D. A.; MARQUES, S. H. P.; BANZATTO, D. A. Propriedades funcionais-digestivas do concentrado de fibra alimentar obtido de mandioca. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 286-291, 2004.

REITZ, P. **Flora Ilustrada Catarinense: Rosáceas**. Itajaí: Atual, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J. N.; PAGANGA, J. Structure-activity antioxidant relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ, J.; CRESPO, J. F.; LOPEZ-RUBIO, A.; CRUZ-BERTOLO J.; FERRANDO-VIVAS, P.; VIVES, R.; DAROCA, P. Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 1, p. 183-189, 2000.

SACHS, S.; CAMPOS, A. D. **A Cultura do Pessegueiro**. Pelotas: Embrapa/CPACT, 1998.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; COSTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology Medicine**, n. 19, p. 481–486; 1995.

SANTAMOUR JUNIOR, F. S. Amygdalin in *Prunus* leaves. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8., p. 1537-1538, 1998.

SCHENKEL, E. P.; ZANNIN, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L.; IRGANG, B. Plantas Tóxicas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003.

SHARP, J. **Quality in the manufacture of medicines and other health products**. London: Pharmaceutical Press, 2000. p. 309-321.

SLOAN, E. The top 10 global food trends. **Food Technology**, v. 56, n. 4, p. 32-57, 2005.

SOTILLO, D. V. R.; HADLEY, M.; SOTILLO, J. E. Insulin receptor exon 11+/\_ is expressed in Zucker (fa/fa) rats, and chlorogenic acid modifies their plasma insulin and liver protein and DNA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 63-71, 2006.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, n. 3, p. 276-284, 2003.

TOMÁZ-BARBERÁN, F. A. T.; GIL, M. I.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A. L.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4748-4760, 2001.

TORALLES, R. P.; VENDRUSCOLO, J. L.; HAAS, L. I. R.; FERRI, N. L.; DEL PINO, F. A. B.; ANTUNES, P. L. Caracterização parcial do escurecimento enzimático pela polifenoloxidase em pêssegos das cv granada, jade, esmeralda e maciel. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 241-244, 2004.

TRINGALI, C. **Bioactive compounds from natural sources**. New York: Taylor Francis, 2001. 693 p.

TUNÇEL, G.; NOUT, M. J. R.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 65-69, 1998.

TUNÇEL, G.; NOUT, M. J. R.; BRIMER, L. The effects of grinding, on the soaking and cooking degradation of amygdalin bitter apricot seed. **Food Chemistry**, v. 53, p. 447-451, 1995.

UN-HO, J.; JI-YOUNG, L.; SUNG-KOO, K.; JUNE-KI, K.; WON-HWAN, P.; JONG-GUK, K.; SUNG-KWON, M.; CHEORL-HO, K. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, p. 2760-2769, 2005.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. **Peaches, raw. NDB N°: 09236.** Disponível em < [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl)>. Acesso em 26.8.2005.

VAN DER STEGEN, G. H. D.; VAN DUIJN, J. Analysis of normal organic acids coffee. **9<sup>th</sup> Colloque Scientifique International sur le Café.** ASIC: Paris, 1980.

VERSARI, A.; CASTELLARI, M. PARPINELLO, G. P.; RIPONI, C.; GALASSI, S. Characterisation of peach juices obtained from cultivars Redhaven, Suncrest and Maria Marta grown in Italy. **Food Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 181-185, 2002.

VETTER, J. Plant Cyanogenic Glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.

VIZZOTTO, M. **Inhibition of invasive breast cancer cell growth by selected peach and plum phenolic antioxidants.** Texas: Horticultural Sciences of the Texas A&M University, 2005. Tese de Doutorado.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. [v. 87, n. 2](#), p. 307-311, 2004.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook fir pharmacy students and pharmaceutical chemists.** London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.

WCRF. **Food, nutrition and the prevention of the cancer: a global perspective.** Londres, 1997. Disponível em <<http://www.wcrf-uk.org/report/index.lasso>>. Acesso em 26.8.2005.

WHO. Good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. 2003. Disponível em <<http://www.who.int>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 257, p. 40–44, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003.





## 9 ANEXOS

**Anexo 1:** Informações nutricionais do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor Por</b>	<b>100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
------------------	-----------------	----------------------	--	--------------------

Água	g	88,87	0,59
Energia	kcal	39	0,0
Energia	kJ	165	0,0
Proteínas	g	0,91	0,011
Lípídeos Totais	g	0,25	0,052
Cinzas	g	0,43	0,013
Carboidratos	g	9,54	0,0
Fibras	g	1,5	0,051

**Anexo 2:** Teores de açúcares do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor por 100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
Açúcares Totais	g	8,39	0,351
Sacarose	g	4,76	0,093
Glicose (dextrose)	g	1,95	0,208
Frutose	g	1,53	0,052
Maltose	g	0,08	0,059
Galactose	g	0,06	0,061

**Anexo 3:** Teores de minerais do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor por 100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
Cálcio	mg	6,0	0,265
Ferro	mg	0,25	0,019
Magnésio	mg	9,0	0,170
Fósforo	mg	20,0	0,352
Potássio	mg	190,0	7,168
Zinco	mg	0,17	0,028
Cobre	mg	0,068	0,007
Manganês	mg	0,061	0,003
Selênio	µg	0,1	0,000

**Anexo 4:** Teores de vitaminas do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor por 100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
Ácido ascórbico total	mg	6,6	1,115
Tiamina	mg	0,024	0,005

Riboflavina	mg	0,031	0,004
Niacina	mg	0,806	0,004
Ácido Pantotênico	mg	0,153	0,046
Vitamina B-6	mg	0,025	0,010
Folato	mcg	4,0	0,000
Vitamina A	IU	326,0	11,69
Vitamina E	mg	0,730	0,086
Vitamina K	µg	2,6	0,462

**Anexo 5:** Teores de ácidos graxos do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

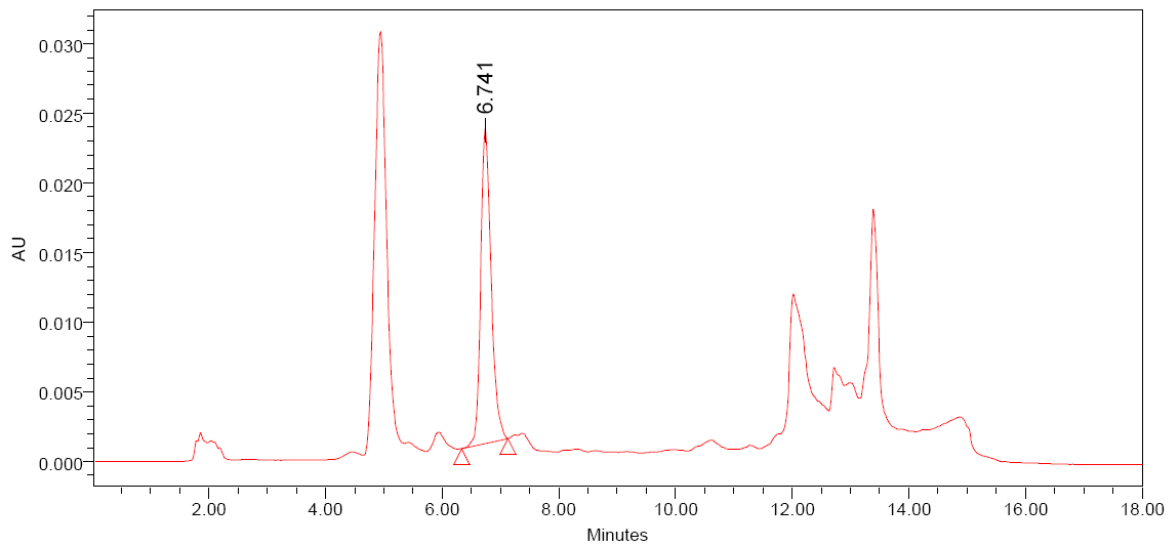
<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor por 100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
Ácidos graxos totais saturados	g	0,019	0,0
16:0	g	0,017	0,0
18:0	g	0,002	0,0
Ácidos graxos totais monoinsaturados	g	0,067	0,0
16:1	g	0,002	0,0
18:1	g	0,065	0,0
Ácidos graxos poliinsaturados	g	0,086	0,0
18:2	g	0,084	0,0
18:3	g	0,002	0,0
Fitoesteróis	mg	10,0	0,0

**Anexo 6:** Teores de aminoácidos do pêssego. Fonte: USDA, 2005.

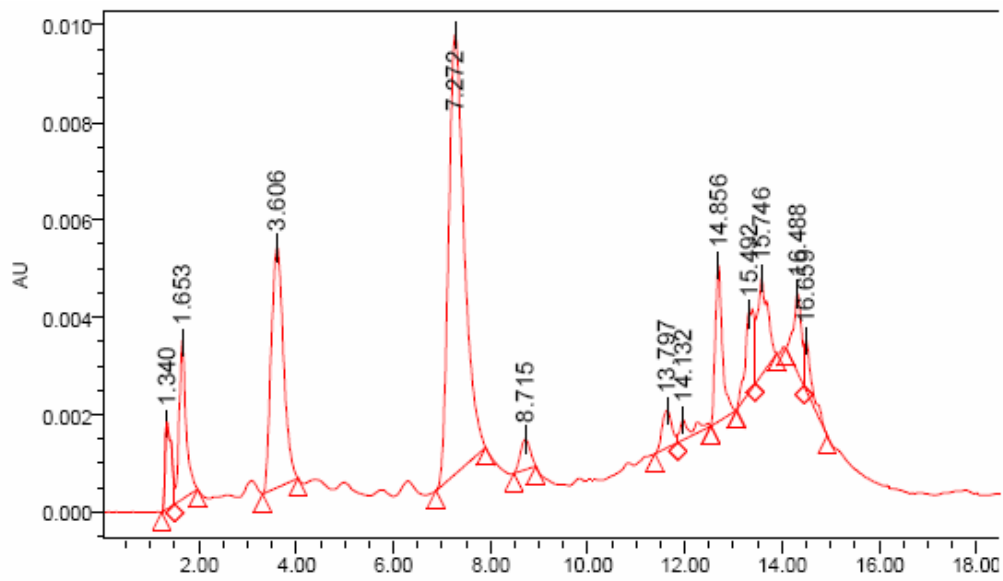
<b>Nutriente</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor por 100 gramas da Porção Comestível</b>	<b>Erro Padrão</b>
Triptofano	g	0,010	0,0
Treonina	g	0,016	0,0
Isoleucina	g	0,017	0,0
Leucina	g	0,027	0,0
Lisina	g	0,030	0,0
Metionina	g	0,010	0,0

Cistina	µg	0,012	0,0
Fenilalanina	µg	0,019	0,0
Tirosina	µg	0,014	0,0
Valina	µg	0,022	0,0
Arginina	µg	0,018	0,0
Histidina	µg	0,013	0,0
Alanina	µg	0,028	0,0
Ácido aspártico	µg	0,418	0,0
Ácido glâmico	µg	0,056	0,0
Glicina	µg	0,021	0,0
Prolina	µg	0,018	0,0
Serina	µg	0,032	0,0

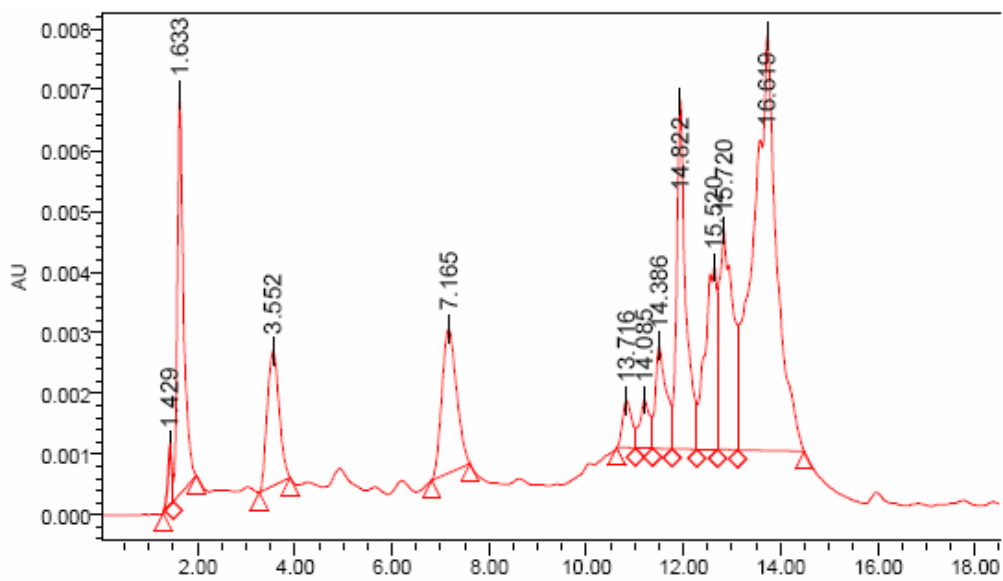
**Anexo 7:** Cromatograma da cultivar Ametista.



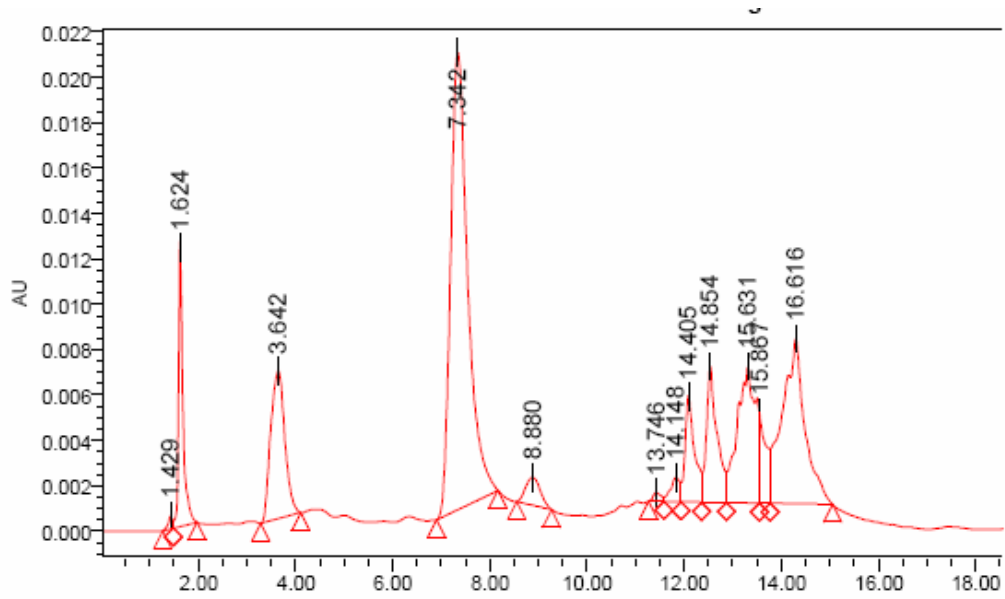
**Anexo 8:** Cromatograma da cultivar Aurora 1.



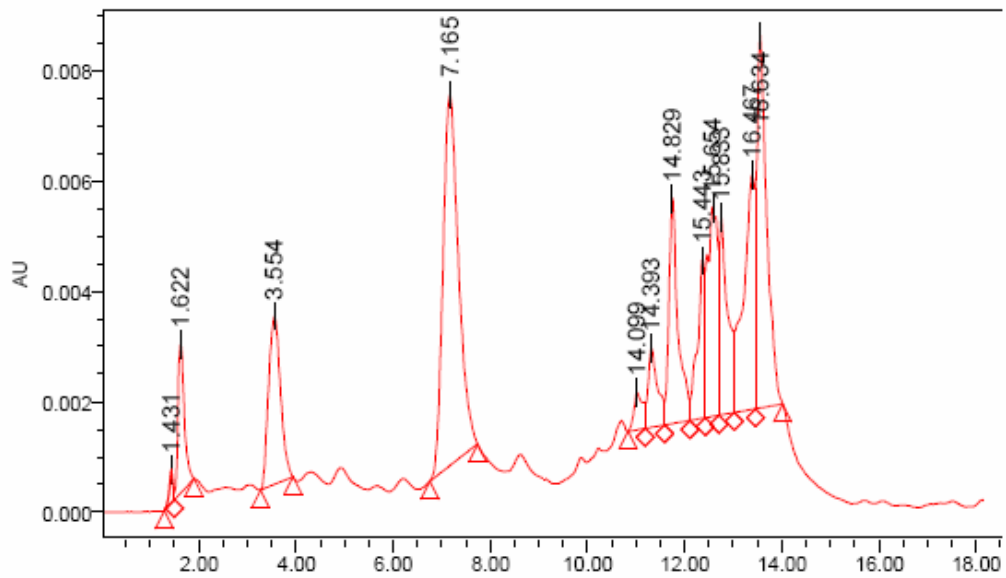
**Anexo 9:** Cromatograma da cultivar Aurora 2.



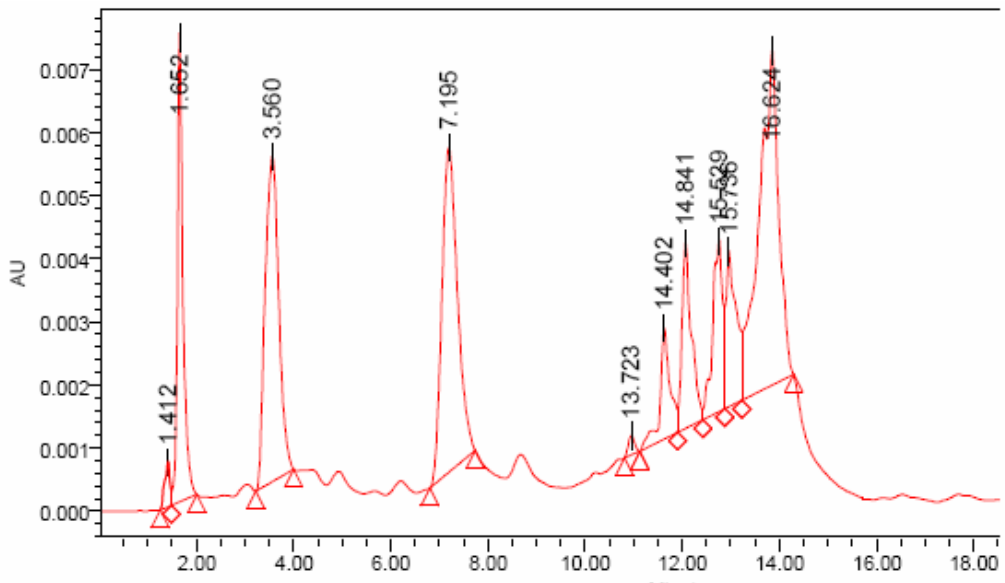
**Anexo 10:** Cromatograma da cultivar Conserva 594.



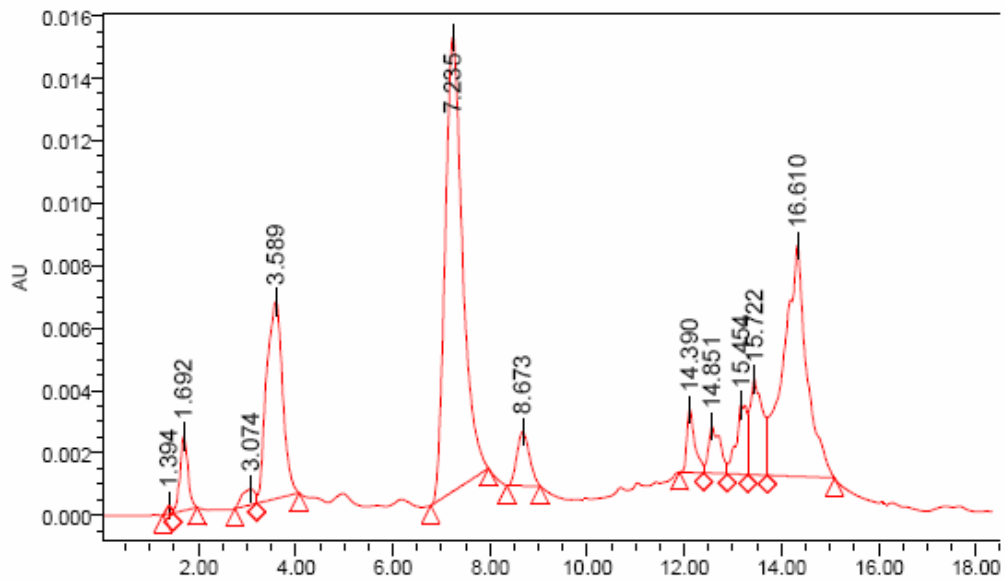
**Anexo 11:** Cromatograma da cultivar Dourado.



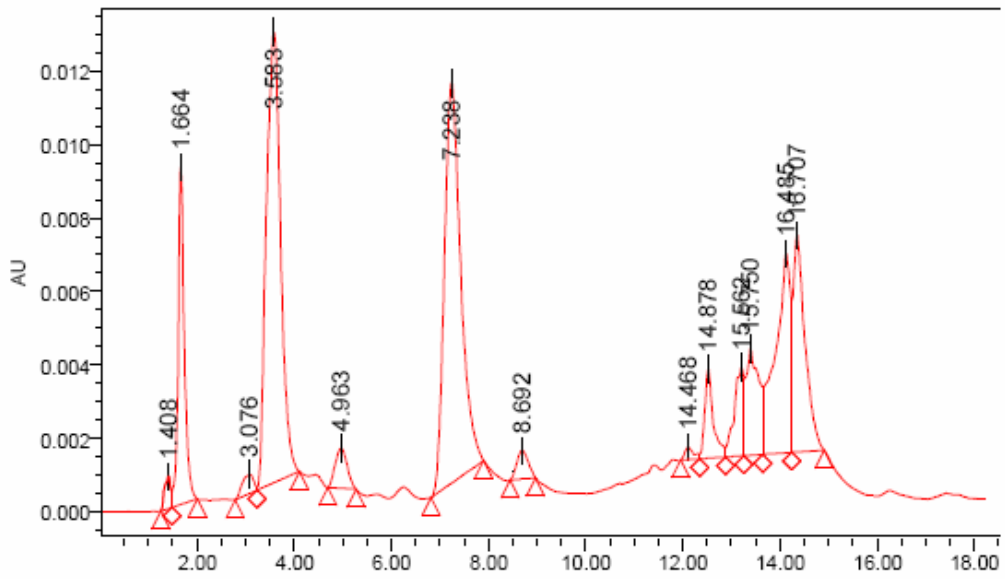
**Anexo 12:** Cromatograma da cultivar Granada.



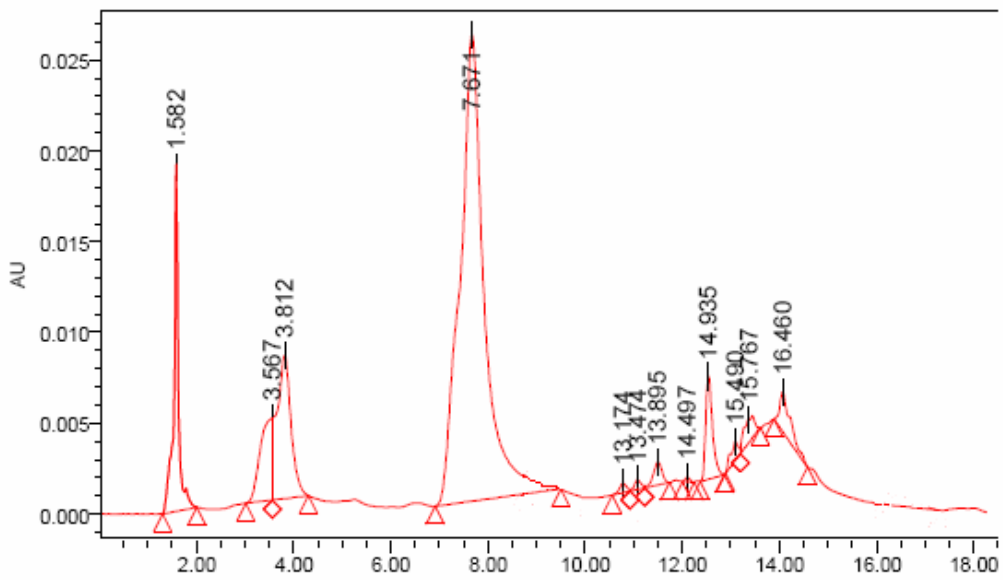
**Anexo 13:** Cromatograma da cultivar Precocinho.



**Anexo 14:** Cromatograma da cultivar Sensação.

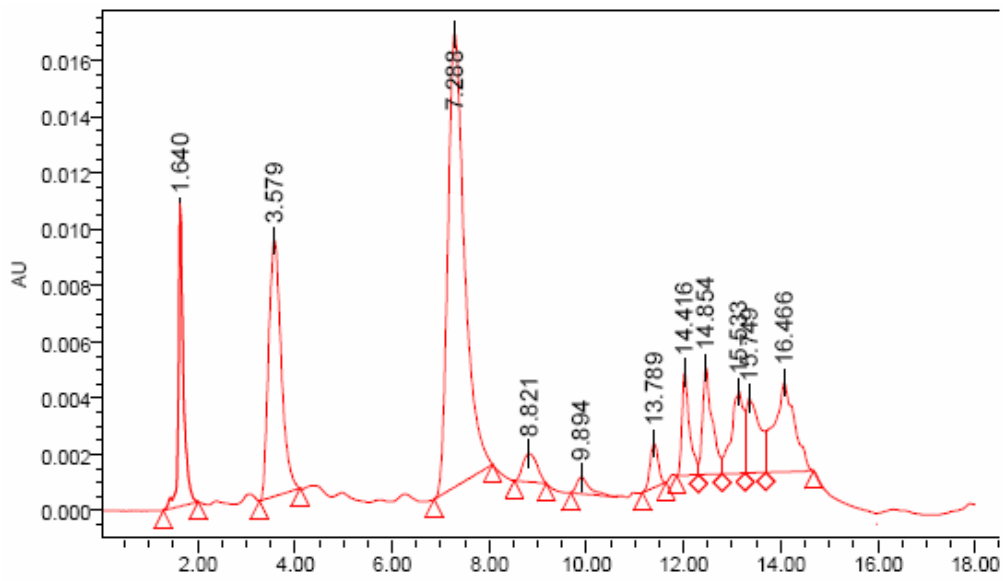


**Anexo 15:** Cromatograma da cultivar Sunblaze.

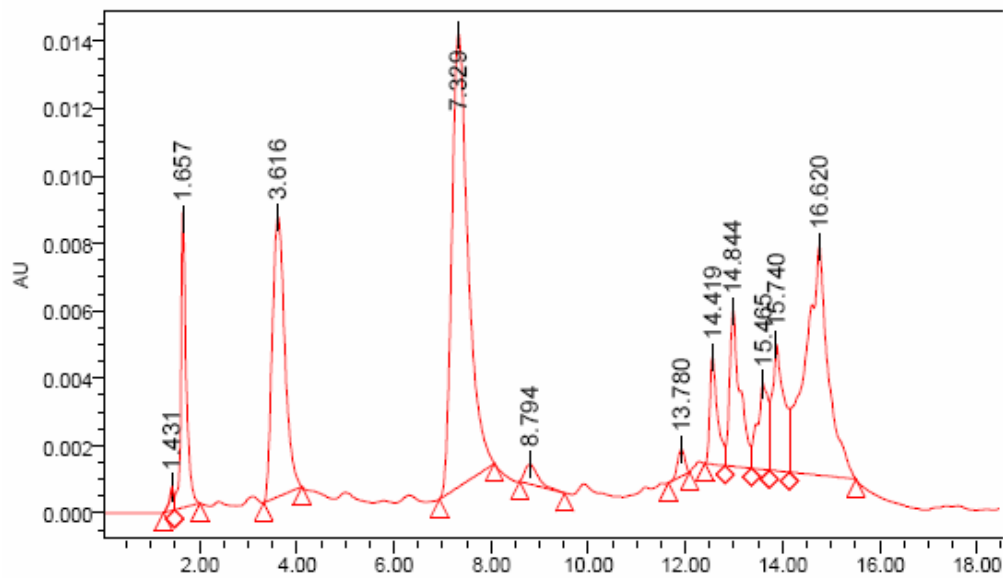


**Anexo 16:** Cromatograma da cultivar Tropic Beauty.

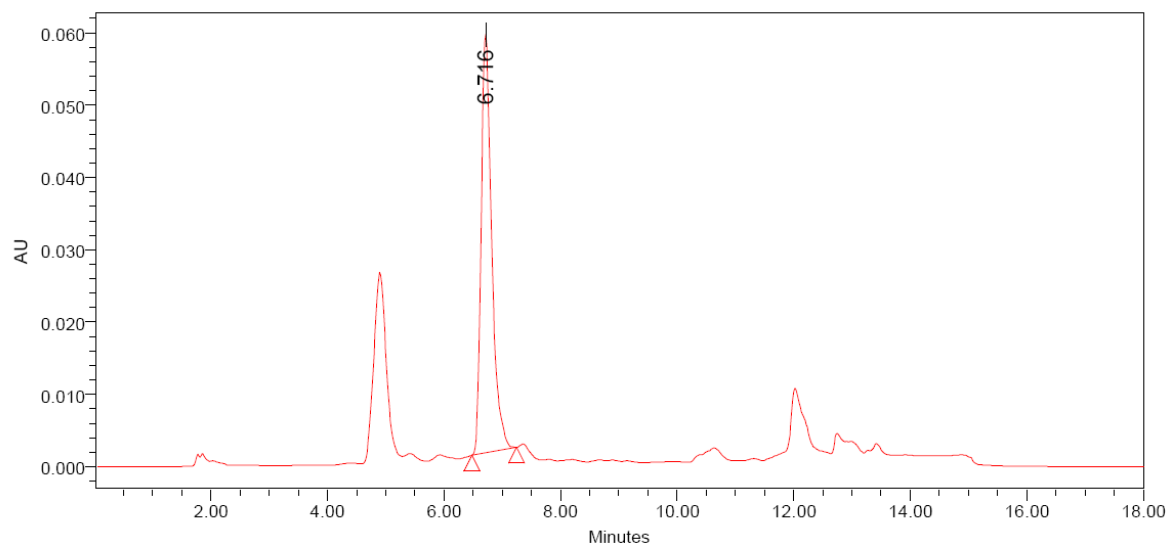




**Anexo 17:** Cromatograma da cultivar Tropic Blush.



**Anexo 18:** Cromatograma da cultivar Turmalina.



## SUMÁRIO

<a href="#">LISTA DE TABELAS</a>	<a href="#">XI</a>
<a href="#">LISTA DE FIGURAS</a>	<a href="#">XIII</a>
<a href="#">LISTA DE ESQUEMAS</a>	<a href="#">XV</a>
<a href="#">LISTA DE ANEXOS</a>	<a href="#">XVII</a>

<a href="#">LISTA DE ABREVIATURAS</a> .....	<a href="#">XIX</a>
<a href="#">RESUMO</a> .....	<a href="#">XXI</a>
<a href="#">ABSTRACT</a> .....	<a href="#">XIII</a>

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	34
3.1 HISTÓRICO.....	36
3.2 BOTÂNICA.....	37
3.2.1 Cultivares.....	39
3.2.2 Cultivares de Dupla Finalidade.....	40
3.3 CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS.....	40
3.4. ECONOMIA.....	42
3.4.1 Pólo de Persicultura do Rio Grande do Sul.....	43
3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	44
3.5.1 Compostos Fenólicos.....	44
3.5.3 Proteína Pru p 3.....	54
3.5.4 Polifenoxidase.....	57
3.5.5 Glicosídeos Cianogênicos.....	59
3.6 ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	61
3.6.1 Fibras.....	61
3.6.2 Carotenóides.....	63
3.6.3 Ácido Ascórbico.....	64
3.6.4 Minerais.....	64
3.6.5 Semente.....	64
3.6.6 Alimento Funcional.....	65
3.7 PATOLOGIAS.....	67
3.7.1 Radicais Livres.....	69
3.7.3 Outras atividades.....	70
3.8 VALIDAÇÃO.....	70
3.8.1 Especificidade.....	71
3.8.2 Linearidade.....	72
3.8.3 Precisão.....	72
3.8.4 Limite de Detecção.....	73
3.8.5 Limite de Quantificação.....	74
3.8.6 Exatidão.....	75
3.8.7 Recuperação.....	75
3.8.8 Robustez.....	76
3.9 ANÁLISES REALIZADAS COM PÊSSEGOS.....	76
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
4.1 MATERIAIS.....	80
4.1.1 Amostras Vegetais.....	81
4.1.2 Materiais.....	81

4.1.3 Equipamentos .....	82
4.2 MÉTODOS .....	83
4.2.1 Otimização .....	83
4.2.2 Validação .....	92
4.2.3 Análise das Amostras .....	97
5 RESULTADOS .....	98
5.1.1 Análise em CLAE-UV .....	100
5.1.2 Resultados da Otimização do Sistema CLAE .....	102
5.1.2 Condições de Extração .....	102
5.1.3 Resultados da Otimização da Extração .....	110
5.2 VALIDAÇÃO .....	110
5.2.1 Curva de Calibração para a Substância Química de Referência .....	110
5.2.2 Intervalo .....	113
5.2.3 Seletividade .....	114
5.2.4 Especificidade .....	115
5.2.5 Precisão .....	116
5.2.6 Exatidão .....	117
5.2.7 Recuperação .....	117
5.2.8 Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	118
5.2.8 Robustez .....	119
5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	119
5.3.1 Perda por Dessecação .....	119
5.3.2 Quantificação de Ácido Clorogênico .....	119
6 DISCUSSÃO .....	123
6.1 OTIMIZAÇÃO .....	124
6.1.1 Sistema CLAE .....	124
6.1.2 Condições de Extração .....	128
6.2 VALIDAÇÃO .....	132
6.3 ANÁLISE DE CULTIVARES .....	136
7 CONCLUSÕES .....	140
7 REFERÊNCIAS .....	142
9 ANEXOS .....	153