

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)

LUANA PEIXOTO MALLMANN

**ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO EXPLORADOS DO ARAÇÁ  
AMARELO E VERMELHO POR LC-DAD-ESI-MS/MS**

PORTO ALEGRE

2019

LUANA PEIXOTO MALLMANN

**ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO EXPLORADOS DO ARAÇÁ  
AMARELO E VERMELHO POR LC-DAD-ESI-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi

Co-orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Porto Alegre

2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

Mallmann, Luana Peixoto  
ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO EXPLORADOS DO  
ARAÇÁ AMARELO E VERMELHO POR LC-DAD-ESI-MS/MS / Luana  
Peixoto Mallmann. -- 2019.

141 f.

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. araçá. 2. compostos fenólicos. 3. não  
extraíveis. 4. capacidade antioxidante. I. Manfroi,  
Vitor, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III.  
Título.

**Luana Peixoto Mallmann**  
Engenheira de Alimentos

**DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

---

VITOR MANFROI  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

---

ELISEU RODRIGUES  
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

---

ELISEU RODRIGUES  
Coordenador PPGCTA/UFRGS

---

JULIANE ELISA WELKE

---

SIMONE HICKMANN FLÔRES

---

LIGIA DAMASCENO FERREIRA

---

SIMONE HICKMANN FLÔRES  
Diretora – ICTA/UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Vitor Manfroi, pela oportunidade de realização deste mestrado e pelo incentivo a continuar os estudos em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Agradeço pelo apoio, pela confiança depositada em mim e pelos brindes com vinho, espumante, cerveja e demais bebidas ao longo desse período.

Ao Prof. Eliseu Rodrigues, por todos os ensinamentos em relação a espectrometria de massas, por me fazer amar esta técnica e os compostos fenólicos. Pela paciência que teve comigo e por me ajudar a desenvolver este trabalho em tempo para a matrícula do doutorado.

Ao meu esposo, Anderson, por insistir para que eu me inscrevesse para o mestrado, por me dar todo apoio e ter muita paciência comigo durante este curso. Agradeço pelo nosso casamento que foi espetacular e muito melhor do que jamais sonhei e pelo nosso amor que cresce a cada dia. Sou grata pela nossa lua-de-mel organizada por ele com tanto carinho e pela melhor companhia do mundo. Ainda, eu agradeço por ter entrado na minha vida para ficar para sempre.

Ao meu enteado, Dudu, por animar os meus dias e me fazer olhar o mundo com a magia e inocência de uma criança. Ao meu cachorro, Doug, por dormir nos meus pés enquanto escrevia a dissertação e identificava os compostos fenólicos e pela companhia mais fiel que existe.

Ao meu pai, Paulo, pelo exemplo de Mestre na família e por me incentivar a estudar e aprender cada vez mais. A minha mãe, Ligia, pelo amor incondicional e pelo apoio a qualquer hora e por qualquer motivo. Aos dois por cuidarem tão bem do meu “filho”, Doug. A minha irmã, Luiza, e ao meu cunhado, Lucas, por estarem sempre presente para festinhas e afins.

Aos meus colegas e amigos do NTC, Andressa, Ana Raisa, Michele, Raul e Tiago, pelas festinhas e momentos de ócio produtivo. Ao Diogo, pelas milhares de vezes que teve que consertar a bomba de alto vácuo do massas e me aguentar perguntando se já estava pronta.

Aos nossos bolsistas, Carol e Grecco por terem me ajudado com as análises. Por serem tão dedicados e comprometidos com o trabalho e pela companhia e risadas compartilhadas.

A todos os meus amigos que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer desse mestrado.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVO.....	17
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1.	Compostos fenólicos.....	18
3.1.1.	Estrutura química e fontes .....	18
3.1.2.	Compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis .....	26
3.1.3.	Efeitos benéficos à saúde atribuídos aos CFNE.....	27
3.2.	Métodos para Quantificação de compostos fenólicos.....	30
3.2.1.	Método espectrofotométrico <i>Folin-Cicalteu</i> .....	30
3.2.2.	Método HPLC-DAD.....	32
3.2.3.	Espectrometria de massas.....	33
3.2.3.1.	Fontes de Ionização.....	34
3.2.3.2.	Analisadores de massas .....	36
3.3	Araçá amarelo e vermelho .....	38
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1.	Reagentes e padrões.....	42
4.2.	Amostragem.....	42
4.3.	Extração de compostos fenólicos extraíveis (CFE) e não extraíveis (CFNE).....	43
4.4.	Determinação de fenólicos totais por <i>Folin-Ciocalteu</i> .....	44
4.5.	Análise por LC-DAD-ESI-MS/MS .....	45
4.6.	Capacidade de desativação do radical peroxila (ROO*) .....	48
4.7.	Análises estatísticas.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49

5.1.	Experimentos de otimização e validação .....	49
5.2.	Identificação .....	55
5.2.1.	Compostos fenólicos extraíveis (CFE) .....	55
5.2.1.	Compostos Fenólicos Não-Extraíveis (CFNE) .....	64
5.3.	Quantificação .....	74
5.4.	Capacidade de desativação do radical peroxila (ROO*) .....	84
6.	CONCLUSÃO .....	88
	APÊNDICE A – Espectro de massas dos CFE .....	106
	APÊNDICE B – Espectro de massas dos CFNE .....	122
	APÊNDICE C – Otimização e validação do método .....	135
	APÊNDICE D – Tabelas suplementares .....	138



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos fenólicos. ....	21
Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides. ....	23
Figura 3. Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.....	34
Figura 4. Mecanismo de ionização da fonte ESI.....	35
Figura 5. Funcionamento de um analisador de massas quadrupolo (Q). ....	36
Figura 6. Esquema de um analisador de massas Q-ToF.....	38
Figura 7. Araçá amarelo e vermelho.....	39
Figura 8. Esquema da análise do efeito de matriz no sistema HPLC-MS.....	47
Figura 9. Efeito matriz do araçá sobre os padrões de rutina, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico e ácido cafeico.....	54
Figura 10. Cromatogramas dos picos identificados da fração de CFE do (a) araçá amarelo e do (b) araçá vermelho. ....	60
Figura 11. CFE identificados pela primeira vez em araçá amarelo e vermelho. ....	63
Figura 12. Cromatogramas dos picos identificados da fração de CFNE do araçá amarelo (a) e do araçá vermelho (b). ....	69
Figura 13. CFNE identificados pela primeira em araçá amarelo e vermelho. .	74
Figura 14. Decaimento de fluorescência para os extratos de CFE e CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV) longo do tempo pelo método ORAC. ....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura básica dos compostos fenólicos classificados com base no número de carbonos na molécula. ....	19
Tabela 2. Concentração de alguns ácidos fenólicos em frutas e vegetais frescos. ....	20
Tabela 3. Variações dos ácidos fenólicos de acordo com os substituintes da estrutura fenólica. ....	21
Tabela 4. Concentração de alguns flavonoides em frutas e vegetais frescos. ....	22
Tabela 5. Estrutura química das diferentes classes dos flavonoides. ....	24
Tabela 6. Compostos fenólicos extraíveis (CFE) identificados em araçá amarelo e vermelho na literatura. ....	40
Tabela 7. Características cromatográficas e espectroscópicas dos padrões de compostos fenólicos obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. ....	50
Tabela 8. Dados obtidos das curvas analíticas de padrões fenólicos obtidos por LC-ESI-MS. ....	51
Tabela 9. Recuperação e Repetibilidade do método analítico. ....	52
Tabela 10. Características cromatográficas e espectroscópicas dos CFE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV). ....	57
Tabela 11. Características cromatográficas e espectroscópicas dos CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV). ....	66
Tabela 12. Concentração total de compostos fenólicos, de CFE e de CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV) liofilizados ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). ....	75
Tabela 13. Comparação de quantificação de compostos fenólicos em araçá amarelo (AA) e vermelho (AV). ....	84
Tabela 14. Capacidade de desativação de $\text{ROO}\cdot$ dos CFE e CFNE do araçá amarelo e vermelho expressa em $\mu\text{mol}$ de Trolox equivalentes por g de extrato liofilizado. ....	86

## GLOSSÁRIO

Acurácia – Erro de massa entre a massa exata e a massa acurada do composto

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists

APCI – Ionização química à pressão atmosférica

C18 – Ocotadecilsilano

CFNE – Compostos fenólicos não-extraíveis

CFE – Compostos fenólicos extraíveis

DAD – Detector de arranjo de diodos

ESI – Ionização por *electrospray*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

m/m – Massa por massa

*m/z* – Razão massa/carga

Massa acurada – Massa de um íon de carga conhecida, determinada experimentalmente

Massa exata – Massa calculada (teórica) para um íon ou molécula

MS – Espectrometria de massas

Pico - Região localizada em um espectro de massas com sinal de um íon relativamente intenso

PTFE – Politetrafluoretileno

Q-ToF – analisador de massas quadrupolo-tempo de voo

R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

ROO• – Radical peroxila

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Supressão iônica – Fenômeno onde a eficiência de ionização de um composto é diminuída pela presença de um composto diferente.

UV-Vis – Espectroscopia Ultravioleta no Visível

v/v – Volume por volume

## RESUMO

Na literatura há estudos epidemiológicos e clínicos relatando os prováveis efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos. Na grande maioria deles há uma limitação recorrente, que é considerar apenas uma das frações dos compostos fenólicos, os extraíveis (CFE) e ignorar os não extraíveis (CFNE). Essa limitação dificulta, por exemplo, a compreensão dos mecanismos de ação desses compostos no organismo humano. Neste trabalho a composição dos CFNE do araçá amarelo e do vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) foi relatada pela primeira vez. Uma hidrólise ácida foi conduzida e os extratos produzidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência conectada a um detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de massas de alta resolução (LC-DAD-ESI-MS/MS). O método LC-DAD-ESI-MS/MS foi otimizado para a identificação e validado para quantificação dos compostos fenólicos. Um total de 45 e 43 compostos fenólicos foram identificados na fração CFNE dos araçás vermelho e amarelo, respectivamente. Esse número de compostos fenólicos foi similar aos 50 compostos encontrados na fração CFE. Entretanto, o perfil qualitativo dos compostos fenólicos presentes nas frações CFE e CFNE foi muito diferente, sendo que apenas os ácidos gálico e elágico estavam presentes em ambas as frações. Os CFNE do araçá são caracterizados compostos majoritariamente por ácidos fenólicos, enquanto a fração CFE é rica em flavanóis. Apesar dos CFNE representarem um terço (1/3) do teor de total de compostos fenólicos presentes no araçá, a sua capacidade antioxidante (frente ao radical peroxila) foi 50 % superior ao da fração CFE. Os resultados desse trabalho mostram que fração CFNE do araçá possui uma grande diversidade e em concentração relativamente alta de compostos fenólicos de baixa massa molecular com elevada capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** araçá, compostos fenólicos, não extraíveis, capacidade antioxidante.

## ABSTRACT

Epidemiological studies and clinic reports are found in the literature associating the beneficial health effects with the consumption of rich in phenolic compounds foods. In most of those, there is a recurrent limitation, which is considering only one of the fractions of the phenolic compounds, the extractables (CFE) and ignoring the non-extractables (CFNE). This limitation makes it difficult, for example, to understand these compounds action mechanisms in the human body. In this work the composition of CFNE in yellow and red araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) is reported for the first time. For this, acid hydrolysis was conducted, and the obtained extracts were analyzed by high performance liquid chromatography connected to a diode arrangement detector and a high-resolution mass spectrometer (LC-DAD-ESI-MS/MS). The LC-DAD-ESI-MS/MS method was optimized for identification and validated for quantification of phenolic compounds. A total of 45 and 43 phenolic compounds were identified in the CFNE fraction of red and yellow araçás, respectively. This number of phenolic compounds was similar to the 50 compounds found in the CFE fraction. However, the qualitative profile of the present phenolic compounds in CFE and CFNE fractions was very different. Only gallic and ellagic acids were present in both fractions. The CFNE of the araçás are characterized by its phenolic acid composition, while the CFE fraction is rich in flavanols. Although CFNE represented one-third (1/3) of total phenolic compounds found in araçá, its antioxidant capacity (against peroxy radical) was 50% higher than the CFE fraction. The results of this work show that CFNE fraction of araçá has a great diversity and a relatively high concentration of phenolic compounds of low molecular mass with high antioxidant capacity.

**Key words:** araçá, phenolic compounds, non-extractable, antioxidant capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos (CF) são metabolitos secundários das plantas e o seu consumo através de frutas e vegetais tem sido associado à redução de doenças crônico-degenerativas, tais como alguns tipos de câncer, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares (Rodríguez-Mateos et al., 2014). Vários mecanismos foram propostos para explicar esse efeito benéfico à saúde, com destaque para a capacidade antioxidante dessas moléculas. Segundo essa hipótese, os compostos fenólicos seriam capazes de auxiliar o organismo humano na desativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) durante o estresse oxidativo, o qual está relacionado à etiologia dessas doenças (Mares, 2015; Song et al., 2018).

Os efeitos benéficos associados ao consumo de CF estimularam um grande número de pesquisas que identificaram, quantificaram e também avaliaram as propriedades antioxidantes dessa classe de moléculas. Um total de 10.000 diferentes CF foram encontrados em plantas, sendo que, desse total, 500 foram identificados em alimentos (Pereira et al., 2010; Shi et al., 2011). Destaca-se o grande número de trabalhos publicados em relação à composição de CF de diferentes frutas nativas do Brasil, tais como açaí, acerola, cajá, goiaba, graviola, maná-cubiu, manga e araçá (Rodrigues et al., 2013; Paz et al., 2015; Silva et al., 2014).

A dimensão do número de estudos relativos ao tema compostos fenólicos pode ser mensurada através do resultado de uma pesquisa realizada na base de dados *Scopus*, com as palavras-chaves "*phenolic and compounds*". A pesquisa retornou cerca de 58.000 estudos desenvolvidos sobre o tema nos últimos 20 anos. Uma análise mais criteriosa nesses trabalhos permite identificar uma característica comum a grande maioria deles, que é a avaliar apenas a fração de compostos fenólicos extraíveis (CFE) da matriz em estudo e ignorar a fração de compostos fenólicos não extraíveis (CFNE).

Os CFNE estão ligados a matriz através de ligações fracas ou covalentes, o que não permite que elas sejam extraídas aplicando apenas solvente orgânico ou misturas de água mais solvente orgânico (Pérez-Jiménez et al., 2013). Essa fração é composta de moléculas de massa molecular baixa (ácidos fenólicos), intermediária (taninos hidrolisáveis) e até polímeros (proantocianidinas). A hidrólise ácida tem apresentado bons resultados no estudo dessa classe de compostos fenólicos. Por exemplo, pela aplicação da hidrólise ácida em frutas e vegetais, observou-se que os CFNE representam cerca de 40% dos fenólicos totais da tangerina e 76% do repolho-roxo (Esparza-Martínez et al., 2016; Gonzales et al., 2015). A capacidade antioxidante dos CFNE também tem sido pouco explorada, sendo ainda uma lacuna a ser preenchida. A capacidade antioxidante dos CFNE de frutas e vegetais comumente consumidas na Europa foi estudada e representou, em média, 64% da capacidade antioxidante total das frutas (Pérez-Ramírez et al., 2018; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015).

O conhecimento da composição e também das propriedades antioxidantes da fração de CFNE de diferentes frutas e vegetais auxiliará na compreensão do papel desses alimentos na diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas que possuem a sua etiologia associada ao estresse oxidativo. Nesse contexto, o araçá (*Psidium cattleianum*), fruta nativa do Brasil e bastante estudada devido ao seu alto teor de compostos fenólicos e elevada capacidade antioxidante (Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014) foi escolhido para este estudo. Alguns estudos foram desenvolvidos com essa fruta em relação ao CFE, onde o ácido elágico (e seus derivados) e epicatequina (e seus derivados) foram os majoritários. Recentemente foi publicada uma revisão sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante do araçá amarelo e vermelho que relatou a falta de estudos comparando o perfil completo de compostos fenólicos do araçá amarelo e vermelho (Pereira et al., 2018).

A novidade deste trabalho é apresentar um estudo dos CFNE do araçá, uma fração não explorada desta fruta, pela aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência conectada a um detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de massas de alta resolução (LC-DAD-ESI-MS/MS).



## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar, quantificar e avaliar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos extraíveis (CFE) e não extraíveis (CFNE) do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine).

As seguintes etapas foram realizadas para atingir o objetivo proposto:

1. Extração dos CFE e CFNE dos araçás amarelo e vermelho;
2. Otimização do método de separação cromatográfica, ionização por *electrospray* e da fragmentação dos compostos fenólicos por LC-DAD-ESI-MS/MS;
3. Validação do método otimizado;
4. Análise, por LC-DAD-ESI-MS/MS, dos CFE e CFNE dos araçás amarelo e vermelho;
5. Determinação da capacidade antioxidante dos CFE e CFNE dos araçás amarelo e vermelho.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas sintetizados durante o seu desenvolvimento normal. A sua produção pode ser influenciada por situações de estresse, tais como injúrias, exposição à radiação ultravioleta (UV), entre outros fatores (Haminiuk et al., 2012). Aproximadamente 10.000 compostos fenólicos foram relatados na literatura, sendo que desse total, 500 estão presentes em plantas que são utilizadas na alimentação humana (Ashraf et al., 2018; Tahara, 2007).

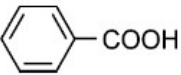
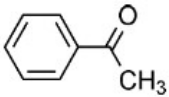
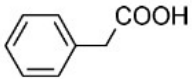
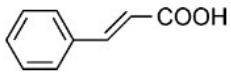
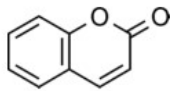
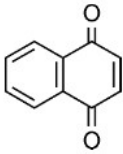
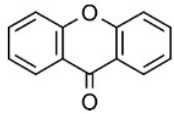
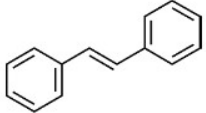
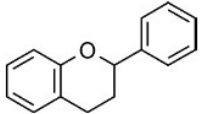
##### 3.1.1. Estrutura química e fontes

Os compostos fenólicos são caracterizados por terem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados. Eles variam de único anel aromático, simples e de baixa massa molecular até grandes complexos de compostos fenólicos de elevada massa molecular. Uma fração significativa dos compostos fenólicos é encontrada glicosilada ou esterificada na matriz vegetal (Haminiuk et al., 2012).

Os compostos fenólicos são distribuídos de forma heterogênea nas plantas. Por exemplo, as camadas externas das plantas contêm diferentes concentrações e classes de compostos fenólicos quando comparadas com suas partes internas. No araçá amarelo, a polpa da fruta possui uma concentração duas vezes superior de compostos fenólicos em comparação com a sua casca. A quercetina e seus derivados glicosilados foram os únicos compostos, em um total de 20 analisados, que apresentaram uma concentração maior na casca (até 5 vezes mais) (Ribeiro et al., 2014).

Os compostos fenólicos constituem um grupo grande e diversificado de compostos que podem ser classificados de acordo com o número de carbonos na molécula e, posteriormente, pelo arranjo desses carbonos na sua estrutura (**Tabela 1**). Usualmente, os compostos fenólicos tem sido divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides (Vermerris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2009).

**Tabela 1. Estrutura básica dos compostos fenólicos classificados com base no número de carbonos na molécula.**

Fórmula básica	Classificação	Estrutura básica
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácido fenilacético	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Naftoquinonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Xantonas	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Estilbenos	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> .C <sub>6</sub>	Flavonoides	

Fonte: própria autora

As frutas e vegetais são a principal fonte de ácidos fenólicos (**Tabela 2**). Eles são caracterizados por possuírem um substituinte carboxílico na sua estrutura fenólica, podendo ter também uma ou mais hidroxilas, além de um ou mais grupos metoxila. Essa classe de compostos apresenta um esqueleto carbônico muito similar, porém, as posições das hidroxilas e das metoxilas no anel aromático variam bastante. O substituinte X (**Figura 1**) faz com o que este grupo se divida em: ácidos hidroxicinâmicos ( $X_a$ ), ácidos hidroxibenzóicos ( $X_b$ ) e ácidos hidroxifenilacéticos ( $X_c$ ) e seus respectivos derivados (**Tabela 3**) (Robbins, 2003).

**Tabela 2. Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de alguns ácidos fenólicos em frutas e vegetais frescos.**

	Ácido Ferúlico	Ácido Cafeico	Ácido Siríngico	Ácido Gálico
Amora	413,8 ± 11,9	377,9 ± 4,4	n.d	46,7 ± 3,8
Araçá Amarelo	3,2 ± 1,0	30,2 ± 2,0	n.d	512,2 ± 48,0
Araçá Vermelho	5,7 ± 2,0	n.d	n.d	497,1 ± 41,2
Banana	n.d	n.d	0,2 ± 0,1	10,0 ± 1,2
Maçã	0,7 ± 0,1	3,3 ± 0,5	9,0 ± 1,2	0,1 ± 0,0
Pêra	n.d	1,4 ± 0,2	n.d	n.d
Laranja	n.d	7,0 ± 1,0	n.d	0,2 ± 0,0
Toranja	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	n.d	60,0 ± 0,0
Azeitona	30,1 ± 2,6	13,3 ± 2,3	60,0 ± 8,5	243,0 ± 12,0
Batata	0,6 ± 0,1	16,2 ± 0,2	n.d	n.d
Berinjela	2,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1	n.d	1,4 ± 0,5
Cenoura	2,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	n.d	n.d
Couve-flor	5,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	11,3 ± 0,0	6,9 ± 0,1
Tomate	9,6 ± 0,4	21,8 ± 0,8	n.d	3,5 ± 0,1

n.d= não detectado.

**Fonte:** adaptado de Andlauer et al., 2003; Boskou, 2010; Escarpa & González, 2000; Gorinstein et al., 2004; Lee et al., 1990; Martínez-Valverde et al., 2002; Méndez et al., 2003; Pereira et al., 2018; Wada & Ou, 2002; Türkben et al., 2010; Russell et al., 2009; Garzón et al., 2017; Surjadinata & Cisneros-zevallos, 2012; (Quifer-Rada et al., 2015); Vallverdú-queralt et al., 2011.

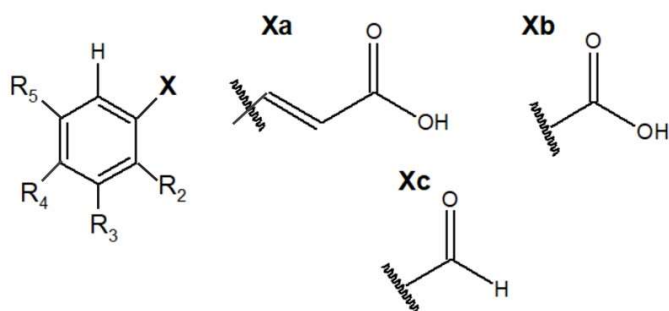


Figura 1. Estrutura química dos ácidos fenólicos. O substituinte X caracteriza ácidos hidroxicinâmicos (Xa), ácidos hidroxibenzoicos (Xb) e ácidos hidroxifenilacéticos (Xc) e seus respectivos derivados. R1- R5 referem-se aos possíveis radicais especificados na Tabela 3.

Fonte: própria autora.

Tabela 3. Variações dos ácidos fenólicos de acordo com os substituintes da estrutura fenólica.

R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	X	Composto
H	H	H	H	a	ácido cinâmico
OH	H	H	H	a	ácido <i>o</i> -cumárico
H	H	OH	H	a	ácido <i>p</i> -cumárico
H	OH	H	H	a	ácido <i>m</i> -cumárico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	a	ácido ferúlico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	a	ácido sináptico
H	OH	OH	H	a	ácido cafeico
H	H	H	H	b	ácido benzoico
OH	H	H	H	b	ácido salicílico
H	H	OH	H	b	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	b	ácido vanílico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	b	ácido siríngico
H	OH	OH	H	b	ácido protocatecuico
OH	H	H	OH	b	ácido gentísico
OH	OH	OH	OH	b	ácido gálico
H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	c	siringaldeído
H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	c	Vanilina

Fonte: própria autora

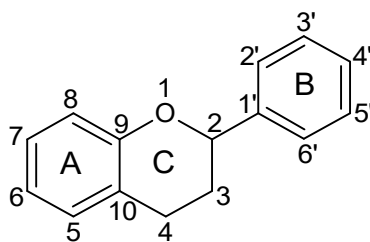
Os flavonoides englobam o maior número de compostos fenólicos, com mais de cinco mil compostos que ocorrem na natureza (**Tabela 4**). Estes compostos são caracterizados por possuírem 15 carbonos (C6-C3-C6) em sua estrutura e dois anéis aromáticos (A e B) conectados por um heterocíclico de três átomos de carbono, anel C, (**Figura 2**). Os substituintes no anel C criam as variações de compostos dando origem a diversas classes (Moussa-Ayoub, El-Samahy, Kroh, & Rohn, 2011; Padilha et al., 2017).

**Tabela 4. Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de alguns flavonoides em frutas e vegetais frescos.**

	Quercetina	Catequina	Epicatequina	Cianidina-hexose
Amora	42,0 ± 9,0	7,2 ± 0,1	180,8 ± 10,9	852,1 ± 105,8
Ameixa	5,4 ± 1,0	46,0 ± 11,3	22,2 ± 2,2	82,9 ± 12,0
Araçá Amarelo	4,4 ± 1,0	n.d	720,5 ± 26,6	n.d
Araçá Vermelho	3,4 ± 0,6	n.d	263,9 ± 21,3	354,7 ± 45,1
Banana	12,9 ± 0,1	13,4 ± 4,4	2,0 ± 0,3	n.d
Maçã	1,3 ± 0,1	12,2 ± 0,8	61,1 ± 3,7	n.d
Morango	0,9 ± 0,1	63,6 ± 5,5	0,2 ± 0,0	5,0 ± 0,1
Pêra	4,3 ± 0,0	2,8 ± 0,4	75,4 ± 12,0	12,2 ± 0,7
Pêssego	9,9 ± 0,5	23,3 ± 5,7	n.d	1,4 ± 0,1
Azeitona preta	40,7 ± 16,9	2,3 ± 0,0	n.d	106,2 ± 23,6
Cebola Roxa	13,1 ± 1,5	n.d	n.d	15,0 ± 23,6
Ervilha	n.d	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	n.d
Feijão	63,0 ± 6,4	162,3 ± 9,7	375 ± 13,7	1,3 ± 0,3

n.d = não detectado

**Fonte:** adaptado de Arts et al., 2000; Crozier et al., 1997; Dalla Nora et al., 2014; Harnly et al., 2006; Kim et al., 2003; Medina et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014; Vanzani et al., 2005; Pascual-Teresa et al., 2000; Rebello et al., 2014; Mikulic-petkovsek et al., 2012; Kolniak-ostek, 2016; Scordino et al., 2012; Rahmanian et al., 2015.



**Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides.**

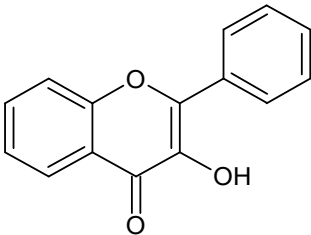
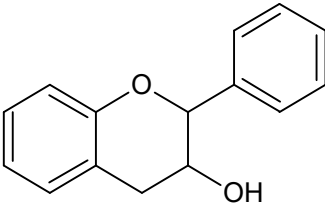
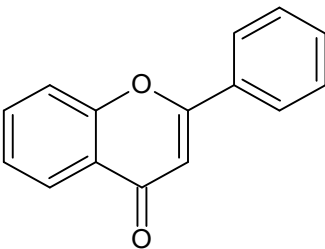
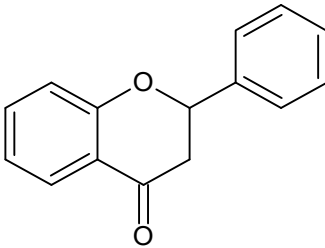
Fonte: própria autora

Hidroxilas e metoxilas também estão presentes em diferentes posições nos anéis A e B, o que propicia uma grande variedade de moléculas em cada uma dessas classes dos flavonoides (**Tabela 5**). O anel B é tipicamente hidroxilado podendo, também, ter éteres metílicos como substituintes. Além disso, os flavonoides podem estar ligados a açúcares, como ramnose, rutinose e glicose (Vermerris & Nicholson, 2006).

Os flavonóis são comuns em angiospermas (arroz, milho, trigo, feijão, entre outros) e muito característicos de cebola e alho. O anel C dos flavonóis contém um grupo cetona e tem uma ligação carbono-carbono insaturada. Os flavonóis mais amplamente distribuídas na natureza incluem quercetina, rutina, kaempferol e miricetina. As flavonas apresentam estrutura semelhante aos flavonóis, porém sem a oxigenação no C-3. Aipo, salsa e ervas são boas fontes de flavonas, como a apigenina e luteolina (Moussa-Ayoub et al., 2011).

As antocianidinas são flavonoides estruturalmente relacionados com a flavona. São pigmentos encontrados nas plantas, sendo que sua cor é determinada pelo pH da seiva. O azul e o vermelho de determinadas flores e frutos podem ser devidos ao mesmo glicosídeo, em pH diferente. As antocianinas, derivadas das antocianidinas, estão na forma de cátion flavílium e são ligadas a açúcares nas matrizes vegetais. Romãs, ameixas, uvas tintas e, conseqüentemente, o vinho tinto são fontes de antocianidinas (Sharma et al., 2016).

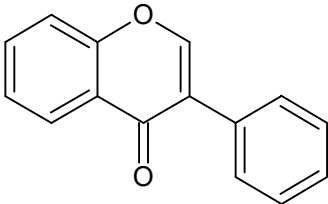
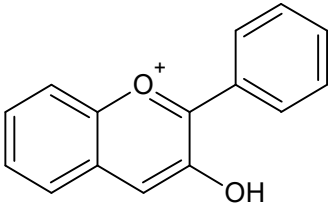
**Tabela 5. Estrutura química das diferentes classes dos flavonoides.**

Flavonoide	Substituição	Exemplos
<p data-bbox="379 398 504 427"><b>Flavonóis</b></p> 	<p data-bbox="842 450 1031 479">3,5,7,3',4' – OH</p> <p data-bbox="778 600 1094 629">5,7,3',4' – OH; 3 – rutinose</p>	<p data-bbox="1273 450 1406 479">Quercetina</p> <p data-bbox="1297 600 1378 629">Rutina</p>
<p data-bbox="379 808 504 837"><b>Flavanóis</b></p> 	<p data-bbox="842 815 1031 844">3,5,7,3',4' – OH</p> <p data-bbox="842 891 1031 920">3,5,7,3',4' – OH</p> <p data-bbox="746 1041 1126 1070">5,7,3',4' – OH; 3 – O-glicosídeo</p>	<p data-bbox="1273 815 1401 844">Catequina</p> <p data-bbox="1257 891 1417 920">Epicatequina</p> <p data-bbox="1241 1025 1433 1088">Catequina 3-O-glicosídeo</p>
<p data-bbox="379 1189 504 1218"><b>Flavonas</b></p> 	<p data-bbox="914 1323 1054 1352">5,7,4' – OH</p>	<p data-bbox="1273 1323 1401 1352">Apigenina</p>
<p data-bbox="352 1585 504 1615"><b>Flavanonas</b></p> 	<p data-bbox="754 1615 1091 1644">5,4' – OH; 7- rhamnoglucose</p> <p data-bbox="826 1688 1019 1718">3,5,7,3',4' – OH</p>	<p data-bbox="1262 1615 1382 1644">Naringina</p> <p data-bbox="1267 1688 1374 1718">Taxifolin</p>

(continua)



(continuação)

Flavonoide	Substituição	Exemplos
<p><b>Isoflavonas</b></p> 	5,7,4' – OH	Genisteína
<p><b>Antocianidinas</b></p> 	3,5,7,3',4' – OH	Cianidina

Fonte: própria autora

Os flavanóis formam a subclasse de flavonoides mais complexa abrangendo desde simples monômeros (catequina, epicatequina, epigallocatequina) até estruturas complexas incluindo os oligômeros e polímeros de até 50 unidades denominados proantocianidinas. Esses compostos são encontrados em chás, cacau, uvas e vinho tinto (Díaz-de-Cerio et al., 2017).

As flavanonas são caracterizadas pela ausência de ligação dupla no anel C e apresentam um centro quiral no C-2. As principais flavanonas encontrados em plantas são a naringina, taxifolina e hesperedina, comumente encontradas em frutas cítricas. As isoflavonas possuem o anel B ligado ao C 3 ao invés C 2. As isoflavonas são encontradas quase exclusivamente em leguminosas, sendo a soja amplamente estudada e conhecida como fonte de isoflavonas. A daidzeína e a genisteína são as principais representantes dessa classe (Rodríguez-Mateos et al., 2014).

### 3.1.2. Compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis

Grande parte dos estudos sobre compostos fenólicos se concentra nos compostos fenólicos extraídos de alimentos vegetais com solventes orgânicos ou mistura de água e solventes orgânicos. No entanto, uma parte considerável dos compostos fenólicos não é extraída pela aplicação de extração direta com solventes orgânicos e, portanto, é ignorada. Estudos recentes demonstraram que estes compostos fenólicos não extraíveis são uma parte importante da dieta total e que exibem uma atividade biológica significativa (Durazzo, 2018; Pérez-Ramírez et al., 2018).

Os compostos fenólicos extraíveis (CFE) são aqueles que, por definição, são extraídos da matriz pela aplicação direta de solventes orgânicos-aquosos. Na sua maioria, são moléculas de baixa massa molecular agrupados em diversas classes e subclasses (descritas previamente no item 3.1.1). Por outro lado, os compostos fenólicos não extraíveis (CFNE) permanecem nos resíduos das extrações prévias e somente são liberados por hidrólise química ou enzimática. Os compostos não extraíveis podem ser polifenóis (proantocianidinas ou ligados a polissacarídeos) ou compostos fenólicos de baixa massa molecular ligados a matriz (ácidos fenólicos) (Durazzo, 2018).

A extração de compostos fenólicos é afetada por fatores como solvente utilizado, tempo e temperatura assim como pela matriz da qual se deseja extraí-los. Para os ligados, a hidrólise deve levar em conta o tipo de ligação dos compostos alvo com a matriz. Moléculas de alta massa molecular ou fracamente ligadas à matriz vegetal são chamadas de CFNE classe I, enquanto que os compostos ligados fortemente aos diferentes constituintes do tecido vegetal como pectina e proteínas estruturais são denominados CFNE classe II (Pérez-Jiménez & Torres, 2011).

Devido a sua natureza complexa, a extração dos CFNE deve seguir duas etapas. Primeiramente, a matriz é submetida a uma extração exaustiva com solvente (água e solventes orgânicos) para a retirada total dos compostos fenólicos extraíveis e de outros compostos orgânicos solúveis. O resíduo da amostra deve passar,

então, por hidrólise química ou enzimática para liberação dos CFNE (Pérez-Jiménez et al., 2013).

A hidrólise enzimática é realizada através da aplicação de uma mistura de enzimas, tais como celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e glucanases. A hidrólise por reação enzimática tem seu efeito dependente da ligação do composto à matriz e da enzima aplicada, além disso, é influenciada pelo tamanho de partícula da amostra e pelo solvente utilizado após a hidrólise. Como desvantagem, esse método tem custo elevado (Meyer et al., 1998; Moussa-Ayoub et al., 2011)

A hidrólise química, por sua vez, pode ser ácida ou alcalina. Na hidrólise alcalina acontece a quebra da ligação éster do composto fenólico ao tecido vegetal causando a liberação do composto fenólico da cadeia de polissacarídeo. As bases mais utilizadas para o tratamento alcalino são: hidróxido de sódio, hidróxido de amônio e hidróxido de cálcio. Infelizmente, o uso da hidrólise alcalina pode causar degradação de alguns compostos fenólicos. Alguns estudos relataram perdas de até 67% de ácido cafeico em sementes oleaginosas que sofreram tratamento alcalino (Krygier et al., 1982; Verma et al., 2009).

Para a hidrólise ácida são utilizados ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico. Neste tratamento ácido, ocorre a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e hemicelulose, além de solubilizar os açúcares. Neste método, o binômio tempo e temperatura é essencial, já que estudos reportaram perdas de flavonóis em tratamentos a 90 °C por uma hora. Metanol acidificado com HCl tem demonstrado bons resultados na extração dos compostos fenólicos ligados, sendo um método acessível e rápido (Arranz & Calixto, 2010; Moussa-Ayoub et al., 2011).

### 3.1.3. Efeitos benéficos à saúde atribuídos aos CFE e CFNE

Algumas doenças crônico-degenerativas, como problemas cardiovasculares, diabetes do tipo 2, câncer e doenças neurodegenerativas possuem sua etiologia

associada ao estresse oxidativo e nitrosativo. Um grande número de trabalhos indica que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos pode reduzir o risco dessas doenças (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Os mecanismos envolvidos ainda são objeto de estudos, porém, um dos mais citados atribui aos CF a capacidade direta de auxiliar o organismo na desativação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Trabalhos recentes têm indicado que a microbiota intestinal tem um papel importante na liberação dos compostos fenólicos e de seus metabólitos no organismo e, ainda, que os próprios compostos fenólicos afetam diretamente na formação da microbiota intestinal (González-Sarrías et al., 2017; Tomás-Barberán et al., 2017).

Os compostos fenólicos são conhecidos pelas suas propriedades relacionadas à saúde, como efeitos anti-inflamatórios e hipotensivos. Esses efeitos devem-se a diferentes processos como a interação da expressão gênica com a microbiota intestinal e também pela sua ação antioxidante (Rodríguez-Mateos et al., 2014). Os CFE tem sido largamente objeto de estudos epidemiológicos e clínicos, porém, somente nos últimos anos as contribuições dos CFNE tem sido consideradas (Pérez-Ramírez et al., 2018).

O efeito potencial da microbiota intestinal na saúde humana tem sido cada vez mais evidente. Desde o advento das técnicas de sequenciamento de genes e a bioinformática, a microbiota intestinal tem sido associada à obesidade, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, funções cerebrais entre outros. Isso resultou em diversas pesquisas que investigaram a microbiota intestinal e seu impacto no metabolismo humano sob condições diferentes (Kau et al., 2011; Tilg & Kaser, 2011).

Similarmente, alimentos ricos em compostos fenólicos foram testados quanto aos seus efeitos nos fatores de risco cardiovascular, inflamatório e em relação a funções cognitivas. Apesar do grande número de compostos fenólicos que compõe a alimentação humana, poucos são absorvidos no trato gastrointestinal superior. O restante alcança o cólon intacto onde estão sujeitos ao catabolismo pela microbiota intestinal (Jaganath et al., 2009).

Os produtos (ácidos fenólicos ou outros intermediários metabólicos estáveis) podem ser os principais agentes de ações benéficas ao organismo. Por exemplo, o metabólito ácido 3,4-di-hidroxifenilacético mostrou maiores efeitos *in vitro* em termos de capacidade antioxidante, anti-inflamatório e antiagregante plaquetário do que seus compostos precursores, a rutina e a quercetina (Monagas et al., 2009).

Uma evidência crescente indica que os compostos fenólicos moldam a diversidade e a abundância das bactérias no trato digestivo humano. Os mecanismos exatos dessas relações não são compreendidos e não são totalmente explorados, apesar de diversas pesquisas recentes. A combinação de alimentos e bebidas derivados de plantas em nossa dieta compõem misturas complexas de compostos fenólicos com múltiplas atividades aditivas ou sinérgicas entre seus componentes (Cardona et al., 2013).

A resposta dos indivíduos em pesquisas com ingestão de compostos fenólicos varia muito com diferenças no metabolismo de cada composto fenólico, o que pode ser atribuída a diferenças na composição da microbiota intestinal. A hipótese de que parte do impacto da microbiota intestinal no organismo do indivíduo poderia ser ditada pelo impacto dos CF sobre as bactérias do intestino (pré e pró-biótico) tem sido relatada. Além disso, o metabolismo dos componentes da matriz pelas bactérias intestinais (González-Sarrías et al., 2017).

Além disso, por estarem ligados ou “presos” à celulose e hemicelulose nas plantas, os CFNE são partes constituintes das fibras alimentares de frutas e vegetais. Os CFNE exercem efeitos significativos sobre as propriedades físico-químicas das fibras alimentares os quais influenciam suas propriedades fisiológicas. Estudos recentes têm explorado o efeito associado das fibras vegetais e dos CFNE a elas ligados já que, de acordo com a matriz, aproximadamente 50% do conteúdo de compostos fenólicos encontra-se ligado às fibras (Macagnan et al., 2018).

O conteúdo de compostos fenólicos nos alimentos tem sido amplamente subestimado nessas hipóteses, tendo em vista o teor de CFNE não computado. Pesquisas recentes demonstraram que os CFNE liberam moléculas de baixa massa molecular (ácidos fenólicos e seus derivados) no trato digestivo humano. Após

liberação da matriz ou despolimerização no intestino, eles são geralmente hidrolisados através de vias semelhantes aos CFE, levando a metabólitos similares (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015; Tomás-Barberán et al., 2017).

### 3.2. Métodos para Quantificação de compostos fenólicos

A compreensão da importância e dos mecanismos de ação dos CFE e CFNE no organismo humano depende essencialmente do conhecimento do perfil quali e quantitativo desses compostos presentes nos alimentos. Apesar de um grande número de técnicas analíticas para determinação de compostos fenólicos livres e não extraíveis serem encontrados na literatura, ainda não se têm um método padrão. Isso está diretamente relacionado à diversidade estrutural, complexidade da matriz e da interação desses compostos com outros componentes celulares (Chisté & Mercadante, 2012).

A análise de teor de fenólicos totais é normalmente realizada por métodos simples, como os espectrofotométricos. Quando se deseja uma certa seletividade, os métodos que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) oferecem uma melhor resposta. Porém, este método ainda deixa lacunas quanto à identificação dos compostos que somente têm sido resolvidas com o espectrômetro de massas (Bronsema et al., 2012).

#### 3.2.1. Método espectrofotométrico *Folin-Ciocalteu*

Devido a sua simplicidade e baixo custo, os métodos espectrofotométricos são os mais largamente utilizados para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. O método mais conhecido utiliza o reagente *Folin-Ciocalteu* que se trata de uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação VI, porém, na presença de

substâncias redutoras, como os compostos fenólicos, formam-se compostos que estão no estado de oxidação entre 5 e 6.

Para que esta reação ocorra, os compostos fenólicos devem estar na forma de fenolato, o que é conseguido pela utilização de um meio reacional contendo carbonato de sódio. Nessa condição os compostos fenólicos transferem elétrons para o reagente *Folin-Ciocalteu*, gerando óxidos azuis com absorção máxima a 765 nm (Singleton & Rossi, 1965), o que permite a determinação da concentração das substâncias redutoras..

Esse método apresenta uma grande limitação, pois o reagente *Folin-Ciocalteu* pode reagir, também, com outros compostos redutores presentes na matriz. Por exemplo, o ácido ascórbico e outros compostos orgânicos naturalmente presentes nos vegetais reagem facilmente com o *Folin-Ciocalteu* gerando, assim, resultados superestimados. Estudos relatam concentrações de compostos fenólicos até cinco vezes superiores às encontradas pelo método utilizando HPLC em amostras de frutas e vegetais (Escarpa & González, 2001).

Para melhorar a seletividade dessa análise pode-se realizar extração em fase sólida (SPE) nas amostras para purificação dos compostos fenólicos, porém, isso elevaria consideravelmente o custo da análise. Além disso, outra limitação deste método é o fato de gerar um resultado da concentração total de compostos fenólicos e, portanto, nenhuma informação sobre a concentração individual de cada composto (Atoui et al., 2005).

Deste modo, o método *Folin-Ciocalteu* é mais adequado como um indicativo da capacidade redutora da amostra analisada do que propriamente do teor de compostos fenólicos. Para quantificar os compostos fenólicos distinguindo-os por classes, métodos mais elaborados devem ser utilizados (Escarpa & González, 2001).

### 3.2.2. Método HPLC-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método dominante para separação e quantificação de CFE e CFNE. Colunas cromatográficas de fase reversa (baixa polaridade; ex: octadecilsilano C18) são as mais utilizadas mesmo que sua habilidade seja limitada quando se trata de polifenóis de alta massa molecular. Em uma coluna de C18, a separação de grandes polímeros é feita com boa resolução até os tetrâmeros, o que não afeta a identificação e quantificação dos compostos fenólicos ligados, uma vez que a hidrólise realizada na extração transforma polímeros em ácidos fenólicos. Geralmente as colunas C18 utilizadas possuem tamanho de partícula entre 4  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  (Sun & Spranger, 2005).

A separação dos analitos ocorre utilizando-se gradiente de eluição de água ultrapura e acetonitrila ou metanol, ambos acidificados com ácido um ácido orgânico fraco, como o fórmico, fosfórico ou acético. Normalmente o tempo de corrida nessas condições é elevado (~60 min). Tem crescido o número de trabalhos determinando compostos bioativos por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) como forma de diminuir o tempo de análise desta técnica além de melhorar a eficiência de separação. A UPLC é caracterizada pela utilização de colunas cromatográficas com fases estacionárias com tamanho de partícula menores que 2  $\mu\text{m}$ , permitindo análises mais rápidas e eficientes (Pereira et al., 2010; Liu et al., 2017)

Os compostos fenólicos possuem múltiplas ligações duplas conjugadas e, assim, possuem absorção no espectro UV-vis. Para uma ampla análise dos compostos fenólicos de diversas classes, o detector de arranjo de diodos (DAD) permite uma varredura completa da absorção dos compostos na região do UV-vis, sendo a faixa mais utilizada de 200 a 800 nm (Motilva et al., 2013).

Ácidos fenólicos possuem dois picos de máxima absorção (em 210-220 nm e 278 nm), desta forma, a maioria dos estudos utilizam o comprimento 280 nm para quantificação dos ácidos fenólicos. A absorção molar dos ácidos fenólicos varia com a sua estrutura molecular, por exemplo, polímeros de procianidina tem uma absorção molar mais alta que polímeros de prodelfinidina. Na sua maioria, os



compostos fenólicos não extraíveis são compostos por derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico. O ácido hidroxibenzoico tem absorção máxima por volta de 280 nm enquanto o segundo tem absorção máxima em 320 nm (Rohr et al., 2000).

Apesar dessas diferenças, diversos compostos de mesmo máximo de absorção coeluem (possuem o mesmo tempo de retenção), fazendo com que a quantificação desses compostos seja dificultada. A complexidade de composição de uma matriz vegetal impossibilita a quantificação dos compostos similares somente pelo detector DAD (Mezni et al., 2018).

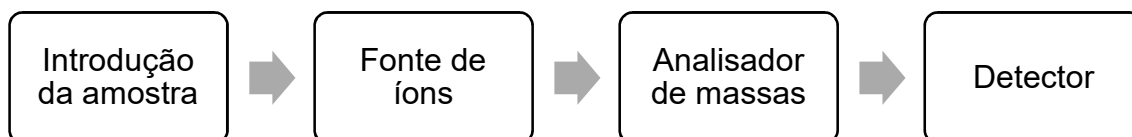
Além disso, para identificação de compostos fenólicos devidamente separados, se faz necessário o uso de padrões analíticos comerciais para fins de comparação e confirmação. Isso onera muito o custo da análise uma vez que uma amostra pode conter centenas de compostos fenólicos e não seria viável a aquisição de padrões analíticos para cada composto encontrado. O método HPLC-DAD é, também, pouco sensível apresentando elevados limites de detecção e quantificação, não sendo ideal para identificação e quantificação de compostos fenólicos livres e não-extraíveis (Mesquita & Monteiro, 2018).

### 3.2.3. Espectrometria de massas

A utilização da espectrometria de massas permite a obtenção de informações de grande relevância para a determinação dos CFE e CFNE. A seletividade intrínseca da técnica revolucionou grandes áreas da química analítica onde traços de analitos orgânicos puderam ser detectados em matrizes complexas. A técnica permite a identificação e quantificação dos compostos, pois fornece informação estrutural dos analitos, mesmo sem a comparação com padrões analíticos (Kruve et al., 2015).

O espectrômetro de massas mede a concentração de moléculas ionizadas geradas na amostra. Para isso, os compostos são ionizados através de uma fonte

de ionização. Os íons gerados passam por um analisador de massas onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) seguindo, então, para um detector (**Figura 3**). A introdução da amostra e ionização se dá à pressão atmosférica enquanto o analisador de massas e o detector operam no vácuo (Gross, 2011).



**Figura 3. Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.**

Fonte: própria autora

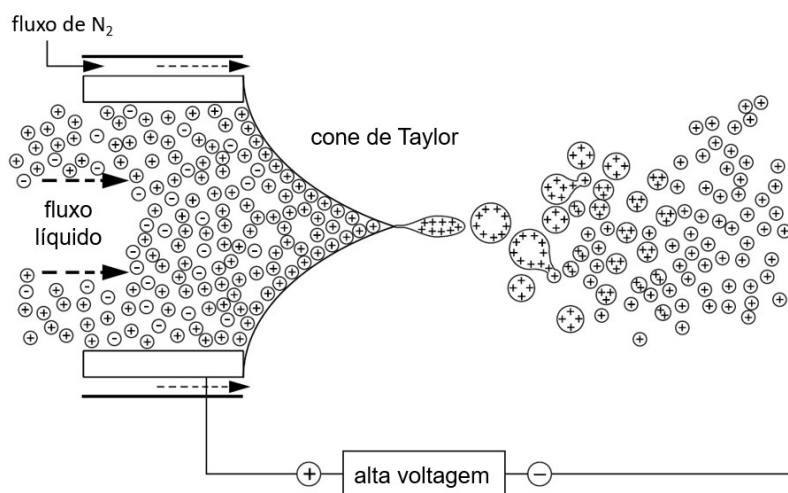
A introdução da amostra no equipamento pode se dar de forma direta ou conectada em série após a saída do equipamento HPLC-DAD, formando o sistema conhecido como HPLC-DAD-MS. Esse sistema é complexo e possui um grande número de parâmetros de ionização e detecção que devem ser otimizados a fim de obter os resultados esperados (La Barbera et al., 2017).

#### 3.2.3.1. Fontes de Ionização

O advento da ionização à pressão atmosférica (API) tornou possível a geração de íons em fase gasosa com pouca ou nenhuma decomposição do analito, sendo ele de baixa ou alta massa molecular. As fontes do tipo API permitem a formação dos íons em fase gasosa diretamente de um fluxo líquido, perfeito para o uso acoplado a HPLC-DAD. As fontes API mais comumente usadas são: *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI) (Kruve et al., 2015).

Dentre os métodos de ionização, as fontes ESI são muito versáteis e por isso as mais aplicadas para os compostos fenólicos livres e ligados. O mecanismo de ionização dessa fonte se dá pela injeção da amostra através de uma agulha de

nebulização onde ela é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica. Um fino *spray* (aerosol) se forma (cone de Taylor) na presença de um alto campo elétrico de alta voltagem (**Figura 4**). O contra-íon é oxidado (ou reduzido) e formam-se gotas com excesso de carga positiva ou negativa. O solvente evapora com o auxílio do gás secante ( $N_2$ ). O volume das gotas é reduzido e gotas se subdividem devido à alta densidade de cargas. Isso causa a dessorção dos íons na fase gasosa, sendo então conduzidos até o analisador de massas (Gross, 2011).



**Figura 4. Mecanismo de ionização da fonte ESI.**

Fonte: adaptado de Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2008.

A desvantagem dessa fonte é sua susceptibilidade à supressão ou incremento iônico, gerando uma mudança de sensibilidade. Trata-se de um efeito da matriz muito comum, onde há a competição de componentes da matriz que coeluem com os compostos a serem analisados. Esse efeito pode resultar em uma perda de até mais de 90% de queda de sinal ou até mesmo o aumento de sinal gerando um resultado superestimado para o analito em questão (Kruve et al., 2015).

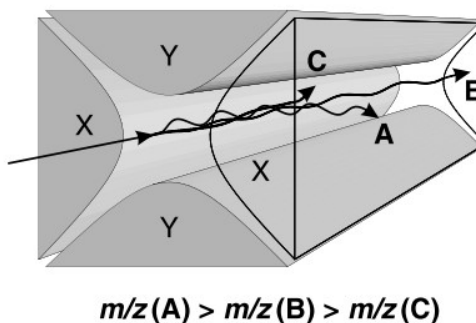
Os mecanismos que envolvem a supressão iônica são muito complexos e ainda não foram totalmente elucidados. A supressão iônica deve ser reduzida ou eliminada nas análises e, quando não for possível, devem ser levadas em conta no cálculo dos resultados. A preparação adequada da amostra, utilização de fonte de ionização e o modo de ionização adequados e melhorias na separação

cromatográfica são parâmetros que influenciam diretamente o efeito da supressão iônica na amostra analisada (Trufelli et al., 2011).

### 3.2.3.2. Analisadores de massas

Os analisadores de relação massa/carga são os responsáveis por separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com a sua razão  $m/z$  para posterior detecção. Os analisadores mais comuns são o quadrupolo (Q), armadilha de íons (IT), tempo de voo (ToF) e quadrupolo – tempo de voo (Q-ToF) que é uma versão híbrida dos analisadores quadrupolo e tempo de voo como forma de obter uma melhor resolução (Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2009).

O analisador de massas do tipo quadrupolo (Q) é formado por quatro hastes posicionadas em paralelo e ligadas eletricamente em pares, com sinais opostos e amplitudes iguais. A combinação de corrente direta e alternada faz com que somente íons com uma faixa de razão  $m/z$  restrita consiga atravessá-lo (**Figura 5**). O par de hastes na direção x atua como um filtro de modo que o íon C (com baixa  $m/z$ ) é retido, e o par de hastes na direção y age como um filtro impedindo o íon A (com alta  $m/z$ ). Somente o íon B com  $m/z$  na faixa estável é permitido através do filtro de massa quadrupolo para posterior detecção (Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2009).



**Figura 5. Analisador de massas do tipo quadrupolo (Q).**

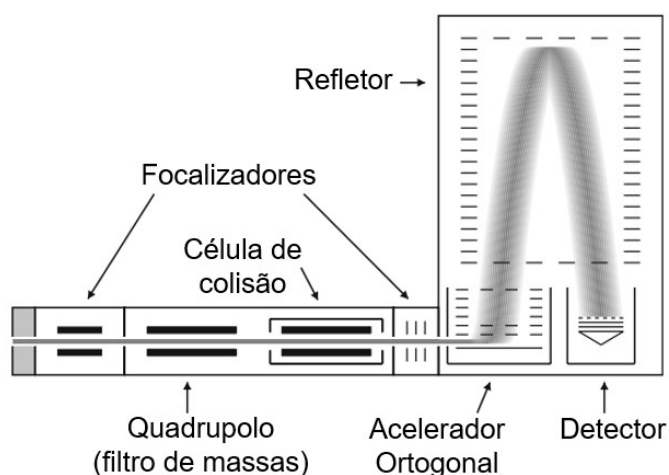
Fonte: Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2008.

O quadrupolo (Q) é caracterizado por ser simples, de baixa resolução (apenas 1 Dalton), barato, eficiente e robusto. Ainda, este tipo de analisador permite o acoplamento com outros, por exemplo, o triplo quadrupolo, onde o primeiro quadrupolo filtra a massa do precursor, o segundo quadrupolo age como uma célula de colisão – onde os íons serão fragmentados – e o terceiro filtra a massa do fragmento (Gross, 2011).

O analisador de massas por armadilha de íons (IT) possui lentes na entrada que se abrem permitindo o ingresso de íons aprisionando-os pela mudança de voltagem das lentes que bloqueia a entrada. Os íons aprisionados são resfriados com gás Hélio e uma varredura de radiofrequência acontece detectando íons que apresentam órbita instável. Este analisador de massas, apesar de possuir baixa resolução, permite a realização de vários experimentos de fragmentação tornando-o ideal para identificação, porém não é aplicável para análises quantitativas (Hoffmann, 2005).

O analisador por tempo de voo (ToF) tem como princípio separar moléculas de acordo com a diferença de tempo de chegada ao detector após serem aceleradas por uma voltagem constante e um campo elétrico conhecido. Quando os íons saem da região de aceleração, eles possuem energia cinética igual, porém, velocidades diferentes de acordo com sua relação  $m/z$  que, conseqüentemente, resultarão em tempos distintos, possibilitando a separação. Quanto maior a  $m/z$ , maior o tempo para chegar ao detector, e, a partir dessa relação juntamente com parâmetros experimentais conhecidos, pode-se identificar o íon. A análise de massas pelo ToF permite uma alta resolução, uma boa exatidão de massa medida e permite a realização de uma análise discriminatória dos analitos (Kruve et al., 2015).

O analisador de massas quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), une as vantagens do quadrupolo e do tempo de voo. O quadrupolo age como um filtro de massas, restringindo as faixas de  $m/z$  e mantendo os íons em uma órbita estável enquanto o analisador por tempo de voo é capaz de separar estes íons (**Figura 6**).



**Figura 6. Esquema de um analisador de massas Q-ToF.**

Fonte: adaptado de Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2008.

### 3.3. Araçá amarelo e vermelho

O araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), pertencente da família *Myrtaceae*, é encontrado em estado nativo no Brasil desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. O fruto do araçá pode ter casca na cor amarela ou vermelha, sugerindo que a espécie possa ser dividida em dois genótipos (**Figura 7**). Os dois genótipos possuem polpa clara, doce e levemente ácida. A fruta pode ser consumida *in natura* ou processada (doces, geleias e sucos) e tem alto potencial para o setor alimentício devido ao seu alto teor de compostos bioativos com capacidade antioxidante (Fetter et al., 2010; Patel, 2012).

O araçá tem ganhado importância para a indústria farmacêutica devido ao seu alto teor de vitamina C até sete vezes maior que as frutas cítricas e sua alta capacidade antioxidante. Para o agronegócio, a vantagem do cultivo de araçá está na sua precocidade de produção e sua regular resistência às doenças e pragas, tornando-se uma promissora opção de cultivo, especialmente para os pequenos produtores rurais (Souza et al., 2018).

Estudos têm reportado um maior teor total de compostos fenólicos em relação ao fruto fresco em araçá vermelho (501,33 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / 100 g de amostra) do que em amarelo (292,03 mg de GAE / 100 g) cultivados em Pelotas (RS-Brasil) (Biegelmeyer et al., 2011). No entanto, Luximon-Ramma e colaboradores (2003) reportaram conteúdo total de compostos fenólicos similares entre os genótipos amarelo e vermelho (5372 mg e 5638 mg GAE / 100 g) para frutos cultivados em Maurícia (país da África). A maior quantidade de compostos fenólicos na variedade vermelha pode ser explicada pela presença de cianidinas que fornece a cor vermelha ao fruto (Dalla Nora et al., 2014; Vinholes et al., 2017).



**Figura 7. Araçá amarelo e vermelho**

Fonte: Safari Garden, 2018.

O teor total de compostos fenólicos varia consideravelmente entre diferentes estudos. Esta diferença pode ser devido à região de cultivo, condições climáticas e ano agrícola dos estudos. Além disso, o método de extração e de quantificação utilizados também podem ser responsáveis pelas diferenças observadas (Pereira et al., 2018). A quantificação nesses estudos foi realizada pelos métodos *Folin-Ciocalteu* e HPLC-DAD com comparação com padrão analítico (Dalla Nora et al., 2014; Medina et al., 2011; Silva et al., 2014; Ribeiro et al., 2014).

Diferentes perfis de compostos fenólicos foram encontrados para o araçá amarelo e vermelho na literatura atual (**Tabela 6**). Os compostos fenólicos mais

representativos no genótipo amarelo foram: ácido gálico e seus derivados e ácido elágico e seus derivados. A polpa do araçá amarelo apresentou maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparada com a casca da fruta (Martínez-Valverde, Periago, Chesson, Provan, et al., 2002; Ribeiro et al., 2014). O genótipo vermelho tem como compostos majoritários a epicatequina e ácido gálico de um total de 9 compostos relatados (Dalla Nora et al., 2014; Medina et al., 2011).

Embora os genótipos de araçá vermelho e amarelo possuam alguns compostos fenólicos comuns, faltam estudos comparando o perfil fenólico individual dos dois genótipos de araçá. Além disso, todos os trabalhos realizados com araçá amarelo e vermelho utilizam somente a extração dos CFE através de métodos simples utilizando solventes aquosos e orgânicos. Não se tem conhecimento do perfil de CFNE do araçá amarelo e vermelho.

**Tabela 6. Compostos fenólicos extraíveis (CFE) identificados em araçá amarelo e vermelho na literatura.**

Nº	Composto fenólico	Araçá amarelo	Araçá vermelho
1	Epicatequina	(Medina et al., 2011)	(Medina et al., 2011)
2	Epicatequina-epicatequina	(Silva et al., 2014)	-
3	Galato de epicatequina	(Ribeiro et al., 2014)	-
4	Ácido cumárico	(Medina et al., 2011)	(Medina et al., 2011)
5	Ácido ferúlico	(Medina et al., 2011)	(Medina et al., 2011)
6	Miricetina	(Medina et al., 2011)	(Medina et al., 2011)
7	Cianidina glicosídeo	-	(Dalla Nora et al., 2014)
8	Malvidina glicosídeo	-	(Dalla Nora et al., 2014)
9	Cianidina	-	(Dalla Nora et al., 2014)
10	Ácido clorogênico	(Ribeiro et al., 2014)	-
11	Ácido clorogênico hexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
12	Ácido gálico	(Medina et al., 2011) (Silva et al., 2014)	(Medina et al., 2011)
13	Galoil hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
14	Digaloil hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
15	Ácido trigaloilquínico	(Ribeiro et al., 2014)	-



(continuação)

Nº	Composto fenólico	Araçá amarelo	Araçá vermelho
16	Ácido elágico	(Ribeiro et al., 2014)	-
17	Ácido elágico hexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
18	Ácido elágico pentosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
19	Ácido elágico deoxihexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
20	Elagitanino	(Ribeiro et al., 2014)	-
21	HHDP hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
22	Di-HHDP hexosídeo I	(Silva et al., 2014)	-
23	Di-HHDP hexosídeo II	(Silva et al., 2014)	-
24	HHDP digaloil hexosídeo I	(Silva et al., 2014)	-
25	HHDP digaloil hexosídeo II	(Silva et al., 2014)	-
26	Quercetina	(Medina et al., 2011)	(Medina et al., 2011)
27	Quercetina glicosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
28	Quercetina hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
29	Quercetina pentosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
30	Quercetina deoxihexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
31	Quercetina cumaroil deoxihexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
32	Ácido metil-elágico hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
33	Ácido metil-elágico pentosídeo	(Silva et al., 2014)	-
34	Ácido metil-elágico deoxihexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
35	Ácido metil-elágico acetil-deoxihexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
36	Cinamoil-galoil hexosídeo	(Ribeiro et al., 2014)	-
37	Ácido vanílico	(Silva et al., 2014)	-
38	Taxifolin hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-
39	Eriodictriol hexosídeo	(Silva et al., 2014)	-

Fonte: própria autora.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e padrões

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados: acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), metanol P.A. (Neon), ácido fórmico P.A. (Neon), ácido clorídrico 6M (Neon), carbonato de sódio anidro (Dinâmica) e *Folin-Ciocalteu* (Fator 1). A água ultrapura (Milli-Q) foi purificada por um sistema Millipore. As fases móveis foram filtradas em filtros de acetato de celulose 0,22 µm (Sartorius) e PTFE 0,22 µm (Sartorius). Para as amostras aquosas foram utilizados filtros de seringa do tipo acetato de celulose de 0,22 µm (Allcrom).

Um total de 17 padrões analíticos de compostos fenólicos (pureza 97-99%, Sigma-Aldrich) foram utilizados para a otimização e validação do método, nomeadamente: ácido elágico, ácido *p*-cumárico, quercetina, quercetina-3-glicosídeo, epigallocatequina, galato de epicatequina, resveratrol, kaempferol, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina, rutina, ácido clorogênico, epicatequina, ácido hidroxibenzoico e daidzeína.

Para construção das curvas analíticas utilizadas na quantificação foram utilizados oito representantes de classes dos compostos fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina, rutina, ácido clorogênico, epicatequina, ácido hidroxibenzoico) e a daidzeína como padrão interno. A escolha da daidzeína como padrão interno levou em consideração a ausência deste composto fenólico em frutas por ser característico de derivados de soja (Tomás-Barberán et al., 2017).

#### 4.1. Amostragem

As amostras de aração amarelo e vermelho foram doadas pela Embrapa Clima Temperado. Os arações foram produzidos nos Campos Experimentais da sede da

empresa, localizada no município de Pelotas – RS (coordenadas: 31°40'47”S e 52°26'24”W) a 60 metros de altitude. A classificação do clima da região é do tipo “Cfa” - clima temperado, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano e verões quentes (Mota et al., 1986). O cultivo não fez uso de irrigação ou de tratamentos fitossanitários como aplicação de pesticidas.

As amostras foram colhidas em ponto de maturação maduros e transportadas para o laboratório a  $5,0 \pm 1,0$  °C, onde foram liofilizadas e pulverizadas com gral e pistilo. A amostra em pó foi embalada a vácuo em embalagens plásticas em porções de 30 g e armazenadas a  $-18,0 \pm 0,5$  °C até o momento das análises.

#### 4.2.Extração de compostos fenólicos extraíveis (CFE) e não extraíveis (CFNE)

Os CFE foram extraídos baseado no método de Rodrigues e colaboradores (2013b) a partir da amostra do araçá amarelo ou vermelho liofilizado e moído (0,5 g) utilizando 5 mL de uma mistura metanol:água (8:2, v/v, acidificada com 0,35 % de ácido fórmico) através da agitação em vortex (USC-1400 - Unique) por 3 minutos. O extrato obtido foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi transferido para um balão de fundo chato. Esse procedimento foi repetido até a extração exaustiva dos CFE. A extração exaustiva foi avaliada pela reação dos sobrenadantes obtidos com o reagente *Folin-Ciocalteu*, sendo a não geração de produtos de coloração azul o indicativo de extração exaustiva dos CFE da amostra. Um total de 8 repetições foram necessárias para extrair os CFE dessa fração. Os extratos obtidos foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo para a remoção do metanol. O extrato aquoso de CFE obtido foi utilizado para a análise por LC-DAD-ESI-MS/MS e para a determinação da capacidade antioxidante dessa fração.

Os CFNE foram obtidos a partir do tratamento do resíduo sólido (*pellet*), gerado na extração dos CFE, com solvente contendo ácido forte. O *pellet* foi submetido a hidrólise utilizando 20 mL de metanol acidificado com HCl (15 %, v/v) durante 15 minutos em banho-maria à 90 °C. O extrato obtido foi reservado por 10

minutos a temperatura ambiente e, então, centrifugado a 3000 g por 5 minutos (4 °C). O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo chato e o procedimento repetido. Após a segunda hidrólise, o *pellet* foi extraído com metanol por oito vezes para garantir a extração exaustiva dos CFNE. Os extratos foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo para remoção do metanol. O extrato aquoso de CFNE obtido foi utilizado para a análise por LC-DAD-ESI-MS/MS e para a determinação da capacidade antioxidante dessa fração.

Todas as frações (CFE e CFNE) dos araçás foram filtradas em filtros de acetato de celulose (0,22 µm) antes da análise por LC-DAD-ESI-MS/MS. Os extratos de CFE e CFNE de cada araçá foram obtidos em triplicata (n=3).

#### 4.3. Determinação de fenólicos totais por *Folin-Ciocalteu*

O método foi executado de acordo com Singleton & Rossi, 1965. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com 9 mL de água e 1 mL do reagente *Folin-Ciocalteu*, agitado manualmente e deixado em repouso por 4 min. Um total de 10 mL da solução de água e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) foi adicionado ao balão e o volume foi aferido com água.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Espectralle 8452A) a 765 nm. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir de uma curva analítica construída com ácido gálico nas concentrações de 12,5 a 300 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em µg de equivalente a ácido gálico (EAG). g<sup>-1</sup> de amostra liofilizada.

#### 4.4. Análise por LC-DAD-ESI-MS/MS

A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (LC) da Shimadzu (Quioto, Japão), contendo os seguintes módulos: duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A, injetor automático SIL20AHT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (DAD) e forno de coluna CTO-20A. O LC foi conectado em série a um espectrômetro de massas (MS) da Bruker Daltonics (micrOTOF-Q III, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador de massas quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

Os compostos fenólicos foram separados no LC utilizando como referência o método descrito previamente por Rodrigues et al. (2013). Com o objetivo de otimizar a separação cromatográfica dos compostos fenólicos, alguns experimentos foram conduzidos. Nesses experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura do forno (29 e 35 °C), tamanho de partícula da coluna C<sub>18</sub> (4 e 5 µm), solvente da fase móvel (acetonitrila e metanol) e quantidade de ácido fórmico (0,1, 0,5 e 1 %) na fase móvel. Para o tamanho de partícula da coluna C<sub>18</sub>, foram utilizadas duas colunas: coluna Phenomenex C18 de 4 µm (250 X 4,6 mm) e coluna Merck C18 de 5 µm (250 X 4,6 mm). A resolução (Rs) foi utilizado como parâmetro de separação entre os picos cromatográficos, sendo considerados separados os picos adjacentes com valor de Rs ≥ 1,5 (AOAC, Horwitz, 2012).

Após a separação dos compostos fenólicos no LC, o eluato da coluna foi dividido utilizando uma conexão em forma de “T” de forma que apenas 0,5 mL.min<sup>-1</sup> do fluxo seguiu para o MS. A fonte ESI foi operada nas seguintes condições: modos negativo e positivo de ionização, faixa de varredura (*scan range*) de *m/z* 50 a 1000, temperatura e fluxo do gás (N<sub>2</sub>) secante: 310 °C e 8 L.min<sup>-1</sup>, pressão do gás nebulizador: 4 bar. A voltagem do capilar (500 a 6000 Volts) e a energia de fragmentação (5 a 100 eV) na célula de colisão foram otimizadas. A intensidade do sinal (TIC - *total ion current*) e o erro de massa (ppm) (**equação 1**) foram utilizados como parâmetros de avaliação do método.

$$Em = \frac{mt - me}{mt} \times 10^6 \quad (1)$$

Onde:

$Em$  = erro de massa (ppm)

$mt$  = massa exata teórica

$me$  = massa acurada

Os compostos fenólicos foram identificados considerando os seguintes parâmetros: massa acurada, padrão de fragmentação, ordem de eluição em coluna  $C_{18}$  e características de absorção no UV-vis. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por padronização interna utilizando as curvas analíticas de 8 padrões analíticos de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina, rutina, ácido clorogênico, epicatequina, ácido hidroxibenzoico) e a daidzeína como padrão interno. As curvas analíticas foram construídas a partir da análise de nove concentrações na faixa de 0,1 a 6 mg.L<sup>-1</sup>. O método foi validado a partir da análise dos seguintes parâmetros de desempenho: linearidade ( $R^2$ ), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), repetibilidade, recuperação e efeito de matriz.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com a metodologia do ICH (2005). Este método calcula os limites com os resultados obtidos das curvas analíticas através da relação entre o erro padrão e a inclinação da curva, de acordo com as **equações 2 e 3**.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (3)$$

Onde:

$s$  = o erro-padrão da curva analítica

$b$  = inclinação da curva analítica

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação nos quais foram adicionados à amostra diferentes concentrações dos padrões de compostos fenólicos: baixo ( $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ), médio ( $3,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) e alto ( $5,5 \text{ mgL}^{-1}$ ). A recuperação foi realizada ( $n=3$ ) a partir da extração exaustiva de cada concentração adicionada. Esses resultados também foram utilizados para estimar a repetibilidade do método.

O efeito matriz foi determinado através da infusão pós-coluna de uma solução contendo 4 padrões analíticos (rutina, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico e ácido cafeico) na concentração de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  através de uma bomba de infusão (**Figura 8**). O critério para a escolha dos padrões foi a ausência deles na matriz. O efeito matriz foi analisado pela diferença entre o sinal absoluto dos padrões injetados simultaneamente com solvente puro e com a matriz, conforme a **equação 4**.

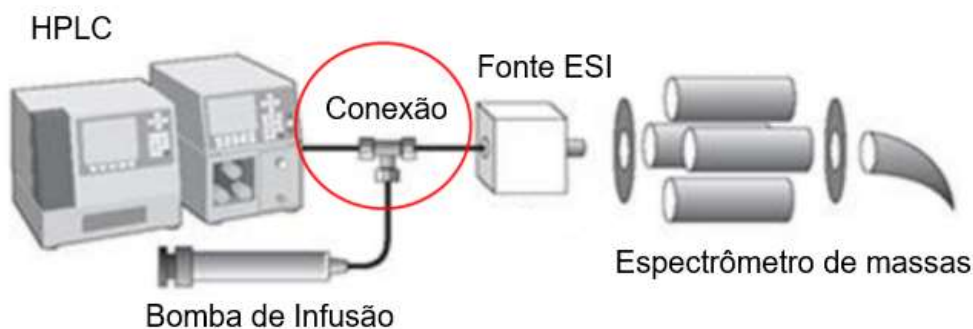
$$Sup = \frac{SP - M}{SP} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$Sup$  = supressão de sinal de cada composto fenólico (%)

$SP$  = sinal absoluto do padrão em solvente puro

$M$  = sinal absoluto do padrão em contato com a matriz



**Figura 8.**Esquema da análise do efeito de matriz no sistema HPLC-MS

Fonte: adaptado de Arsand (2015).

#### 4.5. Capacidade de desativação do radical peroxila (ROO•)

A capacidade de desativação de ROO• dos CFE e CFNE foi determinada de acordo com o método descrito por Ou et al. (2001). O sistema reacional monitora o efeito do extrato ou do padrão (Trolox) no decaimento da fluorescência resultante da oxidação induzida pelo ROO• da fluoresceína. O ROO• foi gerado através da decomposição de AAPH a 37 °C. A mistura reacional continha 25 µL dos extratos previamente diluídos em tampão fosfato de potássio 75 mM, e 150 µL da solução de trabalho de fluoresceína (81 nM). A placa foi incubada por 10 min a 37°C, sendo os últimos 3 min sob agitação constante. Na sequência foram adicionados 25 µL da solução de AAPH (152 mM). O monitoramento do decaimento da fluorescência foi realizado através de um leitor de fluorescência (Enspire 2300, Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, USA) a 37°C por 60 minutos. Foram usados comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente.

A capacidade de desativação de ROO• foi calculada de acordo com o método de Ou et al. (2001) e expressa em µmol equivalente ao Trolox por g de extrato liofilizado (µmol TE. g<sup>-1</sup> extrato).

#### 4.6. Análises estatísticas

As diferenças entre os valores da quantificação de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante entre as frações foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5 % ( $p \leq 0,05$ ). A comparação entre as médias foi realizada pela aplicação do teste de Tukey (Gomes, 1990). As análises foram realizadas através do programa Microsoft Excel®.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Experimentos de otimização e validação

Os experimentos para a otimização da separação cromatográfica foram realizados com 17 padrões de compostos fenólicos. A condição que possibilitou obter as melhores resoluções foi a seguinte: temperatura do forno em 29 °C, coluna C<sub>18</sub> de 4 µm e fase móvel de água e acetonitrila ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico (v/v). Em geral, nessa condição foi possível separar ( $R_s \geq 1,5$ ) todos os compostos fenólicos testados. Posteriormente, os mesmos 17 padrões foram utilizados para otimizar a voltagem da fonte ESI do espectrômetro de massas (MS). A condição ótima, avaliada considerando a maior intensidade de sinal e o menor erro de massa foi obtida na voltagem de 3,5 kV (apêndice C).

As condições otimizadas no LC e no MS permitiram a construção da **Tabela 7**, onde são apresentados os padrões de compostos fenólicos utilizados como referência na identificação dos compostos fenólicos presentes nos araçás amarelo e vermelho.

Tabela 7. Características cromatográficas e espectroscópicas dos padrões de compostos fenólicos obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b</sup>	[M-H] <sup>-</sup> teórico	[M-H] <sup>-</sup> na condição otimizada	Erro de massa (ppm) <sup>c</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>d</sup>
Ácido gálico	8,1	270	169,0143	169,0144	0,91	<b>124</b>
Epigallocatequina	16,3	207	305,0667	305,0658	2,95	221; 179; <b>125</b>
Ácido hidroxibenzóico	16,5	254	137,0244	137,0240	2,70	n.d
Ácido clorogênico	18,1	326	353,0878	353,0880	0,58	<b>191</b>
Catequina	18,4	279	289,0718	289,0727	3,09	221; 203; 151; 137; <b>123</b> ; 109
Ácido cafeico	19,6	323	179,0350	179,0352	1,30	<b>135</b>
Epicatequina	20,4	279	289,0718	289,0730	4,27	137; <b>123</b> ; 109
Galato de epigallocatequina	23,9	272	457,0776	457,0784	1,62	<b>289</b> ; 169; 125
Ácido <i>p</i> -cumárico	25,0	309	163,0401	163,0405	2,46	<b>119</b>
Rutina	25,1	354	609,1461	609,1449	2,01	<b>301</b> ; 271
Quercetina-3-glicosídeo	26,7	354	463,0882	463,0895	2,73	<b>179</b> ; 149; 135
Ácido ferúlico	27,0	322	193,0506	193,0502	2,36	n.d
Ácido elágico	27,9	270	300,9990	300,9995	1,83	<b>185</b> ; 157
Daidzeína	34,9	301	253,0506	253,0510	1,56	n.d
Resveratrol	35,7	305	227,0714	227,0719	2,41	<b>185</b> ; 143; 117
Quercetina	36,8	369	301,0354	301,0342	4,00	<b>179</b> ; 151; 121; 107
Kaempferol	41,6	365	285,0405	285,0408	1,17	257; 213; <b>151</b>

**Nota:** <sup>a</sup>Tempo de retenção em coluna Synergi C18 (4 μm) e gradiente de água e acetonitrila acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

<sup>b</sup>Comprimento de onda referente ao valor máximo de absorvância <sup>c</sup>Resultado obtido de acordo com a equação 1. <sup>d</sup>Intensidade relativa dos íons com maior abundância no MS<sup>2</sup> é mostrado em negrito. n.d.= não detectado.

O método de LC-MS utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos apresentou boa linearidade ( $R^2 > 0,98$ ) INMETRO (2003) na faixa de concentração estudada (0,01 a 6 mg.L<sup>-1</sup>) (apêndice C) e baixos valores limites de detecção e quantificação (**Tabela 8**).

**Tabela 8. Dados obtidos das curvas analíticas de padrões fenólicos obtidos por LC-ESI-MS**

Padrão	Inclinação	Intercepto	LD <sup>a</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ <sup>b</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> <sup>c</sup>
Ácido gálico	0,66	6,3 x10 <sup>3</sup>	0,30	0,90	0,98
Ácido ferúlico	0,17	1,0 x10 <sup>4</sup>	0,28	0,86	0,99
Ácido cafeico	1,62	7,6 x10 <sup>3</sup>	0,44	1,33	0,98
Ácido clorogênico	0,73	4,0 x10 <sup>4</sup>	0,25	0,76	0,99
Ácido hidroxibenzoico	0,18	2,2 x10 <sup>3</sup>	0,19	0,58	0,99
Catequina	0,70	3,1 x10 <sup>3</sup>	0,38	1,16	0,99
Epicatequina	0,65	5,0 x10 <sup>4</sup>	0,28	0,84	0,99
Rutina	0,63	4,4 x10 <sup>3</sup>	0,37	1,12	0,98

<sup>a</sup>LD: limite de detecção <sup>b</sup>LQ: limite de quantificação <sup>c</sup>R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

Em geral, o método apresenta recuperação aceitável (**Tabela 9**) em relação ao estipulado pela AOAC para a faixa de concentração utilizada (75 - 120%). Da mesma forma, a repetibilidade do método, estimada através do coeficiente de variação das triplicatas do ensaio de recuperação, está entre 1 a 8%, dentro dos limites estabelecidos pela AOAC (até 8%), indicando também valores aceitáveis (AOAC - Horwitz, 2012).

O efeito matriz é definido como o efeito combinado de todos os componentes da amostra além do analito que afetam a medição da quantidade (Guilbault & Hjelm, 1989). Os demais componentes da matriz podem coeluir com o analito e influenciar a ionização do mesmo na fonte, gerando um resultado de supressão ou de aumento do sinal no MS, influenciando o resultado de quantificação desse analito.

**Tabela 9. Recuperação e Repetibilidade do método analítico.**

Padrão	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Recuperação CV	Repetibilidade CV
		(%)	(%)
Ácido gálico	1,5	72 %	8 %
	3,5	76 %	2 %
	5,5	75 %	3 %
Catequina	1,5	95 %	1 %
	3,5	94 %	5 %
	5,5	97 %	2 %
Epicatequina	1,5	74 %	9 %
	3,5	71 %	5 %
	5,5	68 %	4 %
Rutina	1,5	74 %	2 %
	3,5	76 %	4 %
	5,5	79%	4 %

CV: coeficiente de variação

Neste trabalho, o efeito matriz foi analisado utilizando a matriz de CFE do araçá amarelo como representativa por ser a fração dessa fruta com maior número de dados na literatura. Os padrões dos compostos fenólicos rutina, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico e ácido cafeico, que não estão presentes na matriz, foram utilizados como marcadores. Esses padrões foram injetados por bomba de infusão (**Figura 8**) e tiveram seu sinal absoluto monitorado enquanto a matriz foi injetada por HPLC-MS. A **Figura 9** apresenta o efeito dos picos verificados na matriz sobre a intensidade do sinal dos padrões injetados ao longo da corrida cromatográfica.

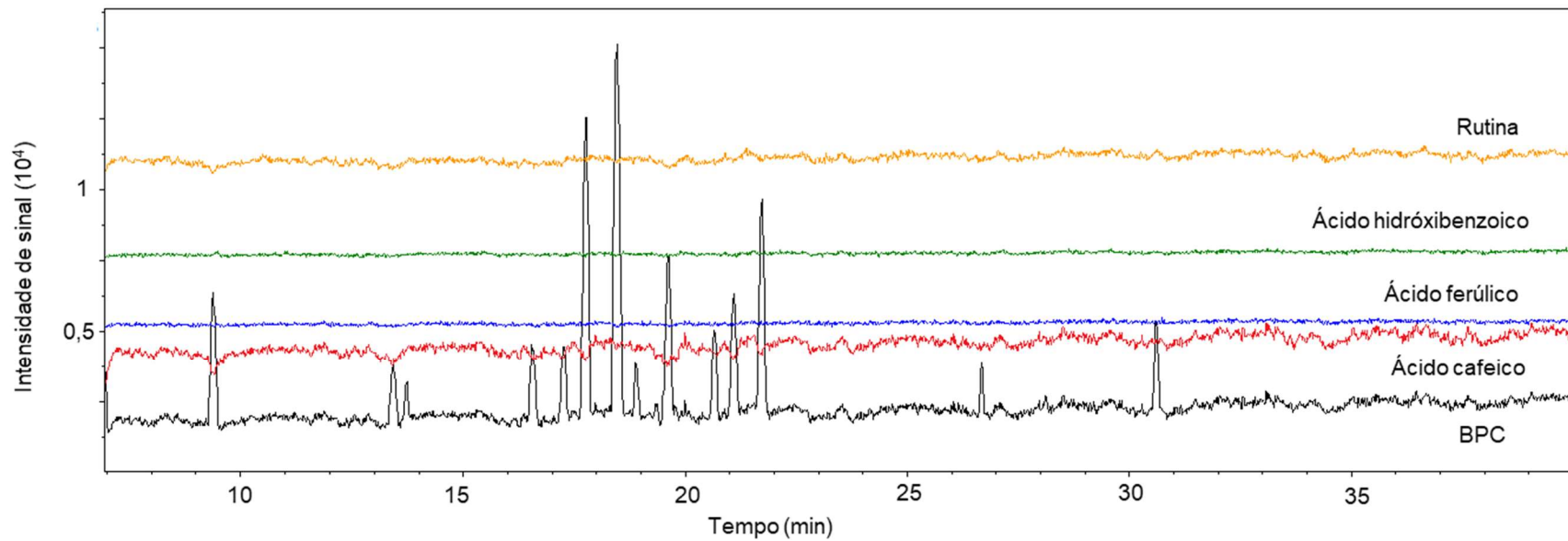
Além da análise visual, o valor do sinal absoluto de cada padrão foi comparado com o sinal absoluto do mesmo em solvente no mesmo tempo de retenção (equação 4). O sinal absoluto do ácido hidroxibenzoico e do ácido ferúlico foram pouco afetados pela matriz. Enquanto que a rutina, em 8,1 min teve supressão de 45% do sinal absoluto possivelmente ocasionado pela presença do ácido gálico neste tempo. O di-HHDP hexosídeo I, presente na matriz é a possível causa da queda de 36% do sinal absoluto da rutina no tempo de 9,8 min. Em 13,5 min houve supressão iônica de 36% devido a presença dos picos de vescalagina e

digaloil (epi)catequina I e no tempo de 19,6 min houve queda de 40% no sinal pela presença de galoil-bis-HHDP-glicosídeo I e HHDP hexosídeo.

Em relação ao ácido cafeico, muito semelhante à rutina, observou-se queda de 38 % no sinal absoluto do padrão em 8,1 min, tempo de retenção do ácido gálico. Em 13,5 min, tempo de retenção da vescalagina e do digaloil (epi)catequina I coincidiu com a supressão de 35 % e no tempo de 17,8 min houve queda de 35% no sinal pela presença do dímero de proantocianidina B I. Em 19,6 min houve 39% de supressão iônica devido a presença de galoil-bis-HHDP-glicosídeo I e HHDP hexosídeo.

Os valores de supressão não puderam ser utilizados para ajuste dos valores quantitativos pois os padrões testados não são encontrados na matriz. No caso de quantificação de compostos fenólicos em frutas, não se tem disponível uma matriz sem os analitos (matriz branca) para análise de efeito matriz. Esse resultado serviu de base qualitativa para estudo da interferência dos demais compostos encontrados na matriz em relação ao analito.

Quantitativamente, o efeito matriz foi analisado pela comparação entre as curvas construídas em solvente e na matriz para os quatro padrões de compostos fenólicos não encontrados na matriz. As variações entre os coeficientes angulares das curvas em solvente e na matriz foram muito similares, ou seja, a supressão iônica não interferiu de forma significativa na determinação desses analitos na matriz (apêndice C).



**Figura 9. Efeito matriz do araçá sobre os padrões de rutina, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico e ácido cafeico.**

**Nota:** BPC: Cromatograma dos picos base da matriz.

## 5.2. Identificação

### 5.2.1. Compostos fenólicos extraíveis (CFE)

Cinquenta e cinquenta e um compostos fenólicos foram identificados na fração de CFE do araçá amarelo e do vermelho, respectivamente (**Tabela 10, Figura 10**). Destaca-se que 7 desses compostos fenólicos não haviam sido identificados em araçás (Balisteiro et al., 2013; Biegelmeier et al., 2011; Chaves et al., 2018; Dalla Nora et al., 2014; Machado et al., 2018; Martínez-Valverde et al., 2002; Medina et al., 2011; Patel, 2012; Silva et al., 2014; Vinholes et al., 2017; Pereira et al., 2018). Considerando que na literatura há uma discussão detalhada sobre a identificação de alguns dos compostos fenólicos encontrados, neste trabalho apenas será discutida a identificação daqueles que foram relatados pela primeira vez no araçá. Os compostos fenólicos foram identificados ou tentativamente identificados considerando a massa acurada, padrão de fragmentação, ordem de eluição na coluna C<sub>18</sub> e as características de absorção no UV-Vis. Essas informações foram comparadas com aquelas de padrões analíticos (**Tabela 10**) e com dados da literatura (Azevedo et al., 2017; Rojas-Garbanzo et al., 2019; Comandini et al., 2014; Tala et al., 2013; Dou et al., 2007; Pérez-Ramírez et al., 2018; Rockenbach et al., 2012; Sisó-Terraza et al., 2016; Perin et al., 2018; Tu et al., 2010; Bylund et al., 2007; Ma et al., 2007; Ravisankar et al., 2018; Gadetskaya et al., 2017; Lin & Harnly, 2010; Verardo et al., 2016; Peng et al., 2017; Quifer-Rada et al., 2015; Li et al., 2016; He & Xia, 2007; Zhang et al., 2019; Chyba et al., 2016; Grace et al., 2017; Khallouki et al., 2015; Peng et al., 2017; Chaves et al., 2018).

Os compostos 5 e 10 foram identificados como a vescalagina e a castalagina, ambos com a massa molecular (MM) igual a 934,0712. Essas moléculas são elagitaninos que possuem como única diferença a estereoquímica no C6 da molécula de glicose (**Figura 11**). No modo de ionização negativo, o espectro de massas apresentou a molécula desprotonada  $[M-H]^- = 933,0632$  e também a  $m/z$  466,0269, associada à perda de dois prótons  $[M-2H]^-$ . No MS<sup>2</sup> foi observado no

espectro de massas a  $m/z$  631,0505 [M-2H-301]<sup>-</sup>, correspondendo à perda de ácido elágico (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>) e  $m/z$  300,9949 [M-H-631]<sup>-</sup>, correspondente ao ácido elágico desprotonado. Esse padrão de fragmentação é compatível com a estrutura química dessas moléculas (**Figura 11**) e também concorda com as fragmentações relatadas por outros autores (Azevedo et al., 2017; Rojas-Garbanzo et al., 2019). Outras informações complementares são um máximo de absorvância em torno de 210 nm com um “ombro” em 280 nm, o que é característico dessas moléculas. Soma-se a essas informações a ordem de eluição encontrada, onde a vescalagina elui antes da castalagina (Comandini et al., 2014).

Um número razoável de moléculas derivadas de catequina ou epicatequina foram encontradas nos arazás, nomeadamente: digaloil (epi-)catequina I e II (compostos 6 e 9), galocatequina (composto 7), catequina (composto 14), dímero (epi-)catequina-(epi-)catequina (composto 15) e galato de (epi-)catequina (composto 46). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 6 (MM = 594,1010) apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  593,1266 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  407,0788 [M-H-168-18]<sup>-</sup>, correspondendo a perda de C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (galato) e uma molécula de H<sub>2</sub>O,  $m/z$  289,0683 correspondente a C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> ((epi)catequina) e  $m/z$  125,0257 [galato-44]<sup>-</sup> correspondente a um derivado de galato após a perda de CO<sub>2</sub>. Esse padrão de fragmentação é compatível com a estrutura química dessas moléculas (**Figura 11**) e também concorda com as fragmentações relatadas por outros autores (Padilha et al., 2017; Tala et al., 2013).

Com relação a galocatequina (MM = 306,0740), no modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  305,0668 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  221,0899 [M-H-84]<sup>-</sup>, correspondendo a perda de C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> referente à clivagem do anel A de flavonol, a  $m/z$  179,0322 [M-H-126]<sup>-</sup>, perda de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> referente à fissão do anel heterocíclico e a  $m/z$  125,0247 [galato-44]<sup>-</sup>, correspondente a um derivado de galato após a perda de CO<sub>2</sub>; a mesma fragmentação encontrada para o padrão analítico de epigalocatequina porém, com o tempo de retenção três minutos menor, mesmo comportamento observado com os padrões de catequina e epicatequina e relatado na literatura (Dou et al., 2007).



Tabela 10. Características cromatográficas e espectroscópicas dos CFE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV).

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
1	Ácido gálico	8,1	272	170	169,0122	<b>124</b>	+ / +
2	Di-HHDP hexosídeo I	9,8	260	784	783,0499	481; <b>301</b> ; 275	+ / +
3	Ácido vanílico hexosídeo I	12,9	260	330	329,0949	167; 152; 123; <b>108</b>	+ / +
4	Di-HHDP hexosídeo II	13,0	260	784	783,0499	481; <b>301</b> ; 275	+ / +
5	Vescalagina	13,5	210,280	934	933,0627, [M-2H] =466,0268	<b>631</b> ; 425; 301; 275	+ / +
6	Digaloil (epi)catequina I	13,5	278	594	593,1266	407; <b>289</b> ; 177; 125	+ / +
7	Galocatequina	13,7	267	306	305,0668	221; 179; <b>125</b>	+ / +
8	Ácido vanílico hexosídeo II	13,9	260	330	329,0961	167; 152; 123; <b>108</b>	+ / -
9	Digaloil (epi)catequina II	14,7	278	594	593,1125	407; <b>289</b> ; 177; 125	+ / +
10	Castalagina	16,6	210,280	934	933,0632, [M-2H] =466,0269	<b>631</b> ; 425; 301; 275	+ / +
11	Di-HHDP hexosídeo III	17,3	260	784	783,0655	481; <b>301</b> ; 275	+ / +
12	Proantocianidina B dímero I	17,8	276	578	577,1452	425; 407; <b>289</b> ; 125	+ / +
13	Ácido cumárico glicosídeo	18,1	315	326	325,1004	<b>145</b> ; 117	+ / +
14	Catequina	18,5	278	290	289,0712	221; 137; <b>123</b> ; 109; 97	+ / +
15	(epi)catequina-(epi)catequina	18,5	278	580	579,1484	<b>289</b> ; 245; 179	+ / +
16	Cianidina 3-hexosídeo	18,8	517	449	449,1164 <sup>g</sup>	359; <b>287</b> ; 223	- / +
17	Di-HHDP hexosídeo IV	18,9	260	784	783,0589	481; <b>301</b> ; 275	+ / +
18	Derivado do galoil-bis-HHDP	19,1	270	916	915,0655, [M-2H] = 457,0321	765; 441; <b>301</b> ;	+ / +
19	Galoil-di-HHDP hexosídeo I	19,4	270	952	951,0636, [M-2H] = 475,0262	783; 605; 481; 425; <b>301</b>	+ / +
20	Proantocianidina B dímero II	19,5	276	578	577,1429	425; 407; <b>289</b> ; 125	+ / +
21	Galoil-bis-HHDP-glicosídeo I	19,6	272	936	935,0940, [M-2H] = 467,0457	765; 343; <b>275</b> ; 169; 125	+ / +

(continua)

(continua)

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
22	HHDP hexosídeo	19,6	286	482	481,0967	319; <b>275</b> ; 195	+ / +
23	Galoil-di-HHDP hexosídeo II	19,8	270	952	951,0663, [M-2H] = 475,0323	783; 481; <b>301</b> ; 275	+ / +
24	Derivado de (epi)catequina	20,2	275	402	401,0999	<b>289</b> ; 245; 205; 137; 109	+ / +
25	Miricetina hexosídeo	20,8	272	480	479,0818	<b>316</b> ; 287	+ / -
26	Digaloil-HHDP hexosídeo I	21,0	276	786	785,0802	633; 483; <b>301</b> ; 275; 169	+ / +
27	Galoil-di-HHDP hexosídeo III	21,0	270	952	951,0664, [M-2H] = 475,0404	783; 481; <b>301</b> ; 275	+ / +
28	Galoil-bis-HHDP-glicosídeo II	21,1	272	936	935,0745, [M-2H] = 467,0350	765; <b>633</b> ; 301; 275; 169	+ / +
29	Derivado de (epi)catequina	21,3	275	402	401,0858	<b>289</b> ; 245; 203; 137	+ / +
30	Taxifolina hexosídeo	21,7	292,343	466	465,0915	<b>303</b> ; 195	+ / +
31	Miricetina pentosídeo I	22,2	353	450	449,0674	<b>316</b> ; 271; 165	- / +
32	Galoil-di-HHDP hexosídeo IV	22,6	270	952	951,0718, [M-2H] = 475,0330	783; 481; <b>301</b> ; 275	+ / +
33	Digaloil-HHDP hexosídeo II	22,8	276,355	786	785,0621	633; 483; <b>301</b> ; 275; 169	+ / +
34	Miricetina pentosídeo II	22,8	353	450	449,0658	<b>316</b> ; 271	- / +
35	Ácido elágico hexosídeo	22,9	253, 361	464	463,0391	<b>301</b>	+ / +
36	Galato de proantocianidina B	23,7	266; 366	730	729,1447	577; 559; 425; 407; <b>289</b> ; 169; 125	+ / +
37	Derivado do ácido abscísico	24,5	n.d	472	471,1789	<b>263</b> ; 219	+ / +
38	Derivado do ácido abscísico	24,8	n.d	472	471,1832	<b>263</b> ; 219	+ / +
39	Proantocianidina B dímero III	25,0	276	578	577,1430	425; 407; <b>289</b> ; 125	+ / +
40	Ácido elágico pentosídeo	25,3	284, 352	434	433,0346	<b>301</b> ; 271	- / +
41	Isofraxidin hexosídeo I	25,9	284	384	383,1276	301; <b>221</b> ; 193; 151	+ / +
42	Derivado de galagil	26,1	254	552	[M-2H] = 551,0243	467; 391; <b>301</b> ; 275; 169	+ / +

(continuação)

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
43	Quercetina hexosídeo	26,6	355	464	463,0755	<b>301</b> ; 179	+ / +
44	Quercetina glicuronídeo	26,7	256, 356	478	477,0511	<b>301</b> ; 179; 151	+ / +
45	Ácido elágico	27,9	302, 369	302	300,9911	<b>185</b>	+ / +
46	Galato de (epi)catequina	28,1	277	442	441,0665	<b>289</b> ; 245; 205; 169; 125	+ / +
47	Ácido diferúlico I	28,4	277, 320	386	385,1416	221; 193; <b>179</b> ; 135; 113	+ / +
48	Eriodictiol hexosídeo	30,6	279	450	449,0950	<b>287</b>	+ / +
49	Quercetina-malonil-glicoronídeo I	31,5	282	726	725,1851	<b>549</b> ; 313; 235; 175	+ / +
50	Quercetina-malonil- glicoronídeo II	32,0	282	726	725,1867	<b>549</b> ; 313; 235; 175	+ / +
51	Ácido metil-elágico pentosídeo	32,0	276	462	461,0573	<b>315</b> ; 301	+ / -
52	Ácido abscísico	32,5	n.d	264	263,1261	219; <b>203</b> ; 189	+ / +
53	Isofraxidin hexosídeo II	34,2	284	384	383,1230	301; <b>221</b> ; 193; 151	+ / +
54	Ácido diferúlico II	35,7	277, 320	386	385,1416	221; 193; <b>179</b> ; 135; 113	+ / +

<sup>a</sup>Pico referente ao cromatograma de massas (**Figura 10**). <sup>b</sup>Tempo de retenção em coluna C<sub>18</sub> Synergi Hydro (4μm). <sup>c</sup>Comprimento de onda referente ao valor máximo de absorvância. <sup>d</sup>Massa molecular do composto. <sup>e</sup>No MS<sup>2</sup>, o fragmento mais abundante está em negrito. <sup>f</sup>O sinal (+) indica presença e o sinal (-) indica ausência. <sup>g</sup>Para a antocianina, a molécula está ionizada [M]<sup>+</sup>.

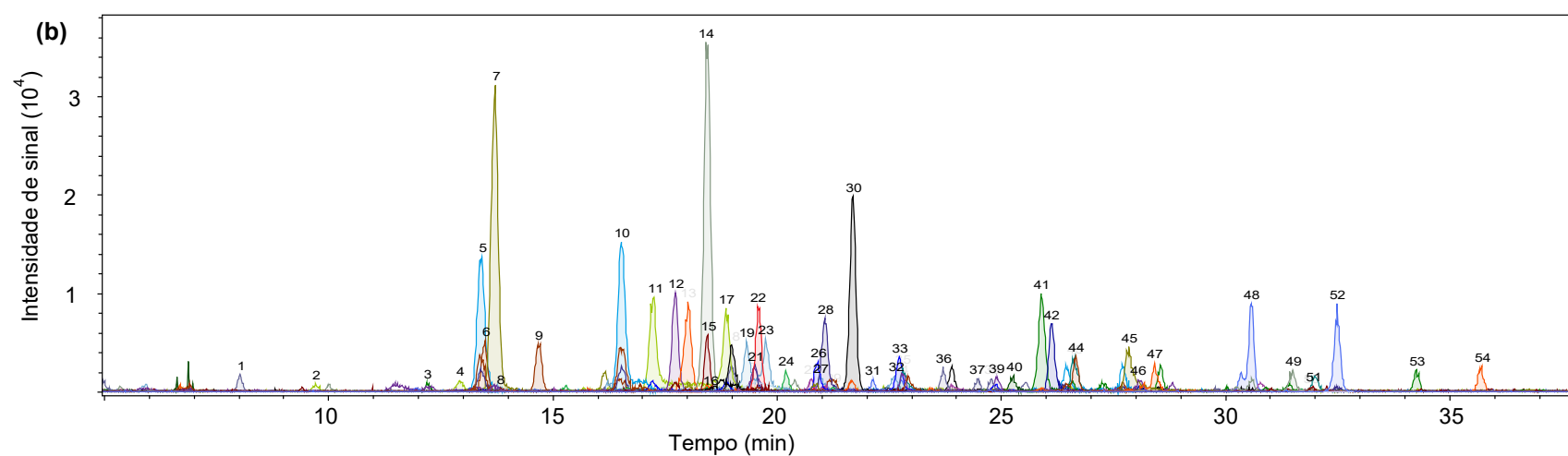
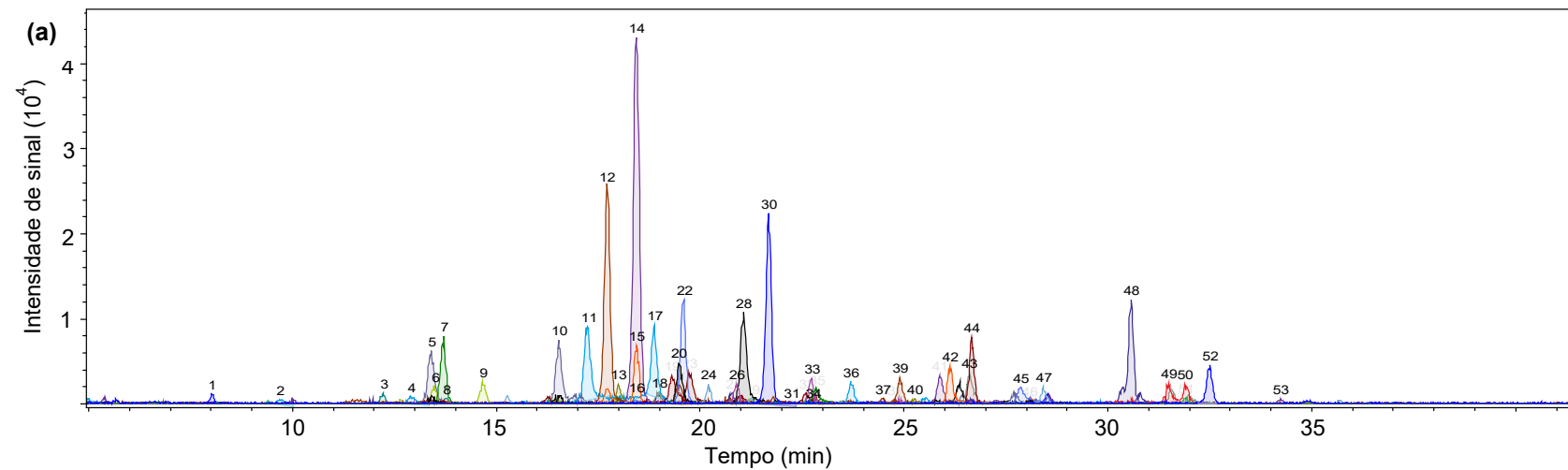


Figura 10. Cromatogramas dos picos identificados da fração de CFE do (a) araçá amarelo e do (b) araçá vermelho.

Os compostos (epi-)catequina-(epi-)catequina e galato de (epi-)catequina apresentaram massa acurada similares aos relatados pela literatura (Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014). Além disso, o máximo de absorvância em 278 nm apresentado é similar ao dos padrões de catequina e epicatequina. A novidade em relação aos derivados de (epi-)catequina é que, com a comparação com padrões analíticos de catequina e epicatequina, foi possível confirmar a identificação do composto 14 como catequina, diferentemente dos trabalhos de identificação de compostos fenólicos em araçá que relatam a presença apenas de epicatequina (Pereira et al., 2018).

Os compostos 12, 20 e 39 foram identificados como dímeros de proantocianidina B I, II e III (MM = 578,1424). Esta proantocianidina apresenta estrutura (-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(-)-epicatequina. Há dois mecanismos de fragmentação do anel heterocíclico dos flavanols: via Retro-Diels-Alder (RDA) e fissão de anel heterocíclico (FAH). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 39 apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 577,1452 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a *m/z* 425,0952 [M-H-152]<sup>-</sup>, correspondente ao rearranjo do anel heterocíclico pela via de fragmentação RDA. A *m/z* 407,0884 [M-H-152-18]<sup>-</sup> corresponde a perda de uma molécula de água (H<sub>2</sub>O) e a *m/z* 289,0802 [M-H-288]<sup>-</sup>, corresponde à perda de uma molécula de catequina, mesma fragmentação relatada por outros autores (Pérez-Ramírez et al., 2018; Rockenbach et al., 2012).

O composto 36 foi identificado como galato de proantocianidina B (MM = 730,1530). O espectro de massas do composto 36 apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 729,1447 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a *m/z* 577,1255 [M-H-152]<sup>-</sup>, a *m/z* 559,1339 [M-H-169]<sup>-</sup>, correspondente à perda de uma molécula de ácido gálico e a *m/z* 425,0670 [M-H-152-152]<sup>-</sup>, a mesma fragmentação relatada na literatura (Díaz-de-Cerio et al., 2017). A ordem de eluição desse composto corresponde à relatada por outros autores (Rockenbach et al., 2012).

Os compostos 41 e 53 foram identificados como isofraxidin hexosídeo I e II (7-hidroxi-6,8-dimetoxicoumarina hexosídeo) (MM = 384,1056). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 41 mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 383,1322 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a *m/z* 221,0790 [M-

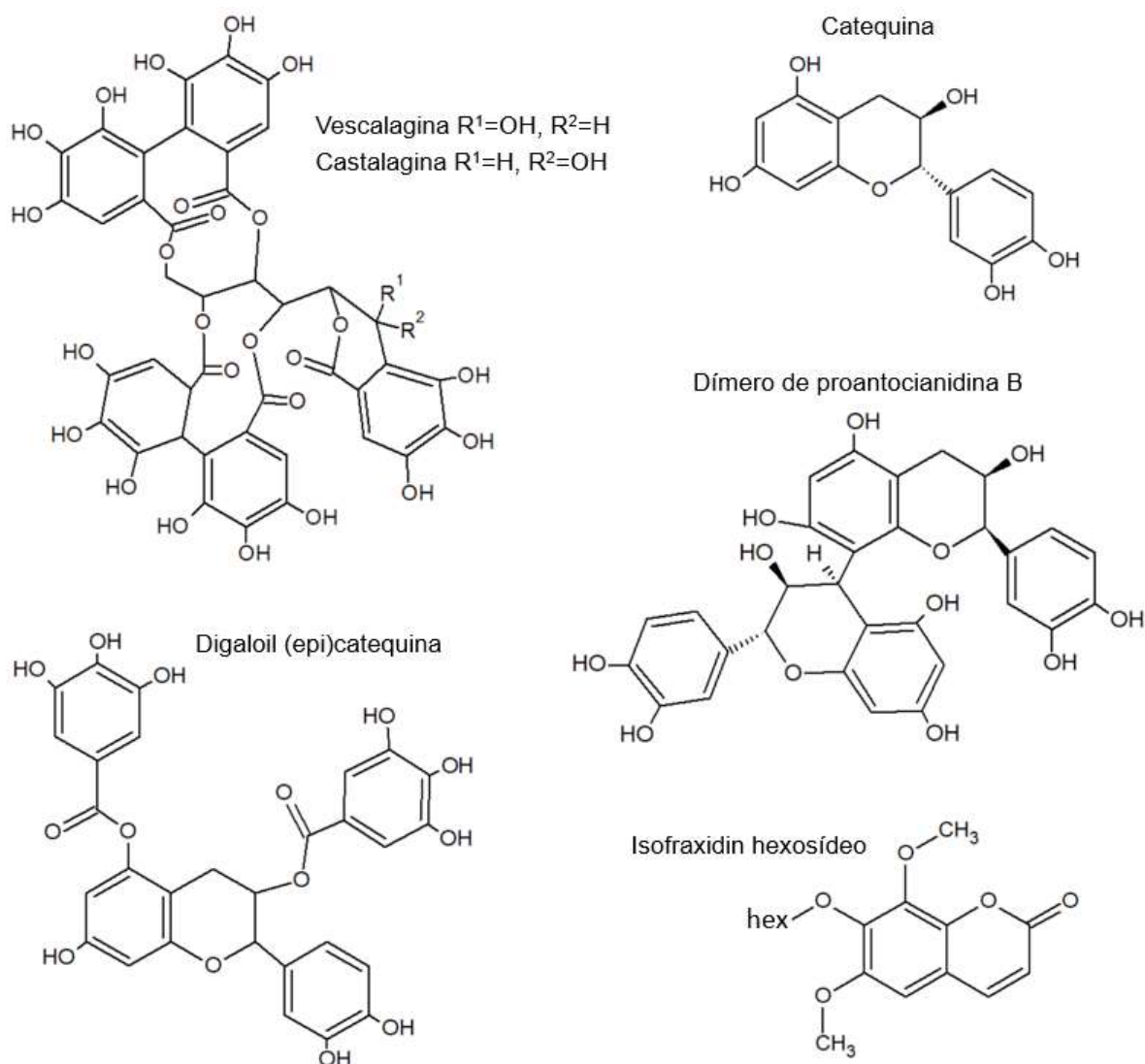
H-162}], correspondendo à perda de um resíduo de hexose, dados similares aos relatados na literatura (Sisó-Terraza et al., 2016).

Em geral, o perfil qualitativo dos CFE do araçá amarelo e do araçá vermelho são similares, com algumas exceções: cianidina 3-hexosídeo, miricetina pentosídeo, miricetina hexosídeo, ácido elágico pentosídeo e ácido metil-elágico pentosídeo. A primeira exceção refere-se à esperada presença de cianidina 3-hexosídeo no araçá vermelho. Essa antocianina é a responsável pela cor vermelha da casca dessa fruta. Outra diferença observada é a maior riqueza em derivados de fenólicos contendo pentose no araçá vermelho. Por exemplo, a miricetina foi encontrada no araçá amarelo na forma de hexosídeo enquanto que no araçá vermelho foram encontrados apenas dois isômeros de miricetina pentosídeo.

Os elagitaninos castalagina e a vescalagina (**Figura 11**) são comumente encontradas em cascas de árvores, na madeira de carvalho e, conseqüentemente, em vinhos envelhecidos em barris desse material (Azevedo et al., 2017; Comandini et al., 2014). Recentemente foi relatado na polpa e casca da goiaba da Costa Rica (*Psidium friedrichsthalianum*), uma fruta tropical muito semelhante ao araçá (Rojas-Garbanzo et al., 2019). Há alguns trabalhos na literatura indicando que a castalagina e a vescalagina possuem efeito benéfico à saúde, sendo a inibição da poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) uma das estratégias mais promissoras de inibição de alguns tipos de câncer. Essas moléculas foram relatadas com atividade dupla já que inibem, também, a topoisomerase II no DNA das células, outro mecanismo formador de alguns tipos de câncer (Kamada et al., 2018).

Os compostos derivados de (epi)catequina são frequentemente encontrados em araçá, tanto na forma monomérica quanto na forma de dímeros, trímeros e polímeros (proantocianidinas) (Pereira et al., 2018). Em relação ao monômeros, neste trabalho foram encontrados pela primeira vez no araçá a digaloil (epi)catequina e a catequina (**Figura 11**). Trabalhos anteriores haviam identificado o composto fenólico epicatequina ao invés de catequina, esses trabalhos possuíam apenas padrão analítico de epicatequina (Medina et al., 2011; Ribeiro et al., 2014) ou nenhum padrão (Silva et al., 2014). Neste trabalho, utilizou-se os padrões de

catequina e epicatequina para comparação. Isso permitiu a confirmação da identificação do composto 14 como catequina.



Nota: hex = hexose

**Figura 11. CFE identificados pela primeira vez em araçá amarelo e vermelho.**

Fonte: própria autora.

As proantocianidinas são compostos incolores que ocorrem predominantemente em plantas lenhosas ou herbáceas. Quimicamente são moléculas formadas por unidades de flavan-3-ol, (+)-catequina e (-)-epicatequina, ligadas entre si por ligações interflavanóides C4-C6 e C4-C8, além de diversos ésteres de galato (Rohr et al., 2000). O consumo desses compostos tem sido

associado à diminuição da ocorrência de câncer de próstata em seres humanos (Praud et al., 2018). Além disso, em estudo utilizando ratos, a redução de tecido adiposo visceral foi relatada com a suplementação de proantocianidinas (Pascual-Serrano et al., 2017). Os dímeros de proantocianidina B (**Figura 11**) ainda não haviam sido relatados em araçá. Eles são os compostos fenólicos majoritários em sementes de uva (Rockenbach et al., 2012). Assim, a presença desses compostos fenólicos no araçá, possivelmente tenha sua origem nas pequenas sementes da fruta.

### 5.2.1. Compostos Fenólicos Não-Extraíveis (CFNE)

Um total de 43 e 45 compostos fenólicos foi identificado na fração de CFNE dos araçás amarelo e vermelho, respectivamente (**Tabela 11, Figura 12**). Destaca-se que este é o primeiro estudo sobre a fração dos CFNE do araçá, uma classe de compostos fenólicos ignorada e, conseqüentemente, pouco explorada. Cabe destacar, que do número total de compostos fenólicos encontrados na fração de CFNE, apenas dois estavam presentes na fração CFE, nomeadamente o ácido gálico e o ácido elágico. A fração de CFNE dos araçás caracterizou-se essencialmente pela presença majoritária de compostos fenólicos de baixa massa molecular, notadamente, ácidos fenólicos.

Os compostos 1, 7 e 9 foram identificados como derivados do ácido cafeoil-chiquímico, nomeadamente: o ácido 3-O-cafeoil-chiquímico, o ácido 4-O-cafeoil-chiquímico e o 5-O-cafeoil-chiquímico (MM = 336,0845), respectivamente, de acordo com a ordem de eluição relatada por Jaiswal et al. (2010). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 7 mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  335,0854, massa acurada similar à relatada na literatura (Tu et al., 2010).

Os compostos 2, 6 e 8 foram identificados como *p*-coumaroil-feruloilglicerol I, II e III (MM = 414,1310). O composto 6 apresentou, no modo de ionização negativo, a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  413,1213 e o MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  207,0468, a



$m/z$  163,0568 [ácido *p*-cumárico - H]<sup>-</sup> sendo derivado da clivagem da ligação éster e a  $m/z$  145,0359 [ácido *p*-cumárico - H - 18]<sup>-</sup>, referente a perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O, mesma fragmentação encontrada por outros autores (Ma et al., 2007; Ravisankar et al., 2018).

Os compostos 5 e 10 foram identificados como ácido feruloilquínico I e II (MM = 368,1110). No modo de ionização negativo, o espectro de massas deste composto apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  367,1139, massa exata e ordem de eluição similar à relatada por outros autores (Lin & Harnly, 2010; Verardo et al., 2016).

Os compostos 12 e 16 foram identificados como galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila I e II (MM = 288,0766). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 12 apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  287,0740 compatível com a fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>8</sub> e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  169,0173 [galato-H]<sup>-</sup> e a  $m/z$  125,0292 [galato-H-44]<sup>-</sup>, correspondente a perda de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Esses dados e a ordem de eluição são similares aos relatados na literatura (Gadetskaya et al., 2017).

Entre os derivados do ácido dihidroxibenzóico (MM = 154,0266), os compostos 13, 18 e 32 foram identificados como ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico e ácido 3,5-dihidroxibenzóico, respectivamente. A ordem de eluição foi igual a relatada por Liu e colaboradores (2009). No modo de ionização negativo o espectro de massas do composto 18 mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  153,0227 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  109,0244 [M-H-44]<sup>-</sup>, correspondendo a perda característica de CO<sub>2</sub>, frequentemente relatada em compostos derivados do ácido hidroxibenzóico (Quifer-Rada et al., 2015). Os compostos 21, 24 e 29 foram identificados como ácido benzoilbenzoico (MM = 226,0630). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 24 apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  225,0692 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou a  $m/z$  165,0170 [M-H-60]<sup>-</sup>, referente a perda de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> e a  $m/z$  137,0219 [M-H-60-28]<sup>-</sup>, correspondente a perda de monóxido de carbono (CO) (Peng et al., 2017).

Tabela 11. Características cromatográficas e espectroscópicas dos CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV).

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
1	Ácido 3-O-cafeoil-chiquímico	5,5	271	336	335,0854	n.d	+ / +
2	<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol I	6,9	272	414	413,1158	207; <b>163</b> ; 145	+ / +
3	Ácido aconítico	7,0	267	174	173,0144	<b>111</b>	+ / +
4	Ácido gálico	8,1	271	170	169,0187	<b>125</b>	+ / +
5	Ácido feruloilquínico I	9,2	269	368	367,1156	n.d	+ / +
6	<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol II	9,2	269	414	413,1213	207; <b>163</b> ; 145	+ / +
7	Ácido 4-O-cafeoil-chiquímico	9,2	271	336	335,0883	n.d	+ / +
8	<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol III	10,3	270	414	413,1168	207; <b>163</b> ; 145	+ / +
9	Ácido 5-O-cafeoil-chiquímico	10,3	271	336	335,0903	n.d	+ / +
10	Ácido feruloilquínico II	10,3	270	368	367,1139	n.d	+ / +
11	Não identificado	10,9	260, 296	220	219,0460	<b>125</b> ; 111	+ / +
12	Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila I	10,9	267	288	287,0440	<b>169</b> ; 125	+ / +
13	Ácido 3,5-dihidroxibenzóico	10,9	260, 296	154	153,0168	n.d	+ / +
14	Luteolina 7-O-glicuronídeo	11,9	260	462	461,0755	n.d	+ / +
15	Não identificado	11,9	260	220	219,0437	<b>125</b> ; 111	+ / +
16	Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila II	12,0	267	288	287,0424	<b>169</b> ; 125	+ / +
17	Metil-galoil-glicopiranosídeo I	12,0	276	346	345,0668	297; <b>169</b> ; 125	+ / +
18	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	12,0	276	154	153,0154	<b>109</b>	+ / +
19	Metil-galoil-glicopiranosídeo II	12,6	275	346	345,0696	297; <b>169</b> ; 151; 125	+ / +
20	Metilbutil-hexosilramnosídeo	13,1	275	382	381,1082	n.d	+ / +
21	Ácido benzoilbenzoico I	15,3	270	226	225,0713	165; <b>137</b>	+ / +

(continua)

(continua)

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
22	Derivado do ácido hidroxibenzoico I	16,0	276	166	165,0137	145; <b>137</b> ; 97	+ / +
23	Galato de metila	16,5	271	184	183,0259	<b>124</b> ; 111	+ / +
24	Ácido benzoilbenzoico II	17,1	270	226	225,0682	165; <b>137</b>	+ / +
25	Não identificado	19,3	263, 287	378	377,0774	317; <b>289</b> ; 193; 161	+ / +
26	Derivado do ácido hidroxibenzoico II	19,5	276	166	165,0163	145; <b>137</b> ; 97	+ / +
27	Derivado do ácido cumárico	20,7	277, 305	196	195,0616	<b>163</b> ; 137; 123; 108	+ / +
28	Derivado do ácido cumaroil-quínico	21,2	305	174	173,0784	<b>111</b>	+ / +
29	Ácido benzoilbenzoico III	21,9	270	226	225,0686	165; <b>137</b>	+ / +
30	Delfinidina	22,4	521	302	303,0543 <sup>g</sup>	n.d	- / +
31	Ácido vanílico	22,9	271	168	167,0313	<b>124</b> ; 111	+ / +
32	Ácido 2,4-dihidroxibenzóico	23,1	260, 296	154	153,0177	n.d	+ / +
33	Cianidina	25,4	517	286	287,0598 <sup>g</sup>	n.d	- / +
34	Isômero do ácido cafeico	25,6	271	180	179,0298	<b>135</b>	+ / +
35	Não identificado	26,9	268	188	187,0912	<b>145</b>	+ / +
36	Ácido elágico	27,9	367	302	300,9925	229; 201; 145	+ / +
37	Ácido sinápico I	29,8	270	224	223,0547	179; 164; <b>150</b>	+ / +
38	Isomero do ácido ferúlico	32,3	270	194	193,0422	<b>161</b> ; 123; 109	+ / +
39	Ácido sinápico II	33,1	270	224	223,0538	179; 164; <b>150</b>	+ / +
40	Derivado de (epi)catequina	33,5	270	222	221,0765	<b>121</b>	+ / +
41	Não identificado	34,6	270	182	181,0084	<b>151</b> ; 145; 107	+ / +
42	Derivado de (epi)catequina II	36,1	279	222	221,0755	<b>121</b>	+ / +
43	Ácido carnosico	38,4	270	332	331,2400	313; <b>157</b> ; 127	+ / +

(continuação)

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	MM <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> (-) (m/z) <sup>e</sup>	Ocorrência AA / AV <sup>f</sup>
44	Derivado de (epi)catequina III	41,3	277	222	221,0763	<b>121</b>	+ / +
45	Isômero de (epi)catequina	41,3	277	290	289,0645	<b>134; 121</b>	+ / +

<sup>a</sup>Pico referente ao cromatograma de massas (**Figura 11**). <sup>b</sup>Tempo de retenção em coluna C<sub>18</sub> Synergi Hydro (4μm). <sup>c</sup>Comprimento de onda referente ao valor máximo de absorvância. <sup>d</sup>Massa molecular do composto. <sup>e</sup>No MS<sup>2</sup>, o fragmento mais abundante está em negrito. <sup>f</sup>O sinal (+) indica presença e o sinal (-) indica ausência. <sup>g</sup>Para as antocianinas, a molécula está ionizada [M]<sup>+</sup>.

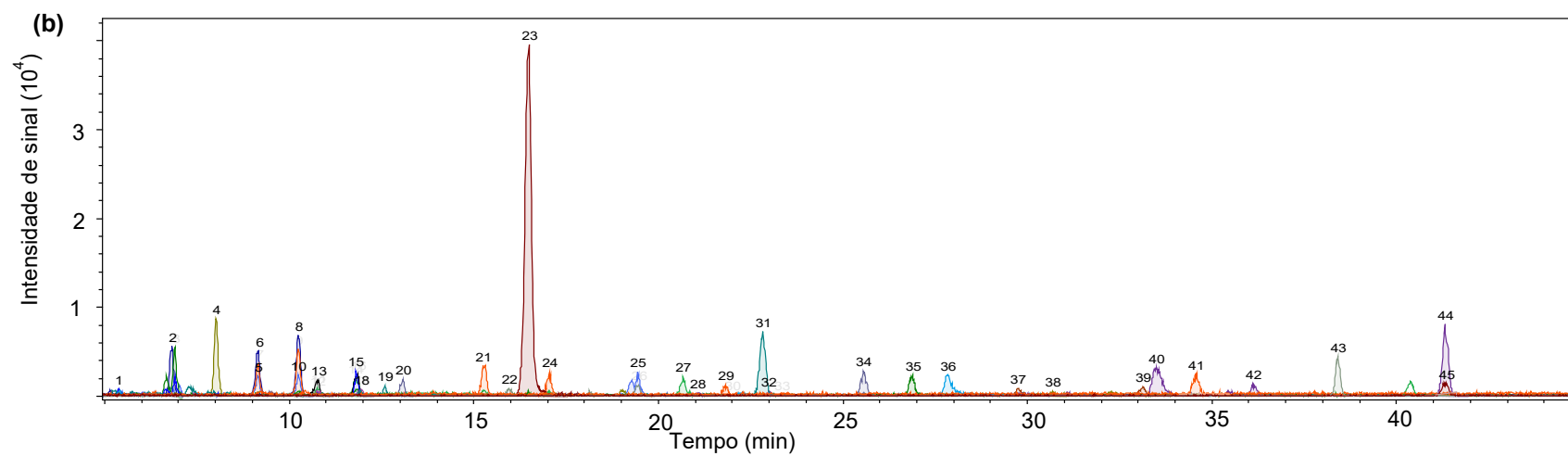
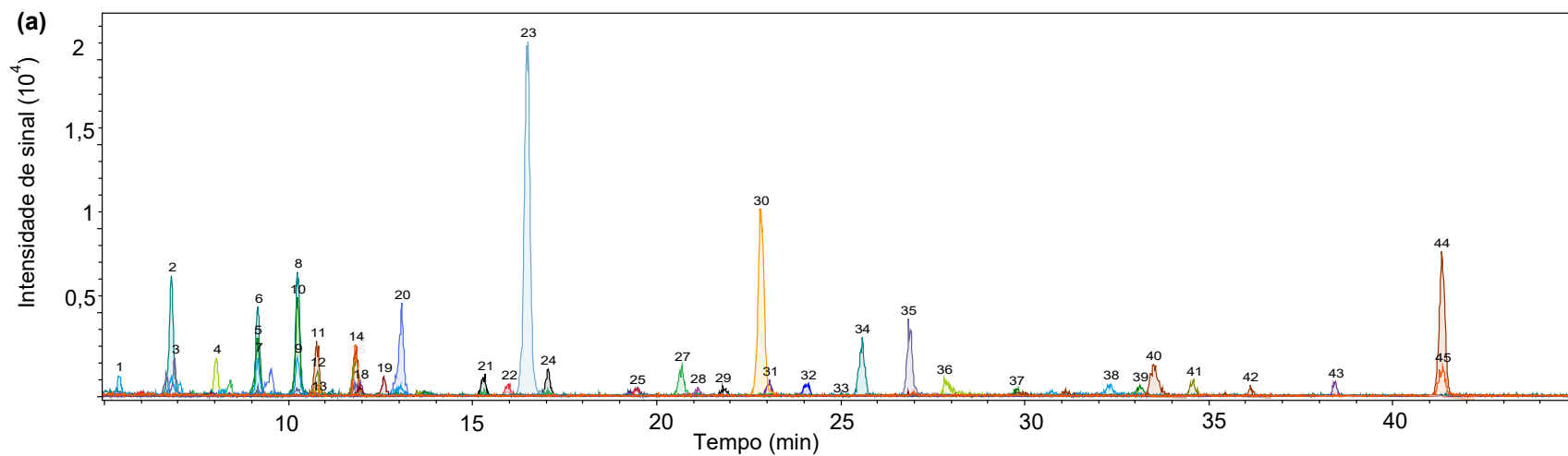


Figura 12. Cromatogramas dos picos identificados da fração de CFNE do araçá amarelo (a) e do araçá vermelho (b).

O composto 14 foi identificado como luteolina 7-O-glicuronídeo (MM = 462,0798). Esse composto apresentou, no modo de ionização negativo, massa molecular desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  461,0789, massa exata similar a relatada na literatura (Li et al., 2016).

Os compostos 17 e 19 foram identificados como galato de metilglicopiranosídeo I e II (MM = 346,0900). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 19 apresentou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  345,0846 e o espectro  $MS^2$  mostrou a  $m/z$  169,0181  $[galoil-H]^-$  e a  $m/z$  125,0260  $[galoil-H-44]^-$ , correspondente a perda de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Chyba et al., 2016).

O composto 20 foi identificado como metilbutil-hexosilramnose (MM = 382,1066) já que apresentou, no modo de ionização negativo, massa molecular desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  381,1082, massa exata e ordem de eluição similar às relatadas na literatura (Zhang et al., 2019).

O composto 23 foi identificado como galato de metila (MM = 184,0372). No modo de ionização negativo, o espectro de massas deste composto apresentou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  183,0344 e o espectro  $MS^2$  mostrou a  $m/z$  124,0130  $[M-H-60]^-$ , referente a perda de  $C_2H_4O_2$  e a  $m/z$  111,0135  $[M-H-44-28]^-$ , referente a perda de CO e  $CO_2$ . Esse padrão de fragmentação é compatível com a estrutura química dessa molécula (**Figura 13**), além disso, o máximo de absorção em torno de 273 nm e a ordem de eluição é similar às relatadas por outros autores (Pérez-Ramírez et al., 2018; He & Xia, 2007).

O composto 30 foi identificado como delphinidina (MM = 303,0499). No modo de ionização positivo, o espectro de massas deste composto apresentou a molécula na forma de cátion flavílio  $[M]^+$  a  $m/z$  303,0544, além disso apresentou valor máximo de absorbância no comprimento de onda 521nm, característico de antocianinas (Chaves et al., 2018).

Os compostos 37 e 39 foram identificados como ácido sinápico I e II (MM = 224,0684). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 37 apresentou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  223,0648, massa

exata e ordem de eluição similar à encontrada na literatura (Khallouki et al., 2015; Peng et al., 2017).

Em geral, o perfil qualitativo dos CFNE do araçá amarelo e do araçá vermelho são similares, com exceção da presença de antocianinas (delfinidina e cianidina) no araçá vermelho e ausência no genótipo amarelo.

Os derivados do ácido cafeoil chiquímico (**Figura 13**) estão relacionados à resistência das plantas a doenças e possuem quatro grupos hidroxilas que são responsáveis pela sua capacidade antioxidante. Esse composto é um intermediário na síntese de polímeros de células vegetais e um dos compostos fenólicos mais estudado em raízes e frutos de palmeiras (Sambanthamurthi et al., 2011; Zeng et al., 2012; Zhang & Cheung, 2011). Com relação a frutas nativas do Brasil, dois isômeros do ácido cafeoil chiquímico foram encontrados em açai (Garzón et al., 2017).

Os derivados dos ácidos fenólicos *p*-cumárico e ferúlico, nas plantas, estão ligados às hemiceluloses como substitutos de estruturas de carboidratos, sendo facilmente liberadas pela hidrólise química. Os cumaroil-feruloil gliceróis (**Figura 13**) são ésteres de ácidos fenólicos e são largamente estudados em cereais, como o sorgo e o tefe (*eragrostis tef*) (Ravisankar et al., 2018; Svensson et al., 2010). Esses compostos não haviam sido relatados em araçá ou frutas da mesma família (*Myrtaceae*), apesar dos compostos 1-O-*p*-cumaroil-3-O-feruloilglicerol, 1-O-*p*-cumaroil-2-O-feruloilglicerol e 1-O-feruloil-2-O-*p*-cumaroilglicerol já terem sido encontrados em folhas de abacaxi e em casca de laranja (Ma et al., 2007). O ácido feruloilquínico (**Figura 13**) foi relatado em folhas e frutos de café, porém foi encontrado pela primeira vez em araçá (Bertrand et al., 2003).

Os derivados de ácido gálico são os compostos mais encontrados nas análises de CFNE de diversas frutas e vegetais. Esses ácidos fenólicos de baixa massa molecular estão ligados fracamente ao tecido vegetal e são liberados somente através de hidrólise. O galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila (**Figura 13**) é um éster de ácido gálico largamente estudado em espécies do gênero *Limonium*, como a lavanda pelas suas propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Gadetskaya et al., 2017), porém, não foi relatada em frutas. O galato de metila

**(Figura 13)**, ou éster metílico de ácido gálico, foi relatado em extrato aquoso (chá) de folha de goiabeira, chá-da-índia, mogno chinês e alecrim e destacado pela sua capacidade antioxidante (Chen et al., 2007). O metil-galoil glicopiranosídeo **(Figura 13)** e outros glicosídeos de ácido gálico são difundidos em várias plantas. Porém, devido ao baixo teor de sua forma livre nas plantas, sua alta polaridade e por ser facilmente oxidado, torna-se difícil isolar esses compostos em grandes quantidades. A maioria dos estudos referente a esse composto, trata da produção sintética desse composto partindo de ácido gálico, glicose e enzimas (Li et al., 2015; Slaghenaufi et al., 2016).

Os compostos derivados do ácido benzoico **(Figura 13)** não haviam sido relatados em araçá. O ácido 2,4-dihidroxibenzoico é o composto majoritário de figo (Ahmad et al., 2016), enquanto que o ácido 3,4-dihidroxibenzoico foi isolado em frutos de argan (Khallouki et al., 2015) e ácido 3,5-dihidroxibenzoico foi relatado em 24 vegetais, como cenoura, alface, espinafre e cebola (Liuquan Zhang et al., 2019)..

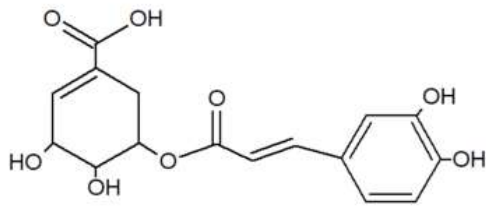
A luteolina 7-O-glicuronídeo **(Figura 13)** tem sido relatada apenas em vegetais folhosos, como o alface verde e roxo (Cui et al., 2017). Apesar disso, a luteolina na forma livre foi encontrada em folhas de goiabeira e araçá-de-veado (*Psidium brownianum*) (Machado et al., 2018).

A delphinidina **(Figura 13)** produz os tons azulados presentes em diversas flores e também é responsável pela coloração azul-avermelhada de diversos frutos, como a uva, com destaque para a Cabernet Sauvignon. A presença da delphinidina no extrato hídrolisado de CFNE do araçá vermelho explica a coloração violácea do extrato. Apesar de não ter sido relatada em araçá, a delphinidina foi encontrada glicosilada na fração CFE de guabijú (*Myrcianthes Pungens*) (Dalla Nora et al., 2014).

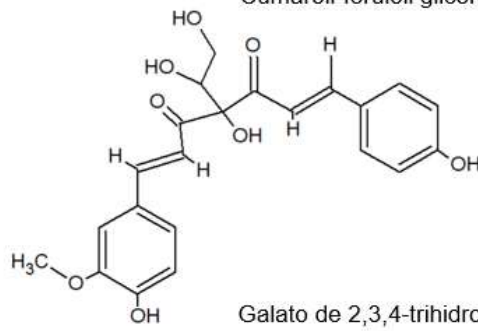
O ácido sináptico **(Figura 13)** é um ácido fenólico de baixa massa molecular relatado frutas tropicais como papaia-de-montanha (*Vasconcellea pubescens*) e goiaba cá da Costa Rica (*Psidium friedrichsthalianum*) (Rojas-Garbanzo et al., 2019; Simirgiotis et al., 2009). Esse composto, derivado do ácido carboxílico, tem como principal efeito benéfico à saúde a sua alta capacidade antioxidante.



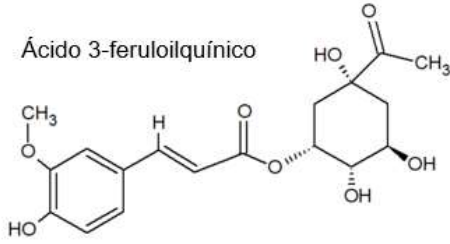
Ácido cafeoil chiquímico



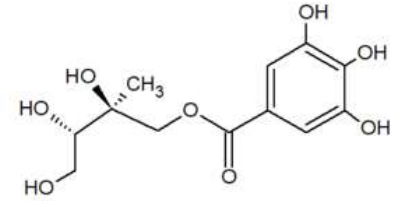
Cumaroil-feruloil glicerol



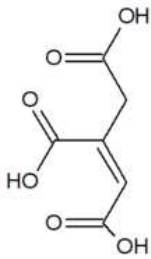
Ácido 3-feruloilquinico



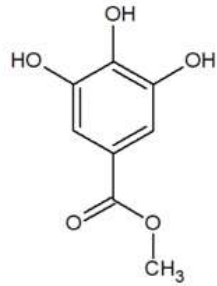
Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutil



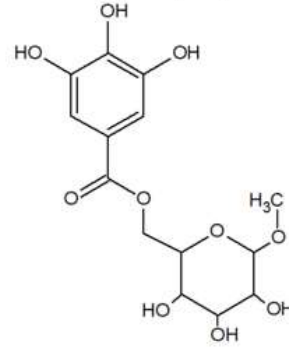
Ácido aconítico



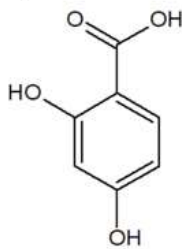
Galato de metilo



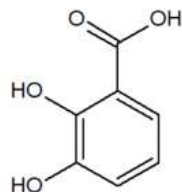
Galato de metila-glicopiranosídeo



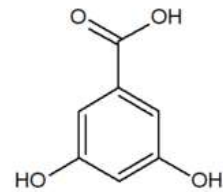
Ácido 2,4-dihidroxibenzóico

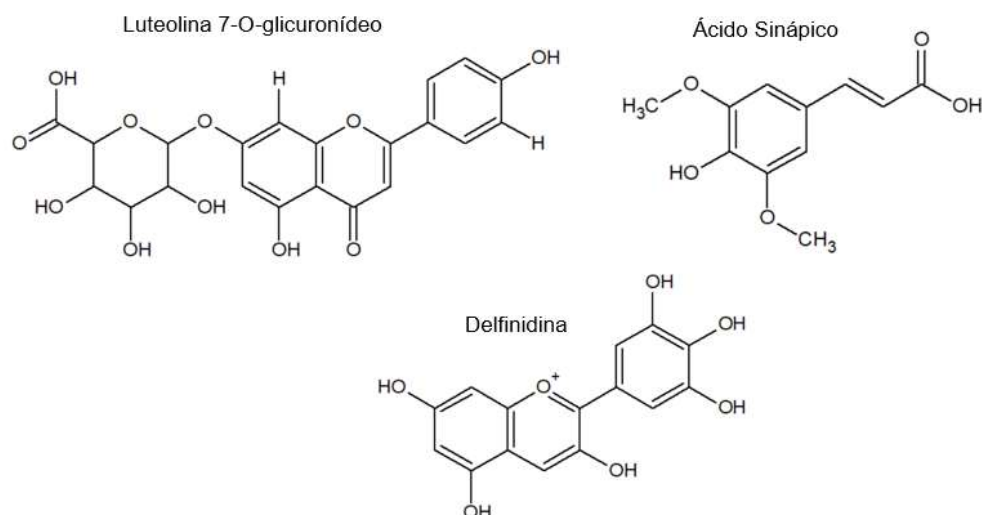


Ácido 2,3-dihidroxibenzóico



Ácido 2,4-dihidroxibenzóico





**Figura 13. CFNE identificados pela primeira em araçá amarelo e vermelho.**

Fonte: própria autora.

### 5.3. Quantificação

O teor de compostos fenólicos totais nos araçás amarelo e vermelho foi similar ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 12**). Para ambas as variedades a fração CFE foi majoritária, representando cerca 65% (m/m) do teor de fenólicos totais. Assim, o restante dos compostos fenólicos é representado pela fração CFNE (35%, m/m), a qual contém compostos fenólicos identificados pela primeira vez no araçá. Os poucos estudos disponíveis na literatura apresentam grande variação na proporção dessas frações nas frutas. Para a tangerina observou-se que os CFNE representam cerca de 40% dos fenólicos totais (m/m), enquanto que para o repolho roxo essa relação foi de 76% (m/m) (Esparza-Martínez et al., 2016; Gonzales et al., 2015).

Essa variação entre diferentes vegetais pode ser explicada pelo teor de fibra alimentar de cada vegetal. Estudos associando o teor de fibra alimentar com o teor de CFNE têm mostrado que os compostos fenólicos podem ser responsáveis por até 63 % da constituição da fibra alimentar. Assim, quanto maior o teor de fibras alimentares na planta, maior a proporção de CFNE (m/m) em relação ao conteúdo de fenólicos totais (Goñi et al., 2009; Macagnan et al., 2018).

**Tabela 12. Concentração  $\pm$  desvio padrão dos compostos fenólicos, de CFE e de CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV) liofilizados ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).**

<b>Composto</b>	<b>AA (CFE)</b>	<b>AA (CFNE)</b>	<b>AV (CFE)</b>	<b>AV (CFNE)</b>
Ácido 3-cafeoil-chiquímico	n.d.	8,5 <sup>B</sup> $\pm$ 1,2	n.d.	87,1 <sup>A</sup> $\pm$ 4,5
<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol I	n.d.	26,3 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2	n.d.	23,9 <sup>A</sup> $\pm$ 1,9
Ácido aconítico	n.d.	9,3 <sup>B</sup> $\pm$ 0,9	n.d.	14,3 <sup>A</sup> $\pm$ 1,9
Ácido gálico	<b>7,4<sup>B</sup> <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>11,1<sup>B</sup> <math>\pm</math> 0,9</b>	<b>9,9<sup>B</sup> <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>34,1<sup>A</sup> <math>\pm</math> 2,1</b>
Ácido feruloilquínico I	n.d.	17,6 <sup>B</sup> $\pm$ 2,2	n.d.	25,8 <sup>A</sup> $\pm$ 0,8
<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol II	n.d.	51,7 <sup>A</sup> $\pm$ 7,2	n.d.	9,4 <sup>B</sup> $\pm$ 1,2
Ácido 4-cafeoil-chiquímico	n.d.	19,2 <sup>A</sup> $\pm$ 2,5	n.d.	6,7 <sup>B</sup> $\pm$ 0,8
Di-HHDP hexosídeo I	6,3 <sup>A</sup> $\pm$ 0,8	n.d.	5,1 <sup>A</sup> $\pm$ 0,5	n.d.
<i>p</i> -coumaroil-feruloilglicerol III	n.d.	22,6 <sup>A</sup> $\pm$ 2,9	n.d.	34,4 <sup>A</sup> $\pm$ 2,6
Ácido 5-cafeoil-chiquímico	n.d.	11,3 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2	n.d.	15,5 <sup>A</sup> $\pm$ 2,2
Ácido feruloilquínico II	n.d.	30,7 <sup>A</sup> $\pm$ 3,3	n.d.	7,2 <sup>B</sup> $\pm$ 0,8
Não identificado	n.d.	6,6 <sup>A</sup> $\pm$ 0,9	n.d.	8,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,2
Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila I	n.d.	10,9 <sup>A</sup> $\pm$ 1,5	n.d.	5,7 <sup>B</sup> $\pm$ 0,4
Ácido 3,5-dihidroxibenzoico	n.d.	7,5 <sup>A</sup> $\pm$ 0,9	n.d.	5,3 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4
Luteolina 7-O-glicuronídeo	n.d.	18,4 <sup>A</sup> $\pm$ 1,6	n.d.	12,8 <sup>B</sup> $\pm$ 0,5
Não identificado	n.d.	14,7 <sup>A</sup> $\pm$ 1,6	n.d.	10,5 <sup>A</sup> $\pm$ 1,0
Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila II	n.d.	6,8 <sup>B</sup> $\pm$ 0,9	n.d.	13,6 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2
Metil-galoil-glicopiranosídeo I	n.d.	3,9 <sup>A</sup> $\pm$ 0,2	n.d.	3,7 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	n.d.	6,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,8	n.d.	8,1 <sup>A</sup> $\pm$ 1,1
Metil-galoil-glicopiranosídeo II	n.d.	6,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,5	n.d.	5,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,7
Ácido vanílico hexosídeo	8,5 <sup>A</sup> $\pm$ 0,2	n.d.	8,0 <sup>A</sup> $\pm$ 0,4	n.d.

(continua)

Composto	AA (CFE)	AA (CFNE)	AV (CFE)	AV (CFNE)
Di-HHDP hexosídeo II	10,5 <sup>A</sup> ± 0,5	n.d.	7,6 <sup>B</sup> ± 0,5	n.d.
Metilbutil-hexosilramnosídeo	n.d.	11,9 <sup>A</sup> ± 1,3	n.d.	6,9 <sup>B</sup> ± 0,8
Vescalagina	<b>42,9<sup>B</sup> ± 5,1</b>	n.d.	<b>77,1<sup>A</sup> ± 7,1</b>	n.d.
Digaloil (epi)catequina	13,5 <sup>B</sup> ± 0,8	n.d.	24,9 <sup>A</sup> ± 2,5	n.d.
Galocatequina	45,7 <sup>B</sup> ± 1,4	n.d.	<b>143,8<sup>A</sup> ± 4,3</b>	n.d.
Ácido vanílico hexosídeo	5,9 ± 0,6	n.d.	n.d.	n.d.
Digaloil (epi)catequina	16,6 <sup>B</sup> ± 1,5	n.d.	23,5 <sup>A</sup> ± 2,8	n.d.
Ácido benzoilbenzoico I	n.d.	8,3 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.	6,5 <sup>B</sup> ± 0,6
Derivado do ácido hidróxibenzoico I	n.d.	9,1 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.	2,4 <sup>B</sup> ± 0,2
Galato de metila	n.d.	<b>171,5<sup>B</sup> ± 11,9</b>	n.d.	<b>253,0<sup>A</sup> ± 2,1</b>
Castalagina	<b>43,8<sup>B</sup> ± 6,2</b>	n.d.	<b>85,5<sup>A</sup> ± 5,2</b>	n.d.
Ácido benzoilbenzoico II	n.d.	8,1 <sup>A</sup> ± 0,6	n.d.	4,8 <sup>B</sup> ± 0,6
Di-HHDP hexosídeo III	60,5 <sup>A</sup> ± 7,7	n.d.	51,2 <sup>A</sup> ± 3,5	n.d.
Dímero de proantocianidina B I	<b>132,3<sup>A</sup> ± 8,5</b>	n.d.	47,6 <sup>B</sup> ± 6,0	n.d.
Ácido cumárico glicosídeo	6,0 <sup>B</sup> ± 0,5	n.d.	57,9 <sup>A</sup> ± 3,3	n.d.
Catequina	<b>229,3<sup>A</sup> ± 7,0</b>	n.d.	<b>168,7<sup>B</sup> ± 9,1</b>	n.d.
(epi)catequina-(epi)catequina	32,6 <sup>A</sup> ± 4,4	n.d.	21,8 <sup>B</sup> ± 3,0	n.d.
Cianidina 3-hexosídeo	n.d.	n.d.	92,9 ± 0,5	n.d.
Di-HHDP hexosídeo IV	54,0 <sup>A</sup> ± 7,3	n.d.	42,8 <sup>B</sup> ± 4,0	n.d.
Derivado de galoil-bis-HHDP	13,2 <sup>B</sup> ± 0,2	n.d.	18,7 <sup>A</sup> ± 1,3	n.d.
Não identificado	n.d.	6,8 <sup>A</sup> ± 0,6	n.d.	4,2 <sup>A</sup> ± 0,3
Galoil-di-HHDP hexosídeo I	20,0 <sup>A</sup> ± 2,5	n.d.	12,4 <sup>B</sup> ± 0,7	n.d.
Derivado do ácido hidróxibenzoico II	n.d.	12,3 <sup>A</sup> ± 1,5	n.d.	14,8 <sup>A</sup> ± 1,2
Dímero de proantocianidina B II	29,8 <sup>A</sup> ± 1,8	n.d.	14,8 <sup>B</sup> ± 1,8	n.d.

(continua)

Composto	AA (CFE)	AA (CFNE)	AV (CFE)	AV (CFNE)
Galoil-bis-HHDP-glicosídeo I	34,5 <sup>A</sup> ± 1,3	n.d.	16,4 <sup>B</sup> ± 1,9	n.d.
HHDP hexosídeo	76,8 <sup>A</sup> ± 1,1	n.d.	43,7 <sup>B</sup> ± 3,0	n.d.
Galoil-di-HHDP hexosídeo II	15,2 <sup>B</sup> ± 1,9	n.d.	25,7 <sup>A</sup> ± 1,7	n.d.
Derivado de (epi)catequina	14,8 <sup>A</sup> ± 0,7	n.d.	7,9 <sup>B</sup> ± 0,7	n.d.
Derivado do ácido cumárico	n.d.	20,9 <sup>A</sup> ± 1,0	n.d.	11,8 <sup>B</sup> ± 1,6
Miricetina hexosídeo	9,5 ± 1,0	n.d.	n.d.	n.d.
Digaloil-HHDP hexosídeo I	16,0 <sup>B</sup> ± 1,5	n.d.	44,0 <sup>A</sup> ± 2,2	n.d.
Galoil-di-HHDP hexosídeo III	9,5 <sup>B</sup> ± 0,9	n.d.	16,5 <sup>A</sup> ± 0,3	n.d.
Galoil-bis-HHDP-glicosídeo II	80,5 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.	45,7 <sup>B</sup> ± 1,9	n.d.
Derivado do ácido cumaroil-quinico	n.d.	4,5 <sup>A</sup> ± 0,0	n.d.	4,2 <sup>A</sup> ± 0,5
Derivado de (epi)catequina	75,3 <sup>A</sup> ± 1,9	n.d.	3,5 <sup>B</sup> ± 0,6	n.d.
Taxifolina hexosídeo	<b>109,2<sup>A</sup> ± 6,0</b>	n.d.	83,1 <sup>B</sup> ± 6,1	n.d.
Ácido benzoilbenzoico III	n.d.	6,2 <sup>A</sup> ± 0,6	n.d.	2,0 <sup>B</sup> ± 0,2
Miricetina pentosídeo I	n.d.	n.d.	5,4 ± 0,7	n.d.
Delfinidina	n.d.	n.d.	n.d.	21,0 ± 0,1
Galoil-di-HHDP hexosídeo IV	6,7 <sup>B</sup> ± 0,9	n.d.	20,2 <sup>A</sup> ± 2,0	n.d.
Digaloil-HHDP hexosídeo II	19,5 <sup>A</sup> ± 2,1	n.d.	15,1 <sup>B</sup> ± 1,2	n.d.
Miricetina pentosídeo II	n.d.	n.d.	5,8 ± 0,7	n.d.
Ácido vanílico	n.d.	53,8 <sup>A</sup> ± 6,0	n.d.	39,5 <sup>A</sup> ± 3,5
Ácido elágico hexosídeo	10,0 <sup>A</sup> ± 1,4	n.d.	12,7 <sup>A</sup> ± 1,0	n.d.
Ácido 2,4-dihidroxibenzóico	n.d.	6,5 <sup>A</sup> ± 1,0	n.d.	5,2 <sup>A</sup> ± 0,3
Galato de proantocianidina B	17,4 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.	8,7 <sup>B</sup> ± 0,9	n.d.
Derivado do ácido abscísico I	9,0 <sup>A</sup> ± 0,6	n.d.	7,5 <sup>A</sup> ± 0,5	n.d.
Derivado do ácido abscísico II	5,2 <sup>B</sup> ± 0,6	n.d.	7,3 <sup>A</sup> ± 0,3	n.d.

(continua)

Composto	AA (CFE)	AA (CFNE)	AV (CFE)	AV (CFNE)
Dímero de proantocianidina B	20,5 <sup>A</sup> ± 2,2	n.d.	9,9 <sup>B</sup> ± 1,1	n.d.
Ácido elágico pentosídeo	n.d.	n.d.	60,5 ± 2,0	n.d.
Cianidina	n.d.	n.d.	n.d.	32,5 ± 0,6
Isômero do ácido cafeico	n.d.	34,1 <sup>A</sup> ± 3,2	n.d.	30,8 <sup>A</sup> ± 2,4
Isofraxidin hexosídeo I	28,2 <sup>A</sup> ± 3,8	n.d.	16,0 <sup>B</sup> ± 0,3	n.d.
Derivado de galagil	25,9 <sup>A</sup> ± 1,9	n.d.	30,9 <sup>A</sup> ± 3,8	n.d.
Quercetina hexosídeo	23,6 <sup>A</sup> ± 0,4	n.d.	16,3 <sup>B</sup> ± 1,8	n.d.
Quercetina glicuronídeo	38,5 <sup>A</sup> ± 4,0	n.d.	17,2 <sup>B</sup> ± 1,7	n.d.
Não identificado	n.d.	19,7 <sup>A</sup> ± 1,9	n.d.	20,7 <sup>A</sup> ± 1,5
Ácido elágico	<b>12,9<sup>B</sup> ± 1,2</b>	<b>6,4<sup>C</sup> ± 0,5</b>	<b>27,2<sup>A</sup> ± 2,0</b>	<b>22,0<sup>A</sup> ± 2,2</b>
Galato de (epi)catequina	3,0 <sup>A</sup> ± 0,1	n.d.	4,8 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.
Ácido diferúlico I	11,0 <sup>A</sup> ± 0,7	n.d.	11,0 <sup>A</sup> ± 0,9	n.d.
Ácido sináptico I	n.d.	4,9 <sup>A</sup> ± 0,1	n.d.	5,5 <sup>A</sup> ± 0,4
Eriodictiol hexosídeo	76,8 <sup>A</sup> ± 0,4	n.d.	41,6 <sup>B</sup> ± 2,4	n.d.
Quercetina-malonil-glicoronídeo I	16,5 <sup>A</sup> ± 1,7	n.d.	12,4 <sup>A</sup> ± 1,0	n.d.
Ácido metil-elágico pentosídeo	3,5 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetina-malonil- glicoronídeo II	11,4 <sup>A</sup> ± 0,5	n.d.	6,4 <sup>B</sup> ± 0,7	n.d.
Isômero do ácido ferúlico	n.d.	6,8 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.	9,9 <sup>A</sup> ± 1,0
Ácido abscísico	8,5 <sup>B</sup> ± 0,1	n.d.	11,7 <sup>A</sup> ± 0,8	n.d.
Ácido sináptico II	n.d.	6,2 <sup>B</sup> ± 0,4	n.d.	10,4 <sup>A</sup> ± 0,8
Derivado de (epi)catequina I	n.d.	15,8 <sup>B</sup> ± 0,8	n.d.	25,1 <sup>A</sup> ± 0,6
Isofraxidin hexosídeo II	5,0 <sup>B</sup> ± 0,3	n.d.	9,3 <sup>A</sup> ± 1,1	n.d.
Não identificado	n.d.	10,2 <sup>B</sup> ± 0,4	n.d.	13,9 <sup>A</sup> ± 1,4
Ácido diferúlico II	6,5 <sup>B</sup> ± 0,8	n.d.	14,5 <sup>A</sup> ± 0,9	n.d.

(continuação)

<b>Composto</b>	<b>AA (CFE)</b>	<b>AA (CFNE)</b>	<b>AV (CFE)</b>	<b>AV (CFNE)</b>
Derivado de (epi)catequina II	n.d	5,4 <sup>B</sup> ± 0,6	n.d	8,2 <sup>A</sup> ± 0,8
Ácido carnosico	n.d.	6,7 <sup>B</sup> ± 0,7	n.d.	23,9 <sup>A</sup> ± 1,6
Derivado de (epi)catequina III	n.d.	38,0 <sup>A</sup> ± 2,2	n.d.	19,2 <sup>B</sup> ± 0,1
Isômero de (epi)catequina	n.d	5,9 <sup>B</sup> ± 0,4	n.d.	9,4 <sup>A</sup> ± 1,3
<b>Concentração de Fenólicos (µg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>1576,4<sup>A</sup> ± 39,9</b>	<b>769,4<sup>C</sup> ± 17,6</b>	<b>1549,5<sup>A</sup> ± 73,3</b>	<b>939,2<sup>B</sup> ± 10,7</b>
<b>Fenólicos totais (CFE + CFNE) (µg.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>2345,8<sup>B</sup> ± 63,2</b>		<b>2488,7<sup>A</sup> ± 80,2</b>	

**Nota:** Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).  
n.d. = abaixo dos limites de detecção e quantificação (Tabela 11).

Entre frutas do mesmo tipo, os dados na literatura também variam significativamente. Para o pêssego e a nectarina, foram encontrados 15% e 13% (m/m) de proantocianidinas na fração de CFNE, respectivamente (Hellström et al., 2009), enquanto Arranz e colaboradores (2009) relataram para as mesmas frutas os valores de 87% e 95% (m/m) de proantocianidinas CFNE, respectivamente. Essa grande variação deve-se, em parte, pelo grau de maturação da fruta. Anéis aromáticos hidrofóbicos e grupos hidroxilas hidrofílicos se ligam em diversos pontos com os polissacarídeos e proteínas na parede celular e são afetados pela maturação da fruta, fazendo com que os compostos fenólicos sejam mais facilmente extraídos ou não (Quirós-Sauceda et al., 2014).

O método de extração dos CFE pode afetar também o teor de CFNE obtido. Estudos com CFNE realizam apenas uma extração dos CFE antes de realizar a hidrólise para liberação dos CFNE (Durazzo, 2018; Esparza-Martínez et al., 2016; Ravisankar et al., 2018). Com apenas uma extração, a amostra não é exaurida completamente fazendo com que resíduos de CFE permaneçam na matriz. Assim, a quantificação de CFNE fica superestimada pois parte dos compostos fenólicos presentes no extrato são, na verdade, CFE.

Diferentemente ao que foi relatado previamente na literatura, a catequina foi encontrada como o composto fenólico majoritário nos araçás amarelo e vermelho com 229,3 e 168,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Esse resultado não concorda com trabalhos anteriores que relatam o ácido elágico como composto majoritário em polpa e casca de araçá (Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014). Nesses estudos mencionados, a quantificação foi realizada por HPLC-DAD somente em relação ao ácido gálico, podendo haver uma distorção de valores na quantificação de compostos com características de absorção UV-Vis diferente do padrão utilizado. A epicatequina, isômero da catequina, foi o composto majoritário relatado para o araçá amarelo e vermelho em um estudo no qual foi utilizado somente o padrão de epicatequina para comparação, podendo ser um erro de identificação pela falta de padrão analítico de catequina (Medina et al., 2011).

No araçá amarelo, o composto com a segunda maior concentração foi o dímero de proantocianidina B (132,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Esse composto não havia sido relatado



em araçá, porém, foi o composto majoritário encontrado em polpa e casca de goiaba da Costa Rica (*P. friedrichsthalianum*), fruta semelhante ao araçá (Rojas-Garbanzo et al., 2019). As condições de armazenamento pós-colheita podem alterar a composição de proantocianidinas. Mudanças pós-colheita no metabolismo de algumas frutas foram relatadas como acúmulo de acetaldeído, seguido por sua condensação com proantocianidinas. Acredita-se que os produtos resultantes, derivados de proantocianidina ligados a etila, sejam fracamente extraíveis e produzem novos derivados além daqueles formados a partir de proantocianidinas puras, como a catequina e epicatequina (Tamura et al., 1999). Da mesma forma, a conversão de proantocianidinas para outros compostos e sua ligação com outros polímeros vegetais tem sido relatada em uvas durante o amadurecimento (Tarascou et al., 2010).

A taxifolina hexosídeo é o terceiro composto com a maior concentração no araçá amarelo com  $109,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . A taxifolina é uma aglicona de astilbina, um flavonol hidrossolúvel encontrado em ervas e facilmente extraível (Zhang & Cheung, 2010). Esse composto já foi relatado em araçá como o terceiro de maior concentração (Silva et al., 2014).

Sobre os CFE no araçá amarelo e vermelho, podemos destacar a vescalagina ( $42,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $77,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente) e a castalagina ( $43,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $85,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente), derivados do ácido elágico. Esses compostos foram relatados pela primeira vez em araçá neste trabalho e apresentam-se em altas concentrações. A castalagina foi relatada em menores quantidade que a vescalagina em extratos vegetais pois a única diferença estrutural entre elas, a orientação do grupo OH em C1 (**Figura 11**), é responsável pela maior estabilidade da vescalagina (Quideau et al., 2010). Nos extratos de araçá os valores obtidos para os dois isômeros foram muito próximos, possivelmente devido à extração exaustiva ter sido conduzida a temperaturas controladas diminuindo a chance de degradação da castalagina.

Dentre todos os compostos fenólicos encontrados, apenas dois deles apareceram em ambas frações (CFE e CFNE) dos araçás, nomeadamente o ácido gálico e o ácido elágico. O ácido gálico foi encontrado na mesma concentração ( $p > 0,05$ ) nas frações de CFE e CFNE no araçá amarelo enquanto que, no araçá

vermelho, a concentração desse composto foi quase 4 vezes maior na fração CFNE. Outros autores encontraram valores maiores de ácido gálico na fração de CFNE em relação a fração CFE em maçãs e tangerina (Arranz et al., 2009; Esparza-Martínez et al., 2016), e pode ser explicado pela forma química que o ácido gálico está presente em algumas frutas. Na fração de CFE são encontrados diversos polímeros de ácido gálico e galatos. Devido a sua alta massa molecular, a maioria desses compostos ficam retidos ligados covalentemente à hemicelulose da parede celular vegetal e não são facilmente extraídos. A hidrólise ácida não só rompe essas ligações com a matriz vegetal como hidrolisa também esses polímeros liberando o ácido gálico na sua forma livre (Esparza-Martínez et al., 2016; Garcia-villalba et al., 2015).

O ácido elágico foi encontrado em concentrações similares ( $p > 0,05$ ) nas frações CFE e CFNE do araçá vermelho. No araçá amarelo foi encontrado menor quantidade de ácido elágico na fração CFNE em relação a CFE. Assim como o ácido gálico, o ácido elágico da fração de CFNE é proveniente dos elagitaninos presentes em grande quantidade no araçá (como vescalagina e castalagina). Esses compostos de alta massa molecular não são totalmente extraídos na fração de CFE, sendo necessária a realização da hidrólise. Comportamento semelhante foi observado em castanha-do-pará (John & Shahidi, 2010). O araçá vermelho apresentou quantidade maior ( $p < 0,05$ ) dos elagitaninos castalagina e vescalagina em comparação ao araçá amarelo, da mesma forma, possui maior quantidade de ácido elágico. Em pastas de romã e uva, o ácido elágico foi encontrado em concentração cinco vezes maior na fração de CFNE em relação a de CFE (Pérez-Ramírez et al., 2018), já que essas frutas são ricas em elagitaninos.

Dentre os CFNE nos araçás, o galato de metila, derivado do ácido gálico, foi composto majoritário nos dois genótipos do araçá (**Tabela 12**) com 171,5 e 253,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Como mencionado anteriormente, esse resultado mostra que grande parte dos compostos fenólicos ligados a matriz são polímeros com algum grau de galoilação. Isso está de acordo com estudos com CFNE em tangerina que encontraram 25 vezes mais ácido gálico do que na fração de CFE (Esparza-Martínez et al., 2016). Em pasta de romã e uva utilizadas como suplemento

nutricional, o galato de metila foi o composto com a terceira maior concentração após a hidrólise ácida (Pérez-Ramírez et al., 2018).

Os derivados do ácido *p*-cumárico e ferúlico, *p*-coumaroil-feruloilglicerol I, II e III somados correspondem a uma importante fração dos CFNE do araçá amarelo e vermelho. Esses compostos não haviam sido relatados em araçá ou em frações de CFNE de outras frutas estudadas. A mesma situação acontece com o composto com a segunda maior concentração na fração de CFNE do araçá vermelho, o ácido 3-O-cafeoil-chiquímico com 87,1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Porém, o ácido ferúlico foi o composto fenólico majoritário encontrado em maçã, pêssigo e nectarina após a hidrólise ácida (Arranz et al., 2009). Assim como o ácido ferúlico, os ácidos *p*-cumárico e cafeico também são frequentemente encontrados nas frações de CFNE estudadas em frutas e vegetais (Navarro-González et al., 2011; Peng et al., 2017; Ye et al., 2011).

Na fração de CFNE do araçá amarelo e vermelho, o ácido vanílico foi o composto com a segunda e terceira maior concentração respectivamente (53,8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e 39,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Esse composto foi relatado na fração de CFE de araçá amarelo na forma de hexosídeo (Silva et al., 2014). O ácido vanílico foi o composto com a segunda maior concentração encontrado em grãos de malte após hidrólise alcalina (Szwajgier, 2011) e encontrado em baixa concentração em pasta de romã e uva e nas frutas maçã e pêssigo após a hidrólise ácida (Arranz et al., 2009; Pérez-Ramírez et al., 2018).

Em geral, os valores relatados na literatura para o teor de fenólicos totais no araçá possuem grande variação já que muitos expressam seus resultados em relação a fruta fresca ou extrato aquoso da fruta, diferentemente deste trabalho que partiu da fruta liofilizada. Os teores verificados no presente estudo foram até 20 vezes inferiores ao relatado previamente para o araçá (Biegelmeier et al., 2011; Medina et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Silva et al., 2014). A hipótese é que essa diferença nos teores encontrados esteja relacionada ao método analítico utilizado em trabalhos prévios. Na maioria desses trabalhos a quantificação foi realizada utilizando o método *Folin-Ciocalteu*, o qual é susceptível a um grande número de interferentes presentes nos extratos e está sendo questionado quanto a sua

utilização como um método para quantificação de compostos fenólicos (Granato et al., 2018).

A hipótese de superestimação no teor de fenólicos totais foi testada pela aplicação do método *Folin-Ciocalteu* (FC) aos extratos dos araçás amarelo e vermelho. Ao utilizar o método FC foram encontrados teores 3 a 9 vezes superiores (**Tabela 13**) aos encontrados pela aplicação da LC-MS. Isso está de acordo com estudo de Escarpa & González (2001) que relataram concentrações de compostos fenólicos até cinco vezes superiores àquelas utilizando HPLC-DAD em amostras de frutas e vegetais.

**Tabela 13. Comparação de quantificação de compostos fenólicos em araçá amarelo (AA) e vermelho (AV) liofilizados.**

	LC-MS ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	FC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
AA CFE	1604 $\pm$ 46	5501 $\pm$ 222
AA CFNE	773 $\pm$ 18	6878 $\pm$ 405
AV CFE	1578 $\pm$ 73	5916 $\pm$ 489
AV CFNE	934 $\pm$ 16	4877 $\pm$ 57

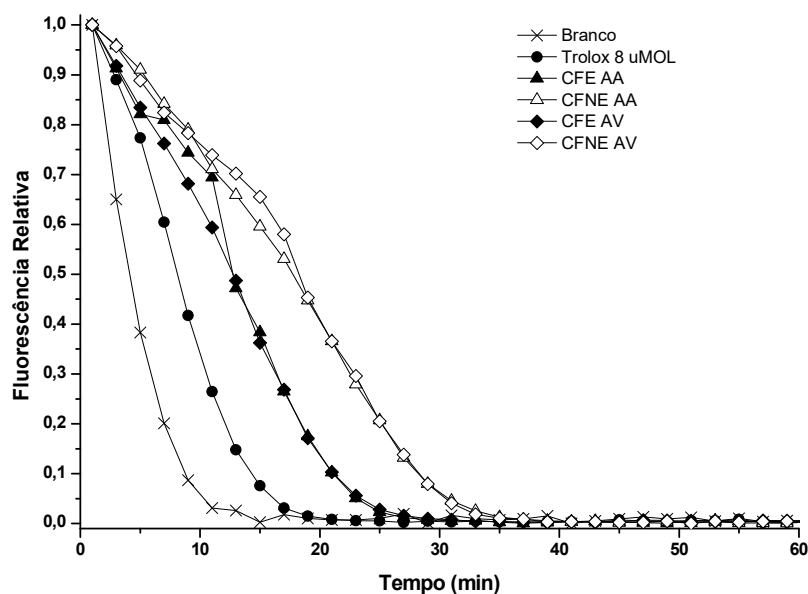
<sup>a</sup>Quantificação realizada pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

#### 5.4. Capacidade de desativação do radical peroxila (ROO<sup>•</sup>)

Ambas as frações CFE e CFNE apresentaram capacidade de desativar o ROO<sup>•</sup> de uma forma dose-dependente (**Figura 14**). Apesar da concentração da fração CFNE representar um terço do total de compostos fenólicos totais, a sua capacidade antioxidante corresponde a 60% da capacidade antioxidante total do extrato (**Tabela 14**). Esse resultado concorda com resultados da literatura, tais como aqueles encontrados para tangerina (Esparza-Martínez et al., 2016) e castanha-do-pará (John & Shahidi, 2010).

A explicação dos resultados encontrados para a capacidade antioxidante está diretamente relacionada aos mecanismos pelos quais os compostos fenólicos podem desativar o ROO<sup>•</sup>. Na literatura são relatados três mecanismos pelos quais

os compostos fenólicos podem desativar esse radical, nomeadamente: (1) transferência de elétrons, (2) transferência de hidrogênio, e (3) formação de aduto. O mecanismo principal dos compostos fenólicos para eliminar ROO• envolve a transferência de hidrogênio (Rodrigues et al., 2013b).



**Figura 14. Decaimento de fluorescência para os extratos de CFE e CFNE do araçá amarelo (AA) e do araçá vermelho (AV) ao longo do tempo pelo método ORAC.**

Estudos tem demonstrado que os ácidos fenólicos possuem maior habilidade de doar íons  $H^+$  (Robbins, 2003). Substituintes no anel aromático afetam a estabilização e, portanto, afetam a capacidade desses ácidos fenólicos de desativação do radical peroxila. A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta de acordo com o grau de hidroxilação, por exemplo, o ácido gálico com três hidroxilas apresenta alta atividade antioxidante. Ao contrário do ácido siríngico que com grupos metoxila nas posições 3 e 5 tem menor capacidade de desativação do radical (Angelo & Jorge, 2007).

**Tabela 14. Capacidade de desativação de ROO• dos extratos de CFE e CFNE do araçá amarelo e vermelho expressa em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes por g de extrato liofilizado**

Amostras	Capacidade de desativar o ROO• ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ )
CFE do araçá amarelo	$663,9^B \pm 6,8$
CFNE do araçá amarelo	$901,1^A \pm 24,3$
CFE do araçá vermelho	$667,5^B \pm 16,1$
CFNE do araçá vermelho	$902,1^A \pm 16,0$

**Nota:** Valores seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Estudos prévios, realizados com frutas típicas da Mauritània, já haviam reportado que o araçá possui quase sete vezes mais capacidade antioxidante do que outras frutas similares como a goiaba. Os níveis reportados foram de  $310 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  para o genótipo amarelo e  $324 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$  para o vermelho. Essas diferenças de valores observadas devem-se aos diferentes métodos de extração, bem como as características de cultivo de cada região (Luximon-Ramma et al., 2003).

Os valores encontrados neste trabalho foram os mais altos já reportados para a fração CFE do araçá. O extrato produzido da fração de CFE foi obtido por extração exaustiva ( $n=8$ ), ao contrário dos demais trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante da fruta (Luximon-Ramma et al., 2003; McCook-Russell et al., 2012; Medina et al., 2011; Ribeiro et al., 2014). Além disso, este é o primeiro estudo que analisa a capacidade antioxidante da fração de CFNE do araçá.

A quantificação dos compostos fenólicos obtidos do extrato liofilizado encontra-se no apêndice D. Os extratos de CFNE, que apresentaram maior capacidade de desativação do radical peroxila, possuem mais de 50 % da sua composição de ácidos fenólicos. Esse resultado concorda com a hipótese de que os ácidos fenólicos possuem maior capacidade antioxidante em relação aos demais compostos fenólicos. O extrato de CFNE do araçá amarelo tem como composto majoritário o derivado do ácido *p*-cumárico e ferúlico, *p*-cumaroil-feruloil-glicerol III. No extrato de CFNE do araçá vermelho, o composto majoritário é o ácido gálico.

Enquanto que nos CFE dos araçás amarelo e vermelho, os compostos majoritários foram os flavonoides catequina e galocatequina, respectivamente.

O interesse na capacidade antioxidante associados aos ácidos fenólicos tem recebido mais atenção na literatura recente por causa de sua presença na maioria das frutas e vegetais (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). O estudo dos CFNE nessas fontes torna-se essencial para explorar a capacidade antioxidante real de frutas e vegetais.

## 6. CONCLUSÃO

A fração de CFNE do araçá amarelo e vermelho representa uma parte significativa dos compostos fenólicos totais. Além disso, a fração de CFNE possui uma elevada capacidade antioxidante. Essa maior capacidade antioxidante está diretamente relacionada a diferença na composição fenólica da fração CFE e CFNE.

Este estudo reforça a relevância dos CFNE para o teor total de compostos fenólicos das plantas. Nos araçás, essa fração representa aproximadamente 33% dos compostos fenólicos totais da fruta que ficam ligados à parede celular vegetal e não são explorados. Essa fração do araçá avaliada pela primeira vez neste estudo é rica em ácidos fenólicos, os maiores responsáveis pela capacidade antioxidante da fruta.

O araçá foi uma das primeiras frutas nativas do Brasil a ter sua fração de CFNE estudada, na literatura encontra-se dados somente sobre frutas comumente consumidas na Europa. O conhecimento do perfil de CFNE de demais frutas brasileiras é essencial para o conhecimento da capacidade antioxidante real das mesmas e seus possíveis efeitos benéficos a saúde.



## 7. PERSPECTIVAS

Este estudo foi o primeiro do grupo de pesquisa sobre os CFNE. Trata-se de um estudo inicial, sendo que durante o seu desenvolvimento surgiram ideias de novos trabalhos que podem ser desenvolvidos:

- a) Determinação de CFNE de outras frutas nativas do Brasil e avaliação da capacidade antioxidante desta fração.
- b) Estudo da bioacessibilidade *in vitro* dos CFNE para conhecimento do seu comportamento durante a digestão gastrointestinal.
- c) Estudo da biodisponibilidade *in vivo* dos CFNE para determinação do percentual de absorção desses compostos bem como seus efeitos na microbiota intestinal.

## 8. REFERÊNCIAS

- Ahmad, N., Zuo, Y., Lu, X., Anwar, F., & Hameed, S. (2016). Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. *Food Chemistry*, *190*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.077>
- Andlauer, Stumpf, Hubert, Rings, & Fürst. (2003). Influence of Cooking Process on Phenolic Marker Compounds of Vegetables. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *73*(2), 152–159. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.73.2.152>
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Phenolic compounds in foods – A brief review. *Rev Inst Adolfo Lutz*, *66*(1), 1–9.
- Arranz, S., & Calixto, S. (2010). Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*, *51*, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.006>
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(16), 7298–7303. <https://doi.org/10.1021/jf9016652>
- Arsand, J. B. (2015). *Desenvolvimento e validação de método de Screening por LC-QToF-MS e método quantitativo por LC-MS/MS para análise de antibióticos da classe aminoglicosídeos em alimentos de origem animal*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.
- Arts, I. C. W., Putte, B. Van De, & Hollman, P. C. H. (2000). Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands . 1 . Fruits , Vegetables , Staple Foods , and Processed Foods. *J. Agric. Food Chem*, *48*, 1746–1751.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018). *Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, *89*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Azevedo, J., Fernandes, A., Oliveira, J., Brás, N. F., Reis, S., Lopes, P., ... De Freitas, V. (2017). Reactivity of cork extracts with (+)-catechin and malvidin-3-O-glucoside in wine model solutions: Identification of a new family of ellagitannin-derived compounds (corklins). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(39), 8714–8726. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02845>

- Balisteiro, D. M., Alezandro, M. R., & Genovese, M. I. (2013). Characterization and effect of clarified araçá (*Psidium guineenses* Sw.) juice on postprandial glycemia in healthy subjects. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 66–74. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500011>
- Bertrand, C., Noirot, M., Doulebeau, S., De Kochko, A., Hamon, S., & Campa, C. (2003). Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae* Qualitative comparison with leaves. *Plant Science*, 165(6), 1355–1361. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.07.002>
- Biegelmeyer, R., Andrade, J. M. M., Aboy, A. L., Apel, M. A., Dresch, R. R., Marin, R., ... Henriques, A. T. (2011). Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum*var.*lucidum*) Strawberry Guava Fruit. *Journal of Food Science*, 76(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x>
- Boskou, G. (2010). Antioxidant Capacity and Phenolic Profile of Table Olives from the Greek Market. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 925–934). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00099-1>
- Bronsema, K. J., Bischoff, R., & Van de Merbel, N. C. (2012). Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 893–894, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.021>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Chaves, V. C., Boff, L., Vizzotto, M., Calvete, E., Reginatto, F. H., & Simões, C. M. O. (2018). Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4331–4338. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8959>
- Chen, H. Y., Lin, Y. C., & Hsieh, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104(4), 1418–1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.004>
- Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5884–5892.
- Chyba, A., Mastihubová, M., & Mastihuba, V. (2016). Regioselective galloylation of methyl  $\beta$ -D-glucopyranoside by a lipase. *Monatshefte Fur Chemie*, 147(6), 1137–1142. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1696-8>

- Comandini, P., Lerma-García, M. J., Simó-Alfonso, E. F., & Toschi, T. G. (2014). Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD-MS. *Food Chemistry*, *157*, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.003>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, *26*(8), 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S., & Black, C. (1997). Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(3), 590–595.
- Cui, X. X., Yang, X., Wang, H. J., Rong, X. Y., Jing, S., Xie, Y. H., ... Zhao, C. (2017). Luteolin-7-O-Glucoside present in lettuce extracts inhibits hepatitis B surface antigen production and viral replication by human hepatoma cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*, *8*(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02425>
- Dalla Nora, C., Jablonski, A., Rios, A. de O., Hertz, P. F., de Jong, E. V., & Flôres, S. H. (2014). The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(8), 1842–1849. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12493>
- Díaz-de-Cerio, E., Tylewicz, U., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., & Romani, S. (2017). Design of Sonotrode Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Psidium guajava* L. Leaves. *Food Analytical Methods*, *10*(8), 2781–2791. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0836-z>
- Dou, J., Lee, V. S. Y., Tzen, J. T. C., & Lee, M. R. (2007). Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(18), 7462–7468. <https://doi.org/10.1021/jf0718603>
- Durazzo, A. (2018). Extractable and Non-extractable Polyphenols: an Overview. In *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health* (p. 382). Retrieved from <https://pubs.rsc.org/en/content/chapterpdf/2018/9781788013208-00037?isbn=978-1-78801-106-8&sercode=bk>
- Escarpa, A., & González, M. C. (2000). Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars. *Chromatographia*, *51*(1–2), 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02490693>

- Escarpa, A., & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01188-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01188-0)
- Esparza-Martínez, F. J., Miranda-López, R., Mata-Sánchez, S. M., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2016). Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. *Plant Foods Hum Nutr*, 71, 294–300. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0559-0>
- Fetter, M. da R., Vizzoto, M., & Corbelini, Diandra Dutra Goonzalez, T. N. (2010). Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13(EE01), 92–95. <https://doi.org/10.4260/BJFT20101304115>
- Gadetskaya, A. V., Mohamed, S. M., Tarawneh, A. H., Mohamed, N. M., Ma, G., Ponomarev, B. N., ... Ross, S. A. (2017). Phytochemical characterization and biological activity of secondary metabolites from three *Limonium* species. *Medicinal Chemistry Research*, 26(11), 2743–2750. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1973-z>
- Garcia-villalba, R., Espín, J. C., Kroon, P. A., Alasalvar, C., Heinonen, M., Voorspoels, S., & Tomas-barberan, F. (2015). Article A validated method for the characterization and quantification of extractable and non-extractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits , juices , and extracts . <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02062>
- Garzón, G. A., Narvárez-Cuenca, C. E., Vincken, J. P., & Gruppen, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. *Food Chemistry*, 217(February), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.107>
- Gomes, F. P. (1990). *Curso De Estatística Experimental* (13th ed.). Piracicaba: Livraria Nobel S.A. Retrieved from <https://www.passeidireto.com/arquivo/6026215/livro-curso-de-estatistica-experimental-pimentel-gomes>
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*, 42(7), 840–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.010>
- Gonzales, G. B., Raes, K., Vanhoutte, H., Coelus, S., Smaghe, G., & Van Camp, J. (2015). Liquid chromatography-mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams. *Journal of Chromatography A*, 1402, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.009>

- González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Romo-Vaquero, M., Alasalvar, C., Örem, A., Zafrilla, P., ... Espín, J. C. (2017). Clustering according to urolithin metabotype explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600830>
- Gorinstein, S., Cvikrová, M., Machackova, I., Haruenkit, R., Park, Y.-S., Jung, S.-T., ... Trakhtenberg, S. (2004). Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and white grapefruits. *Food Chemistry*, *84*(4), 503–510. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00127-4)
- Grace, M. H., Qiang, Y., Sang, S., & Lila, M. A. (2017). One-step isolation of carnosic acid and carnosol from rosemary by centrifugal partition chromatography. *Journal of Separation Science*, *40*(5), 1057–1062. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601063>
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, *264*(March), 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry Second Edition* (second). Heidelberg: Springer Heidelberg Dordrecht London New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>
- Guilbault, G. ., & Hjelm, M. (1989). Nomenclature for automated and mechanised analysis. *Pure&Appl. Chem*, *61*(9), 1657–1664.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid Content of U . S . Fruits , Vegetables , and Nuts. *J. Agric. Food Chem*, *54*, 9966–9977.
- He, Z., & Xia, W. (2007). Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry*, *105*(3), 1307–1311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.049>
- Hellström, J. K., Törrönen, A. R., & Mattila, P. H. (2009). Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(17), 7899–7906. <https://doi.org/10.1021/jf901434d>
- Hoffmann, E. (2005). *Mass Spectrometry. Mass Spectrometry: Principles and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>

- Horwitz, W. (2012). *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. Gaithersburg. Retrieved from [www.AOAC.org](http://www.AOAC.org)
- ICH, E. W. G. (2005). *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. [https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
- INMETRO. (2003). Orientações Sobre Validação De Métodos De Ensaio Químicos - Doq-Cgcre-008. *Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial*. Retrieved from [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_01.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_01.pdf)
- Jaganath, I. B., Mullen, W., Lean, M. E. J., Edwards, C. A., & Crozier, A. (2009). In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(3), 1180–1189. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.031>
- Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, F., & Kuhnert, N. (2010). Profiling and Characterization by LC-MS n of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Mate ( *Ilex paraguariensis* ). *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 5471–5484. <https://doi.org/10.1021/jf904537z>
- John, J. A., & Shahidi, F. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of Functional Foods*, 2(3), 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>
- Kamada, Y., Yakabu, H., Ichiba, T., Tamanaha, A., Shimoji, M., Kato, M., ... Tanaka, Y. (2018). Castalagin and vescalagin purified from leaves of *Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & L.M. Perry: Dual inhibitory activity against PARP1 and DNA topoisomerase II. *Fitoterapia*, 129(June), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.06.015>
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351), 327–336. <https://doi.org/10.1038/nature10213>
- Khallouki, F., Haubner, R., Ricarte, I., Erben, G., Klika, K., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2015). Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits. *Food Chemistry*, 179, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.103>
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>

- Kolniak-ostek, J. (2016). Journal of Food Composition and Analysis Identification and quantification of polyphenolic compounds in ten pear cultivars by UPLC-PDA-Q / TOF-MS, 49, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.004>
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., ... Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). *Food Chem* (Vol. 30). UTC. Retrieved from <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- La Barbera, G., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Montone, C. M., Piovesana, S., Samperi, R., ... Laganà, A. (2017). Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages. *Food Research International*, 100, 28–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.080>
- Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W., & Brown, S. K. (1990). Enzymic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 99–101. <https://doi.org/10.1021/jf00091a019>
- Li, C. W., Dong, H. J., & Cui, C. Bin. (2015). The synthesis and antitumor activity of twelve galloyl glucosides. *Molecules*, 20(2), 2034–2060. <https://doi.org/10.3390/molecules20022034>
- Li, Z. H., Guo, H., Xu, W. Bin, Ge, J., Li, X., Alimu, M., & He, D. J. (2016). Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 805–810. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2010). Phenolic component profiles of mustard greens, Yu Choy, and 15 other Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6850–6857. <https://doi.org/10.1021/jf1004786>
- Liu, Z., Wu, H. L., Xie, L. X., Hu, Y., Fang, H., Sun, X. D., ... Yu, R. Q. (2017). Direct and interference-free determination of thirteen phenolic compounds in red wines using a chemometrics-assisted HPLC-DAD strategy for authentication of vintage year. *Analytical Methods*, 9(22), 3361–3374. <https://doi.org/10.1039/c7ay00415j>
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., & Crozier, A. (2003). Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 496–502. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1365>



- Ma, C., Xiao, S. yuan, Li, Z. guo, Wang, W., & Du, L. jun. (2007). Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165(1–2), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.060>
- Macagnan, F. T., Bender, A. B. B., & Speroni, C. S. (2018). CHAPTER 2. Dietary Fiber and Non-extractable Polyphenols. In *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids* (pp. 1–36). <https://doi.org/10.1039/9781788013208-00017>
- Machado, A. J. T., Santos, A. T. L., Martins, G. M. A. B., Cruz, R. P., Costa, M. do S., Campina, F. F., ... Morais-Braga, M. F. B. (2018). Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 119(January), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.018>
- Mares, J. (2015). Food antioxidants to prevent cataract. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(10), 1048–1049. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.15301>
- Martínez-Valverde, I., Periago, Ma. J., Chesson, A., & Provan, G. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323–330. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1035>
- Martínez-Valverde, I., Periago, Ma. J., Chesson, A., Provan, G., Kris-Etherton, P. M., Etherton, T. D., ... Rosso, V. V. (2002). Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. *Analytica Chimica Acta*, 8(3), 165–183. <https://doi.org/10.1177/0973174113494599>
- McCook-Russell, K. P., Nair, M. G., Facey, P. C., & Bowen-Forbes, C. S. (2012). Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. *Food Chemistry*, 134(2), 1069–1073. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.018>
- Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., da Silva, W. P., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119>
- Méndez, C. del M. V., Forster, M. P., Rodríguez-Delgado, M. Á., Rodríguez-Rodríguez, E. M., & Romero, C. D. (2003). Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. *European Food Research and Technology*, 217(4), 287–290. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0762-8>
- Mesquita, E., & Monteiro, M. (2018). Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice. *Food Research International*, 106(December 2017), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.025>

- Meyer, A. S., Jepsen, S. M., & Sørensen, N. S. (1998). Enzymatic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2439–2446. <https://doi.org/10.1021/jf971012f>
- Mezni, F., Slama, A., Ksouri, R., Hamdaoui, G., Khouja, M. L., & Khaldi, A. (2018). Phenolic profile and effect of growing area on Pistacia lentiscus seed oil. *Food Chemistry*, 257(November 2017), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.019>
- Mikulic-petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). HPLC – MS n identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *FOOD CHEMISTRY*, 135(4), 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.115>
- Monagas, M., Khan, N., Andrés-Lacueva, C., Urpí-Sardá, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2009). Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition*, 102(2), 201–206. <https://doi.org/10.1017/S0007114508162110>
- Mota, F. S., Beirsdorf, M. I. C., & Acosta, M. J. (1986). Estação Agroclimatológica de Pelotas: realizações e programa de trabalho. Pelotas.
- Motilva, M. J., Serra, A., & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292, 66–82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.012>
- Moussa-Ayoub, E., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). Analytical Methods Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.032>
- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44(5), 1528–1535. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.005>
- Nora, C. D., Müller, C. D. R., de Bona, G. S., Rios, A. de O., Hertz, P. F., Jablonski, A., ... Flôres, S. H. (2014). Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.01.006>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>

- Padilha, C. V. da S., Miskinis, G. A., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. dos S. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Pascual-Serrano, A., Arola-Arnal, A., Suárez-García, S., Bravo, F. I., Suárez, M., Arola, L., & Bladé, C. (2017). Grape seed proanthocyanidin supplementation reduces adipocyte size and increases adipocyte number in obese rats. *International Journal of Obesity*, 41(8), 1246–1255. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.90>
- Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. G. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331–5337. <https://doi.org/10.1021/jf000549h>
- Patel, S. (2012). Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: A review on prospects and threats. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11(3), 243–248. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9269-8>
- Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., ... Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.102>
- Peng, H., Li, W., Li, H., Deng, Z., & Zhang, B. (2017). Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *Journal of Functional Foods*, 32, 296–312. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.003>
- Pereira, E., Vinholes, J., C. Franzon, R., Dalmazo, G., Vizzotto, M., & Nora, L. (2018). *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry*, 258, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.024>
- Pereira, V., Câmara, J. S., Cacho, J., & Marques, J. C. (2010). HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1204–1215. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900784>
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), 118–129. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000097>
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007>

- Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12713–12724. <https://doi.org/10.1021/jf203372w>
- Pérez-Ramírez, I. F., Reynoso-Camacho, R., Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (2018). Comprehensive Characterization of Extractable and Nonextractable Phenolic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight of a Grape/Pomegranate Pomace Dietary Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(3), 661–673. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05901>
- Praud, D., Parpinel, M., Guercio, V., Bosetti, C., Serraino, D., Facchini, G., ... Rossi, M. (2018). Proanthocyanidins and the risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Causes and Control*, 29(2), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s10552-018-1002-7>
- Quideau, S., Jourdes, M., & Lefeuvre, D. (2010). *Ellagitannins – An Underestimated Class of Plant Polyphenols: Chemical Reactivity of C -Glucosidic Ellagitannins in Relation to Wine Chemistry and Biological Activity* (Vol. 2).
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 169, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. ., Ayala-Zavala, J. F., Bello, L. A., Álvarez-Parrilla, E., ... González-Aguilar, G. . (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function*, 5(6), 1063–1095.
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). *Department of Food Materials and Process Design Engineering , Faculty of Food Science. Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.009>
- Ravisankar, S., Abegaz, K., & Awika, J. M. (2018). Structural profile of soluble and bound phenolic compounds in teff (*Eragrostis tef*) reveals abundance of distinctly different flavones in white and brown varieties. *Food Chemistry*, 263(April), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.002>
- Rebello, G., Mota, A., Becker, P., Teixeira, M., Castillo-muñoz, N., & Hermosín-gutiérrez, I. (2014). Flour of banana ( *Musa AAA* ) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. *FRIN*, 55, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.039>
- Ribeiro, A. B., Chisté, R. C., Freitas, M., Da Silva, A. F., Visentainer, J. V., & Fernandes, E. (2014). *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 165, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.079>

- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem*, 51, 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Rockenbach, I. I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R., & Galensa, R. (2012). Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Research International*, 48(2), 848–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.001>
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2013a). Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 3022–3029. <https://doi.org/10.1021/jf3054214>
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., & Mercadante, A. Z. (2013b). Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum* , an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 3022–3029. <https://doi.org/10.1021/jf3054214>
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., ... Crozier, A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch Toxicol*, 3, 1803–1853. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Rohr, G. E., Meier, B., & Sticher, O. (2000). Analysis of procyanidins. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21(1), 497–570. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80013-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80013-7)
- Rojas-Garbanzo, C., Winter, J., Montero, M. L., Zimmermann, B. F., & Schieber, A. (2019). Characterization of phytochemicals in Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum* -Nied.) fruit and stability of main compounds during juice processing - (U)HPLC-DAD-ESI-TQD-MSn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 75(May 2018), 26–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.012>
- Russell, W. R., Labat, A., Scobbie, L., Duncan, G. J., & Duthie, G. G. (2009). Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland OH HO OH OH OH OH OH OH OH HO HO OH OH OH OH OH. *Food Chemistry*, 115(1), 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.086>
- Safari Garden. (2018). Muda de Araçá Vermelho e Amarelo - Safari Garden. Retrieved January 8, 2019, from <https://www.safarigarden.com.br/muda-de-araca-rosa-ou-araca-vermelho>
- Sambanthamurthi, R., Tan, Y., Sundram, K., Abeywardena, M., Sambandan, T. G., Rha, C., ... Basri Wahid, M. (2011). Oil palm vegetation liquor: A new source of phenolic bioactives. *British Journal of Nutrition*, 106(11), 1655–1663. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002121>

- Scordino, M., Sabatino, L., Muratore, A., Belligno, A., & Gagliano, G. (2012). PHENOLIC CHARACTERIZATION OF SICILIAN YELLOW FLESH PEACH ( PRUNUS PERSICA L .) CULTIVARS AT DIFFERENT RIPENING STAGES. *Journal of Food Quality*, 35, 255–262.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, 190, 808–817. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.029>
- Shi, J., Li, G., Zhang, R., Zheng, J., Suo, Y., You, J., & Liu, Y. J. (2011). A validated HPLC-DAD-MS method for identifying and determining the bioactive components of two kinds of Luobuma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(7), 537–547. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.546173>
- Silva, N. A. Da, Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & De Rosso, V. V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5072–5084. <https://doi.org/10.1021/jf501211p>
- Simirgiotis, M. J., Caligari, P. D. S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 115(2), 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.071>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. J. (1965). COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH - Copy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- Sisó-Terraza, P., Luis-Villarroya, A., Fourcroy, P., Briat, J.-F., Abadía, A., Gaymard, F., ... Álvarez-Fernández, A. (2016). Accumulation and Secretion of Coumarinolignans and other Coumarins in *Arabidopsis thaliana* Roots in Response to Iron Deficiency at High pH. *Frontiers in Plant Science*, 7(November), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01711>
- Slaghenaufi, D., Franc, C., Mora, N., Marchand, S., Perello, M. C., & Revel, G. de. (2016). Quantification of three galloylglucoside flavour precursors by liquid chromatography tandem mass spectrometry in brandies aged in oak wood barrels. *Journal of Chromatography A*, 1442, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.007>

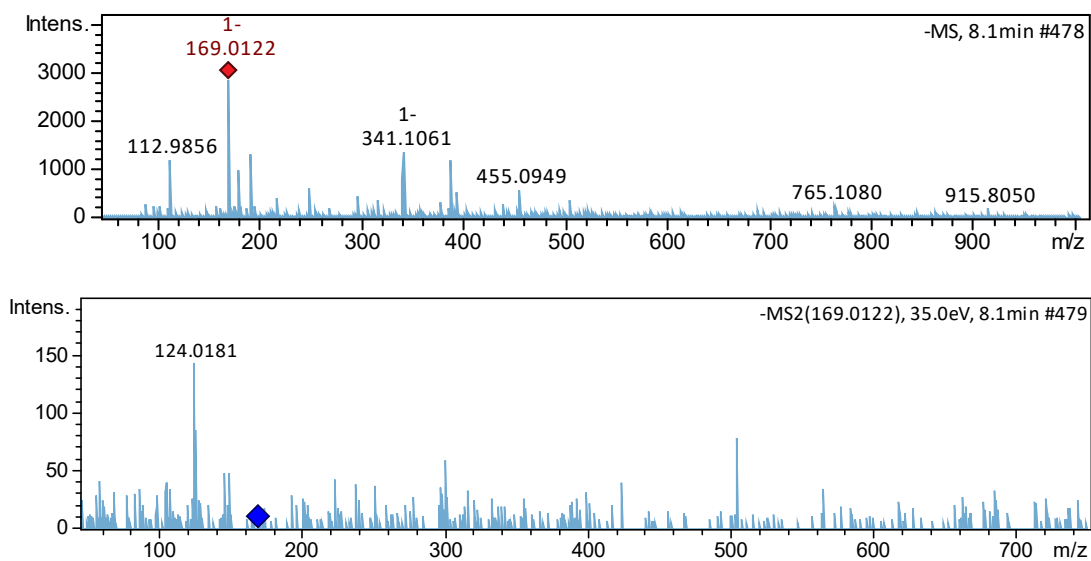
- Song, Y., Wei, X. Q., Li, M. Y., Duan, X. W., Sun, Y. M., Yang, R. L., ... Wang, H. (2018). Nutritional composition and antioxidant properties of the fruits of a Chinese wild passiflora foetida. *Molecules*, 23(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23020459>
- Souza, A. ., Fassina, A. C., Saraiva, F., & Souza, L. (2018). Caracterização Físico-Química De Frutos Nativos Da Região Sul Do Brasil. *Evidência*, 18(1), 81–94. <https://doi.org/10.18593/eba.v18i1.16546>
- Sun, B., & Spranger, M. I. (2005). REVIEW: QUANTITATIVE EXTRACTION AND ANALYSIS OF GRAPE AND WINE PROANTHOCYANIDINS AND STILBENES REVISÃO: EXTRACÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE PROANTOCIANIDINAS E ESTILBENOS DA UVA E DO VINHO. *Ciência Téc. Vitiv* (Vol. 20). Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.506.5512&rep=rep1&type=pdf>
- Surjadinata, B. B., & Cisneros-zevallos, L. (2012). Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. *Food Chemistry*, 134(2), 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.097>
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, R., & Gänzle, M. G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9214–9220. <https://doi.org/10.1021/jf101504v>
- Szwajgier, D. (2011). The use of an extracellular ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids during mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 427–434. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00489.x>
- Tahara, S. (2007). A Journey of Twenty-Five Years through the Ecological Biochemistry of Flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(6), 1387–1404. <https://doi.org/10.1271/bbb.70028>
- Tala, V. R. S., Da Silva, V. C., Rodrigues, C. M., Nkengfack, A. E., Dos Santos, L. C., & Vilegas, W. (2013). Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by flow injection analysis - Electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 18(3), 2803–2820. <https://doi.org/10.3390/molecules18032803>
- Tamura, F., Tanabe, K., Itai, A., & Hasegawa, M. (1999). NII-Electronic Library Service. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 68(6), 1178–1183.
- Tarascou, I., Souquet, J. M., Mazauric, J. P., Carrillo, S., Coq, S., Canon, F., ... Cheynier, V. (2010). The hidden face of food phenolic composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.018>

- Tilg, H., & Kaser, A. (2011). Review series: Gut microbiome , obesity , and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*, 121(6), 2126–32. <https://doi.org/10.1172/JCI58109.2126>
- Tomás-Barberán, F. A., González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. A., Selma, M. V., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2017). Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 1500901. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500901>
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G., & Cappiello, A. (2011). AN OVERVIEW OF MATRIX EFFECTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(3), 491–509. <https://doi.org/10.1002/mas.20298>
- Tu, Y., Rochfort, S., Liu, Z., Ran, Y., Griffith, M., Badenhorst, P., ... Spangenberg, G. (2010). Functional Analyses of *Caffeic Acid O-Methyltransferase* and *Cinnamoyl-CoA-Reductase* Genes from Perennial Ryegrass ( *Lolium perenne* ). *The Plant Cell*, 22(10), 3357–3373. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072827>
- Türkben, C., Sar, E., & Demir, C. (2010). Effect of Freezing and Frozen Storage on Phenolic Compounds of Raspberry and Blackberry Cultivars, 144–153. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9102-3>
- Vallverdú-queralt, A., Medina-remón, A., Andres-lacueva, C., & Lamuela-raventos, R. M. (2011). Changes in phenolic profile and antioxidant activity during production of diced tomatoes. *Food Chemistry Journal*, 126, 1700–1707. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.061>
- Vanzani, P., Rosseto, M., Rigo, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., D’Amato, E., & Scarpa, M. (2005). Major Phytochemicals in Apple Cultivars: Contribution to Peroxyl Radical Trapping Efficiency. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3377–3382.
- Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Marconi, E., Segura-Carretero, A., Garrido-Frenich, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Determination of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds in raw and parboiled rice bran. *RSC Advances*, 6(56), 50786–50796. <https://doi.org/10.1039/c6ra04836f>
- Verma, B., Hucl, P., & Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116, 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.060>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS 151 ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS A practical guide*. Retrieved from [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_4.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5164-7_4.pdf)

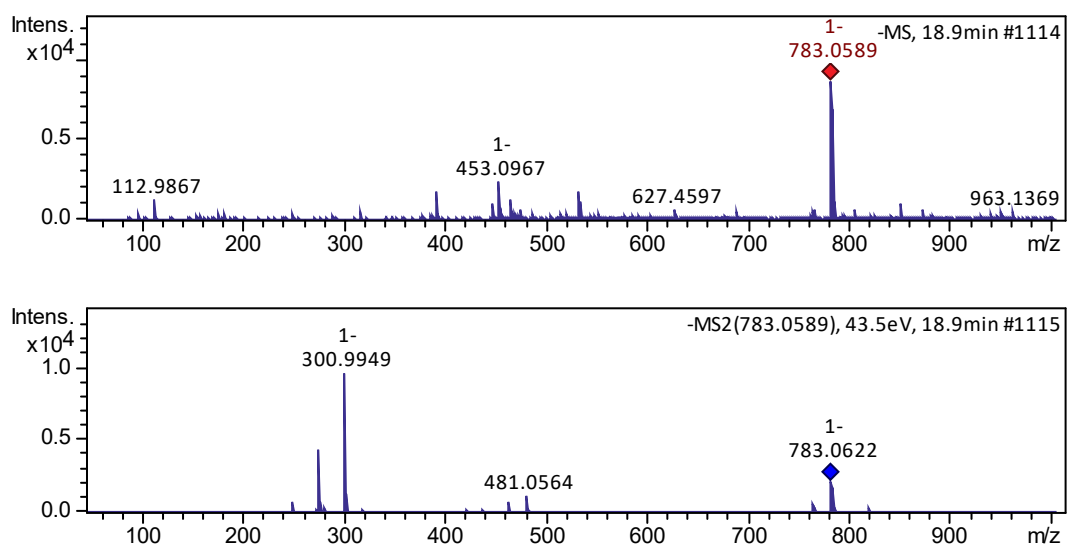


- Vinholes, J., Lemos, G., Lia Barbieri, R., Franzon, R. C., & Vizzotto, M. (2017). In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food Bioscience*, 19, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.005>
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495–3500. <https://doi.org/10.1021/jf011405l>
- Westman-Brinkmalm, A., & Brinkmalm, G. (2009). A Mass Spectrometer's Building Blocks. In *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications* (pp. 15–87). <https://doi.org/10.1002/9780470395813.ch2>
- Ye, X. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., ... Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124(4), 1561–1566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>
- Zeng, X., Wang, Y., Qiu, Q., Jiang, C., Jing, Y., Qiu, G., & He, X. (2012). Bioactive phenolics from the fruits of *Livistona chinensis*. *Fitoterapia*, 83(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.09.020>
- Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., ... Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.074>
- Zhang, L., Xu, L., Ye, Y. hua, Zhu, M. fang, Li, J., Tu, Z. cai, ... Liao, H. (2019). Phytochemical profiles and screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors of four *Acer* species leaves with ultra-filtration combined with UPLC-QTOF-MS/MS. *Industrial Crops and Products*, 129(September 2018), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.051>
- Zhang, Q., & Cheung, H. (2010). The content of astilbin and taxifolin in concentrated extracts of *Rhizoma Smilacis Glabrae* and turtle jelly vary significantly. *Food Chemistry*, 119(3), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.048>
- Zhang, Q. F., & Cheung, H. Y. (2011). Development of capillary electrophoresis fingerprint for quality control of *Rhizoma Smilacis Glabrae*. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 18–25. <https://doi.org/10.1002/pca.1245>

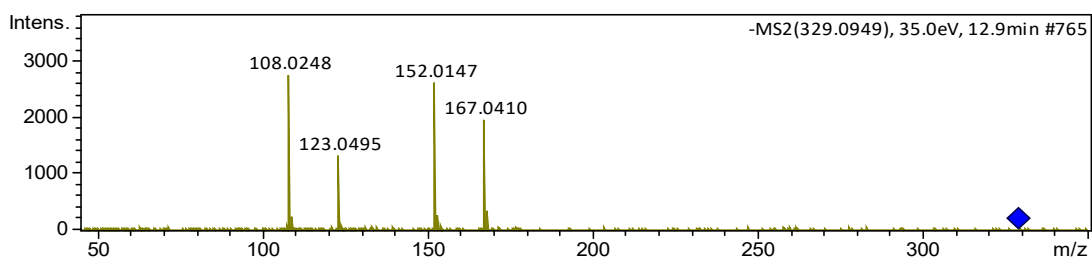
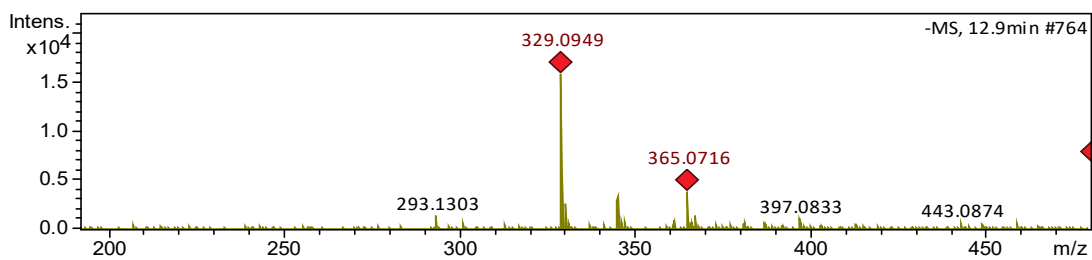
## APÊNDICE A – Espectros de massas dos CFE



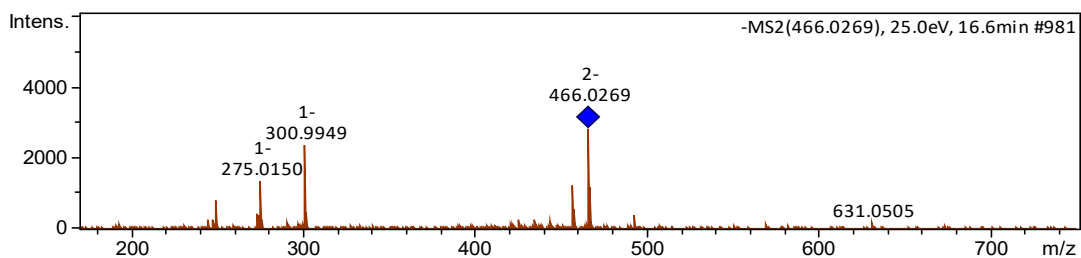
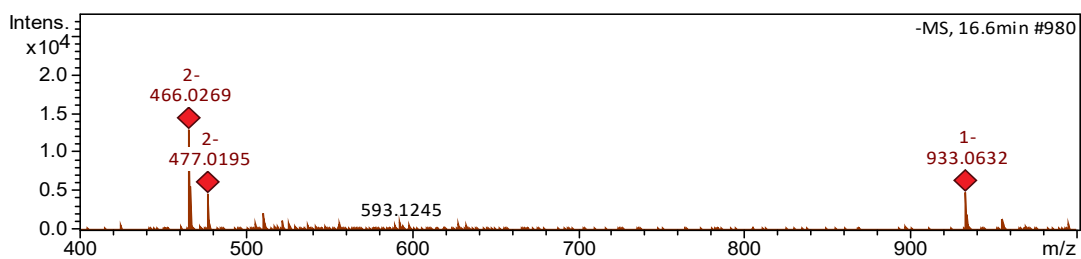
**Figura S1. Espectro de massas do ácido gálico no modo negativo**  
Fonte: própria autora



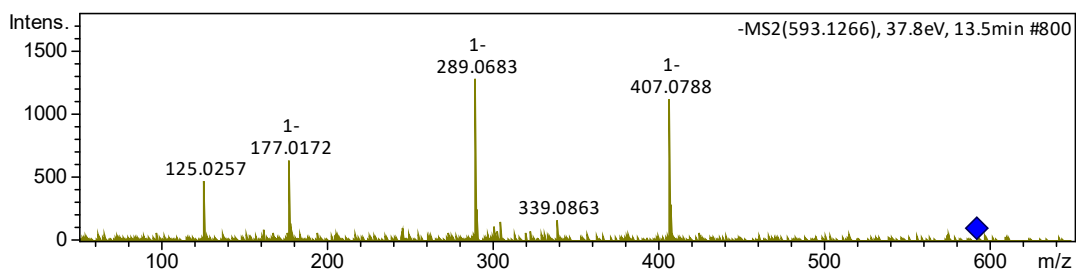
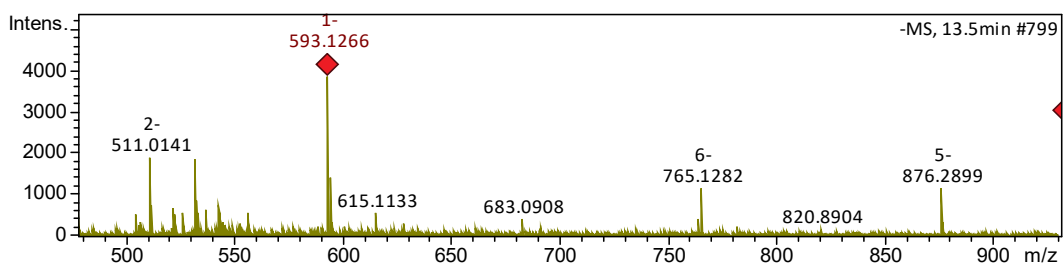
**Figura S2. Espectro de massas do Di-HHDP hexosídeo IV no modo negativo**  
Fonte: própria autora



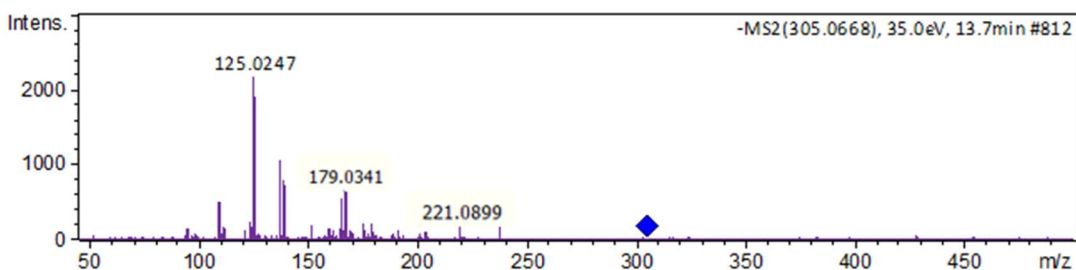
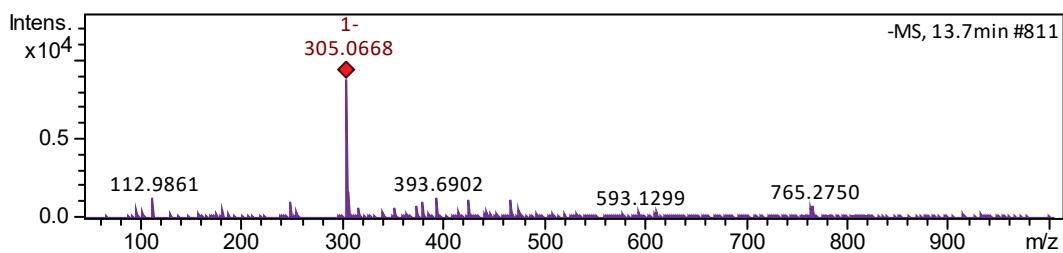
**Figura S3. Espectro de massas do ácido vanílico hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



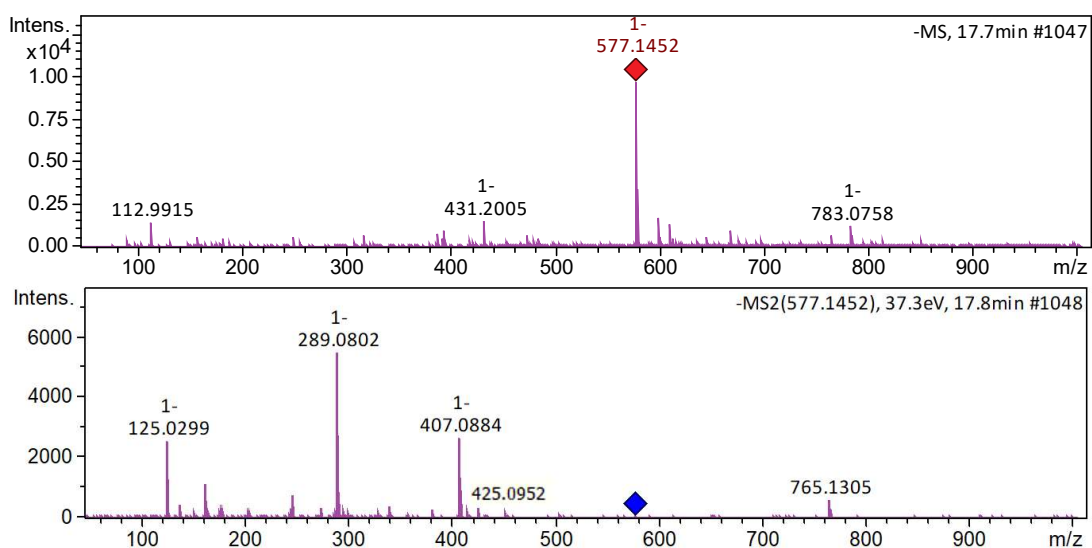
**Figura S4. Espectro de massas da castalagina / vescalagina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



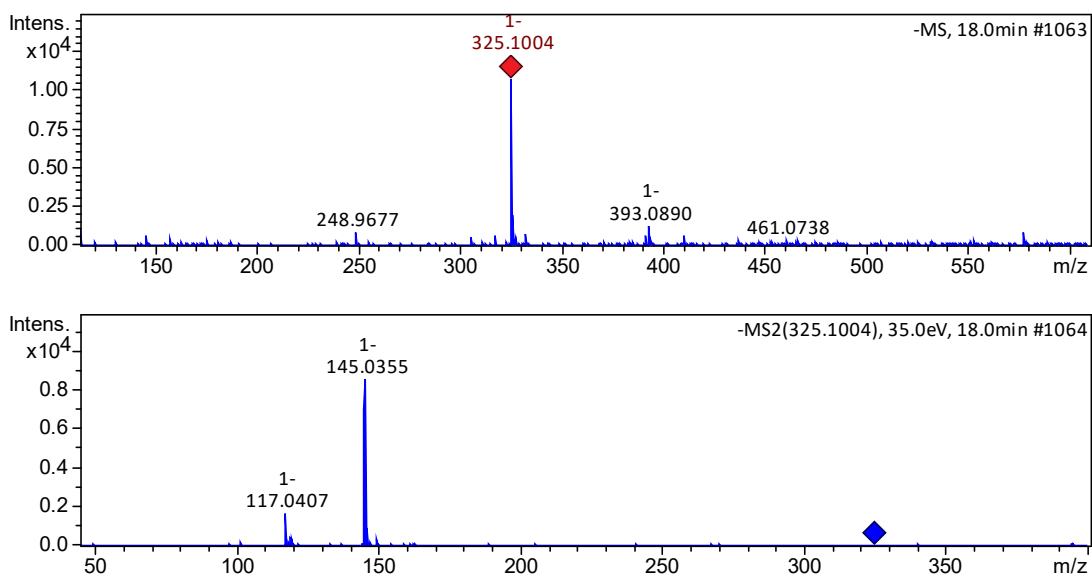
**Figura S5. Espectro de massas do digaloiil (epi)catequina II no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



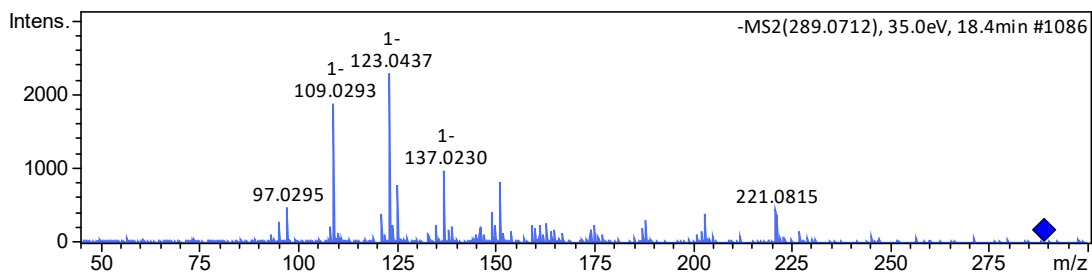
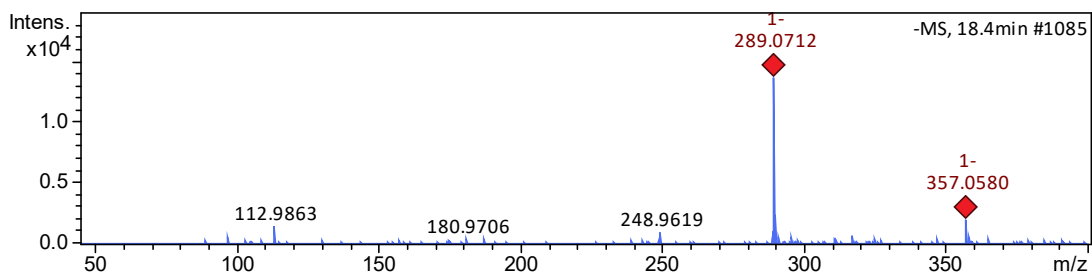
**Figura S6. Espectro de massas da (epi)galocatequina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



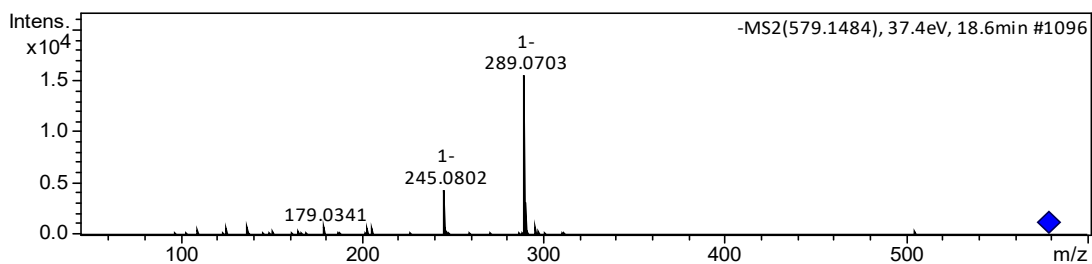
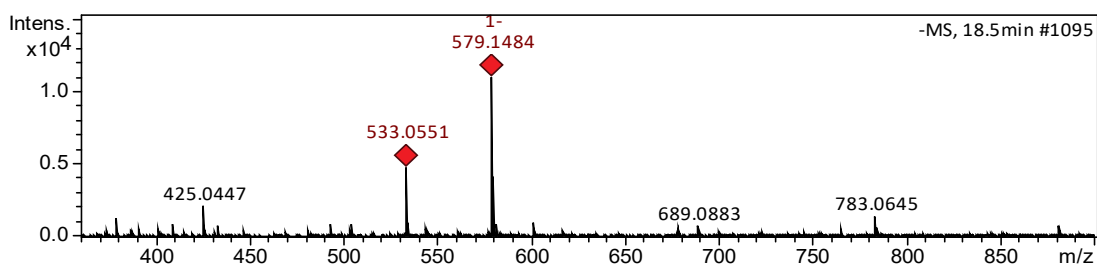
**Figura S7. Espectro de massas do dímero de proantocianidina B I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



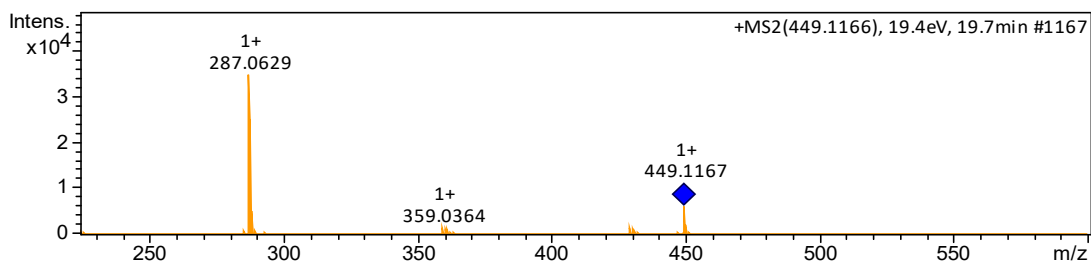
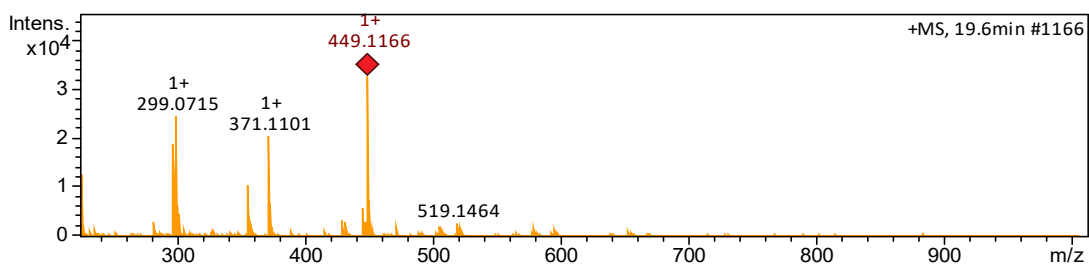
**Figura S8. Espectro de massas do ácido cumárico glicosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



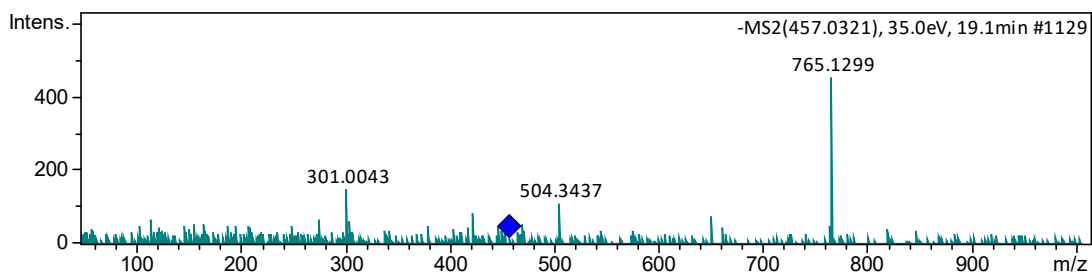
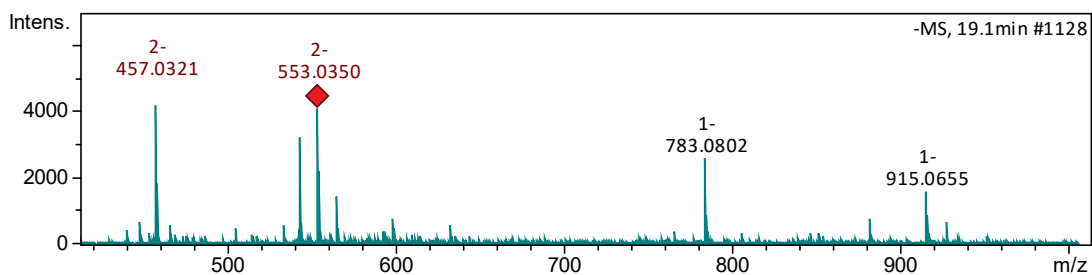
**Figura S9. Espectro de massas da catequina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



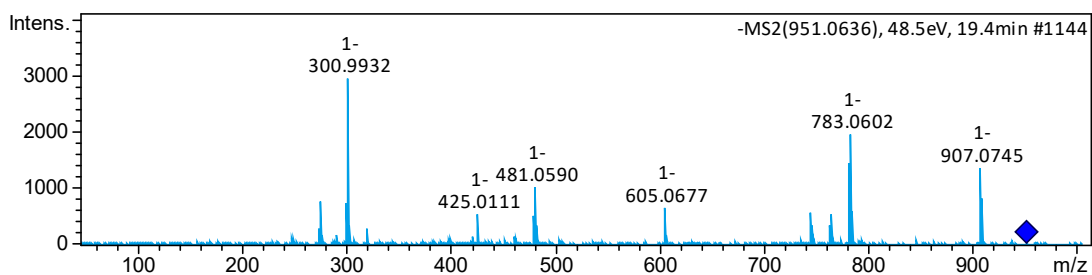
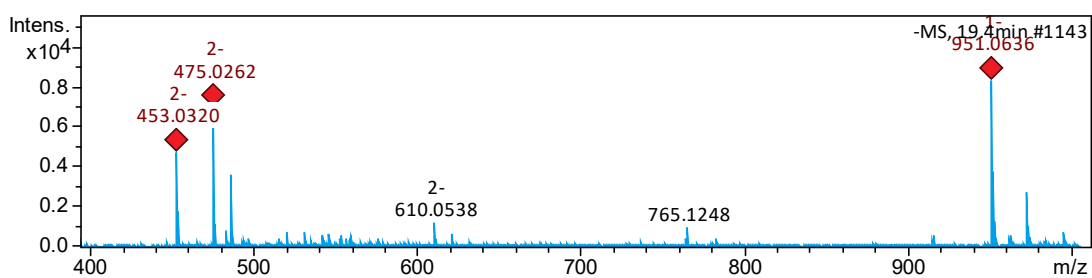
**Figura S10. Espectro de massas da (epi)catequina-(epi)catequina I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



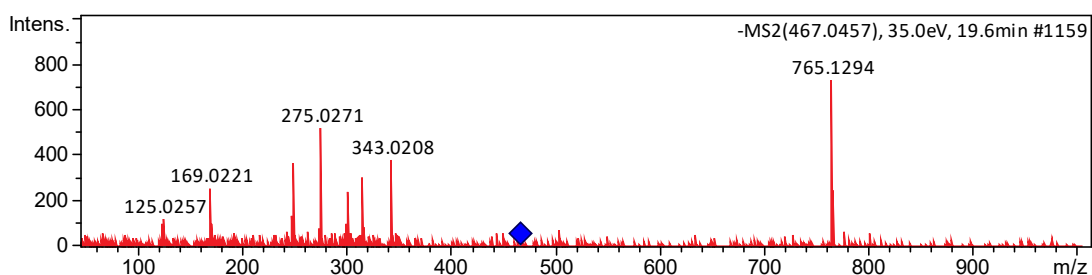
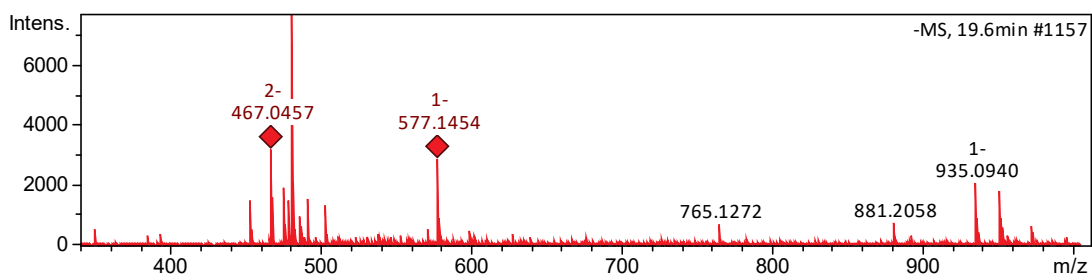
**Figura S11. Espectro de massas da cianidina glicosídeo no modo positivo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S12. Espectro de massas do derivado do galloil-bis-HHDP no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

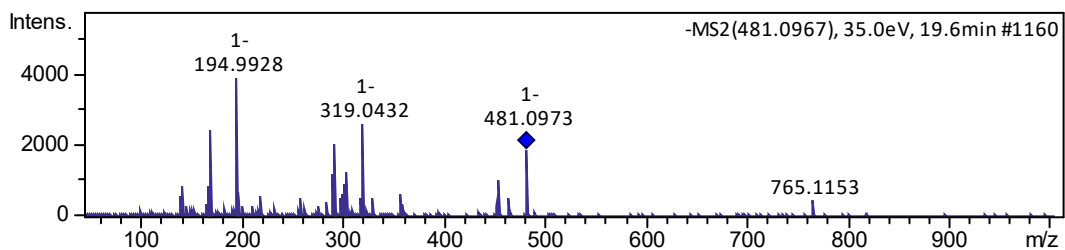
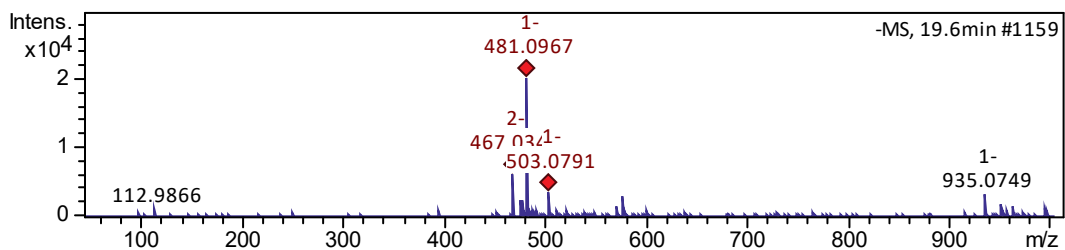


**Figura S13. Espectro de massas do galloil-di-HHDP hexosídeo I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

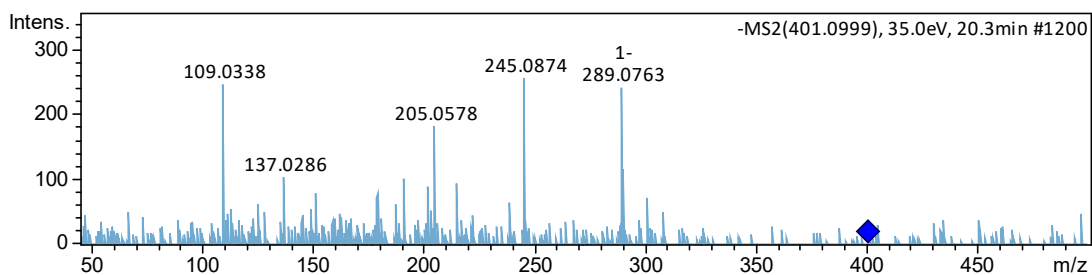
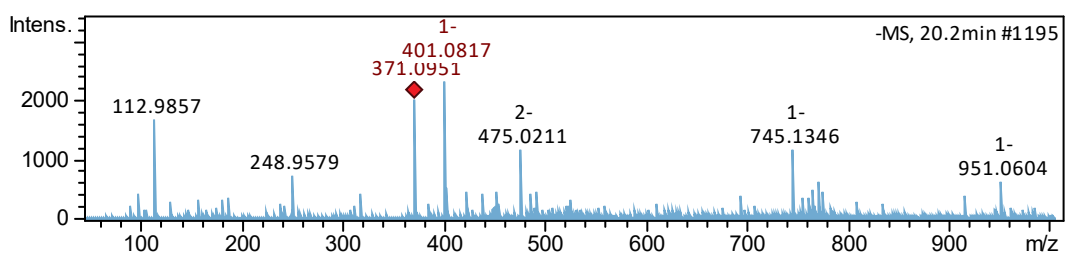


**Figura S14. Espectro de massas do galloil-bis-HHDP-glicosídeo I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

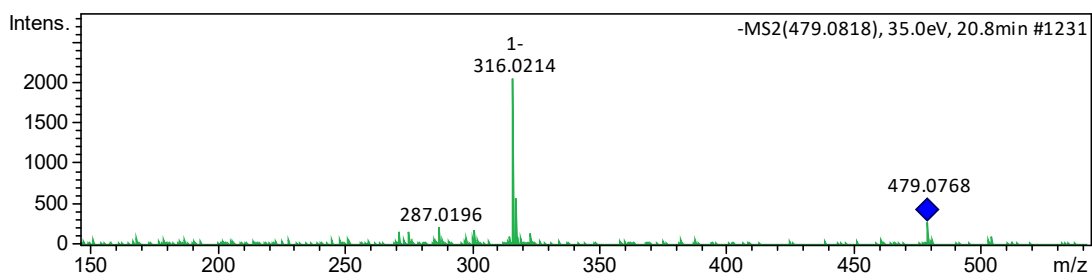
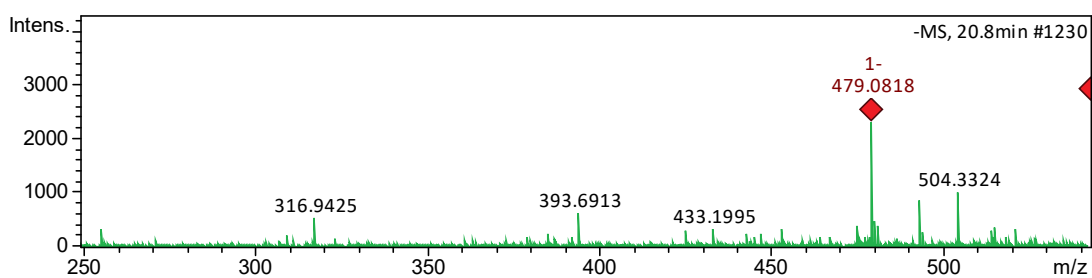




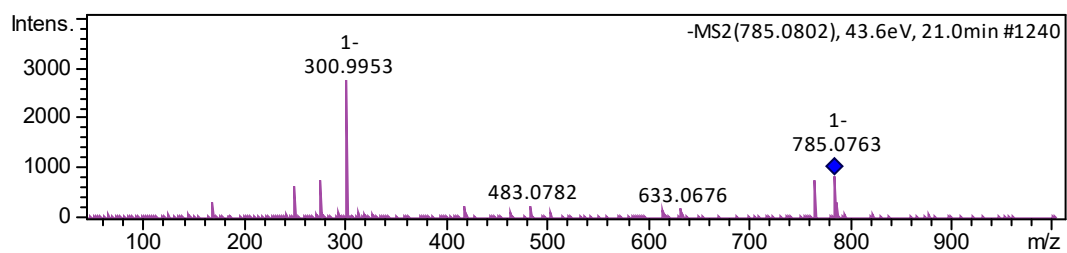
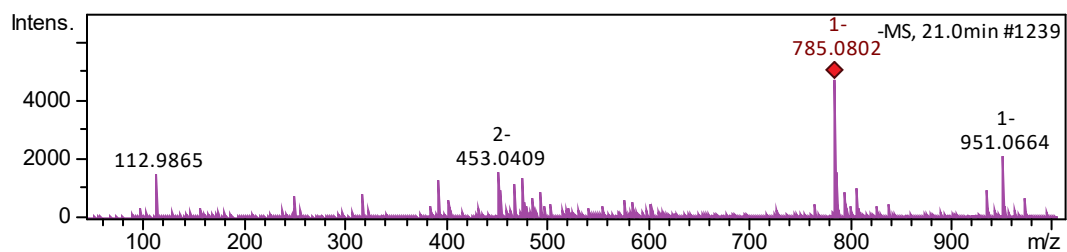
**Figura S15 – Espectro de massas do HHDP hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



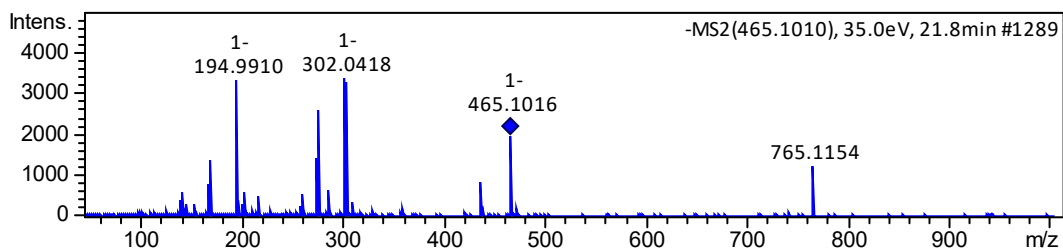
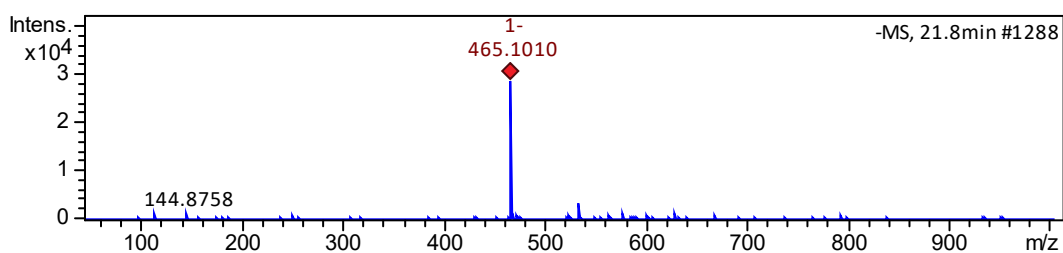
**Figura S16. Espectro de massas do derivado de (epi)catequina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



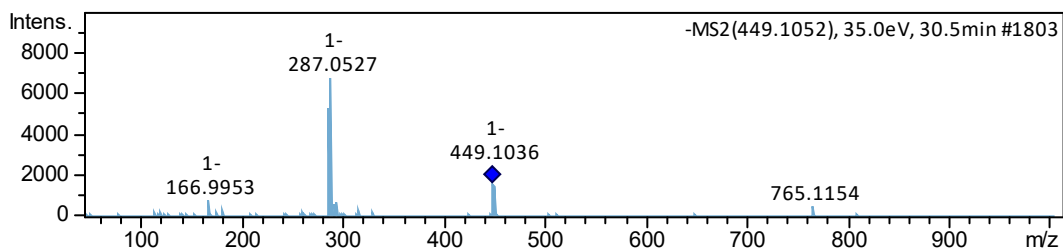
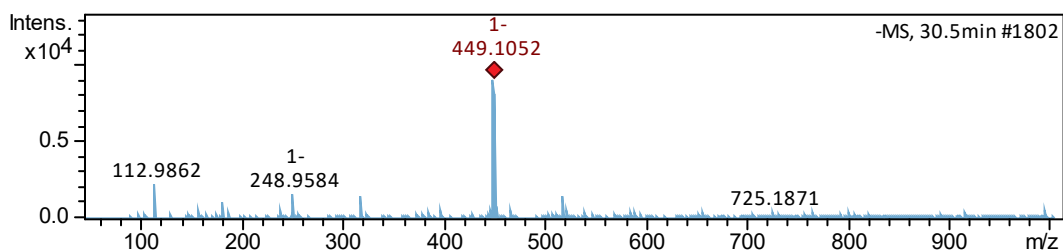
**Figura S17. Espectro de massas da miricetina hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



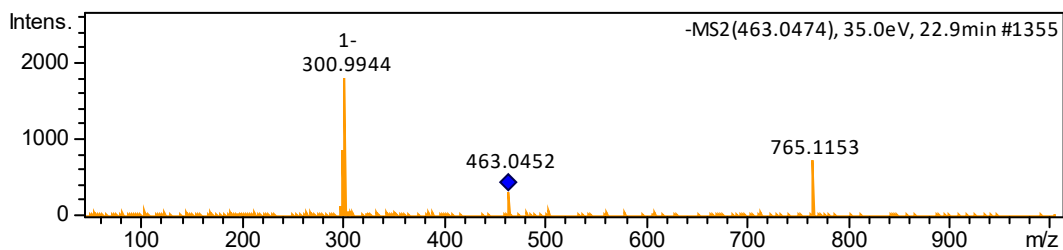
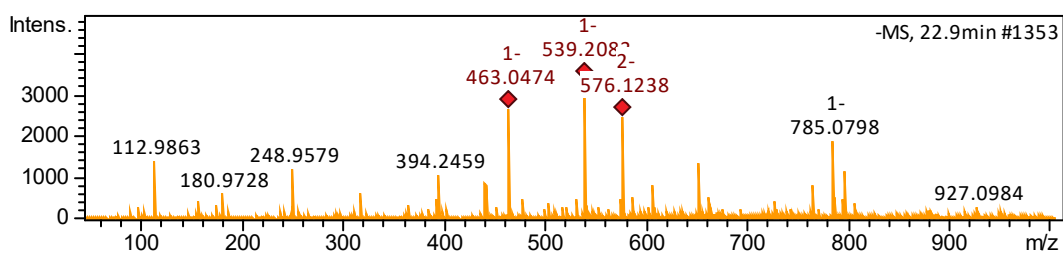
**Figura S18. Espectro de massas do digaloiil-HHDP hexosídeo I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



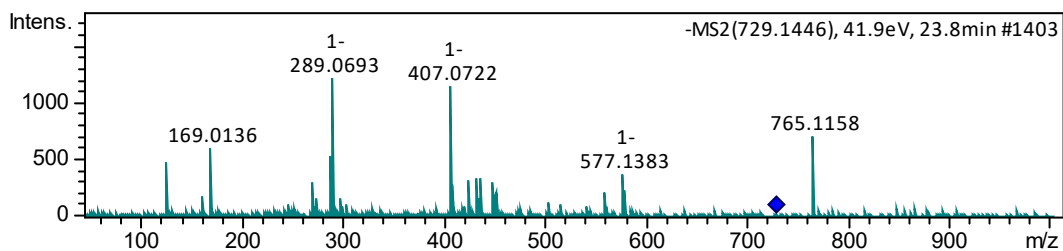
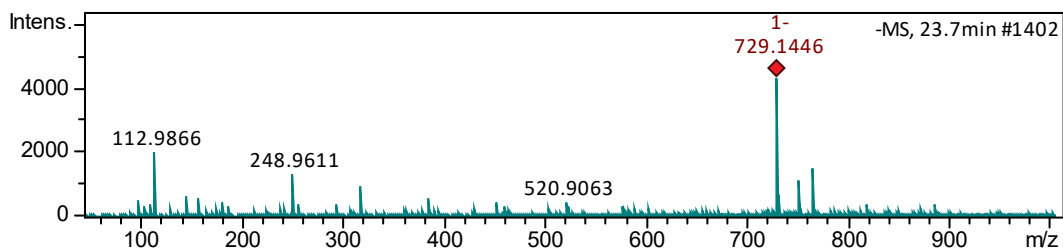
**Figura S19. Espectro de massas da taxifolina hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



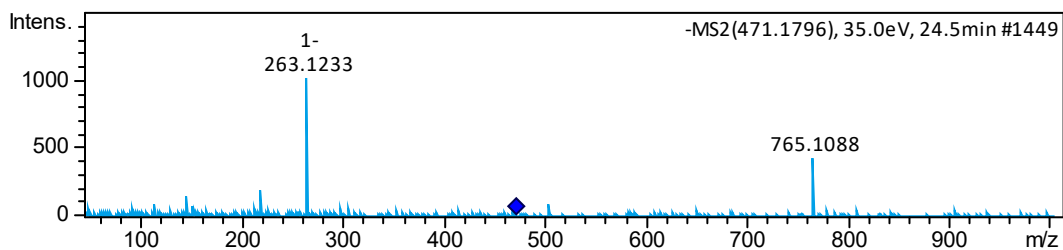
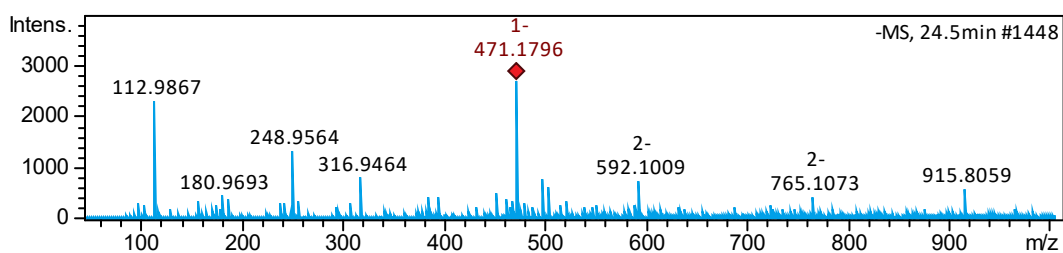
**Figura S20. Espectro de massas do eriodictiol hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



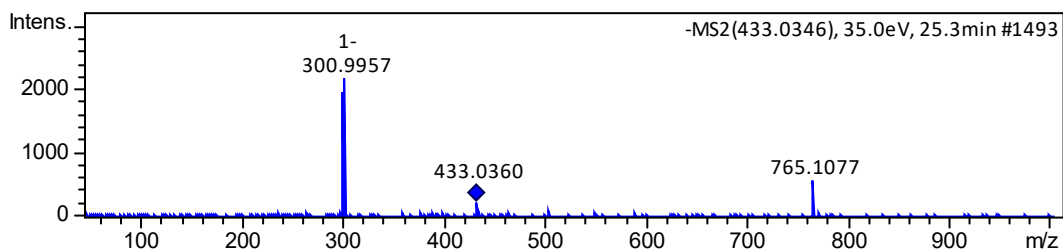
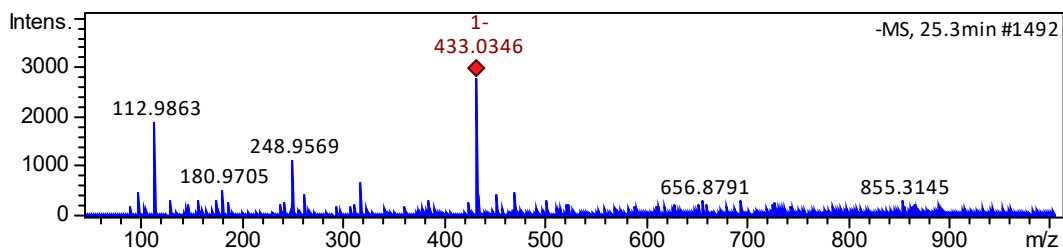
**Figura S21. Espectro de massas do ácido elágico hexosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



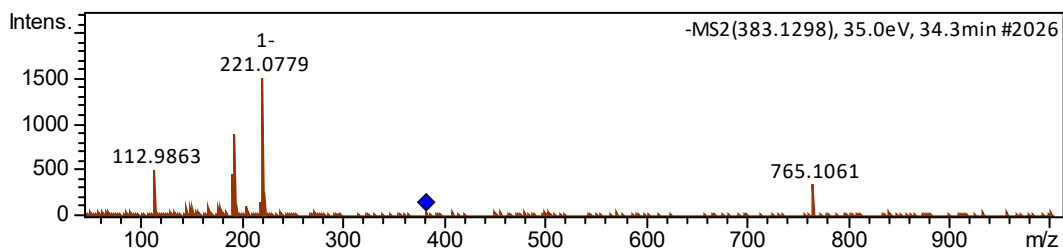
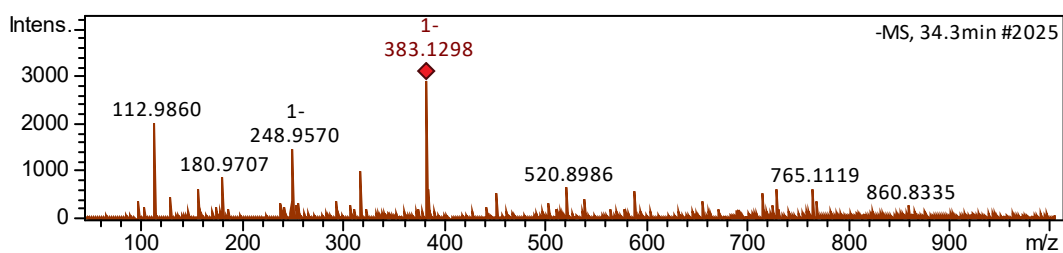
**Figura S22. Espectro de massas do galato de proantocianidina B no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



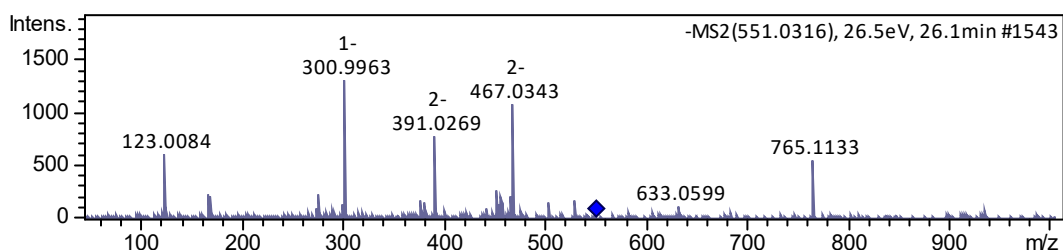
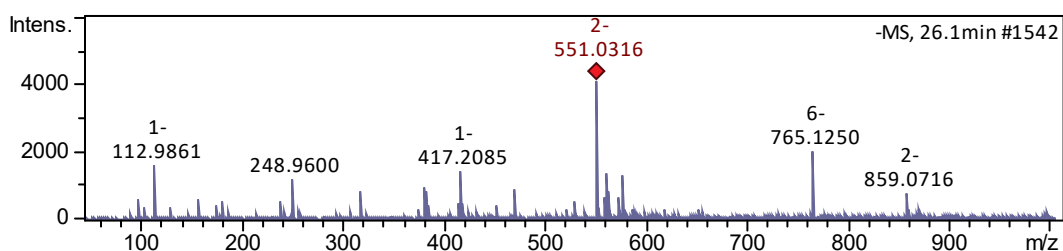
**Figura S23. Espectro de massas do derivado do ácido abscísico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



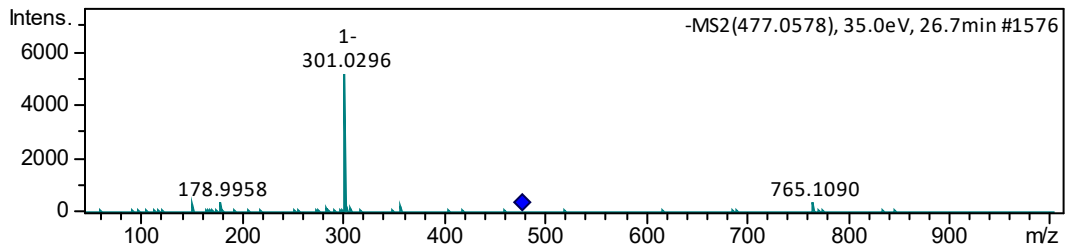
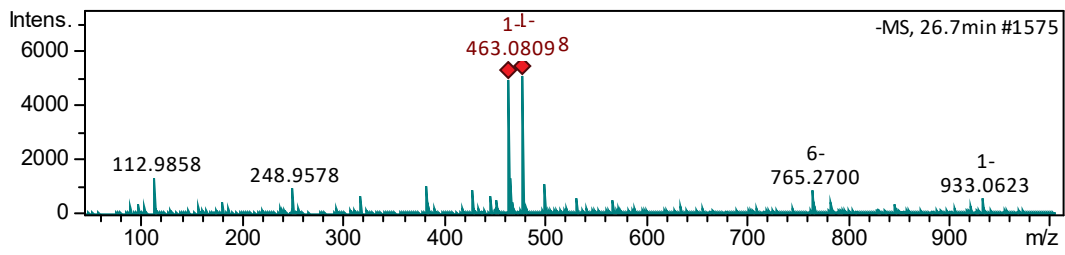
**Figura S24. Espectro de massas do ácido elágico pentose no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



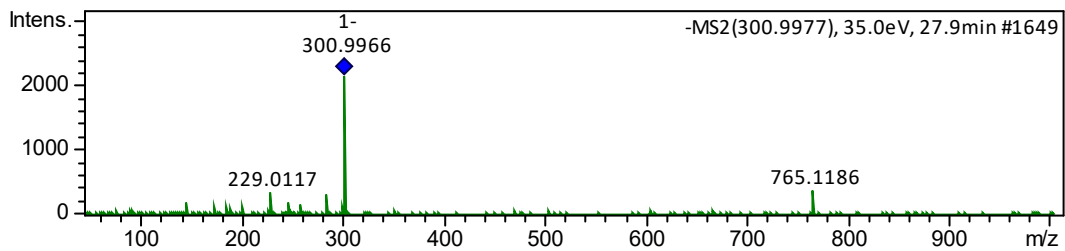
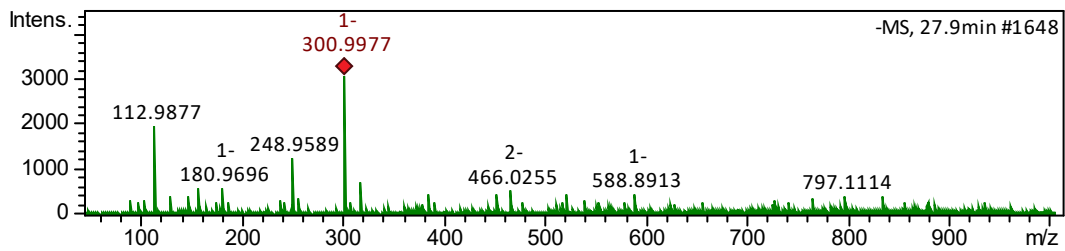
**Figura S25. Espectro de massas do isofraxidin hexosídeo II no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



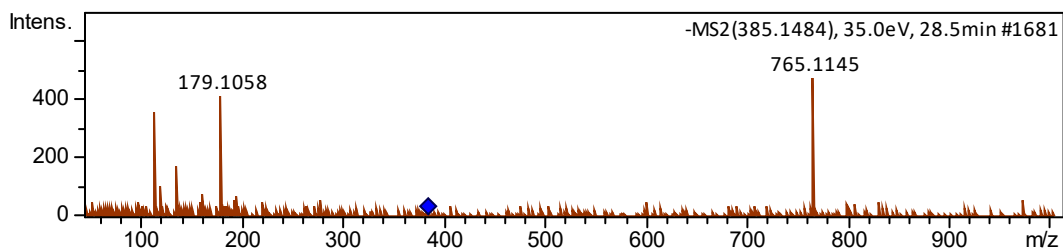
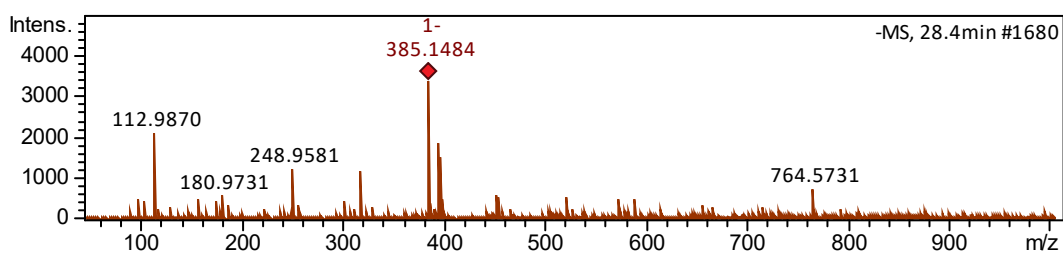
**Figura S26. Espectro de massas do derivado de galagil no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



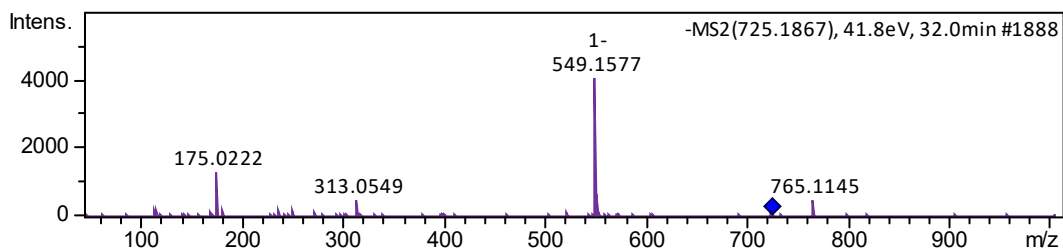
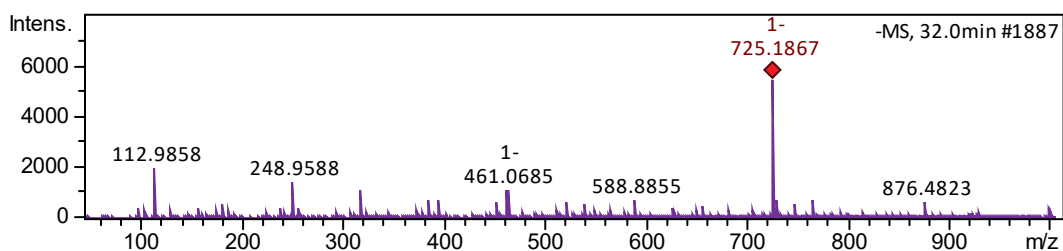
**Figura S27. Espectro de massas do quercetin glucuronídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



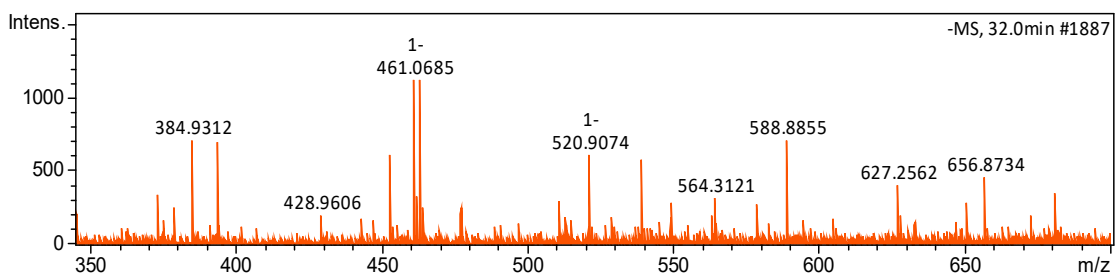
**Figura S28. Espectro de massas do ácido elágico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S29. Espectro de massas do ácido diferúlico I no modo negativo**  
Fonte: própria autora

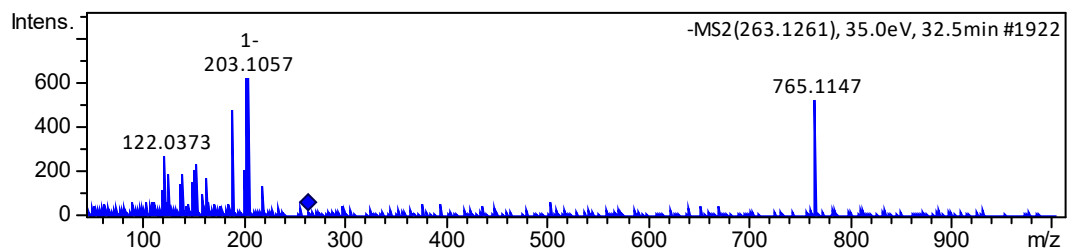
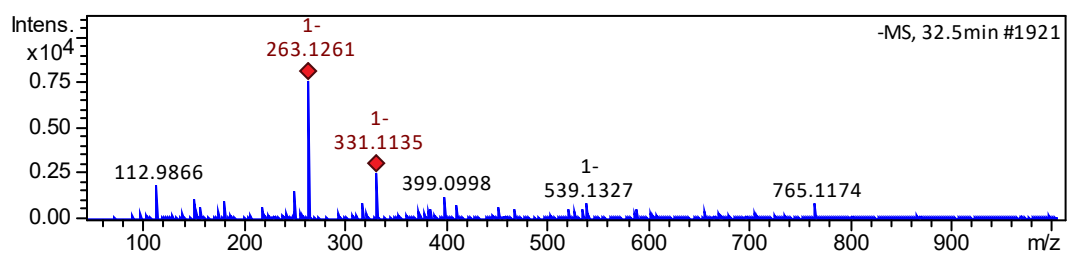


**Figura S30. Espectro de massas da quercetina-malonil-glicoronídeo II no modo negativo**  
Fonte: própria autora



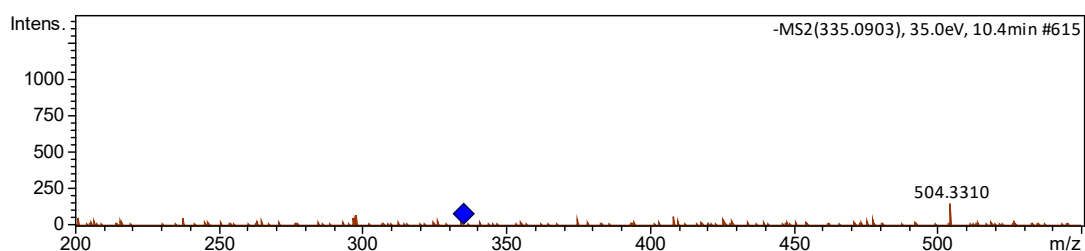
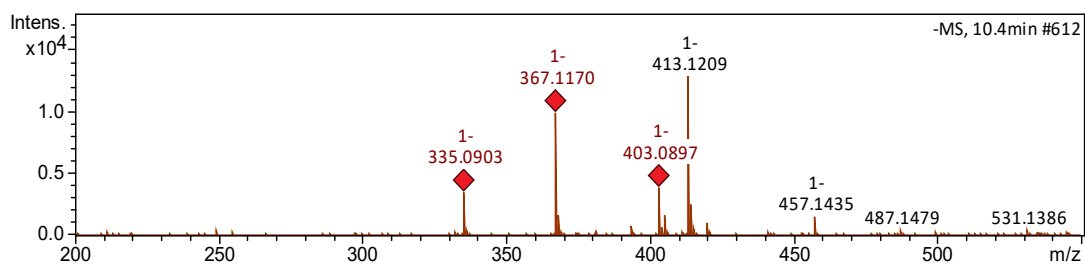
**Figura S31. Espectro de massas do ácido metil-eláxico pentosídeo no modo negativo**  
Fonte: própria autora



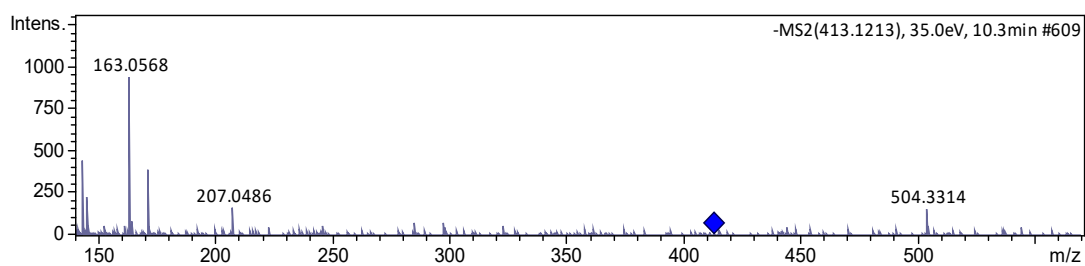
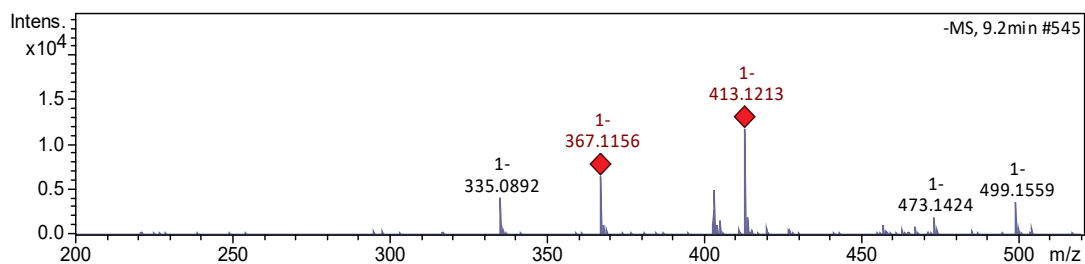


**Figura S32. Espectro de massas do ácido abscísico no modo negativo**  
Fonte: própria autora

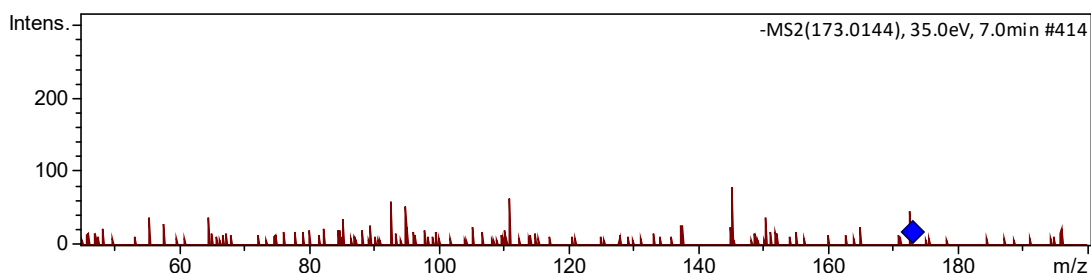
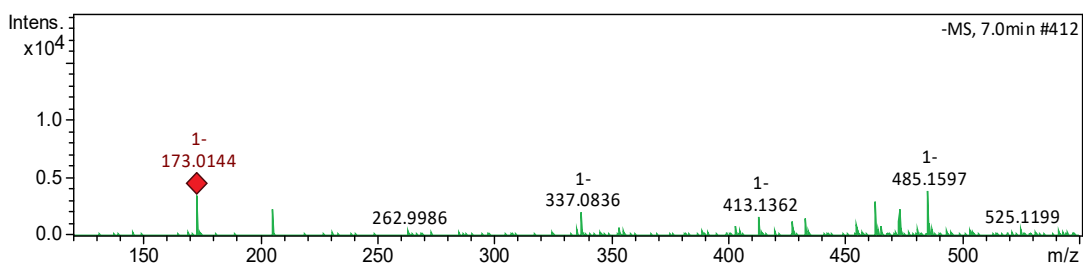
## APÊNDICE B – Espectros de massas dos CFNE



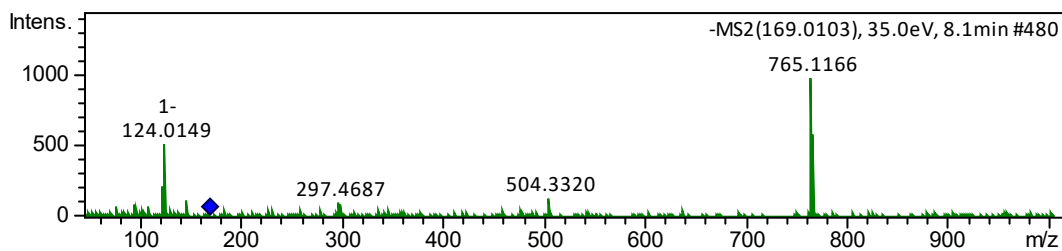
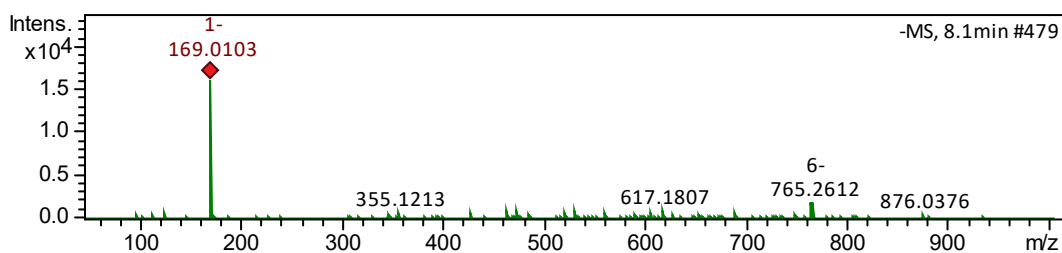
**Figura S33. Espectro de massas do ácido 5-O-caffeoilshikimico I no modo negativo**  
Fonte: própria autora



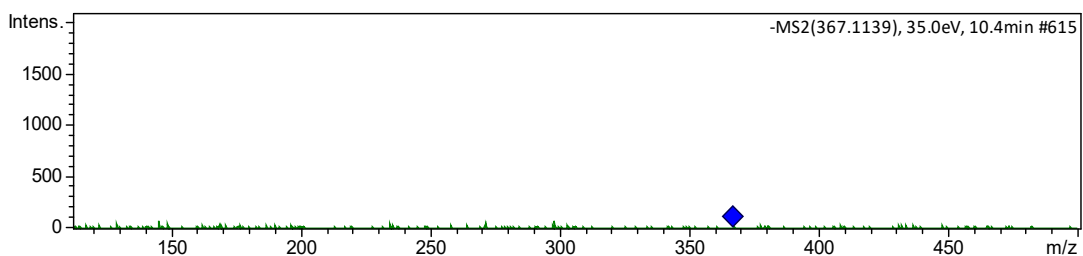
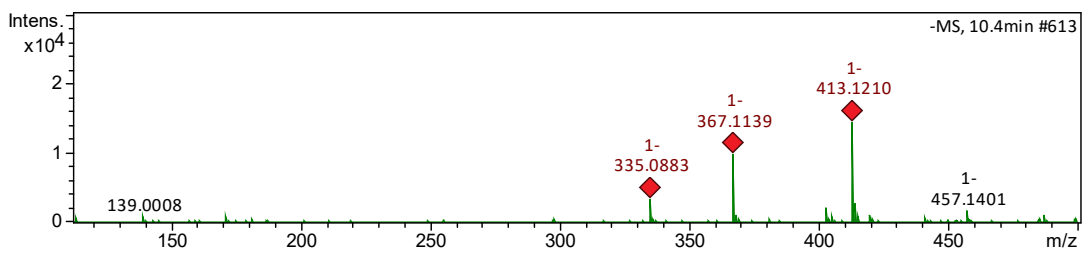
**Figura S34. Espectro de massas do coumaroil-feruloil-glicerol II no modo negativo**  
Fonte: própria autora



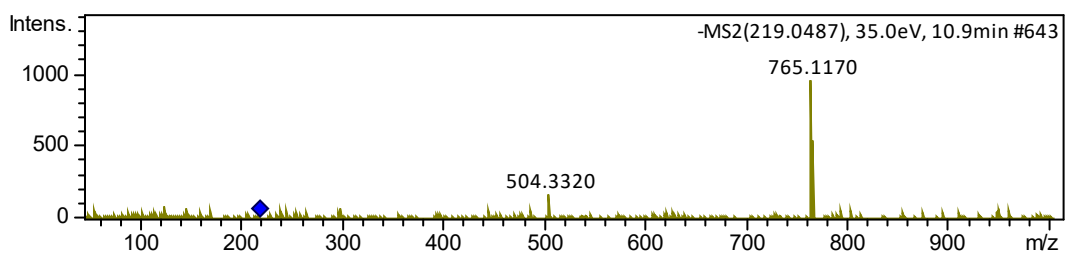
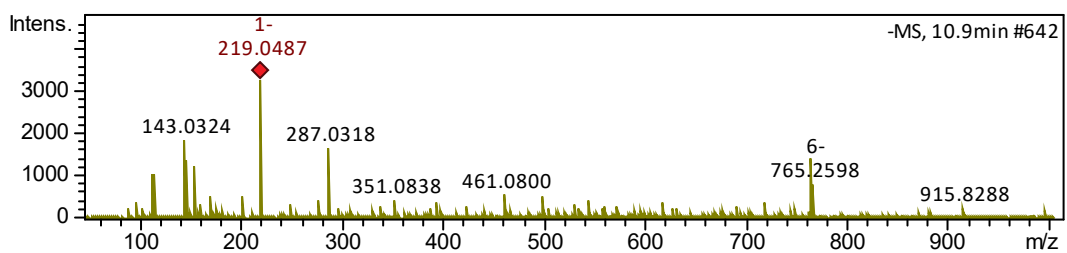
**Figura S35. Espectro de massas do ácido acético no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



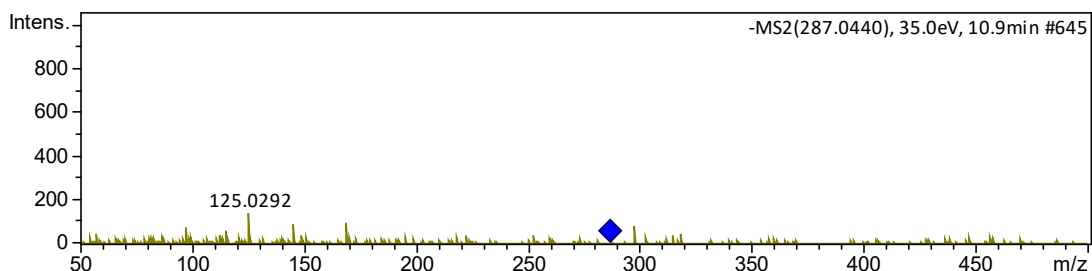
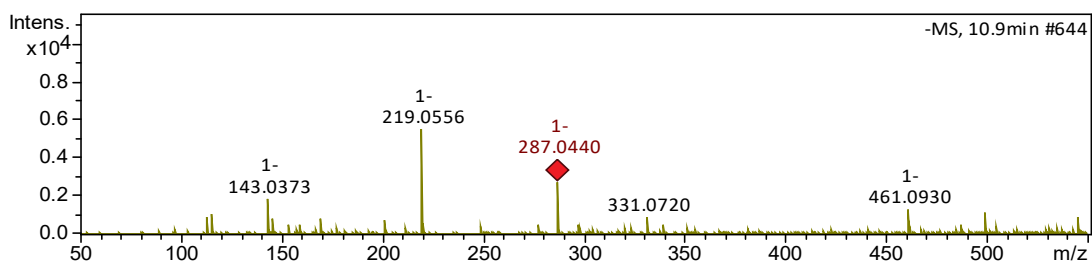
**Figura S36. Espectro de massas do ácido gálico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



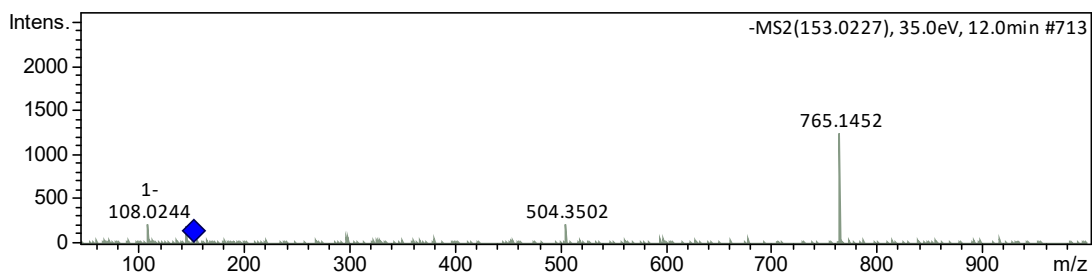
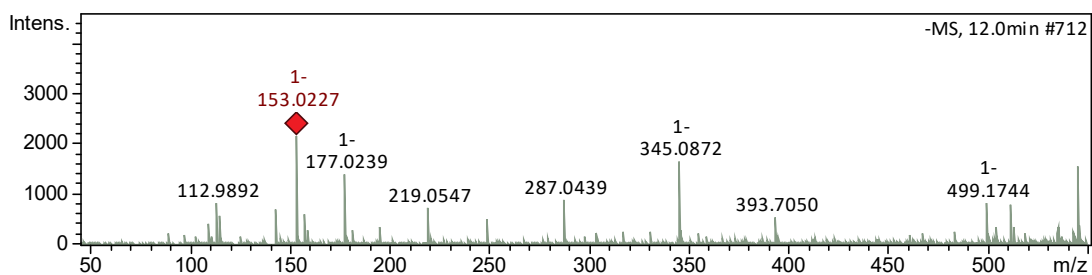
**Figura S37. Espectro de massas do ácido feruloilquínico I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



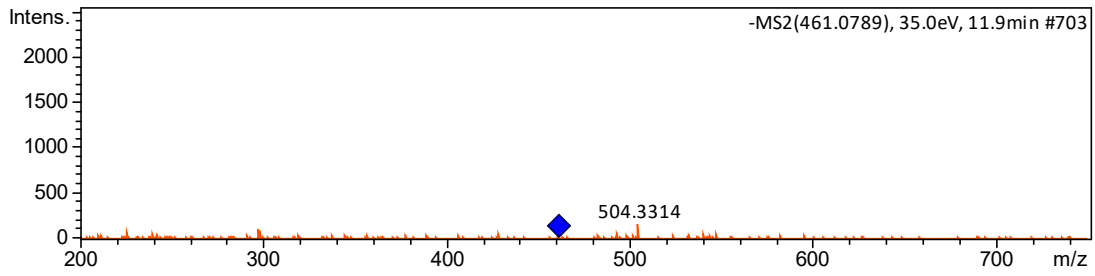
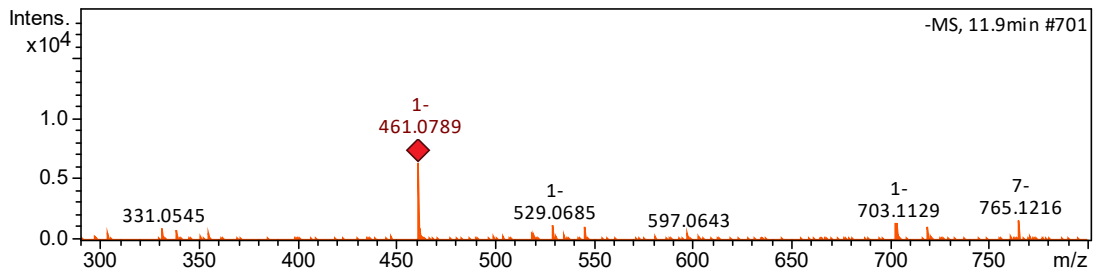
**Figura S38. Espectro de massas do composto não identificado no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



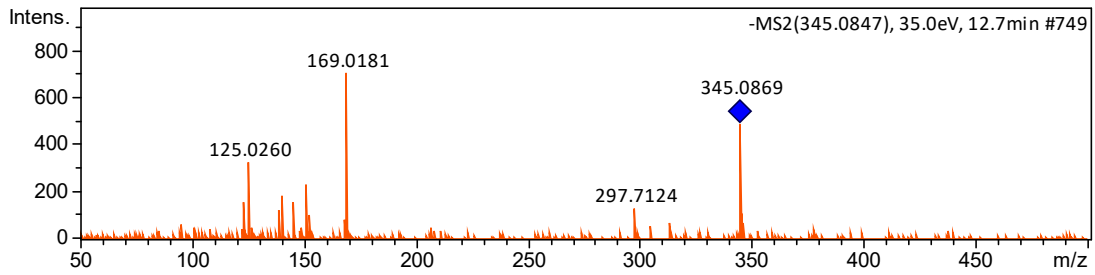
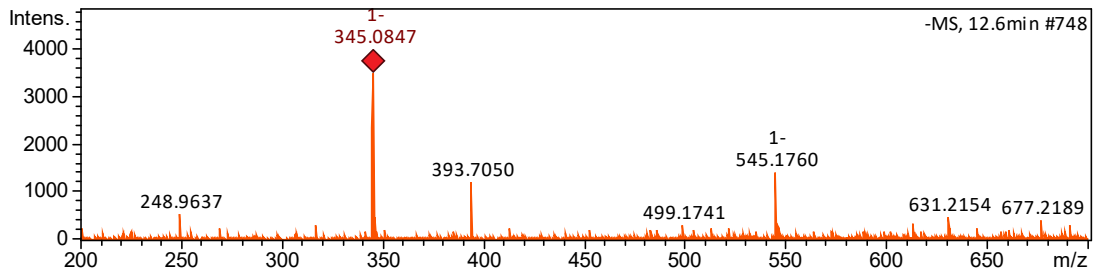
**Figura S39. Espectro de massas do galate de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutilano modo negativo**  
 Fonte: própria autora



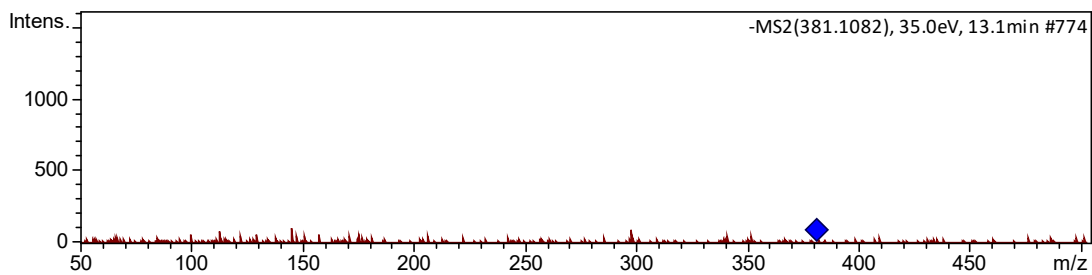
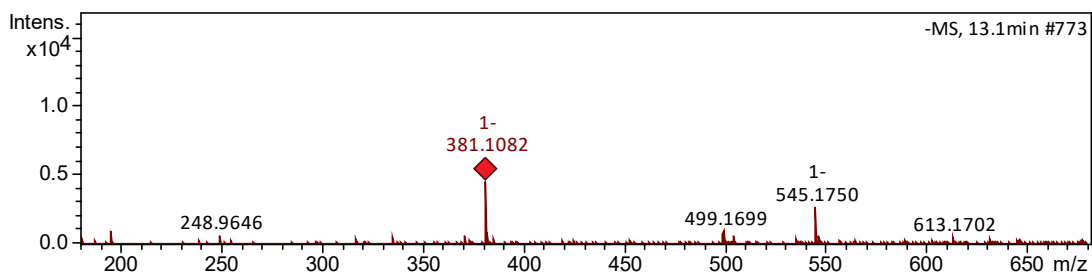
**Figura S40. Espectro de massas do ácido 3,4-dihidroxi-benzóico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



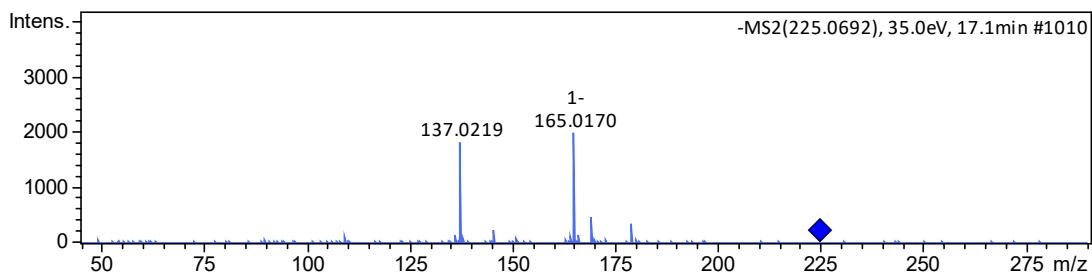
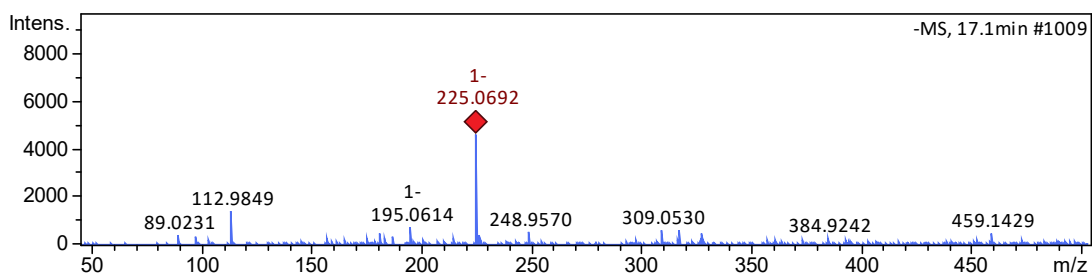
**Figura S41. Espectro de massas da luteolina glucuronídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



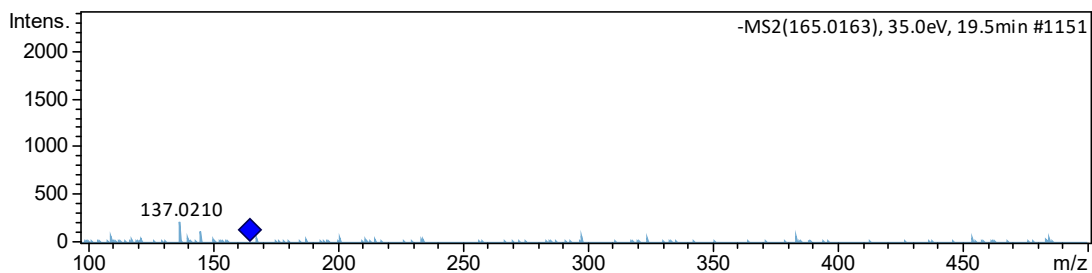
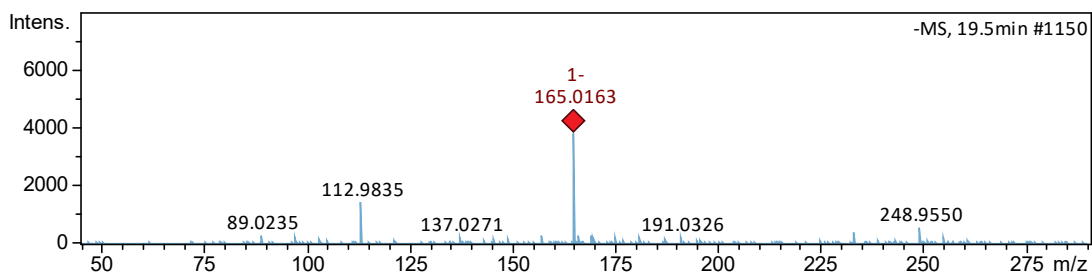
**Figura S42. Espectro de massas do galato de metila-glicopiranosídeo no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



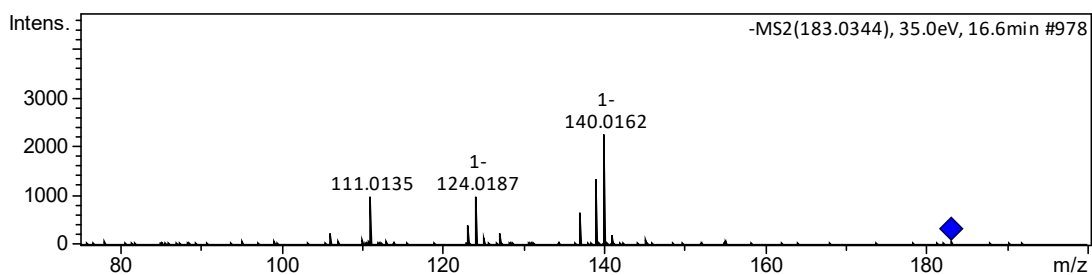
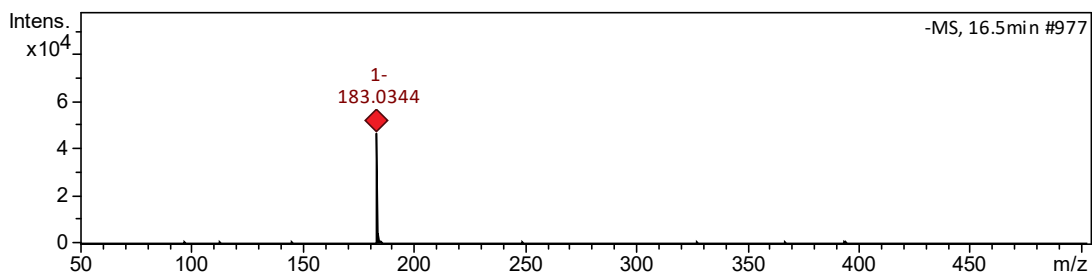
**Figura S43. Espectro de massas do metilbutil-hexosilramnose no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S44. Espectro de massas do ácido benzoilbenzoico I no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

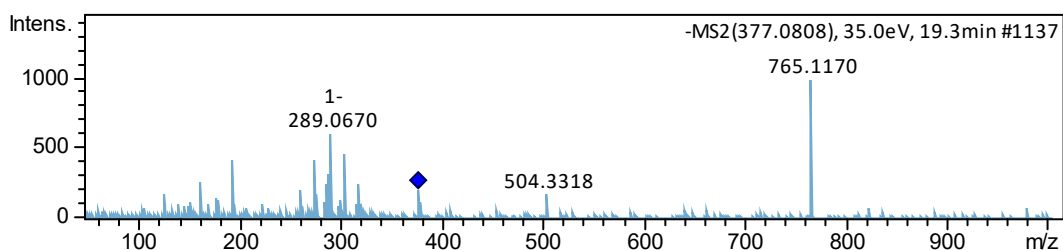
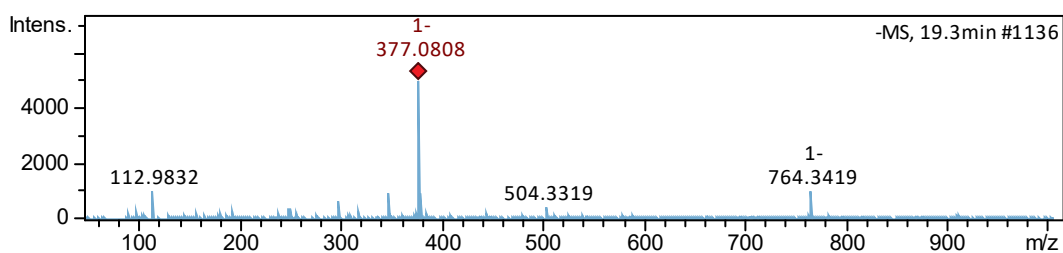


**Figura S45. Espectro de massas do derivado do ácido hidroxibenzoico II no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

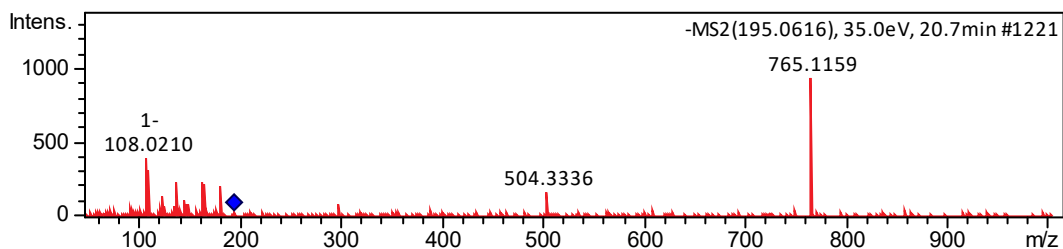
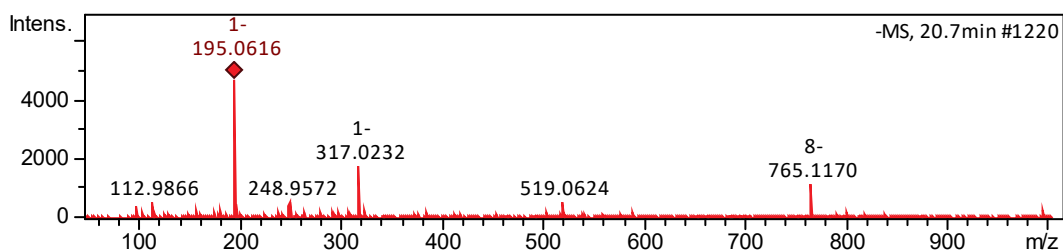


**Figura S46. Espectro de massas do galato de metila no modo negativo**  
 Fonte: própria autora

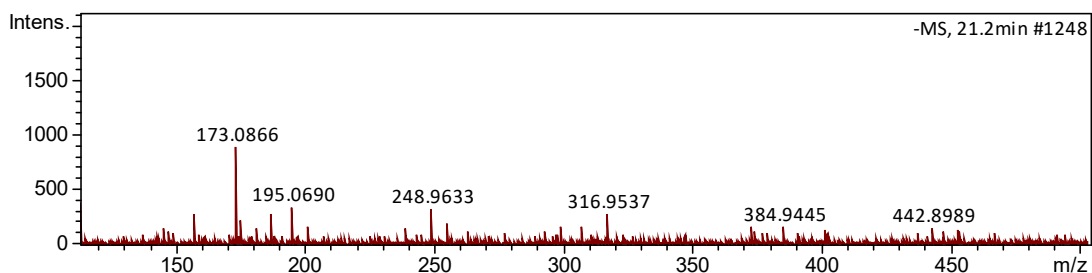




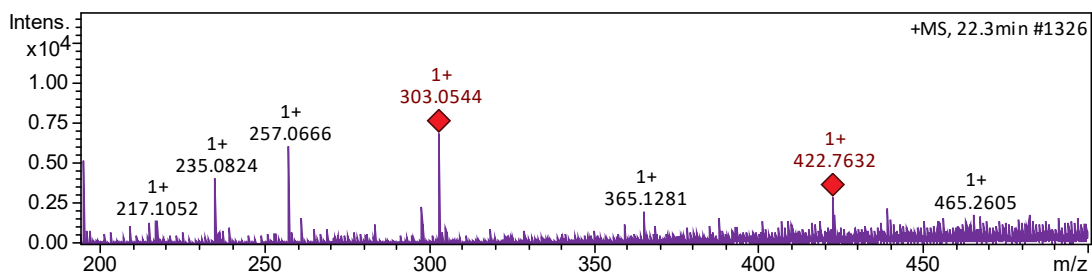
**Figura S47. Espectro de massas do composto não identificado no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



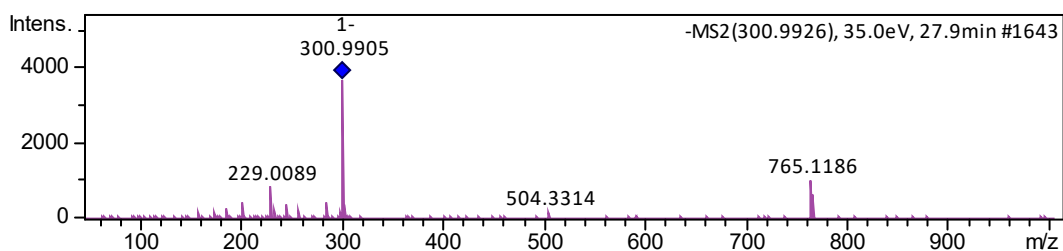
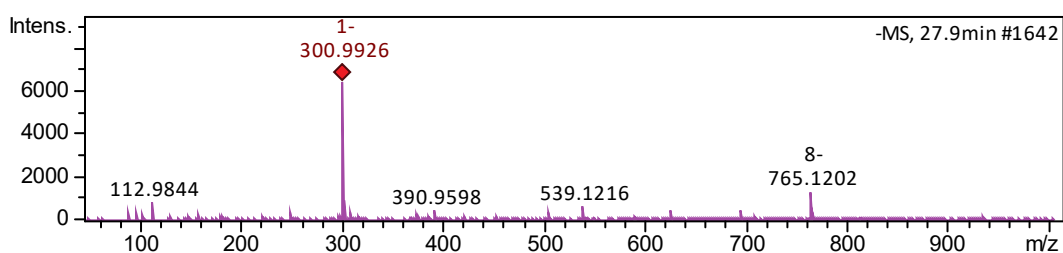
**Figura S48. Espectro de massas do derivado do ácido cumárico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



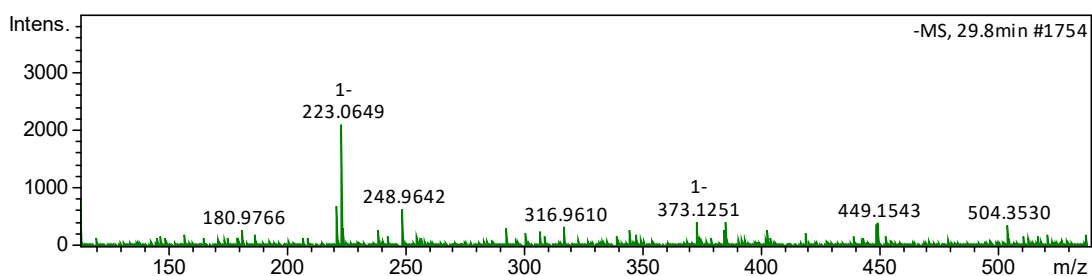
**Figura S49. Espectro de massas do derivado do ácido cumaril-quinico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



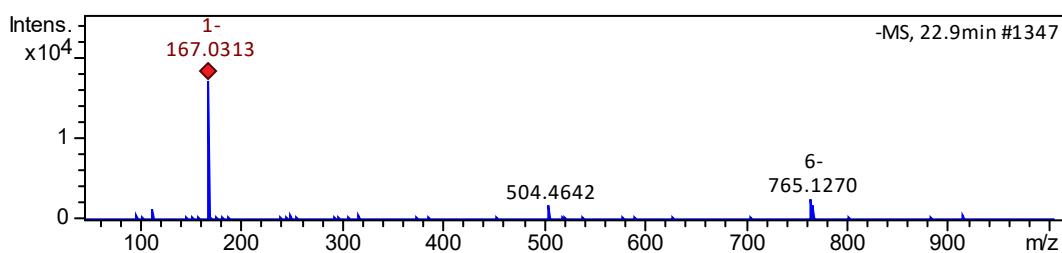
**Figura S50. Espectro de massas da delphinidina no modo positivo.**  
 Fonte: própria autora



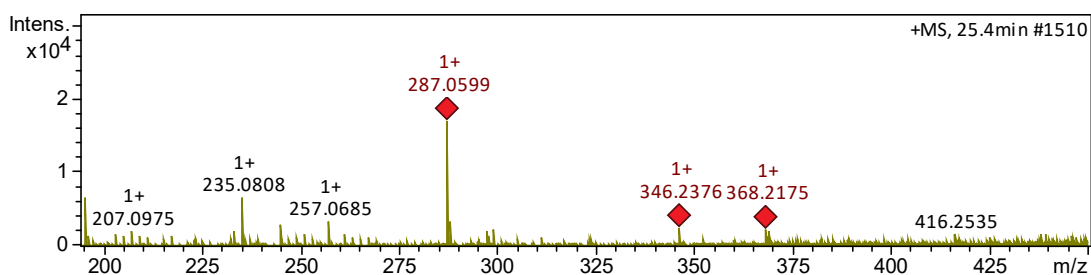
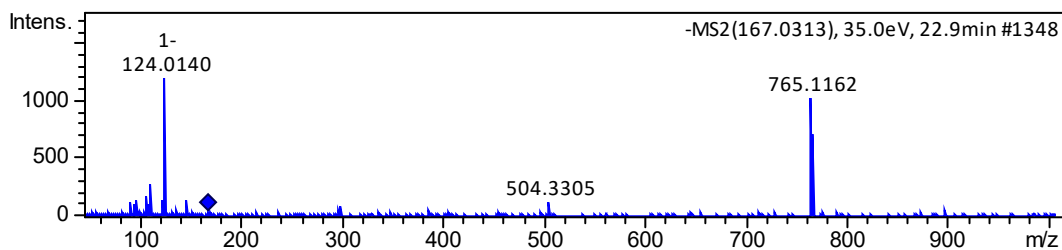
**Figura S51. Espectro de massas do ácido elágico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



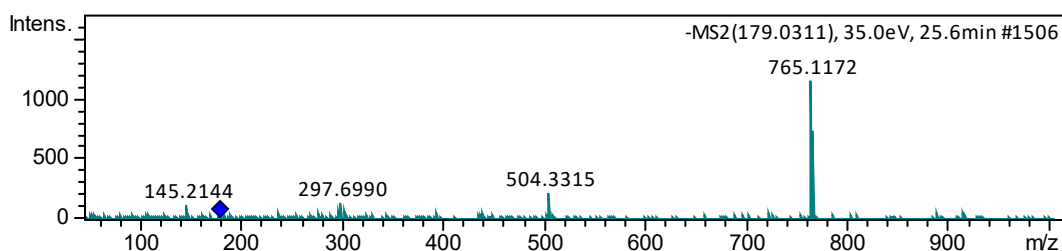
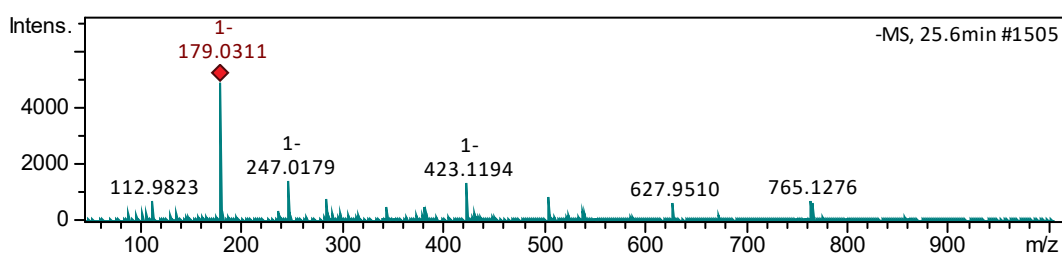
**Figura S52. Espectro de massas do ácido sinápico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



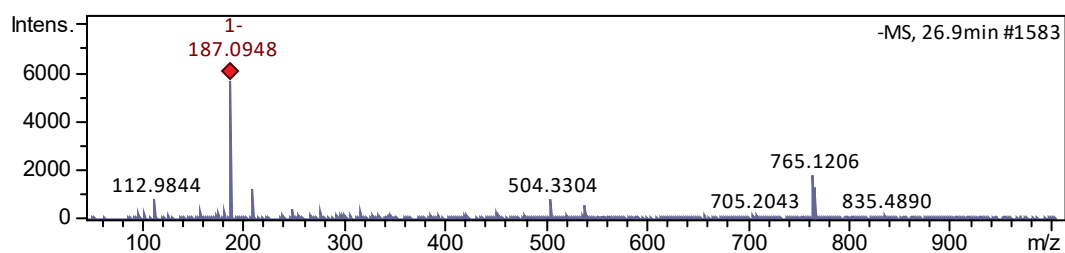
**Figura S53. Espectro de massas do ácido vanílico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



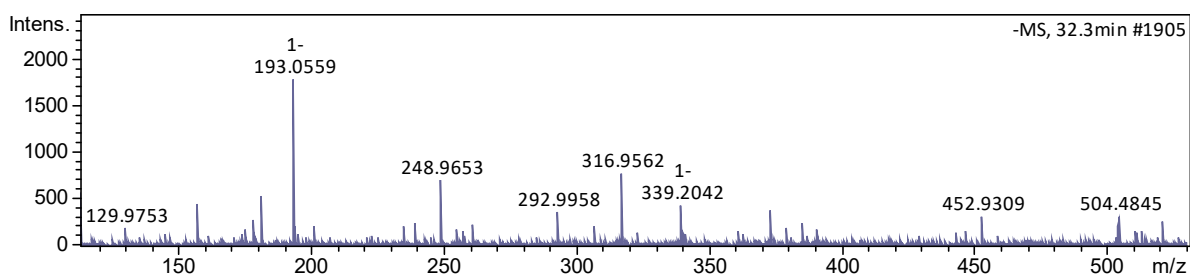
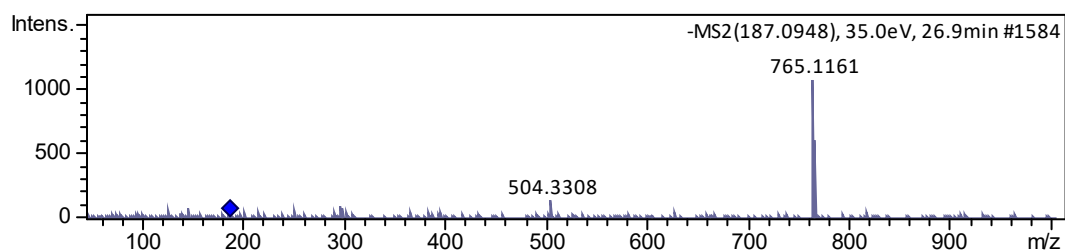
**Figura S54. Espectro de massas da cianidina no modo positivo**  
 Fonte: própria autora



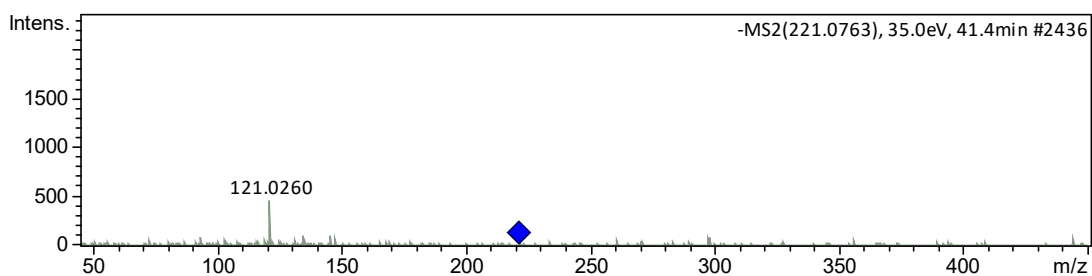
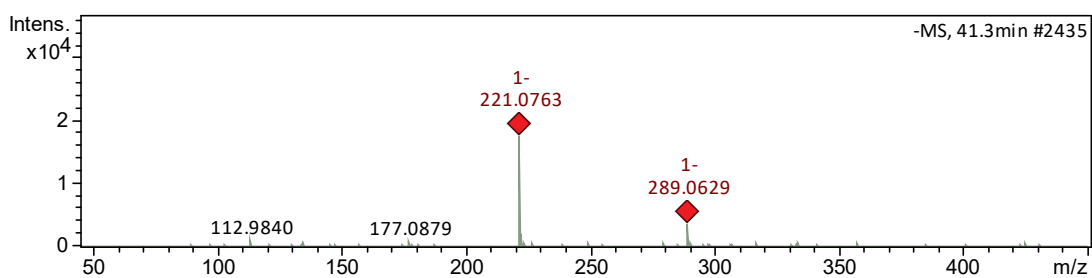
**Figura S55. Espectro de massas do isômero do ácido cafeico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



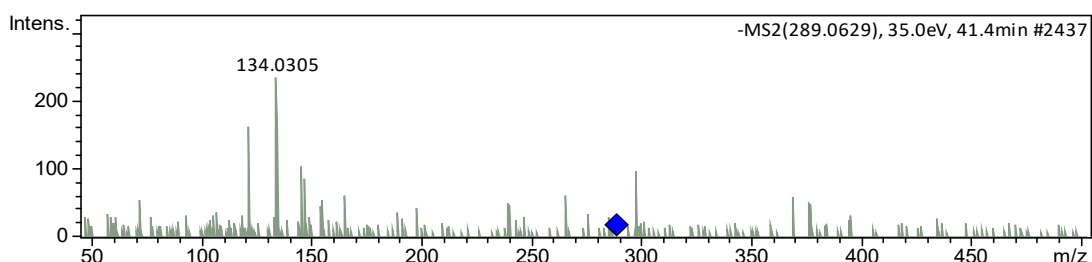
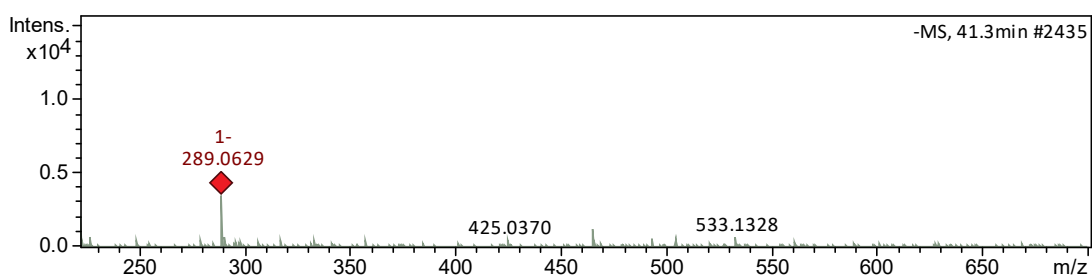
**Figura S56. Espectro de massas do composto não identificado no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



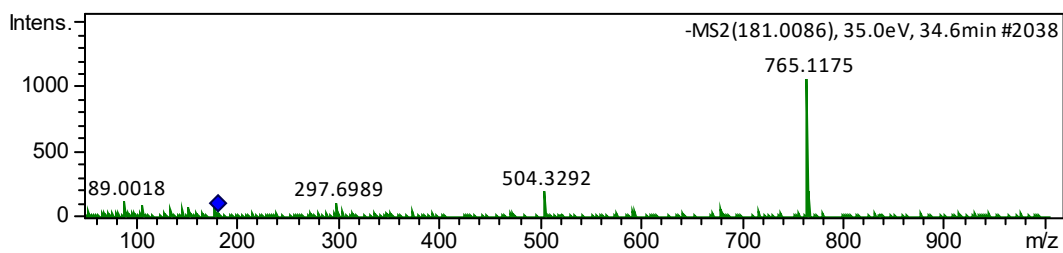
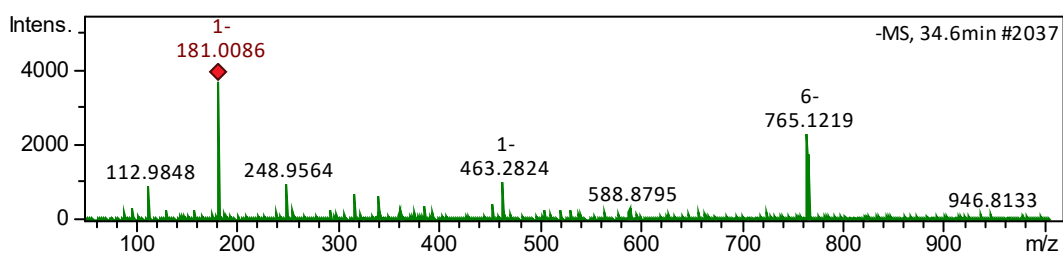
**Figura S57. Espectro de massas do isômero do ácido ferúlico no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



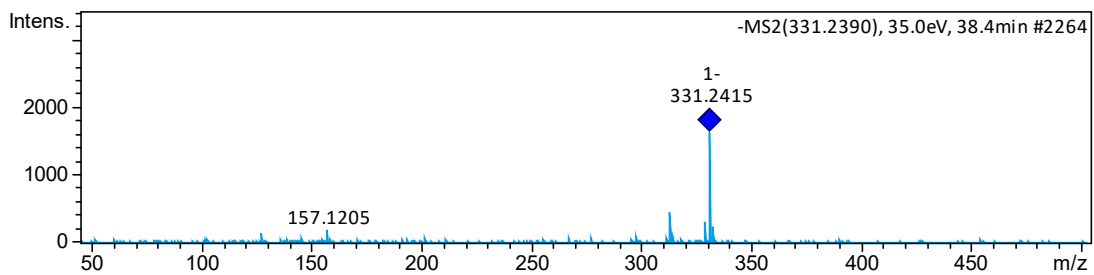
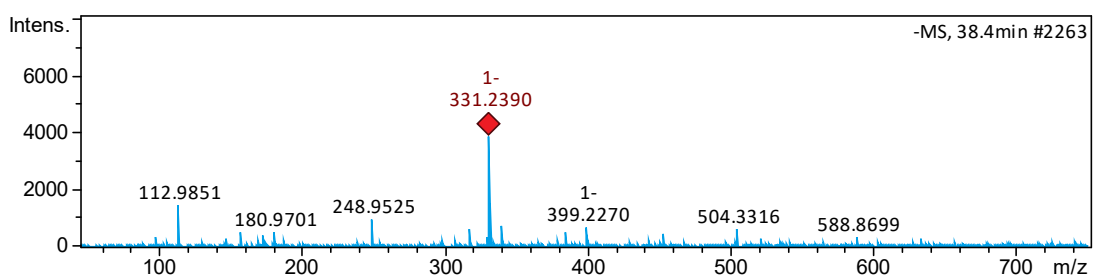
**Figura S58. Espectro de massas do derivado de (epi)catequina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S59. Espectro de massas do isômero de (epi)-catequina no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S60. Espectro de massas do composto não identificado no modo negativo**  
 Fonte: própria autora



**Figura S61. Espectro de massas do ácido carnosínico no modo negativo**  
Fonte: própria autora

## APÊNDICE C – Otimização e validação do método

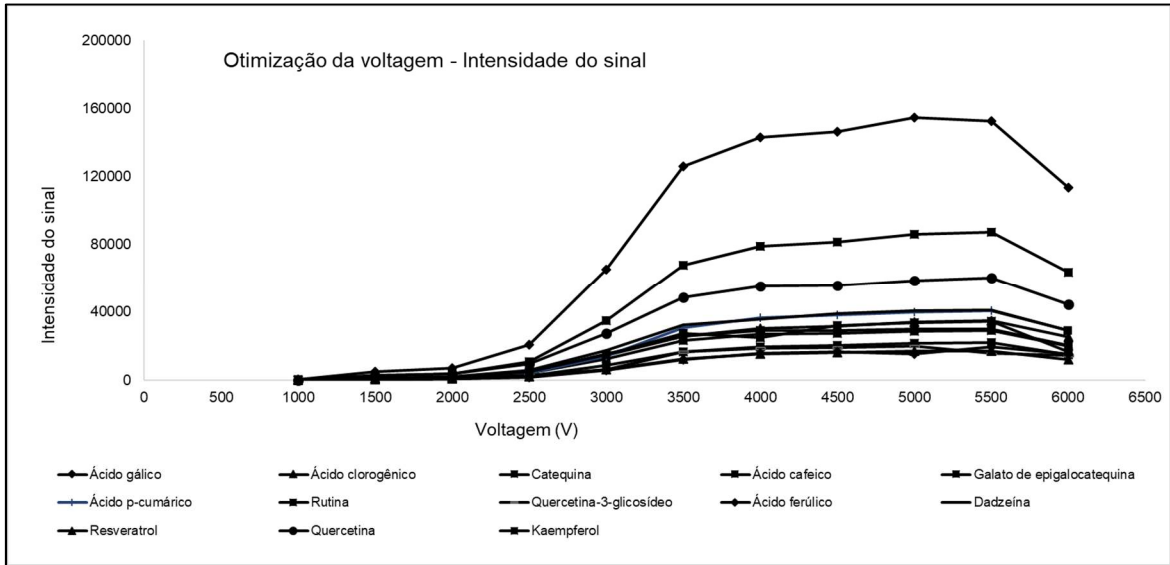


Figura S62. Variação da voltagem em relação com a intensidade do sinal

Fonte: própria autora

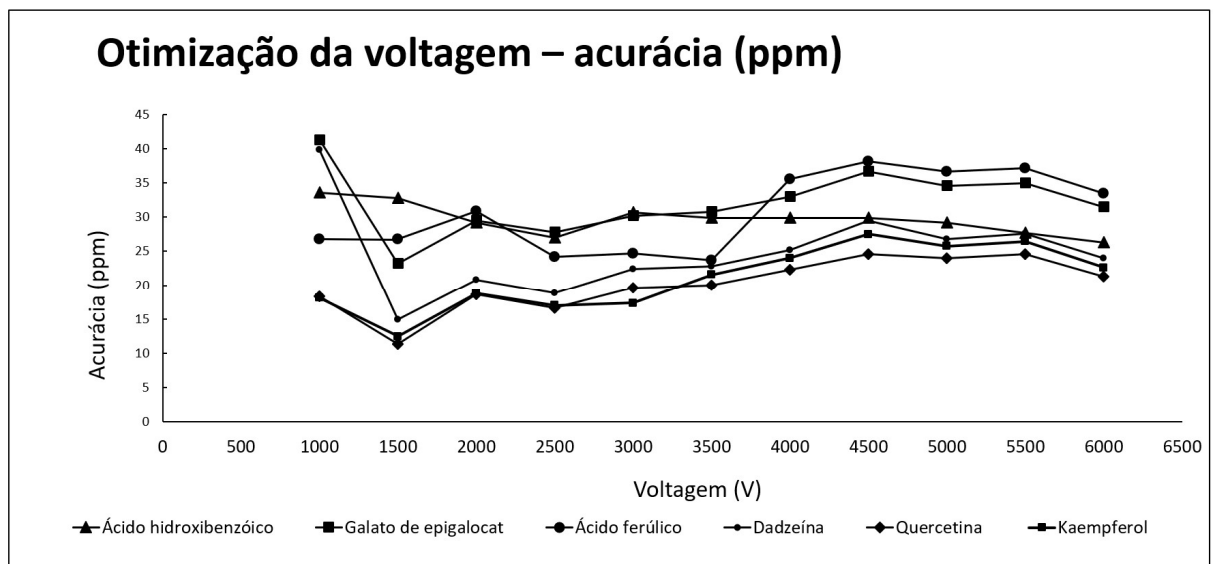
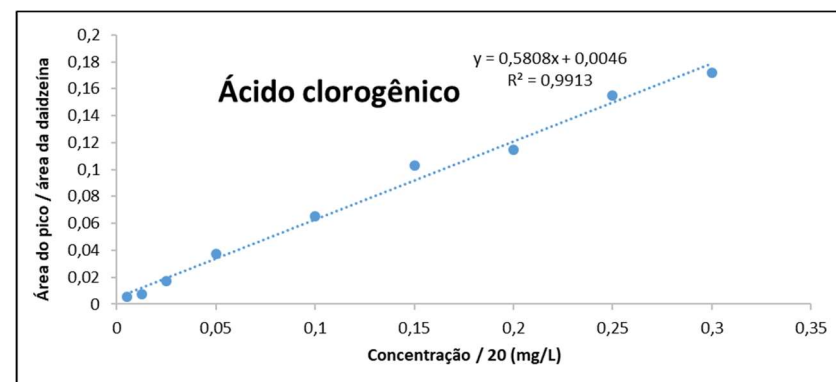
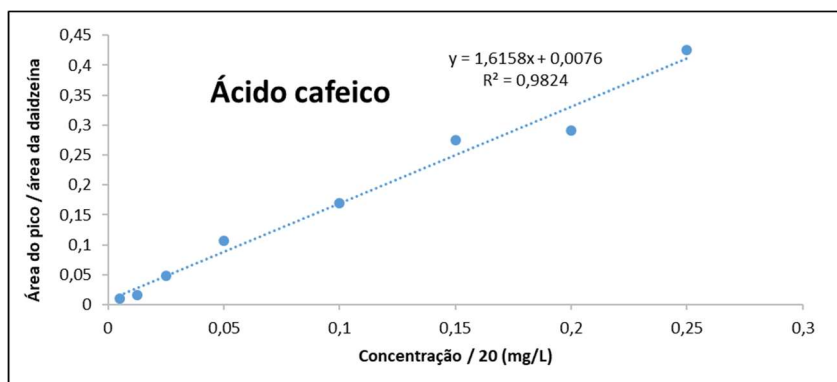
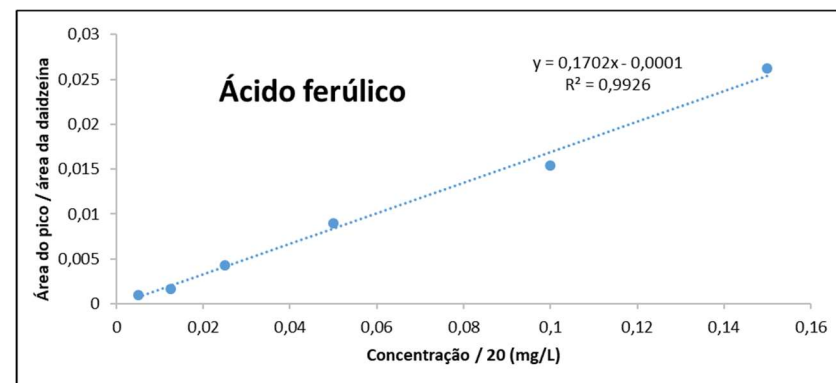
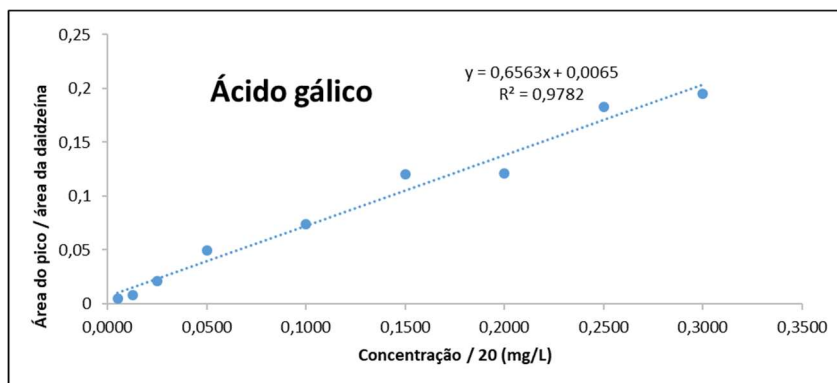


Figura S63. Variação da voltagem em relação à acurácia

Fonte: própria autora



**Figura S64. Curvas analíticas em solvente via padronização interna dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido clorogênico.**

Fonte: própria autora



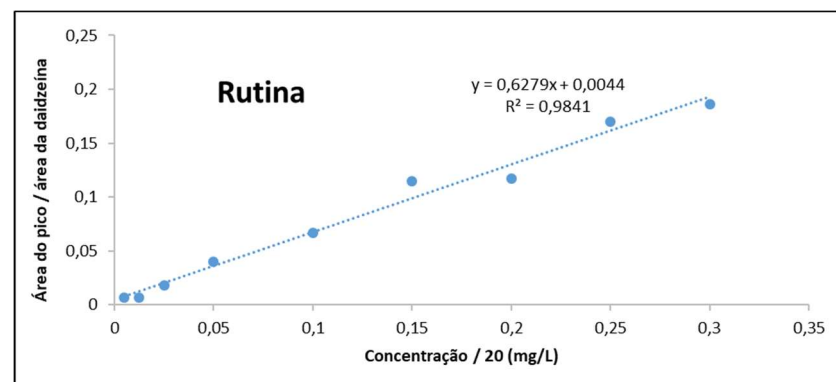
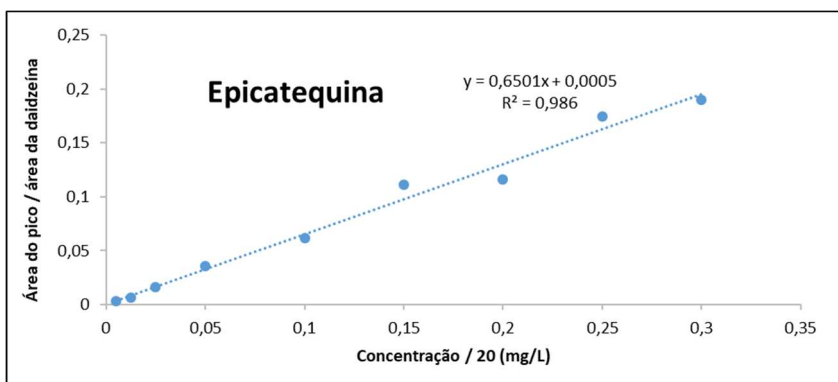
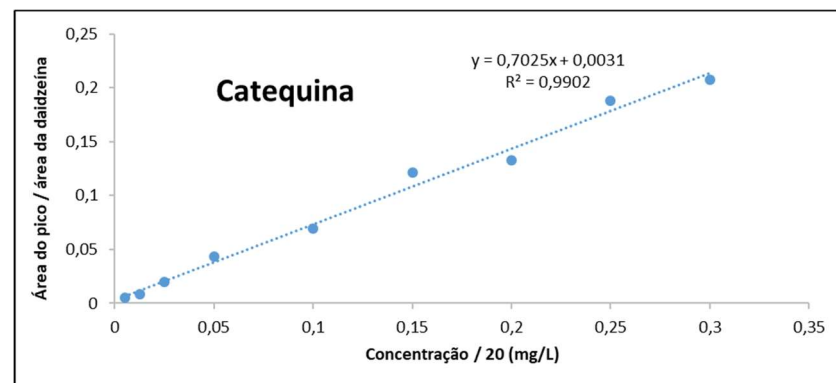
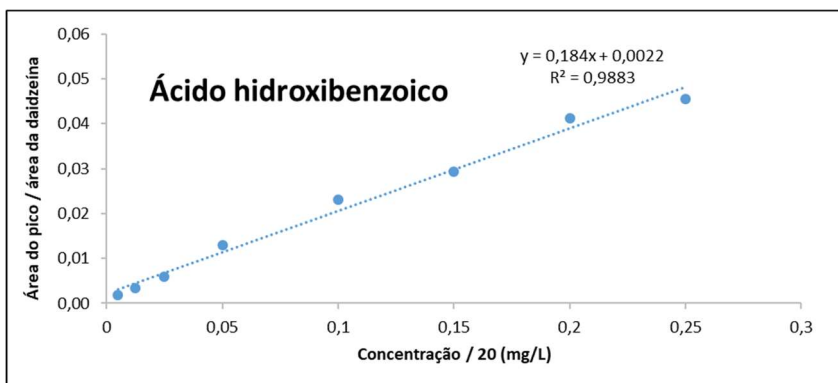


Figura S65. Curvas analíticas em solvente via padronização interna dos compostos fenólicos ácido hidroxibenzoico, catequina, epicatequina e rutina.

Fonte: própria autora.

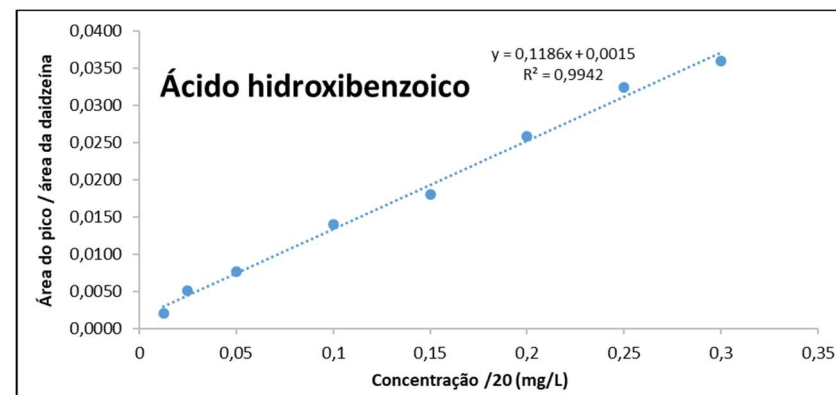
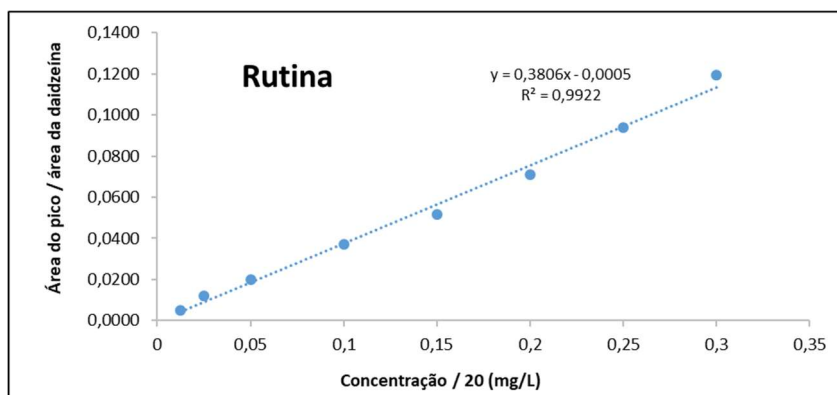
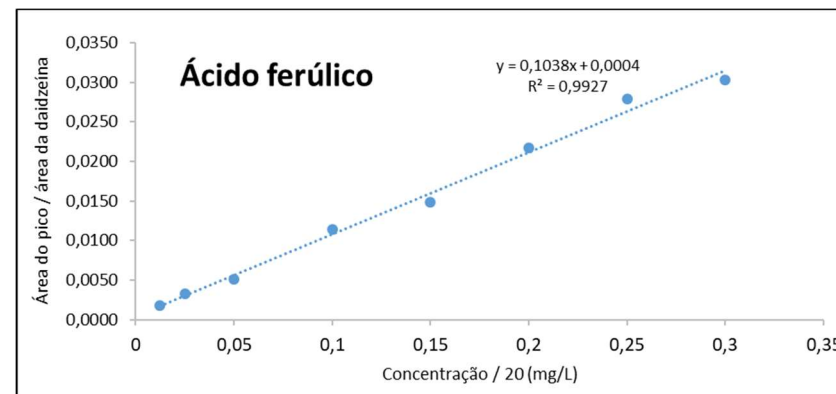
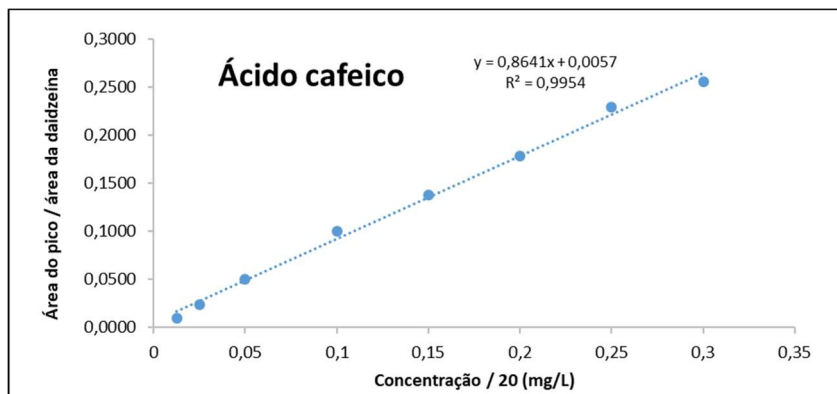


Figura S66. Curvas analíticas na matriz via padronização interna (20 ppm) dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido clorogênico.

Fonte: própria autora

## APÊNDICE D – Tabelas suplementares

**Tabela S2. Concentração de CFE e CFNE dos extratos liofilizados do araçá amarelo e do araçá vermelho ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).**

Composto	araçá amarelo (CFE)	araçá amarelo (CFNE)	araçá vermelho (CFE)	araçá vermelho (CFNE)
Ácido 3-O-cafeoil-chiquímico	n.d	319,8 ± 16,3	n.d	207,0 ± 39,3
<i>p</i> -cumaroil-feruloil-glicerol I	n.d	1000,7 ± 89,0	n.d	1408,3 ± 67,7
Ácido aconítico	n.d	434,4 ± 25,3	n.d	488,8 ± 56,4
Ácido gálico	n.d	470,7 ± 30,6	n.d	1644,3 ± 113,7
<i>p</i> -cumaroil-feruloil-glicerol II	n.d	1407,9 ± 95,0	n.d	997,3 ± 38,1
Ácido feruloilquínico I	n.d	860,3 ± 4,4	n.d	950,5 ± 50,1
Ácido 4-O-cafeoil-chiquímico	n.d	1265,2 ± 129,4	n.d	818,2 ± 77,8
<i>p</i> -cumaroil-feruloil-glicerol III	n.d	2088,4 ± 162,1	n.d	1574,8 ± 51,1
Ácido feruloilquínico II	n.d	1496,1 ± 132,7	n.d	1187,7 ± 38,5
Ácido 5-O-cafeoil-chiquímico	n.d	1409,5 ± 60,4	n.d	566,2 ± 17,6
Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila I	n.d	749,9 ± 49,4	n.d	1220,8 ± 89,0
Ácido 3,5-dihidroxibenzoico	n.d	309,3 ± 45,2	n.d	529,5 ± 69,9
Não identificado	n.d	372,4 ± 18,1	n.d	633,1 ± 48,3
Luteolina 7-O-glucuronídeo	n.d	218,6 ± 28,0	n.d	277,8 ± 24,1
Galato de 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutila II	n.d	368,2 ± 51,3	n.d	491,1 ± 22,9
Metil-galoil-glicopiranosídeo I	n.d	250,0 ± 3,0	n.d	224,9 ± 28,3
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	n.d	193,7 ± 23,7	n.d	n.d
Ácido vanílico hexosídeo	156,4 ± 4,2	n.d	n.d	n.d
Metil-galoil-glicopiranosídeo II	n.d	313,2 ± 9,2	n.d	323,3 ± 8,1

(continua)

(continua)

<b>Composto</b>	<b>araçá amarelo (CFE)</b>	<b>araçá amarelo (CFNE)</b>	<b>araçá vermelho (CFE)</b>	<b>araçá vermelho (CFNE)</b>
Metil-butil-hexosilramnosídeo	n.d	545,0 ± 74,4	n.d	478,9 ± 24,1
Vescalagina	295,8 ± 26,0	n.d	286,8 ± 25,5	n.d
Digaloil (-epi)catequina I	149,4 ± 9,7	n.d	345,8 ± 34,7	n.d
Galocatequina	289,5 ± 19,1	n.d	2485,2 ± 185,5	n.d
Ácido vanílico hexosídeo II	n.d	n.d	249,4 ± 5,4	n.d
Digaloil (-epi)catequina II	n.d	n.d	1390,6 ± 92,0	n.d
Ácido benzoilbenzoico I	n.d	286,1 ± 3,9	n.d	n.d
Galato de metila	n.d	1029,1 ± 61,2	n.d	9504,4 ± 365,8
Castalagina	406,5 ± 34,1	n.d	375,4 ± 58,8	n.d
Ácido benzoilbenzoico II	n.d	294,4 ± 2,6	n.d	n.d
Di-HHDP hexosídeo III	367,6 ± 24,0	n.d	488,4 ± 26,6	n.d
(-epi)catequina-(-epi)catequina	681,1 ± 86,5	n.d	539,0 ± 13,1	n.d
Ácido cumárico glicosídeo	525,7 ± 29,6	n.d	1579,0 ± 49,5	n.d
Catequina	1561,3 ± 226,3	n.d	199,3 ± 32,0	n.d
Di-HHDP hexosídeo IV	323,1 ± 43,2	n.d	347,4 ± 40,1	n.d
Derivado do galoil-bis-HHDP	162,0 ± 7,6	n.d	686,9 ± 98,9	n.d
Não identificado	n.d	n.d	n.d	798,4 ± 30,1
Galoil-di-HHDP hexosídeo I	214,0 ± 30,5	n.d	243,3 ± 12,0	n.d
Dímero de proantocianidina B II	244,7 ± 13,1	n.d	550,8 ± 24,1	n.d
HHDP hexosídeo	661,2 ± 46,0	n.d	n.d	n.d
Galoil-bis-HHDP-glicosídeo I	323,0 ± 16,0	n.d	n.d	n.d
Galoil-di-HHDP hexosídeo II	239,5 ± 18,7	n.d	218,5 ± 6,9	n.d
Derivado de (-epi)catequina	234,6 ± 10,2	n.d	344,3 ± 42,1	n.d

(continua)

<b>Composto</b>	<b>araçá amarelo (CFE)</b>	<b>araçá amarelo (CFNE)</b>	<b>araçá vermelho (CFE)</b>	<b>araçá vermelho (CFNE)</b>
Derivado do ácido cumárico	n.d	501,2 ± 50,4	n.d	n.d
Miricetina hexosídeo	270,0 ± 17,2	n.d	n.d	n.d
Galoil-di-HHDP hexosídeo II	569,6 ± 59,5	n.d	334,1 ± 50,1	n.d
Digaloil-HHDP hexosídeo I	n.d	n.d	247,9 ± 41,1	n.d
Galoil-bis-HHDP-glicosídeo II	640,6 ± 41,6	n.d	856,8 ± 97,3	n.d
Derivado do ácido <i>p</i> -cumaroil-quínico	n.d	339,5 ± 12,1	n.d	294,7 ± 21,2
Taxifolina hexosídeo	646,7 ± 83,0	n.d	n.d	
Ácido benzoilbenzoico III	n.d	n.d	n.d	55,3 ± 3,9
Delfinidina	n.d	n.d	n.d	1050,6 ± 21,0
Galoil-di-HHDP hexosídeo IV	203,8 ± 18,9	n.d	353,3 ± 57,1	n.d
Digaloil-HHDP hexosídeo II	235,4 ± 33,5	n.d	n.d	n.d
Ácido vanílico	n.d	649,6 ± 53,5	n.d	16,3 ± 1,6
Ácido elágico hexosídeo	n.d	n.d	251,0 ± 25,3	n.d
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	n.d	52,0 ± 5,2	n.d	61,3 ± 1,4
Galato de proantocianidina B	201,18 ± 21,7	n.d	188,6 ± 11,3	n.d
Derivado do ácido abscísico	n.d	n.d	268,9 ± 35,8	n.d
Derivado do ácido abscísico	n.d	n.d	248,1 ± 31,8	n.d
Dímero de proantocianidina B III	159,8 ± 21,4	n.d	256,0 ± 16,5	n.d
Cianidina	n.d	n.d	n.d	1624,2 ± 89,0
Isômero do ácido cafeico	n.d	1810,4 ± 140,5	n.d	34,6 ± 3,3
Isofraxidin hexosídeo I	320,0 ± 29,1	n.d	n.d	n.d
Derivado de galagil	437,4 ± 59,0	n.d	276,8 ± 17,1	n.d
Quercetina hexosídeo	244,4 ± 22,6	n.d	185,2 ± 25,7	n.d

(continuação)

Composto	araçá amarelo (CFE)	araçá amarelo (CFNE)	araçá vermelho (CFE)	araçá vermelho (CFNE)
Quercetina glucuronídeo	251,0 ± 26,6	n.d	241,1 ± 22,0	n.d
Não identificado	n.d	220,1 ± 3,9	n.d	21,2 ± 2,4
Ácido elágico	n.d	1362,8 ± 149,1	252,4 ± 44,5	36,9 ± 1,4
Galato de (-epi)catequina	n.d	n.d	424,7 ± 33,8	n.d
Ácido diferúlico I	n.d	n.d	124,0 ± 4,7	n.d
Ácido sináptico I	n.d	261,5 ± 12,5	n.d	8,3 ± 1,1
Eriodictiol hexosídeo	560,5 ± 45,4	n.d	217,9 ± 35,4	n.d
Quercetina-malonil-glicoronídeo I	n.d	n.d	453,3 ± 29,8	n.d
Isômero do ácido ferúlico	n.d	213,3 ± 0,8	n.d	n.d
Ácido abscísico	63,9 ± 5,5	n.d	151,2 ± 27,9	n.d
Ácido sináptico II	n.d	177,9 ± 8,6	n.d	5,9 ± 0,4
Derivado de (-epi)catequina I	n.d	433,6 ± 19,3	n.d	17,3 ± 0,9
Não identificado	n.d	463,0 ± 35,0	n.d	7,2 ± 0,2
Derivado de (-epi)catequina II	n.d	325,3 ± 46,1	n.d	8,6 ± 0,6
Ácido carnosico	n.d	465,1 ± 69,8	n.d	4,7 ± 0,7
Derivado de (-epi)catequina III	n.d	259,6 ± 32,4	n.d	8,0 ± 1,4
<b>Fenólicos totais</b>	<b>11639 ± 338</b>	<b>23166 ± 1.107</b>	<b>15661 ± 505</b>	<b>23110 ± 938</b>

n.d. = abaixo dos limites de detecção e quantificação (equação 1 e 2).