

## Uso de metodologias analíticas para determinação de compostos fenólicos em alimentos no Brasil: avanços e fragilidades

Use of analytical methodologies for the determination of phenolic compounds in food in Brazil: advances and weaknesses

Uso de metodologías analíticas para la determinación de compuestos fenólicos en alimentos en Brasil: avances y fragilidade

Recebido: 28/12/2021 | Revisado: 02/01/2022 | Aceito: 15/01/2022 | Publicado: 17/01/2022

**Alex Sander Lopes da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5918-1366>  
Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
E-mail: [sanderlopes@gmail.com](mailto:sanderlopes@gmail.com)

**Amanda de Jesus Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8355-8541>  
Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
E-mail: [amandasilvaprof@gmail.com](mailto:amandasilvaprof@gmail.com)

**Abdon Luis Ornelas Latif**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7236-5517>  
Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
E-mail: [ABDONLATIF@gmail.com](mailto:ABDONLATIF@gmail.com)

**Aníbal de Freitas Santos Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3022-0771>  
Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
E-mail: [afjunior@uneb.br](mailto:afjunior@uneb.br)

**Clícia Maria de Jesus Benevides**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7214-1318>  
Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
E-mail: [cbenevides@uneb.br](mailto:cbenevides@uneb.br)

### Resumo

A importância das plantas alimentícias para a saúde humana transcende o aspecto nutricional, podendo contribuir para a prevenção de doenças, em função da presença de substâncias bioativas, dentre as quais se destacam alguns compostos fenólicos. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo fazer uma revisão integrativa da literatura sobre as principais metodologias analíticas utilizadas no Brasil para extração, identificação, quantificação e avaliação da atividade antioxidante (AA) de fenólicos totais (FT) em alimentos, abordando seus avanços e fragilidades. Observou-se que ainda não foi estabelecido um protocolo universal para estudos de FT e de sua AA, pois fatores como origem da amostra ainda são preponderantes para a escolha dos métodos. O elevado custo é o principal fator limitador para a ampla utilização de técnicas mais modernas como a liofilização, apesar de outras metodologias não-convencionais como extração por ultrassom (US) e micro-ondas estarem se popularizando. A maceração, a extração com solvente, a percolação e a extração a frio permanecerem como os métodos de extração mais comuns no Brasil. Apesar do uso de técnicas cromatográficas, como HPLC, acopladas a potentes detectores serem mais precisas para quantificação e identificação, o elevado custo também tem restringido a popularização de seu uso, permanecendo a técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu como a mais difundida, devido a sua simplicidade, reprodutibilidade e conveniência. Quanto à medição da AA é comum o uso de mais de uma metodologia para a sua determinação, a fim de suprir as fragilidades de cada método.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Metodologias analíticas.

### Abstract

The importance of food plants for human health transcends the nutritional aspect, and can contribute to the prevention of diseases, due to the presence of bioactive substances, among which some phenolic compounds stand out. Thus, the present work aims to carry out an integrative literature review on the main analytical methodologies used in Brazil for the extraction, identification, quantification and evaluation of the antioxidant activity (AA) of total phenolics (TF) in foods, addressing their advances and weaknesses. It was observed that a universal protocol for studies of TF and its AA has not yet been established, as factors such as the origin of the sample are still preponderant for the choice of methods. The high cost is the main limiting factor for the wide use of more modern techniques such as lyophilization, despite other unconventional methodologies such as ultrasound (US) and microwave extraction are not becoming more popular. Maceration, solvent extraction, percolation and cold extraction will remain the most common extraction methods in

Brazil. Although the use of chromatographic techniques, such as HPLC, coupled with powerful detectors are more accurate for quantification and identification, the high cost has also restricted the popularization of its use, with the Folin-Ciocalteu spectrophotometric technique remaining as the most widespread, due to its simplicity, reproducibility and convenience. As for the measurement of AA, it is common to use more than one methodology for its determination, in order to overcome the weaknesses of each method.

**Keywords:** Phenolic compounds; Antioxidant activity; Analytical methodologies.

### Resumen

La importancia de las plantas alimenticias para la salud humana trasciende el aspecto nutricional, y puede contribuir a la prevención de enfermedades, debido a la presencia de sustancias bioactivas, entre las que destacan algunos compuestos fenólicos. Así, el presente trabajo tiene como objetivo realizar una revisión integradora de la literatura sobre las principales metodologías analíticas utilizadas en Brasil para la extracción, identificación, cuantificación y evaluación de la actividad antioxidante (AA) de los fenólicos totales (FT) en los alimentos, abordando sus avances y debilidades. Se observó que aún no se ha establecido un protocolo universal para estudios de FT y su AA, ya que factores como el origen de la muestra siguen siendo preponderantes para la elección de métodos. El alto costo es el principal factor limitante para el amplio uso de técnicas más modernas como la liofilización, a pesar de que otras metodologías no convencionales como el ultrasonido y la extracción por microondas se están volviendo más populares. La maceración y extracción por solventes seguirán siendo los métodos de extracción más comunes en Brasil. Si bien el uso de técnicas cromatográficas, como HPLC, junto con detectores potentes son más precisas para la cuantificación e identificación, el alto costo también ha restringido su popularización, quedando la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu como la más extendida, debido a su sencillez, reproducibilidad y conveniencia. En cuanto a la medición de AA, es común utilizar más de una metodología para su determinación, con el fin de superar las debilidades de cada método.

**Palabras clave:** Compuestos fenólicos; Actividad antioxidante; Metodologías analíticas.

## 1. Introdução

O crescente mercado dos produtos naturais, juntamente com o interesse dos consumidores por alimentos que tragam benefícios à saúde, tem pressionado a indústria alimentícia na fabricação de produtos mais saudáveis, assim como muitos cientistas têm direcionado suas pesquisas para este contexto (Mendonça *et al.*, 2004; Alves, 2010; Agostini *et al.*, 2017; Canepelle *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2020). O interesse dos pesquisadores por compostos fitoquímicos que apresentem bioatividade está relacionado a efeitos benéficos à saúde, como redução do risco de doenças coronarianas, atividade antioxidante, estimulação do sistema imunológico, redução da pressão sanguínea, regulação hormonal, dentre outros (Dajas, 2003; Carratu *et al.*, 2005).

Além de utilização de plantas contendo compostos bioativos, ou seus extratos, como alternativa à terapêutica convencional na prevenção e controle de doenças crônicas, a indústria tem usado alguns compostos com propriedades antioxidantes para a conservação de alimentos, substituindo os antioxidantes sintéticos, ou mesmo na produção de alimentos funcionais (Martillanes *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2020).

Os compostos fitoquímicos, dentre os quais destacam-se os fenólicos totais (FT), são substâncias derivadas do metabolismo secundário dos vegetais (Oksana *et al.*, 2012; Meregalli, 2020; Dias *et al.*, 2020), os quais são sintetizadas em diferentes partes das plantas para atuar contra predadores e pressões fisiológicas, como patógenos e ataque de insetos, radiação UV e ferimentos (Diaz Napal *et al.*, 2010; Oksana *et al.*, 2012; Khoddami *et al.*, 2013). Estes compostos estão associados às propriedades sensoriais das plantas, mas também podem ter efeitos benéficos à saúde humana, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, hipocolesterolemiantes, hipoglicemiantes e até para prevenir acidentes isquêmicos, sendo, neste caso, também denominados de compostos bioativos vegetais (Dajas, 2003; Dias *et al.*, 2020). Portanto, a importância dos compostos bioativos vegetais para a indústria alimentícia, química e farmacêutica é crescente. Nesse sentido, várias pesquisas foram publicadas evidenciando a capacidade antioxidante de alguns compostos fenólicos e seus benefícios à saúde humana (Huber & Amaya, 2008; Medina *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2020; Bennemann *et al.*, 2018).

De acordo com as diferentes estruturas químicas dos FT, os mesmos podem ser subdivididos em vários grupos, como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (Ângelo & Jorge, 2007). Os flavonoides, por exemplo, são os compostos fenólicos mais comuns e podem ser classificados em subgrupos como: flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, flavonóis

e flavanóis (Meregalli, 2020). Considerando-se a diversidade dos compostos fenólicos e o extenso número de espécies de plantas, é difícil encontrar uma metodologia universal para sua identificação e quantificação. Sendo assim, os pesquisadores têm buscado desenvolver metodologias que envolvam menor custo, menor tempo de análise, uso de menor volume de solvente orgânico, dentre outros diferenciais analíticos (Guerra *et al.*, 2016; Pinto, 2016).

Como os alimentos constituem uma matriz complexa, com produtos variando de textura sólida, líquida e pastosa, além da interação de várias substâncias químicas presentes, deve-se atentar para todas as etapas envolvidas no processo metodológico utilizado para a identificação e quantificação dos FT, que envolve a amostragem, preparo e armazenamento da amostra, extração, pureza dos padrões e a identificação e quantificação propriamente dita. Segundo Ignat *et al.* (2011), a determinação dos vários grupos de fenólicos é uma atividade complexa, apesar de vários estudos terem sido publicados (Agostini *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2017; Espinosa *et al.*, 2017; Ignat *et al.*, 2011). Visto isto, existem diversas possibilidades metodológicas de identificação e quantificação de compostos fenólicos a serem utilizadas, principalmente, por meio de métodos cromatográficos (cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE) e cromatografia gasosa (GC), associados a diferentes (fluorescência, espectrometria de massa, UV, entre outros) (Khoddami *et al.*, 2013; Kivilompolo & Hyotylainen, 2009; Mendes *et al.*, 2018; Peres, 2007; Santos *et al.*, 2020).

Assim, este artigo objetivou realizar uma revisão integrativa da literatura sobre as metodologias analíticas utilizadas no Brasil para identificação, quantificação e avaliação da atividade antioxidante (AA) de fenólicos totais (FT) em alimentos, abordando os avanços e as fragilidades das diversas técnicas. Neste intuito, inicialmente foi realizada uma abordagem sobre os compostos fenólicos, suas características químicas e sua importância para a saúde humana e, posteriormente, foram apresentadas as principais etapas envolvendo os métodos para identificação e quantificação de fenólicos totais (amostragem e preparo das amostras, obtenção dos extratos, métodos analíticos de identificação e quantificação), bem como os métodos para a medição da atividade antioxidante.

## 2. Metodologia

A pesquisa foi realizada através de uma revisão integrativa da literatura científica, conforme metodologia de Mendes (2008), em seis etapas: identificação do tema e seleção da hipótese ou questão de pesquisa para a elaboração da revisão integrativa; estabelecimento de critérios para inclusão e exclusão de estudos; definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados; interpretação dos resultados e apresentação da revisão/síntese do conhecimento.

As técnicas e métodos em uso no Brasil para a identificação, quantificação e avaliação da atividade antioxidante (AA) de fenólicos totais (FT) em alimentos foram eleitas como o tema central do presente estudo, sendo a hipótese principal a de que existem inúmeras técnicas e adaptações para estes fins e que, apesar dos muitos avanços tecnológicos, os diversos métodos ainda apresentam fragilidades que devem ser levadas em consideração para seu correto uso.

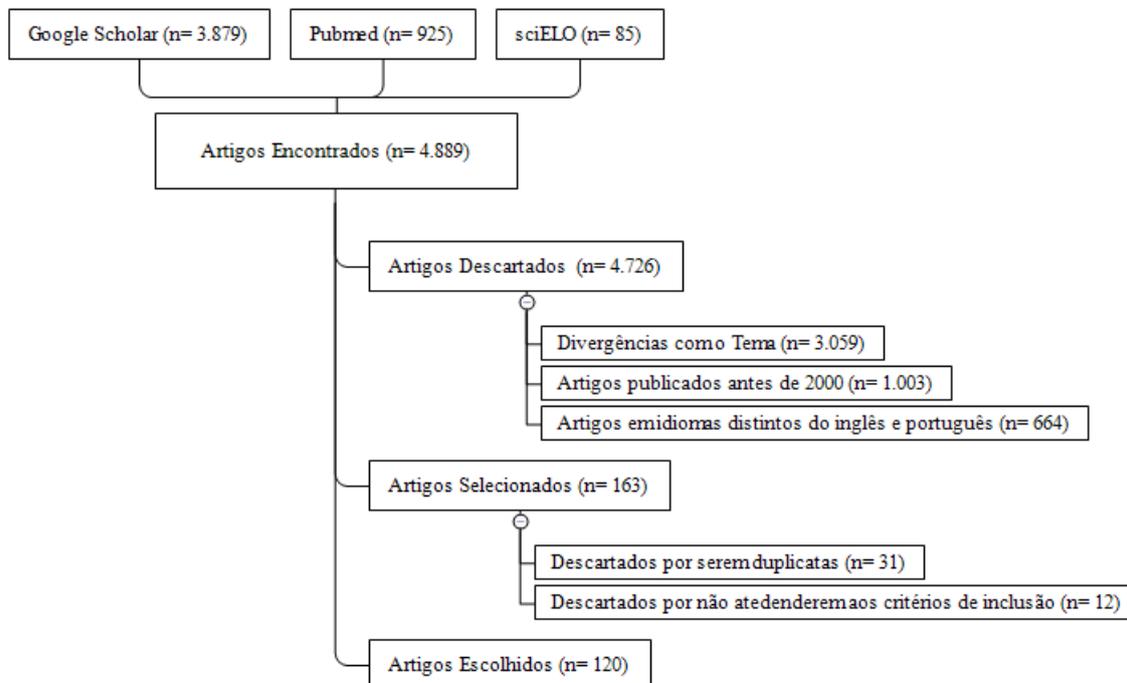
Como critérios de inclusão foram utilizados artigos científicos, livros impressos e ebooks, dissertações, teses e demais produções científicas em inglês e português prospectados principalmente nos bancos de dados *Scielo*, *PubMed* e *Google Scholar* entre os anos 2000 e 2021, que versavam sobre compostos fenólicos, presença de compostos fenólicos em alimentos, síntese vegetal, métodos de extração, separação, identificação, quantificação e atividade antioxidante destas substâncias, com foco em estudos nacionais, não descartando os internacionais para fins de conceituação teórica.

Foram estabelecidos como critérios de exclusão publicações anteriores ao ano 2000, publicações escritas em línguas diferentes do português e do inglês, artigos com divergências quanto ao tema ou que não se encaixasse nas definições de informações a serem extraídas, expostas na abordagem de construção textual adotada: características químicas e importância dos compostos fenólicos para a saúde humana; métodos para identificação e quantificação de fenólicos totais em alimentos

(amostragem e preparo das amostras, obtenção dos extratos, métodos analíticos de identificação e quantificação) e métodos para a medição da atividade antioxidante.

Um fluxograma resumido das etapas metodológicas é apresentado na Figura 1.

**Figura 1.** Fluxograma da revisão integrativa.



Fonte: Adaptado do fluxograma PRISMA. Fonte: Autores (2021).

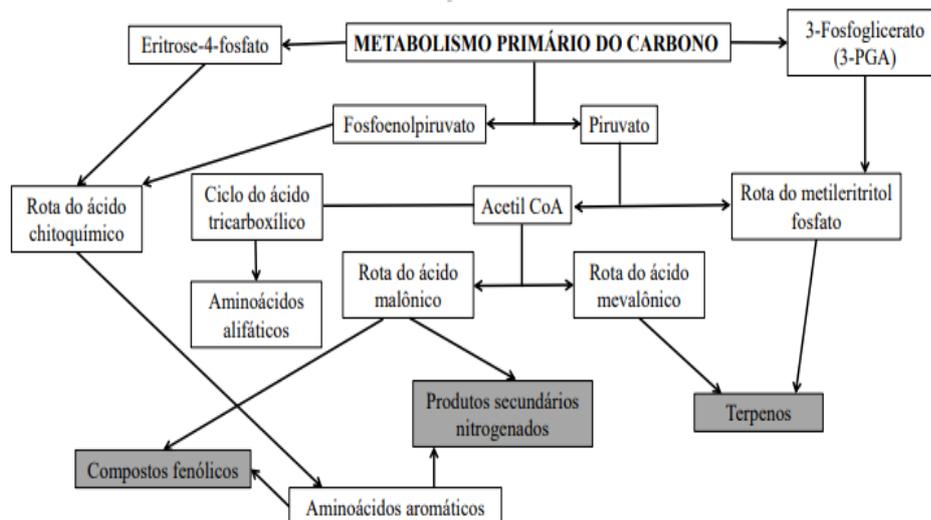
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Compostos fenólicos: características químicas e sua importância para a saúde humana

Os compostos fitoquímicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas os quais atuam, principalmente, na proteção contra infecções, radiações UV, ferimentos, agentes invasores (Ângelo & Jorge, 2007), sendo responsáveis pela cor, aroma, adstringência e sabor de alimentos ou bebidas oriundas de plantas (Sequeiros, 2009; Carratu, 2005).

Estes metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos quimicamente distintos, compreendendo terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. As rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas interconexões com o metabolismo primário estão apresentados, de forma simplificada, na Figura 2 (Taiz & Zeiger, 2004).

**Figura 2.** Principal rota da biossíntese de metabólitos secundários.

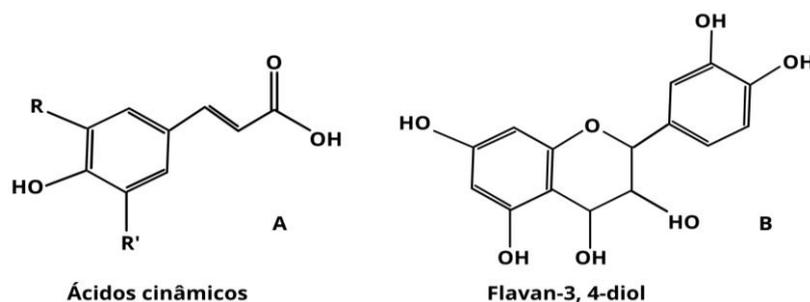


Fonte: Adaptado de Taiz & Zeigert (2004).

Os compostos fenólicos possuem uma grande diversidade estrutural com aproximadamente 10.000 compostos, sendo que alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros, como os ácidos carboxílicos e glicosídeos, são solúveis em água e há ainda aqueles que são grandes polímeros insolúveis (Oksana *et al.*, 2012; Khoddami *et al.*, 2013). A conformação básica estrutural desses compostos, é a presença de um anel aromático com um ou mais substituintes de hidroxila, incluindo grupos funcionais, como ésteres e glicosídeos. São classificados em fenóis simples (ácidos fenólicos) ou em polifenóis (flavonoides, taninos) (Figura 3) conforme o número de unidades de fenol na estrutura. Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 4) (Oliveira & Bastos, 2011; Oksana *et al.*, 2012; Savi, 2015).

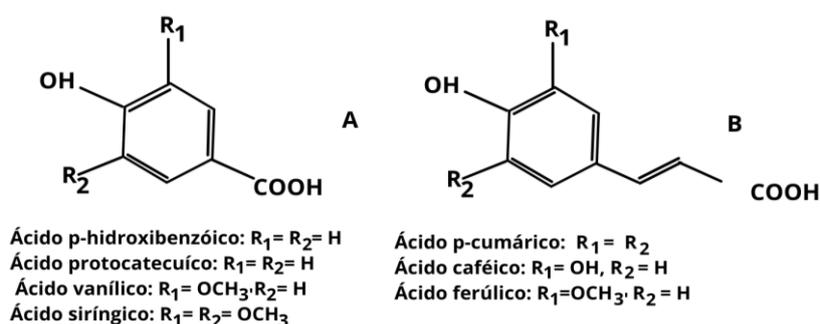
A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas na forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, porém não são muito reativos quimicamente. Assim, estes compostos, possuem em geral características ácidas, e podem ser isolados através da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (Carvalho *et al.*, 2004).

**Figura 3.** Estrutura química do ácido cinâmico (A) e do tanino flavan-3,4-diol (B).



Fonte: Autores (2021).

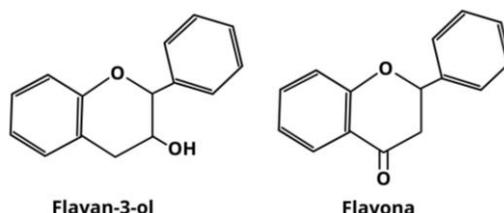
**Figura 4.** Derivados do ácido Hidroxibenzóico (A) e do ácido Hidroxicinâmico (B).



Fonte: Autores (2021).

Quimicamente, os flavonoides são constituídos por 15 átomos de carbono, organizados como C6-C3-C6, na configuração de dois anéis aromáticos, ligados através de um pirano, flavanóis e antocianinas ou pirona como as flavonas, flavonóis, flavanonas, conforme expresso na Figura 5 (Oksana *et al.*, 2012; Khoddami *et al.*, 2013).

**Figura 5.** Estrutura química de alguns flavonoides.



Fonte: Autores (2021).

Os flavonóides são de baixo peso molecular, são frequentemente encontrados nas plantas (hortaliças, frutas, café, vinho, suco de frutas) (Meregalli, 2020), sendo agentes responsáveis pelos pigmentos das folhas e flores. As flavonas se fazem presentes nos grãos, cereais e especiarias, enquanto as flavanonas são comuns nos frutos cítricos conhecida pelo flavour e o sabor amargo que concedem a estes alimentos (Gomes, 2003).

### 3.1.1 Compostos fenólicos e sua importância para o organismo humano

O Brasil tem uma grande diversidade biológica vegetal (Brack, 2020), e esta, junto à grande produtividade, pode ser utilizada na alimentação humana e explorada sustentavelmente para produzir extratos com aplicação terapêutica no controle e prevenção de diversas doenças (Faller & Fialho, 2009; Santos *et al.*, 2020). As frutas, por exemplo, podem se tornar uma fonte inesgotável de recursos nutricionais, uma vez que são uma fonte potencial de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, vitaminas, carotenóides e minerais, e reconhecidas como fontes de fibras alimentares (Schiassi *et al.*, 2018). Habibi e Ramezani (2017) afirmaram que o alto consumo de frutas é associado a uma menor incidência de doenças como câncer, disfunções cardiovasculares, inflamação, aterosclerose, declínio do sistema imunológico, entre outros. Assim, as espécies vegetais produzem substâncias que hoje são bastante reconhecidas pelos seus benefícios para a saúde, sendo muitas destas utilizadas na

indústria farmacêutica, na produção de medicamentos e cosméticos, nas indústrias alimentícias, entre outras (Croteau *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2002; Martillanes *et al.*, 2017; Nollet & Gutierrez-Urbe, 2018).

A utilização de produtos naturais é tão antiga quanto a humanidade. O ser humano passou a utilizar produtos de origem vegetal na forma de infusão ou condimentos, como alternativa para cura de doenças e como flavorizantes, para dar sabor e cheiro aos alimentos. Devido ao consumo de espécies vegetais para fins terapêuticos, os povos do mundo inteiro realizaram descobertas que ainda hoje a ciência e a medicina continuam a pesquisar (Pereira *et al.*, 2012; Araújo & Lima, 2019; Silva *et al.*, 2020). A determinação da composição de compostos fenólicos e a investigação de seus efeitos, portanto, é apontada como uma necessidade mundial e está eminente na literatura, nacional e internacional, por estar associada à redução do risco de doenças cardiovasculares e de câncer (Peres, 2020). Jiao e colaboradores (2018) reforçam que os estudos desses compostos associados à capacidade antioxidante são de grande interesse porque são capazes de absorver radicais livres e assim inibir a cadeia de iniciação ou até mesmo interromper a cadeia de propagação das reações oxidativas, causadas pelos radicais livres no organismo humano (Soares, 2002).

Santos e colaboradores (2020) avaliaram o perfil dos compostos fenólicos e carotenoides presentes no óleo da casca da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), bem como suas implicações para a saúde humana e observaram que a ação destes é associada à proteção do corpo contra o estresse oxidativo, o qual é causado por espécies reativas de oxigênio que afetam os constituintes celulares, sendo considerados, portanto, um dos fatores responsáveis pela etiologia de vários tipos de câncer.

O araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foi pesquisado por Medina *et al.* (2011), os quais citam as diversas propriedades nutricionais, entre elas alto teor de vitamina C e quantidades significativas de compostos fenólicos, como epicatequina e ácido gálico, além de importante capacidade antimicrobiana e atividade antioxidante. É apontado que o extrato de araçá reduz a metástase de células cancerígenas do pulmão, de cólon e mama (Im, 2012). Teixeira *et al.* (2008) citam que a romã (*Punica granatum* L.) possui teores reduzidos de antocianinas quando comparados com a jabuticaba e o hibisco, mas não menosprezando o fruto porque no mesmo existem outros compostos bioativos também importantes para a saúde.

## 3.2 Metodologias analíticas

### 3.2.1 Amostragem e preparo das amostras (desidratação e moagem)

Uma das etapas mais importante para determinação dos FT é a preparação das amostras da forma mais adequada possível, a fim de proporcionar uma melhor representatividade e rendimento na obtenção dos extratos. Os vegetais possuem alto teor de umidade em sua composição, o que dificulta a quantificação de FT. Assim, para que a extração e a quantificação dos compostos sejam mais eficientes, o vegetal é submetido à desidratação. Desse modo, antes da etapa de extração é necessário que a amostra seja desidratada, seguido de moagem, pois quando o produto seco é fragmentado, a superfície de contato aumenta, facilitando a absorção e ação do solvente e, conseqüentemente, a extração (Ângelo & Jorge, 2007).

A secagem consiste na retirada de água das amostras em ambientes que têm controle da temperatura, da umidade relativa e da velocidade do ar de secagem. Alguns métodos são utilizados para o preparo da amostra, como desidratação com o ar quente, forno micro-ondas, secador de esteira, liofilização, radiação infravermelha, entre outros. Essa etapa metodológica é importante porque visa garantir a umidade desejada, ajuda o solvente a adentrar na amostra otimizando gastos e minimizando as impurezas no produto final (Canepelle *et al.*, 2020).

A secagem em estufa com ar forçado é o método mais empregado industrialmente, também sendo utilizado para fins analíticos, e consiste na remoção da água através da transferência de calor e de massa. É um procedimento lento, podendo levar até 72 horas dependendo da temperatura empregada e do produto a ser desidratado, levando ao alto consumo de energia. Como vantagens tem-se a simplicidade do processo, baixo custo e fácil manuseio. Entretanto, essa é uma etapa crítica pois se a temperatura for elevada, a amostra pode sofrer perdas dos compostos bioativos voláteis, subestimando a quantificação (Kaur *et*

*al.*, 2020, Davoodi *et al.*, 2007). Dessa forma, se faz necessário avaliar também outras técnicas (Cecchi, 2003).

Agostini e colaboradores (2017) realizaram a secagem das partes aéreas de três espécies: a *Passiflora caerulea* L. (maracujá), *Myrcia oblongata* DC. (guamirim) e *Equisetum giganteum* L. (cavalinha) em estufa (40°C / 48h) com circulação de ar forçado, enquanto que Santos *et al.* (2016), estudaram o perfil de compostos fenólicos nas folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com a temperatura 35°C ± 2°C por 48h. Estes autores citam que a temperatura de secagem das folhas para a produção da farinha da folha de mandioca é um fator que interfere negativamente nos níveis de compostos fenólicos. No estudo realizado por Sobrinho *et al.* (2010), foi avaliado o efeito da secagem em diferentes temperaturas (25, 40, 60 e 80°C) nas folhas da *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel para quantificação de flavonoides. Os resultados mostraram uma perda de umidade entre 67,47 a 68,99%, sendo que a 25°C as concentrações de flavonoides foram maiores, corroborando com a afirmativa dos estudos anteriores. Os autores afirmam ainda que a temperatura de desidratação não deve exceder 60°C para a quantificação dos flavonoides.

Uma alternativa para reduzir a degradação dos fitoquímicos na etapa de secagem, principalmente quando realizada em escala industrial, é a utilização do secador de esteira. Trata-se de um equipamento que contém uma esteira de aço inoxidável que permite o transporte da amostra durante todo o processo de desidratação e a circulação do ar quente é disposta perpendicularmente sobre a mesma, no entanto, o método tem pouca aplicabilidade para amostras analíticas (Jensen *et al.*, 2011; Zanoelo, 2007).

A extração de água por meio do forno micro-ondas envolve a radiação sobre as moléculas de água, de forma seletiva, podendo acelerar a secagem para tempos mais curtos (± 20 min), quando comparados com os métodos convencionais como a secagem em estufa, e propicia a determinação da umidade mais precisa, simples e rápida (Ribeiro, 2018). Melo *et al.* (2013) compararam a desidratação de folhas de 4 diferentes frutos (videira, caqui, macieira e pessegueiro) utilizando a secagem da estufa com a temperatura variando entre 65 a 70°C por 48 horas e o forno de micro-ondas em tempos diferentes. Foi constatado que a desidratação por micro-ondas é muito mais rápida (± 7min) que na estufa, o que é corroborado por Marur e Canepelle (2020) e Nery e colaboradores (2004), entretanto, mais estudos são necessários com relação às possíveis perdas por degradação durante o processo, principalmente no que tange aos FT.

A liofilização é um método de desidratação em que a amostra é submetida à temperatura de congelamento e à baixa pressão e que consiste no congelamento prévio da amostra à - 40°C. A seguir a amostra congelada é colocada no liofilizador, onde ocorre a sublimação com conseqüente desidratação, obtendo-se um produto final desidratado com propriedades conservadas (Marques, 2008). Trata-se de um dos métodos mais confiáveis e adequados para desidratação de amostras, apresentando-se mais eficiente na conservação de FT, pois não são utilizadas altas temperaturas, permitindo menores perdas de compostos voláteis e por decomposição térmica (Garcia, 2009; Borges, 2015). Todavia, como desvantagens tem a lentidão do procedimento de secagem e alto custo operacional (Borges, 2015). Benneman *et al.* (2018), avaliaram a eficiência da desidratação de bagaço de uvas em liofilizador e em estufa com circulação de ar (45°C), verificando a influência desses processos na determinação de compostos bioativos. Os teores de antocianinas das amostras desidratadas no liofilizador foram maiores (20,74 e 218,19 mg/100g) quando comparado com a estufa (15,78 e 114,67 mg/100g), confirmando a eficiência do liofilizador.

O método de desidratação por radiação infravermelha consiste na secagem da amostra com uma lâmpada de radiação infravermelha com 250 a 500 watts, e painéis metálicos aquecidos. O calor é transferido para o material a ser analisado na forma de energia eletromagnética (Nascimento, 2015). Como vantagens, esse método tem a simplicidade do equipamento, o menor tempo de processamento e menor custo com energia, porque a radiação é transmitida diretamente na amostra. Como desvantagens, tem-se a não uniformidade da desidratação devido à pequena penetração da radiação na matriz, necessitando, portanto, de uma amostra com pouca espessura (Neto *et al.*, 2014; Nascimento, 2015). Melo e Almeida-Muradian (2011) investigaram a desidratação do pólen apícola por diferentes métodos: estufa convencional a 100°C, estufa a vácuo a 70°C,

secagem por radiação infravermelha, liofilização e Karl Fisher. De acordo com os resultados obtidos, os melhores métodos para determinação de umidade do pólen apícola foram a secagem por radiação infravermelha e a liofilização, os quais apresentaram menores valores de umidade.

Assim, atualmente estão disponíveis diferentes métodos para a desidratação de vegetais, cada um com suas vantagens e limitações. A liofilização apresenta-se como o método mais eficiente e com menores perdas de FT, entretanto, bastante oneroso. Por isto, o secador de esteira é o método mais comum industrialmente, enquanto que, em termos analíticos, é a secagem em estufa, preferencialmente de ar forçado. Desde que cuidados para inibir a degradação térmica sejam tomados, todos os métodos citados se mostraram bastante eficazes.

### 3.2.2 Extração

A extração também é considerada uma etapa crítica no processo metodológico para compostos bioativos (Garcia-Salas, 2010). Para uma melhor eficiência na obtenção dos extratos dos compostos fenólicos é imprescindível a escolha da técnica de extração mais adequada para sua matriz em investigação. Como não existe uma metodologia única para a extração dos fitoquímicos, principalmente FT, em todas as amostras vegetais, é necessário analisar o melhor processo para cada caso de acordo com as características do material vegetal, sua estrutura anatômica (raiz, caule, folhas, frutos, sementes), a estabilidade frente ao solvente, quando empregados, o grau de solubilidade da substância a ser extraída, entre outros (Queiroz *et al.* 2007; Oliveira *et al.*, 2016).

A extração é um procedimento que consiste na transferência de massa, tendo como objetivo a separação de compostos desejados de uma forma mais seletiva possível, a partir de processos químicos, físicos e/ou mecânicos (Tzia & Liadakis, 2003). Dentre os métodos mais comuns de extração, estão a maceração, extração com solvente, arraste (percolação), extração a frio (prensagem mecânica), hidrodestilação (Oliveira *et al.*, 2016) e as metodologias consideradas como não-convencionais, como a assistida por ultrassom (US) e micro-ondas, líquido pressurizado (PLE) eletroforese capilar, fluido supercrítico (SFE) e até mesmo enzimas (Santos *et al.*, 2010; Garcia-Salas, 2010).

A maceração é um procedimento estático que consiste em adicionar a amostra em contato com o solvente em um recipiente fechado à temperatura ambiente ou controlada, por um tempo que pode variar de horas até dias. É uma técnica prática e econômica, contudo não garante o aproveitamento máximo da matriz vegetal, uma vez que os extratos vegetais podem ser degradados, se altas temperaturas forem utilizadas, além da possibilidade do quantitativo dos FT poder ser subestimado devido à possibilidade de saturação do solvente (Guerra *et al.*, 2016). Como opção para otimizar o tempo da execução, existe a maceração dinâmica, que consiste no mesmo princípio, sob constante agitação mecânica e a remaceração, a qual é baseada na repetição do procedimento com a mesma amostra com renovação do líquido extrator, ou seja, o solvente, minimizando a fragilidade ocasionada pela possível saturação do solvente (Cardoso *et al.*, 2017).

Neste caso, a escolha do solvente também tem influência sobre o rendimento quali quantitativo do fitoquímico na amostra. Solventes como metanol, hexano, butano, podem contaminar a amostra, uma vez que, mesmo sendo removidos após a extração, pode ficar um residual no extrato final, comprometendo as etapas posteriores (Khoddami *et al.*, 2013). Entretanto, solventes como etanol e água são extratores não tóxicos, seguros para o consumo (Brum *et al.*, 2009). Como os diversos fitoquímicos possuem estrutura química diferentes, deve-se também levar em conta a polaridade das substâncias em estudo e o solvente.

Hayouni *et al.* (2007) avaliaram diferentes solventes para obtenção do extrato em frutos de *Quercus coccifera* L. (Fagaceae) e *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae) e verificaram que os melhores solventes empregados para a extração foram a acetona, metanol, água, e que de modo geral, quando aplicados individualmente afeta significativamente a extração de polifenóis totais. No estudo de Vizzotto e Pereira (2009) foi pesquisado a otimização do processo de extração de compostos

fenólicos totais (FT) e outros antioxidantes em Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), sendo utilizado uma combinação de solventes (água ultrapura, metanol, etanol, acetona e hexano), volumes e tempo de contato. Foi verificado que os teores de compostos FT não sofreram modificações referente ao volume do solvente, indicando que é possível economizar solvente e reduzir a contaminação ambiental.

A percolação ou arraste é feita a partir do transporte da substância alvo através da passagem constante do líquido extrator na amostra, que está posta dentro de um recipiente de vidro. Essa técnica permite a aquisição de soluções mais concentradas, diminuindo o líquido extrator, além de ser rápida (Hartanti *et al.*, 2019), barata e sustentável (Cardoso *et al.*, 2017). Cardoso *et al.*, (2017) avaliaram o uso do etanol:água (7:3 v/v) em folhas secas de *Alpinia zerumbet* (B. L. Burt & R. M. Smith) comparando-se quatro técnicas de extração para FT (percolação, maceração estática, extração por ultrassom e maceração dinâmica). A percolação demonstrou ser a técnica mais eficiente, seguida da maceração dinâmica, extração por ultrassom e, com menor eficiência, a maceração estática.

Com a preocupação cada vez mais crescente com a preservação do meio ambiente, pesquisadores têm procurado desenvolver tecnologias limpas com o uso da menor quantidade possível de solventes, como por exemplo, o processo de extração e fracionamento que utiliza fluidos supercríticos. Esta técnica de obtenção do extrato utiliza o dióxido de carbono como solvente, por ser inerte e vastamente disponível, além de não produzir resíduos (Reverchon *et al.*, 2006). A Extração com fluidos supercrítico tem como vantagem a facilidade de separação do soluto do solvente, além de possibilitar a alteração da temperatura, pressão e co-solvente, evidenciando, deste modo, a eficácia da utilização desse procedimento que, quando combinado com o etanol, apresenta um bom rendimento, amostra com alto grau de pureza e com grande maior variedade de substâncias quando comparado com os métodos convencionais (Araújo & Lima, 2019).

Benelli *et al.* (2010) pesquisando os compostos bioativos de bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L.) comparou diferentes técnicas de extração como a hidrodestilação, ultrassom, soxhlet e extração com fluido supercrítico (ESC), com diferentes solventes. Os dados obtidos mostraram que o teor de compostos FT foi maior quando usado a técnica por meio da ESC e que, embora o etanol e a água terem apresentados um resultado mais significativo em comparação a outros solventes (hexano; diclorometano; acetato de etila), o etanol pode ser mais adequado como co-solvente para a ESC, uma vez que a água possui viscosidade e tensão superficial altas, o que normalmente não são desejadas pois dificulta a absorção do solvente nos poros da matriz (Markon *et al.*, 2007).

A extração assistida por micro-ondas (MAE), que consiste em combinar a extração por micro-ondas mais o emprego de um solvente extrator, provoca o movimento molecular na matriz vegetal ou solventes polar ou apolar, efetuando o aquecimento. Os solventes aquecidos penetram facilmente na matriz vegetal e extraem os compostos bioativos. Para as amostras sensíveis ao calor, podem ser utilizados os solventes como o hexano, clorofórmio e tolueno, uma vez que estes reduzem a degradação dos compostos bioquímicos. É importante salientar que os solventes são adequados com base em seus pontos de ebulição, transferência de energia e propriedades isolantes (Mandal *et al.*, 2007). Os solventes polares podem ter uma propriedade isolante, ou seja, inibe a passagem elétrica, podendo absorver mais energia do micro-ondas o que facilita o maior rendimento de fenólicos (Khoddami *et al.*, 2013). Comparando com os métodos tradicionais de extração como a maceração, é evidenciado a otimização do tempo com a MAE (inferior a 30 min), menor adição de solventes orgânicos e maior rendimento da amostra (Huie, 2002).

Espinosa, *et al.* (2017) utilizaram a extração assistida por micro-ondas em frutas secas de mirtilo (*Vaccinium meridionale* Sw.) para a recuperação de FT, utilizando o etanol como solvente. Foi observada eficiência na metodologia empregada, assim como velocidade no processo extrativo, uma vez que requer menor consumo de energia. O etanol tem sido apontado como adequado para ser utilizado como co-solvente para a extração ultrassônica e com fluidos supercríticos devido ao melhor rendimento. As desvantagens da extração com o emprego do etanol é que se necessita da remoção do mesmo para obter o extrato seco e, como dito anteriormente, além do gasto de energia com implicações ambientais, econômicas, podendo ter

também o surgimento de compostos secundários indesejáveis (Brum *et al.*, 2009).

Por fim, as metodologias extrativas não-convencionais têm como vantagens a necessidade de um volume menor de solvente e de tempo para a obtenção de resultados, e se mostram mais eficazes do que as convencionais. A ESC utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico modificado com co-solvente (principalmente etanol) se demonstrou extremamente eficiente na extração de FT (Tyśkiewicz *et al.*, 2018) todavia, os custos são altos para a realização dos processos, o que faz com que a extração líquido-líquido ainda seja o método analítico mais difundido para a extração de FT, devido à sua praticidade e custo mais acessível.

### 3.2.3 Métodos analíticos de identificação e quantificação

Devido à grande polaridade, reatividade e susceptibilidade à degradação enzimática dos compostos fenólicos, sua identificação e quantificação em alimentos tornou-se uma tarefa complexa, com elevado grau de dificuldade metodológica. Os métodos de análise podem ser classificados como métodos para determinação de compostos FT, por classe ou grupo, a exemplo dos taninos condensados ou flavonóides totais, ou ainda, identificação e quantificação de uma substância isolada, sendo as análises altamente influenciadas pela natureza físico-química dos compostos em questão, técnicas de amostragem, secagem, extração, padrão utilizado e presença de outras substâncias (Ângelo & Jorge, 2007; Bastola *et al.*, 2017).

Apesar dos métodos espectrofotométricos ainda serem os mais empregados, por causa da elevada praticidade em laboratório e rapidez nos ensaios (Bastola *et al.*, 2017; Wolff *et al.*, 2019), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC ou CLAE) acoplada a diferentes tipos de detectores, como UV-Vis ou espectrômetro de massa (MS), é uma das técnicas mais empregadas para a determinação e quantificação dos polifenóis, sendo considerada a mais robusta, principalmente quando é necessário se efetuar a separação e quantificação dos componentes isolados ou efetuar elucidação estrutural de um componente de estrutura desconhecida (Campos & Grinberg, 2001; Kalili & Villiers, 2011).

#### 3.2.3.1 Métodos Espectrofotométricos

Os métodos espectrofotométricos, por serem convenientes, simples e reprodutivos, são os mais utilizados para a determinação de FT em espécies vegetais (Veber *et al.*, 2015; Bastola *et al.*, 2017; Wolff *et al.*, 2019). Estes métodos fundamentam-se na medição da absorvância, ou capacidade de absorção de luz radiante, por uma solução, efetuando curvas de soluções padrão de concentrações conhecidas, para comparação.

Dentre os métodos espectrofotométricos utilizados para a determinação dos compostos FT, destacam-se os métodos com os reagentes de Folin-Denis ou com o reagente de Folin-Ciocalteu, ambos com diversas variações e adaptações, a fim de atender às necessidades metodológicas impostas pelo tipo de amostra (Ângelo & Jorge, 2007; Veber *et al.*, 2015; Bastola *et al.*, 2017; Wolff *et al.*, 2019). Estes reagentes baseiam-se na redução do ácido fosfomolibdico (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) e do ácido fosfotúngstico (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) pelas hidroxilas fenólicas, em meio alcalino, geralmente obtido com uso de uma solução saturada de carbonato de sódio, o que resulta num complexo de coloração azulada de molibdênio azul (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) e tungstênio azul (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>), capaz de absorver entre 620 e 740 nm. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma adaptação do reagente Folin-Denis que apresenta menor chance de precipitação e maior sensibilidade, devido à adição de sulfato de lítio, o que o transformou no método mais popular para determinação de compostos fenólicos (Ângelo & Jorge, 2007; Veber *et al.*, 2015; Bastola *et al.*, 2017), sendo o resultado da análise, comumente, expresso em miligramas equivalente de ácido gálico, também podendo ser expressos através de outros padrões, como ácido ferúlico, ácido clorogênico, catecol e ácido vanílico (Milani *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2016; Bastola *et al.*, 2017).

Apesar da existência de técnicas mais avançadas como o HPLC para a análise dos FT, diversos pesquisadores têm utilizado métodos espectrofotométricos como o de Folin-Ciocalteu nos seus estudos devido às vantagens supracitadas, como sua simplicidade, reprodutibilidade e baixo custo (Bastola *et al.*, 2017). Assim, Milani e colaboradores (2012) quantificaram FT no

extrato hidroetanólico bruto e frações hexânicas, clorofórmica, de acetato de etila de caqui (*Diospyros kaki* L.), tendo metanol como branco e curva padrão de ácido gálico como referência. Veber *et al.* (2015) analisaram FT em extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.) e Wolff *et al.* (2019) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.).

Apesar de suas inegáveis vantagens, os métodos espectrofotométricos não possuem uma elevada especificidade determinando, além de todos os compostos fenólicos presentes, qualquer outra substância redutora adicionada à amostra ou presente naturalmente no extrato, sendo ainda fortemente influenciados pelo padrão utilizado, o que superestima a quantificação (Ângelo & Jorge, 2007; Bastola *et al.*, 2017).

### 3.2.3.2 Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos são métodos de separação de componentes de uma mistura amostral através da interação destes com a fase móvel, ou eluente, e a fase estacionária, durante a eluição ou corrida cromatográfica. Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE), geralmente se utiliza uma coluna de fase reversa, pela qual a amostra é inserida, devidamente diluída num sistema binário de solventes, sendo um polar e um apolar, tendo um detector acoplado, o que permite a análise simultânea de polifenóis de diferentes classes (Collins *et al.*, 2006).

Dutra *et al.* (2010) realizaram a análise de compostos fenólicos - ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido cafeico (AC) e rutina (Ru) - em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) de 06 diferentes regiões de São Mateus (Paraná). Para quantificação, foi utilizado um método isocrático de HPLC de fase reversa usando metanol: água (35:65 v/v) acidificada com ácido acético 0,5% como fase móvel e um detector de fotiodo. Os resultados mostraram que o conteúdo de 5-CQA e Ru são mantidos constantes durante o armazenamento. Um outro trabalho avaliou ácidos fenólicos e flavonoides de méis produzido por três espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona flavolineata*, *M. fasciculata* e *Apis mellifera*) de diferentes regiões da Amazônia pela técnica de separação com HPLC. Os Resultados mostraram que as amostras de méis podem ser distinguidas pela composição fenólica e que méis com maiores teores de compostos fenólicos tinham maior capacidade antioxidante e cor mais escura (Oliveira *et al.*, 2012).

Um dos desafios no uso dos métodos cromatográficos é otimizar a separação dos componentes do extrato vegetal na coluna cromatográfica, permitindo uma melhor separação e leitura dos picos cromatográficos resultantes. Hoffmann-Ribani e Ribani (2010) obtiveram um bom resultado neste desafio efetuando testes preliminares com diferentes proporções de fase móvel para diversos padrões de fenólicos, cuja presença era esperada na amostra, o que serviu de base para definir a separação para amostras de erva-mate, com e sem adição de padrões externos, apesar da quantificação ter sido realizada apenas por padronização externa. Segundo os autores, a validação do método apresentou-se como o maior desafio, pois é uma etapa do trabalho na qual é necessário a realização de diversas alterações na composição da fase móvel, de modo a permitir a leitura dos três padrões externos sem sobreposição de nenhum deles entre si e sem retenção completa de algum deles na coluna, para somente então eluir a amostra, com as definições da melhor fase móvel já plenamente estabelecidas para a amostra teste.

A Cromatografia Gasosa (CG) é baseada na distribuição dos componentes de uma amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa, constituída por um gás de arraste quimicamente inerte, como o hélio, e oferece alta sensibilidade, seletividade, capacidade de separação (Collins *et al.*, 2006) e também tem sido empregada na identificação e quantificação de compostos mais voláteis. O surgimento de inovações tecnológicas nas colunas de cromatografia a gás, como colunas de alta temperatura, controladores de pressão e detectores eletrônicos, otimizaram a resolução e o alcance, principalmente no que tange à ampliação da capacidade para se trabalhar com substâncias de peso molecular mais elevado, que a grande fragilidade da técnica quando utilizada em equipamentos mais antigos (Ângelo & Jorge, 2007). As colunas para CG podem ser confeccionadas com diversos tipos de materiais, como vidro, aço inoxidável, ou alumínio e podem ser classificadas em capilares, onde a fase estacionária é depositada na parede interna do tubo na forma de um fino filme, ou empacotadas, nas quais são

preenchidas integralmente pelo material da fase estacionária e coluna capilar. Sua eficiência está diretamente relacionada às dimensões, tanto com relação ao diâmetro interno quanto com relação ao comprimento da coluna (Collins *et al.*, 2006).

Entretanto, para possibilitar o uso da CG com estas inovações, é necessário que os componentes a serem isolados e identificados sejam voláteis e estáveis a altas temperaturas (Amorim, 2019). A termosensibilidade dos compostos fenólicos e sua baixa volatilidade geram uma necessidade de derivatização das substâncias para possibilitar a utilização da CG, processo que dificulta o uso desta técnica para identificação e quantificação de compostos FT ou isolados (Frias *et al.*, 2014). A derivatização é um processo no qual substâncias de interesse analítico são submetidas a reações químicas que alteram sua estrutura, a fim de aumentar a sua volatilidade, diminuir a polaridade e melhorar a sua estabilidade, obtendo características físico-químicas compatíveis com as técnicas de separação e quantificação, mas de modo que os componentes originais possam continuar a ser identificados pela relação entre a composição química original do analito e o produto oriundo da derivatização (Frias *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2014).

Augusto *et al.* (2014) utilizaram a CG para identificação de compostos fenólicos em extratos hidroalcoólicos de murtila (*Ugni molinae* Turcz.), utilizando hélio como carreador, o que somente foi possível após derivatização dos componentes dos extratos com o n-metil-n (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), vaporização com nitrogênio, congelamento e liofilização das frações aquosas, além de diversas etapas intermediárias para preparo da amostra. Mesmo com todos estes cuidados, o estudo relata que não foi obtida uma separação completa. Entretanto, Adelowo e Oladeji (2016) não relataram dificuldades em seu estudo utilizando CG para identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos metanólicos de *Senna alata* L., com adição de álcool absoluto para eluição, nem Yang *et al.* (2013) para a mesma análise em extratos etanólicos de *Geranium sibiricum* L. utilizando acetonitrila e água na fase móvel e detector UV-Vis a 220 nm.

Deste modo, apesar de todos os avanços nos métodos de CG, que possibilitaram análise de uma maior diversidade de compostos, HPLC ainda é o método cromatográfico mais difundido para separação, identificação e quantificação de fenólicos.

### 3.2.3.3 Tipos de detectores

Detectores são equipamentos conectados aos cromatógrafos que medem, de forma contínua, alguma propriedade física ou físico-química dos componentes de uma amostra, enviando um sinal para um processador de dados, cuja interpretação produz dados qualitativos e quantitativos sobre estas substâncias, permitindo sua identificação e quantificação (Amorim, 2019).

Atualmente existem diversos detectores que podem ser utilizados para a identificação e quantificação de compostos analisados por métodos cromatográficos, como detectores do espectro ultravioleta e visível (UV-VIS), detectores do espectro infravermelho, detectores de massas, de fluorescência, de ressonância magnética nuclear, dentre outros. Cada detector é baseado em propriedades físico-químicas específicas, o que torna a escolha do detector um importante passo do processo metodológico da pesquisa, pois se deve ponderar a escolha de um detector que tenha boa aplicabilidade para análise dos tipos de substâncias que se espera identificar (Amorim, 2019).

Como grupos de compostos fenólicos absorvem radiações de diferentes comprimentos de onda, quando um feixe de luz lhe é incidido, o detector UV-VIS torna-se uma boa opção de escolha, pois é possível selecionar o comprimento de onda compatível com o absorvido pelo grupo que se deseja quantificar, possibilitando a identificação e a quantificação diferencial, além de ser um equipamento de menor custo. Os detectores UV-VIS podem ser multiplexados (empregam um único detector que recebe informações simultâneas codificadas segundo um determinado padrão) ou não multiplexados, que abrange os monocanais ou multicanais, que são capazes de analisar comprimentos de onda variável, ou com arranjo de diodos (DAD), mais versátil, por determinar simultaneamente os espectros das substâncias com diferentes comprimentos de onda, através da transformação da radiação luminosa em corrente elétrica e esta, por sua vez, em absorbância ((Skoog, West, Holler & Crouch, 2002; Silva, 2012).

O detector DAD consiste em um circuito integrado único, composto por detectores de fotodiodos posicionados lado a lado num cristal de silício, onde cada diodo atua simultaneamente como transdutor de intensidade luminosa/carga elétrica e como elemento de armazenamento de carga, de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e conseqüentemente um dos detectores, permitindo, assim, a determinação da absorbância de uma amostra de modo simultâneo em todos os comprimentos de onda (Silva, 2012). Yang *et al.* (2013) utilizou o UV-VIS como detector em seu estudo para identificação de compostos fenólicos em extratos de *Geranium cibiricum* L., enquanto Tallini *et al.* (2015) utilizaram o detector de arranjo de diodos (DAD) acoplado ao HPLC e UPLC para identificação de flavonóides em extratos de capinuriba verde (*Rubus erythrocladus* Schott) e amora (*Morus nigra* L.).

Apesar de não serem de uso tão popular quanto os detectores DAD, os detectores de fluorescência, cujo princípio baseia-se na medida da luz emitida pelas substâncias previamente irradiadas com luz UV, é bastante útil na detecção de compostos fluorescentes, como vitaminas e compostos derivatizados (Amorim, 2019). Vinas *et al.* (2000) otimizaram o método HPLC de fase reversa por eluição de gradiente, para a separação de trans- e cis-resveratrol, catequina, epicatequina, quercetina, e rutina em vinho. A detecção foi realizada detector de fotodiodo, embora o uso de um detector fluorimétrico tenha reduzido consideravelmente os limites de detecção para catequina, epicatequina e ambos os isômeros de resveratrol.

O espectrômetro de massa (MS) é tido como o tipo de detector que obtém melhores dados com relação à estrutura das moléculas, permitindo a identificação e a quantificação de compostos individuais através da massa total de uma substância e das massas dos fragmentos de sua decomposição a partir de quatro etapas: ionização, separação, análise e detecção. O princípio da técnica consiste na ionização de moléculas e sua identificação a partir da razão massa/carga, que é específica de cada composto (El-Aneed *et al.*, 2009). A análise das trajetórias dos íons no vácuo possibilita determinar com precisão as massas moleculares e identificar corretamente os analitos em estudo, por meio da avaliação dos seus fragmentos de massas, que são separados e encaminhados para detecção e quantificação com o auxílio de softwares (Lanças, 2009; El-Aneed *et al.*, 2009). A ionização é a etapa inicial para a análise via espectrômetro de massas e pode ser realizada através de diversas técnicas, adaptadas para melhor se ajustar às características da amostra, dentre as quais se destacam o electrospray (ESI-MS), que permite a análise de uma ampla gama de compostos, desde que a molécula possa ser solubilizada em um solvente polar para permitir a incorporação da carga (Mann *et al.*, 2001) e a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) (Glish & Vachet, 2003). A ionização por impacto de elétrons é a mais antiga e ainda é a mais difundida. Baseia-se no bombardeamento da amostra, presente em fase gasosa, por elétrons de alta energia de colisão, que se ioniza com carga positiva, permitindo a obtenção de espectros de massas reprodutíveis, que são direcionados para o analisador de massas (Glish & Vachet, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009; Emidio *et al.*, 2015).

Existem diversos modelos de analisadores de massas, que separam e analisam os íons gerados na etapa de ionização de acordo com sua razão massa/carga (El-Aneed *et al.*, 2009). O mais utilizado é o analisador quádruplo, pois apresenta melhor relação custo versus benefício e facilidade operacional (Glish & Vachet, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009). Um destes modelos, denominado quádruplo simples ou MS, é constituído por quatro hastes metálicas com cargas opostas, permitindo que íons em consonância com o campo elétrico o percorram completamente, até atingir o detector, enquanto os demais serão desviados da trajetória e eliminados. A realização desta técnica em triplicata sequencial, visando a redução de ruídos e aumentando a especificidade, é denominada de triplo quádruplo ou MS/MS (Glish & Vachet, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009; Emidio *et al.*, 2015).

Quanto à etapa de detecção, onde há o registro da carga induzida quando um íon atinge a superfície de um detector, gerando um espectro de massas em função da razão massa/carga, os dois principais tipos utilizados são o detector de Faraday ou copo de Faraday (CF) e o multiplicador de elétrons (ME). O primeiro é constituído por um copo metálico que capta partículas carregadas em baixa pressão, cuja medida da corrente elétrica é utilizada como base para quantificar os íons, enquanto o segundo é composto por catodos que perdem elétrons quando atingidos por um íon, gerando, uma cascata de elétrons em quantidade

proporcional à quantidade de íons que chegam ao detector, com amplificação da corrente elétrica detectada (Glish & Vachet, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009; Lanças, 2009; Emidio *et al.*, 2015).

A grande diversidade de sistemas no uso da espectrometria de massas permite aplicações específicas. Geralmente os sistemas MS e MS/MS são aplicados para identificação e quantificação de compostos de estrutura conhecida, selecionando íons já conhecidos que se espera encontrar na amostra, propiciando sua quantificação, enquanto sistemas de alta resolução, como os baseados em tempo de voo (TOF-MS, ion trap-MS) são destinados para a identificação de compostos desconhecidos e sua elucidação estrutural (Glish & Vachet, 2003; Lanças, 2009; Emidio *et al.*, 2015).

Diversos estudos de ponta utilizaram os detectores de massas em suas análises de compostos fenólicos. Seraglio *et al.* (2018) identificou e quantificou compostos fenólicos de frutos de acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), Caleja *et al.* (2017) para a caracterização do perfil fenólico de extratos aquosos de camomila (*Matricaria recutita* L.) via HPLC-DAD-ESI/MS e Cheng *et al.* (2014) estudou o perfil de degradação dos compostos fenólicos em altas temperaturas, utilizando HPLC/MS.

Apesar do detector de MS acoplado ao HPLC ou UPLC ser o melhor método para elucidação estrutural de FT, é uma metodologia extremamente onerosa e de difícil acesso, deste modo, nos casos onde esta elucidação não é essencial, a utilização de HPLC-UV-VIS ou de HPLC-DAD é extremamente satisfatória para identificação e quantificação de fenólicos isolados (Chiaradia, Collins & Jardim, 2008).

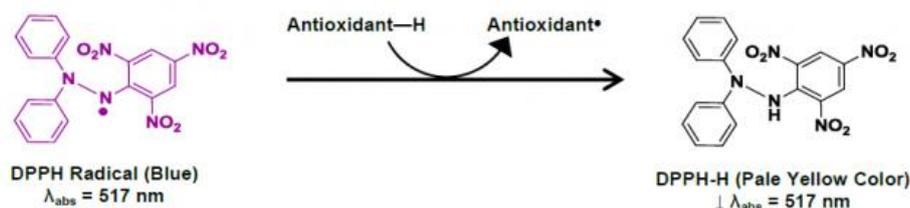
### 3.2.4 Métodos analíticos para determinação de atividade antioxidante (AA)

Apesar dos radicais livres possuírem significativa importância para o bom funcionamento dos organismos vivos, o excesso destes elementos frente à quantidade de agentes antioxidantes pode provocar lesões celulares e o desencadeamento de diversas doenças (Prior *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos constituem a maior classe de substâncias com AA, ou seja, de inibir ou neutralizar agentes oxidantes, presentes naturalmente nos alimentos. Entretanto, outras substâncias também podem apresentar esta bioatividade, o que faz com que a determinação da AA não seja uma metodologia específica para determinação e quantificação de compostos fenólicos, mas de uma de suas principais características (Milani *et al.*, 2012). Uma vez que os alimentos são considerados matrizes complexas no que se refere às determinações analíticas, pois possuem uma infinidade de diferentes compostos bioativos com características químicas específicas e, muitas vezes, interação entre si, há um consenso entre os pesquisadores que não há uma metodologia que especifica para a determinação da AA nesses produtos. Desse modo, muitas vezes são utilizadas mais de uma metodologia para a determinação da AA (Prior *et al.*, 2005; Apak *et al.*, 2007).

Por outro lado, o crescente interesse pelos efeitos benéficos dos antioxidantes à saúde humana tem feito com que seja desenvolvida uma grande quantidade de métodos para determinar a AA dos extratos de alimentos (Rufino *et al.*, 2006). Desse modo, a literatura descreve vários métodos para a determinação de antioxidantes *in vitro* em extratos de plantas. Dentre as mais utilizadas estão a capacidade de sequestro do radical DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil), a capacidade de sequestro do radical ABTS•+ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), a atividade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e Sistema  $\beta$ Caroteno/Ácido Linoleico (Rufino *et al.*, 2006; Rufino *et al.*, 2007).

Um dos métodos mais utilizados para a determinação da AA é a avaliação da atividade sequestradora do radical livre DPPH•, de cor púrpura que, ao perder elétrons, se converte em difenil-picril-hidrazila, de cor amarelada (Figura 6). A perda de cor pode ser monitorada pelo decréscimo no valor da absorbância ( $\lambda \approx 515-517$  nm), ao longo do tempo de 40min por espectrofotometria e está correlacionada com a capacidade antiradicalar da amostra testada (Prior & Schaich, 2005; Apak *et al.*, 2007; Tirzitis & Bartosz, 2010), sendo utilizado uma solução “branco” e uma solução controle com padrão devidamente identificado e quantificado (Wolff *et al.*, 2019).

**Figura 6.** figura ilustrativa da atividade sequestradora do radical livre DPPH•, de cor púrpura, por um agente antioxidante. Ao perder elétrons, o DPPH• se converte em difenil-picril-hidrazila, de cor amarelada.

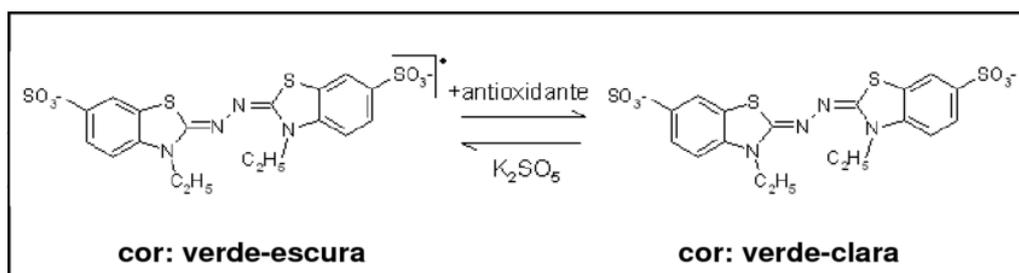


Fonte: Biovision Company.

Assim, vários pesquisadores têm utilizado esse método para a análise da AA em vegetais. Milani e colaboradores (2012) determinaram a AA do caqui (*Diospyros kaki* L.) com o uso do DPPH• e citam a elevada correlação entre o conteúdo de compostos polifenólicos encontrados em extratos desta fruta e a porcentagem de inibição da oxidação por meio do teste de captura de radicais livres DPPH. Veber *et al.* (2015) utilizaram o método DPPH• para determinação da AA em compostos fenólicos do jambolão (*Syzygium cumini* L.) e Ferreira *et al.* (2016) em abacaxi (*Ananas comosus* L. – Merr.), não sendo relatadas dificuldades metodológicas em nenhum destes estudos. Os autores relataram uma elevada correlação entre a inibição da oxidação e a quantidade de compostos fenólicos.

O método de ensaio ABTS•, também chamado de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), é outro método de determinação de AA bastante utilizado. Analisa a oxidação do ABTS por persulfato de potássio ou dióxido de manganês (Figura 7), que é monitorada através de espectrofotometria com máximos de absorção de 415, 645, 734, e 815 nm, utilizando-se o trolox como antioxidante padrão, sendo o resultado apresentado como massa equivalente de Trolox (Babbar *et al.*, 2011; Görüşük *et al.* 2020). Soares *et al.* (2008) utilizaram este método para determinação da AA dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã gala.

**Figura 7.** Oxidação do ABTS por persulfato de potássio ou dióxido de manganês com alteração da coloração.



Fonte: Adaptado de Rufino *et al.* (2007).

Um outro método também utilizado é o que envolve a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , conhecido por FRAP. Seu princípio é baseado na redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) por substâncias antioxidantes, em meio ácido, cujo complexo resultante apresenta coloração azulada e absorvância característica de aproximadamente 593 nm. Quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, entretanto, uma importante limitação desta técnica consiste no fato de apenas avaliar a capacidade da amostra em reduzir íons férricos e não na sua capacidade em neutralizar radicais livres ou outras espécies antioxidantes (Apak *et al.*, 2007).

Cottica *et al.* (2011) pesquisaram a composição fenólica e AA de extrato de própolis obtido por diversos métodos, e observaram que os teores de flavonóides possuíam importante correlação para a AA se analisados pelo método DPPH, entretanto,

isto não pôde ser observado através do método FRAP. Este fato foi considerado como indicativo da limitação do método para ensaios com flavonoides, possivelmente, por algumas destas substâncias serem antioxidantes que não possuem potencial de redução para o ferro. Silva *et al.* (2018) determinaram a AA do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP). Para os autores este óleo essencial apresentou baixa atividade antioxidante, sendo pouco eficaz comparativamente às referências, mesmo que testado por mais de um mecanismo.

Métodos eletroquímicos também têm sido bastante utilizados pela indústria alimentícia na análise de compostos fenólicos (Ângelo & Jorge, 2007). Técnicas voltamétricas, como a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de fluxo diferenciado (VPD) muitas vezes se mostram mais seletivas e com maior sensibilidade de detecção da AA do que métodos espectrofotométricos. Geralmente, tais técnicas correlacionam potenciais de oxirredução e outros parâmetros eletroquímicos à capacidade antioxidante dos compostos analisados. Técnicas coulométricas, cujo princípio é a medição da carga elétrica requerida para oxidar ou reduzir um analito, são baseadas na proporcionalidade entre número de elétrons que fluem pelo eletrodo e a quantidade de moles de uma substância eletroativa, e se mostram bastante confiáveis quando a reação eletrolítica ocorre com eficiência (Alves *et al.*, 2010). A eletrólise em fluxo contínuo, também apresenta satisfatória correlação entre a intensidade de corrente e a atividade antioxidante de diversas espécies eletroativas naturais, tais como catequinas e outros polifenóis (Alves *et al.*, 2010).

Dentre os estudos utilizando métodos eletroquímicos, destaca-se o trabalho de Ferreira e Avaca (2008) que utilizou o método eletroquímico com uso de  $Ce^{4+}$  como antioxidante (CRAC) em 0,8 V vs Ag/AgCl para determinação da AA em sucos industrializados de frutas, encontrando diferenças quantitativas entre os valores dos ensaios, porém, com manutenção da hierarquia de proporcionalidade, o que levou a pesquisadora a atribuir as variações às diferenças nos mecanismos de desativação radicalar e condições experimentais para a aplicabilidade de cada método.

Como os métodos para determinação da AA podem sofrer interferências de uma infindável gama de fatores, tem sido difundido o hábito de se realizar análises com dois a três métodos diferentes, a exemplo de Silva *et al.* (2018), a fim de se garantir uma maior robustez e certeza dos resultados.

#### 4. Considerações Finais

Apesar dos enormes avanços tecnológicos das últimas décadas, que permitiram o desenvolvimento de diferentes técnicas para a extração, a separação, a identificação e a medição da AA de compostos fenólicos em alimentos, não há um protocolo único que possa abarcar todos os tipos de amostras. Fatores como origem da amostra (caule, folhas, frutos, raízes, casca) e características específicas das mesmas ainda são preponderantes para a escolha das melhores técnicas de preparo e extração. A liofilização é uma das técnicas de desidratação que permite maior preservação do conteúdo originantes fitoquímicos de uma amostra, entretanto, seu alto custo ainda é um desafio. Por esta razão, o uso da maceração seguida de extração com solvente permanece mais frequente para a extração de compostos fenólicos, entretanto, metodologias consideradas como não-convencionais, como extração por ultrassom (US) e micro-ondas vêm se popularizando.

A identificação e quantificação de compostos fenólicos tem excelentes resultados com o uso de técnicas cromatográficas, como HPLC, acopladas a detectores mais potentes, como MS ou DAD, principalmente quando se faz necessária elucidação estrutural, entretanto, o elevado custo ainda restringe a popularização de seu uso, permanecendo a técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu como a técnica mais difundida, devido a sua simplicidade, reprodutibilidade e conveniência. Quanto à medição da atividade antioxidante, é comum o uso de utilizar mais de uma metodologia para a sua determinação, a fim de suprir as fragilidades de cada método.

Atualmente, a enorme diversidade de protocolos utilizados para a extração de compostos fenólicos, com bons rendimentos, demonstra que existem várias opções de técnicas reprodutíveis e robustas, tanto para extração quanto para

quantificação, identificação e determinação de AA, cujas adaptações para cada tipo de alimento vêm incrementando as perspectivas de novos progressos. Neste sentido, consideramos que novos trabalhos, incluindo revisões integrativas, comparando os resultados oriundos da aplicação de diversas técnicas para um mesmo tipo de amostra são extremamente necessários para difundir informações, tanto para a prática de análise laboratorial em controle de qualidade e pesquisa, quanto para a extração industrial.

## Referências

- Adelowo, F., & Oladeji, O. (2016). Gas chromatographic and antimicrobial analyses of phenolic compounds in *Senna alata* (L.) Roxb. (Fabales: Fabaceae). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade* 3(6), 355-365.
- Agostini, F., Michelon, F. M., Gomes, V. A. A., Bertolazzi, S., Schwambachi, & Moura, S. (2017). Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L. *Scientia Chromatographica*, 9(3), 180-193.
- Alonso, L. F. T., & Park, K. J. (2005). Dryer selection methods. *Food Science and Technology* 25(2), 208-216.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210.
- Amorim, A. F. V. (2019). *Química - Métodos Cromatográficos*. Fortaleza: Editora UECE, 2019. 84p.
- Ângelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 2007, 66, 01-09. [Link]
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 496-547.
- Araújo, M., & Lima, M. (2019). O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos: os conhecimentos etnobotânicos de alunos de escolas pública e privada em Floriano, Piauí, Brasil. Amazônia: *Revista de Educação em Ciências e Matemática*, 15(33), 235-250.
- Augusto, T. R., Salinas, E. S. S., Alencar, S. M., D'arce, M. A. B. R., Camargo, A. C., & Vieira, T. M. F. S. (2014). Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Science and Technology*, 34(4), 667-679.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629-643.
- Barcelos, S. C., Silva, E. F., Batista, E. M., Souza, P. A., & Farias, V. L. (2019). Efeito do processamento na composição bioativa e na capacidade antioxidante de tomates. *Brazilian Journal of Food Research*, 10(2), 122-142.
- Bastola, K. P., Guragain, Y. N., Bhadriraju, V., Vadlani, P. V. (2017). Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8(6), 77036.
- Benelli, P., Riehi, C. A. S., Smânia Jr., E. F. A., & Ferreira, S. R. S. (2010). Bioactive extracts of orange *Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *O Diário dos Fluidos Supercríticos*, 55(1), 132-141.
- Benemann, G. D., Botelho, R. V., Torres, Y. R., Camargo, L. A., Khalil, N. M., Oldoni, T. L. C., & Silva, D. H. (2018). Compostos bioativos e atividade antirradicalar em farinhas de bagaço de uvas de diferentes cultivares desidratadas em liofilizador e em estufa. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21, e2017205.
- Borges, K. C. (2015). Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização: Características físico-químicas, compostos bioativos e efeito sobre a longevidade, estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida em modelos in vivos *Caenorhabditis elegans*
- Brack, P., Köhler, M., Corrêa, C. A., Ardisson, R. E., Sobral, M. E. G., & Knupp, V. F. (2020). Native fruits of Rio Grande do Sul, Brazil: richness and potential as food. *Rodriguésia*, 71, e03102018.
- Brum, A. A. S., Arruda, L. F., & Regitano-d'Arce, M. A. B. (2009). Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32(4), 849-854.
- Caleja, C., Barros, L., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Caracterização do perfil fenólico de extratos aquosos de *Matricaria recutita* L. obtidos por decoação. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(1), 161-170.
- Campos, R. C., & Grinberg, P. (2001). Acoplamento cromatografia gasosa - espectrometria de absorção atômica em estudos de especiação: uma revisão. *Química Nova*, 24(2), 220-227.
- Canepelle, E., Writzl, T. C., Steffler, A. D., Redin, M., Weber, F. H., & Scherer, G. C. R. S. (2020). Influência dos métodos de secagem e preparo das amostras no processo de desidratação e reidratação do Abacaxi Pérola *Ananas comosus* L. *Revista brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 14(2), 3267-3283.
- Cardoso, I. C., Pereira, H. M. G., Tappin, M. R. R., & Behrens, M. D. (2017). Influence of extraction technique and particle size of the plant material in the content of total phenolic compounds of tincture of *Alpinia zerumbet* leaves. *Revista Fitos*, 11,1-126.
- Carratu, E., & Sazini, E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 41(1),7-16.

- Carvalho, J. C. T., Gosmann, G., & Schenkel, E. P. (2004). Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Florianópolis: UFSC, 1102p.
- Cecchi, H. M. (2003). *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2.ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 207p.
- Celestino, S. M. C. (2010). Princípios de Secagem de Alimentos. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*, 33-46.
- Cheng, Y., Xu, Q., Liu, J., Zhao, C., Xue, F., & Zhao, Y. (2014). Decomposition of five phenolic compounds in high temperature water. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 2102-2107.
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., & Jardim, I. C. S. F. (2008). O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31(3), 623-636.
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. (2006). *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Ed. da UNICAMP, 452p.
- Cottica, S. M., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., Franco, S. L., Zeoula, L. M., & Visentainer, J. V. (2011). Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22(5), p.929-935.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Davoodi, M. G., Vijayanand, P., Kulkarni, S.G., & Ramana, K.V.R. (2007). Effect of different pre-treatments and dehydration methods on quality characteristics and storage stability of tomato powder. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1832-1840.
- Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J. A., Costa, G., Echeverry, C., Lafon, L., Heizen, H., Ferreira, M., & Morquio A. (2003). Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(12), 1613-1620.
- Dias, R., Oliveira H., Fernandes, I., Simal-Gandra, J., & Perez-Gregorio, R. (2020). Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), p. 1130-1151.
- Diaz Napal, G. N., Defagó, M. T., Valladares, G.R., & Palacios, S. M. (2010). Response of *Epilachna paenulata* to Two Flavonoids, Pinocembrin and Quercetin, in a Comparative Study. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1), 898-904.
- Dutra, F. L. G., Hoffmann-Ribani, R., & Ribani, M. (2010). Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. *Química Nova*, 33(1), 119-123.
- El-Anead, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210-230.
- Emidio, N. B., Carpanez, A. G., Quellis, L. R., Farani, P. S., Vasconcelos, E. G., & Faria-Pinto, P. (2015). Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. *HU Revista*, 41, 101-111.
- Espinosa, E. W., Garzon, L. C. A., & Medina, O. J. (2017). Extração assistida por micro-ondas em frutas secas de espécies andinas Meridionale de Vaccinium: Condições experimentais na recuperação de polifenóis totais. *Ciências e Agrotecnologia*, 41(6), 701-712.
- Faller, A. L. K., & Fialho, E. (2009). Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 43(2), 211-8.
- Ferreira, R. Q., & Avaca, L. A. (2008). Determinação eletroquímica da atividade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. *Química Nova*, 31(8), 2169-2173.
- Ferreira, E. A., Siqueira, H. E., Vilas Boas, E. V., Hermes, V. S., & Rios, A. O. (2016). Compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de cultivares de abacaxizeiros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(3), 146.
- Frias, C. F., Gramacho, S. A., & Pineiro, M. (2014). Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos. *Química Nova*, 37(1), 176-180.
- Garcia, L. P. (2009). Liofilização aplicada a alimentos. Monografia (Química em Alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 46 f.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813-8826. [doi:10.3390/molecules15128813]
- Glish, G. L., & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140-150.
- Gomes, D., C., L. (2003) Os fitonutrientes: revisão bibliográfica. Tese de licenciatura em Ciências da Nutrição e Alimentação apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Görüşük, E.M., Bekdeşer, B., Bener, M., & Apak, R. (2020). ABTS radical-based single reagent assay for simultaneous determination of biologically important thiols and disulfides. *Talanta*, 218, 121212.
- Guerra, A. P., Garcia, V. A. S., & Silva, C. (2016). Otimização da extração de compostos fenólicos da casca de manga (*Tommy Atkins*) utilizando processo assistido por ultrassom. *E-xacta*, 09(1), 103-110.
- Habibi, F., & Ramezani, A. (2017). Vacuum infiltration of putrescine enhances bioactive compounds and maintains quality of blood orange during cold storage. *Food Chemistry*, 227, 1-8.
- Hartanti, S. M. K., Yonas, J. J., Mustamu, S., Wijaya, H. K., Setiawan, L., & Soegianto L. (2019). Influence of extraction methods of bay leaves (*Syzygium polyanthum*) on antioxidant and HMG-CoA Reductase inhibitory activity. *Heliyon*, 5(4), 01485.

- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126–1134.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 23-30.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. A. (2011). critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.
- Im, I., Park, K. R., Kim, S. M., Kim, C., Park, J. H., Nam, D., Jang, H. J., Shim, B. S., Ahn, K. S., Mosaddik, A., Sethi, G., Cho, S. K., & Ahn, K. S. (2012). The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK. *Nutrition and Cancer*, 64(2), 255–266.
- Jensen, S., Meleiro, L. A. C., & Zaoelo, E. F. (2011). Soft-sensor model design for control of a virtual conveyor-belt dryer of mate leaves (*Ilex paraguariensis*). *Biosystems Engineering*, 108(1), 75-85.
- Jiao, Y., Kilmartin, P. A., Fan, M., & Quek, S. Y. (2018). Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with HPLC. *Food Chemistry*, 268(1), 77-85.
- Kalili, K. M., & Villiers A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, 34(8), 854-876.
- Kaur, R., Kaur, K., & Ahluwalia, P. (2020). Effect of drying temperatures and storage on chemical and bioactive attributes of dried tomato and sweet pepper. *LWT - Food Science and Technology*, 117, 108604.
- Khoddami, A., Meredith, A. W., & Roberts T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375. [CrossRef]
- Kivilompolo, M., & Hyotylainen, T. (2009). On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs. *Chromatography*, 1216(6), 892-896.
- Lanças, F. M. A. (2009). Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, 01. [CrossRef]
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1) 437-473.
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
- Markon, M., Hasan, M., Daud, W. R. W., Singh H., Jahim, J. M. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52(3), 487-96.
- Marques, L. G., Silveira, A. M., & Freire, J. T. (2006). Freeze-Drying Characteristics of Tropical Fruits. *Drying Technology*, 24, 457-463.
- Marques, L. G. (2008). Liofilização de frutas tropicais. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 293 f.
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. *IntechOpen*. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/66885>
- Medina, A. L., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiazzi, R. C., Silva, W. P., Nora, L., & Rombaldi, C. V. (2011). Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128(4), 916–922.
- Melo, G. W., Rodighero, K., Freitas, R. F., Magro, Albarello, J. B., & Oliveira, P. D. (2013). Secagem Rápida de Tecidos de Plantas para Determinação da Matéria Seca. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo.
- Melo, I. L. P., & Almeida-Muradian, L. B. (2011). Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Food Science and Technology*, 31(1), 194-197.
- Mendes, K. R., Dantas, M. V. C., Nogueira, A. B., Etchegaray, A., Filgueiras, P. R., & Poppi, R. J. (2018). Determinação simultânea de diferentes compostos fenólicos usando biossensor eletroquímico e calibração multivariada. *Journal Brazilian Chemical Society*, 29(3), 88-97.
- Mendes K. D. S., Silveira R. C. C. P., & GALVÃO C. M. (2008). Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. *Texto Contexto Enfermagem*, 17(4), 758.
- Mendonça, C. P., & Anjos, L.A. (2004). Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 20(3), 698-709.
- Meregalli, M. B., Puton, B. M. S., Camera, F. D. M., Amaral, A. U., Zenia, J., Cansian, R. L., Mignoni, M. L., Backes, G. T. (2020). Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, 12(6), 5800-5809.
- Milani, L. I. G., Terra, N. N., Fries, L. L. M., Cichoski, A. J., Rezer, A. P. S., Backes, A. M., & Parodia, C. G. (2012). Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(2), 118-124.
- Nascimento, V. R. G., Biagi, J. D., & Oliveira, R. A. (2015). Modelagem matemática da secagem convectiva com radiação infravermelha de grãos de Moringa oleifera. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(7), 686-692.
- Nery, M. C., Carvalho, M. L. M., & Oliveira, L. M. (2004). Determinação do grau de umidade de sementes de Ipê-do Cerrado *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. pelos métodos de estufa e forno de microondas. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(6), 1299-1305.

- Neto, A. M. B., Lima, J. O., Marques, L. G., Prado, M. M. (2014). Secagem Infravermelho de caroços de açaí para a obtenção de biomassa. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. XX congresso brasileiro de engenharia química. Florianópolis, Santa Catarina.
- Nollet, L. M. L., & Gutierrez-Uribe, J. A. (2018). *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*. Routledge Taylor & Francis Group, 2018, 420p.
- Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R., & Bo, S. H. (2012). Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13), 2526-2539.
- Oliveira, D. M., Bastos, D. H. M. (2011). Phenolic acids bioavailability. *Química Nova*, 34(6).
- Oliveira, P. S., Muller, R. C. S.; Dantas, K. G. F., Alves, C. N., Vasconcelos, M. A. M., & Venturieri G.C. (2012). Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova*, 35(9), 1728-1732.
- Oliveira, V. B., Zuchetto, M., Oliveira, C. F., Paula, C. S., Duarte, A. S. F., Miguel, M. D., & Miguel, O. G. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 230-239.
- Pacheco, S., Borguini, R. G., Santiago, M. C. P. A., Nascimento, L. S. M., & Godoy, R. L. O (2014). História da Cromatografia Líquida. *Revista Virtual de Química*, 7(4), 1225-1271.
- Pereira, R. J.; Cardoso, M. G. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 3(4), 146-152
- Peres, D. S. (2020). Butter oil with added vegetable extracts from oregano (*Origanum vulgare* L.) and basil (*Ocimum basilium* L.): development and physical, chemical and sensory characterization. *Research, Society and Development*, 9, e85953205.
- Peres, R. G. Aplicações de CE-DAD e HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas. Tese em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2007.
- Pinto, Â. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S., Lopes, N. P., & Epifânio, R. A. (2002). Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25(1), 45-61.
- Prior, R., Xianli, W.U., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4306.
- Queiroz, V. A. V., Berbert, P. A., Molina, M. A. B, Gravina, G. A., Queiroz, L R., & Deliza, R. (2007). Desidratação por imersão-impregnação e secagem por convecção de goiaba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 42(10), 1479-1486.
- Reverchon, E., & Marco I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166. [CrossRef]
- Ribeiro, L. G. (2018). Extração Assistida por Micro-ondas de Óleo Essencial de Folhas de Eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *globulus*). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Filho, J. M., & Moreira, A. V. B. (2006). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema b-caroteno/ácido linoleico. Fortaleza: *EMBRAPA*, 126, 1-4.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *EMBRAPA*, 127, 1-4.
- Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2010). Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 23-31.
- Santos, M. A. I., Simão, A. A., Marques, T. R., Sackz, A. A., & Corrêa, A. D. (2016). Effect of different extraction methods on the antioxidant activity and phenolic compounds profile of cassava leaf. *Brazilian Journal Food Technology*, 19, e2015067.
- Santos, V. O., Soares, S. D., Dias, P. C.S., Duarte, S. P. A., Santos, M. P. L. & Nascimento, F. C. A. (2020). Chromatographic profile and bioactive compounds found in the composition of pupunha oil (*Bactris gasipaes* Kunth): implications for human health. *Revista de Nutrição*, 33, e190146, 190-146. [CrossRef]
- Savi, A. (2015). Otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de jambo (*Syzygium malaccense*). Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 48 f.
- Sequeiros, R. C. P. (2009). Aplicação de novas metodologias analíticas no estudo de compostos fenólicos em matrizes alimentares. Dissertação (Departamento de Química e Bioquímica). Universidade de Lisboa.
- Schiassi, M. C. E. V., Souza, V. R., Lago, A. M. T., Campos, L. G., & Queiroz, F. (2018). Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 245, 305-311.
- Seraglio, S. K. T. (2018). Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS e capacidade antioxidante de acerola em três estágios de maturação comestíveis. *Revista CSBEA*, 4(1), 96-108.
- Silva, L. A., Raposo, J. D. A., Campos, L. P. G., Conceição, E. C., Oliveira, R. B., & Mourão, R. H. V. (2018). Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, βcaroteno/ácido linoleico). *Revista Fitos*, 12(2), 117-126.
- Silva, P. D. (2012). Determinação de compostos fenólicos por HPLC. Dissertação de mestrado. Universidade da Beira Inferior, Covilhã, Portugal.
- Skoog, D., West, D., Holler, J., e Crouch, S. (2006). Fundamentos de Química Analítica. (1ª ed.) São Paulo, SP.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes - Revisão. *Revista de Nutrição*, 15(1), 71-81.

- Soares, M., Welter, L., Gonzaga, L., Lima, A., Mancini-Filho, J., & Felt, R. (2008). Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 727-732.
- Sobrinho, T. J. S. P., Gomes, T. L. B., Cardoso, K. C. M., Amorim, E. L. C., & Albuquerque, U. P. (2010). Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, 33(2), 288-291.
- Taiz, L., & Zeigert, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 719 p.
- Tallini, L. R., Pedrazza, G. P. R., Bordignon, S. A. L., Costa, A. C. O., Steppe, M., Fuentefria, A., & Zuanazzi, J. A. S. (2015). Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(3), 219-227.
- Texeira, L. N., Stringheta, P. C., & Oliveira, F. A. (2008). Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55(4), 297-304.
- Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2), 139-142.
- Tyskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The Application of Supercritical Fluid Extraction in Phenolic Compounds Isolation from Natural Plant Materials. *Molecules*, 23(10), 2625. <https://doi.org/10.3390/molecules23102625>
- Tzia, C., & Liadakis, G. (2003). Extraction optimization in food engineering. New York: *Marcel Dekker, Inc.*, p.70.
- Veber, J., Petri, L. A., Andrade, L. B., & Siviero, J. (2015). Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(2), 267-273.
- Vinas, P., Lopez-Erroz, C., Marin-Hernandez, J. J., & Hernandez-Cordoba, M. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 871(1-2), 85-93.
- Vizzotto, M., & Pereira, M. C. (2009). Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). *EMBRAPA Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 101, 1-19.
- Wolff, S. M., Silveira, A. C., & Lazzarotto, M. (2019). Metodologia para extração de compostos fenólicos e antioxidantes da erva-mate. *Revista de Iniciação Científica CESUMAR*, 21(1), 45-54.
- Yamaguchi, S. K. F., Krebs, C. S., Bertolli, S. L., & Carvalho, L. F. (2017). Freeze-drying of dairy products: A review. *Revista Espacios*, 38(22), 2.
- Yang, Y. C., Yang, Z. W., Zhang, Z. H., Li, J., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2013). Effect of acid hydrolysis in the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Geranium sibiricum* Linne with the guidance of antibacterial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14), 819-830.
- Zanoelo, E. F., di Celso, G. M., & Kaskantzis, G. (2007). Drying Kinetics of Mate Leaves in a Packed Bed Dryer. *Biosystems Engineering*, 96(4), 487-494.