



**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)**



**Caroline Carboni Martins**

**INFLUÊNCIA DA HIDRÓLISE ÁCIDA NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS NÃO EXTRAÍVEIS DA CASCA E SEMENTE DE UVA**

**Porto Alegre**

**2021**

**Caroline Carboni Martins**

**INFLUÊNCIA DA HIDRÓLISE ÁCIDA NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS NÃO EXTRAÍVEIS DA CASCA E SEMENTE DE UVA**

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.

Orientadores: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues e Prof<sup>a</sup>.  
Dr<sup>a</sup>. Giovana Domeneghini Mercali

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

**Porto Alegre**

**2021**

### CIP - Catalogação na Publicação

Martins, Caroline Carboni  
Influência da hidrólise ácida na obtenção de  
compostos fenólicos não extraíveis da casca e semente  
de uva / Caroline Carboni Martins. -- 2021.  
151 f.  
Orientadores: Giovana Domeneghini Mercali, Eliseu  
Rodrigues.

Coorientador: Rafael Costa 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, 2021.

1. Compostos fenólicos não extraíveis. I. Mercali,  
Giovana Domeneghini, orient. II. Rodrigues, Eliseu,  
orient. III. Rodrigues, Rafael Costa, coorient. IV.  
Título.

Caroline Carboni Martins

**DISSERTAÇÃO**

**INFLUÊNCIA DA HIDRÓLISE ÁCIDA NA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
NÃO EXTRAÍVEIS DA CASCA E SEMENTE DE UVA**

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 Comissão Examinadora:

Homologada em: ...../...../.....

Por:

.....  
Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Giovana Domeneghini Mercali  
Orientadora – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues  
Coorientador – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flôres  
PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Coordenador – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Regina Barros Mariutti  
UNICAMP

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Emanuelli  
UFSM

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flôres  
Diretora – ICTA/UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus orientadores e coorientador, Prof. Eliseu Rodrigues, Prof<sup>ª</sup>. Giovana Domeneghini Mercali e Prof. Rafael Costa Rodrigues, por toda dedicação, auxílio e ensinamentos, bem como a disponibilidade sempre que necessário.*

*Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela possibilidade de execução deste trabalho.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS por todo empenho em manter-se e aos alunos, diante de todos os desafios que estamos enfrentando.*

*À equipe e colegas dos laboratórios de equipamentos especiais e de antioxidantes naturais, em especial, as técnicas Luana e Priscila, e a bolsista Juliana, por toda ajuda, conversas e cafés.*

*Aos meus colegas de trabalho, que chegaram há pouco mas compartilham o dia a dia comigo, por todo apoio e parceria, meu agradecimento ao pessoal do “turno”.*

*Aos colegas da Pós-Graduação pela convivência e amizade durante o mestrado.*

*À minha família, em especial minha mãe, Rosane, e meu irmão, Igor, por sempre apoiarem e possibilitarem meus sonhos, e sempre estarem ao meu lado.*

*Ao Matheus, por todo apoio e companheirismo durante mais esta jornada.*

## RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos exercem benefícios à saúde humana. Grande parte destes estudos foram conduzidos avaliando os compostos fenólicos extraíveis (CFE), sendo ignorados os compostos fenólicos não extraíveis (CFNE). Os CFNE são uma fração de compostos fenólicos que não são extraídos da maneira convencional, uma vez que interagem de diferentes formas com a matriz do alimento, podendo estar ligados a macromoléculas ou a parede celular de produtos de origem vegetal. Atualmente, a sua extração é conduzida aplicando hidrólise ácida ou básica, utilizando concentrações elevadas de ácido ou base, respectivamente. Uma grande limitação associada à aplicação do processo de hidrólise é a degradação dos compostos fenólicos, o que prejudica a interpretação da sua ação biológica em estudos *in vivo* e *in vitro*. Nesse trabalho, o efeito da hidrólise ácida sobre os CFNE de casca e semente de uva em pó foi avaliado, e a aplicação de condições ácidas menos agressivas para a sua obtenção foi sugerida. Diferentes concentrações de ácido clorídrico (0,10 até 15,0 %), temperaturas (50 a 90 °C) e tempos (5 a 20 min) foram avaliados para a obtenção dos CFNE. Os CFNE foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Os resultados foram analisados considerando como resposta a concentração de CFNE total e a concentração obtida para as classes de CFNE separadamente. Os resultados mostraram que as concentrações de ácido e temperaturas intermediárias estão associadas a uma maior concentração de CFNE para a casca (8,0 % e 65 °C) e a semente (1,0 % e 80 °C). Nessas condições, o teor dos CFNE representou 39 e 22 % (*m/m*) dos CF totais para casca e semente de uva, respectivamente. Avaliando as classes dos compostos fenólicos separadamente para ambas as matrizes, observou-se que estas combinações foram capazes de extrair grandes concentrações de CFNE de taninos condensados, sendo esta a classe majoritária desses compostos nessas matrizes. Os resultados demonstram que as condições de hidrólise podem ser moduladas para a obtenção de extratos ricos em uma determinada classe. Os taninos hidrolisáveis e ácidos hidroxibenzoicos, por exemplo, foram melhor extraídos usando concentrações de ácido e temperaturas mais elevadas. Os taninos condensados, por outro lado, apresentaram maiores concentrações quando valores intermediários de temperatura e concentração de ácido foram utilizados. O maior tempo de hidrólise (20 min) aumentou 1,2 vezes a concentração dos CFNE totais para a casca da uva em pó, mas isso não aconteceu para a semente em pó, sendo 5 min o suficiente para liberá-los da matriz alimentar. Os resultados desse trabalho demonstram que a fração dos CFNE é capaz de ser obtida das matrizes estudadas com a aplicação de condições mais brandas de hidrólise, com menor degradação. De uma forma geral, os resultados indicam que a concentração e composição dos CFNE obtidos estão diretamente relacionados com as condições de hidrólise e a matriz estudada.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos ligados, concentração de ácido, hidrólise ácida, temperatura

## ABSTRACT

Several studies have shown that phenolic compounds have beneficial effects on human health. Most of these studies were conducted evaluating extractable phenolic compounds (EPC), while non-extractable phenolic compounds (NEPC) were ignored. NEPC are a fraction of phenolic compounds that are not released in the conventional extraction, as they interact in different ways with the food matrix and may be linked to macromolecules or components of the plant cell wall. Currently, their extraction is carried out by applying acidic or basic hydrolysis, using strong acid or base concentrations, respectively. A major limitation of this process is the degradation of phenolic compounds, which impairs the interpretation of their biological action in *in vivo* and *in vitro* studies. In this work, the effect of acid hydrolysis on NEPC from grape peel and seed powder was evaluated, suggesting application of less aggressive conditions to obtain them. Different concentrations of hydrochloric acid (0.1 to 15.0 %), temperatures (50 to 90 °C) and times (5 to 20 min) were evaluated to obtain NEPC. NEPC were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). The results were analyzed considering the NEPC total concentration and the concentration obtained for each CFNE class individually. Overall, the results showed that intermediate of acid and temperatures are associated with a higher concentration and higher number of NEPC for grape peel (8.0 % and 65 °C) and seed (1.0% and 80 °C) powders. Under these conditions, the NEPC content represented 39 and 22 % (*m/m*) of the total PC for grape peel and seed, respectively. Evaluating each class of NEPC separately for both matrices, it was observed that these combinations were able to extract large concentrations of condensed tannins, which is the major class of these compounds in both matrices. The results indicate that hydrolysis conditions can be modulated to obtain extracts rich in a specific class. Hydrolysable tannins and hydroxybenzoic acids, for example, were better extracted using higher acid concentrations and higher temperatures. Condensed tannins, on the other hand, showed higher concentrations when intermediate values of temperature and acid concentration were applied. The longer hydrolysis time (20 min) increased 1.2 times total NEPC concentration for the grape peel powder, while for the grape seed powder the shortest time (5 min) was enough to release it from the food matrix. The results of this work demonstrate that the NEPC fraction can be obtained from the studied matrices with the application of milder hydrolysis conditions, with less NEPC degradation. Overall, the results highlight that NEPC concentration and composition are directly related to the hydrolysis conditions and the matrix characteristics.

**Keywords:** acid hydrolysis, acid concentration, bound phenolic compounds, temperature

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Casca e semente de uva em pó.....	91
<b>Figura 2.</b> Diagrama das etapas experimentais realizadas no presente trabalho.....	93
<b>Figura 3.</b> Sistema <i>by-pass</i> utilizado na hidrólise ácida: banho de resfriamento (Figura A), banho de aquecimento (B), banho ligado ao condensador (C), painel com o sistema <i>by-pass</i> (D), agitador magnético (1), célula de vidro encamisada (2), condensador (3), mangueiras e válvulas de entrada (4) e saída (5) de água.....	94
<b>Figura 4.</b> Perfil de temperatura obtido durante a hidrólise ácida dos compostos fenólicos não extraíveis.....	95



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Faixas de concentração das curvas analíticas e concentração das soluções-estoque dos padrões de compostos fenólicos.....	99
---	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 <i>New insights into non-extractable phenolic compounds: how to overcome the analytical challenges</i> .....	14
Abstract.....	14
3.1.1 Introduction.....	14
3.1.2 Literature search strategy.....	16
3.1.3 Phenolic compounds.....	17
3.1.3.1 Chemical nature.....	17
3.1.3.2 Sources.....	19
3.1.4 Non-extractable phenolic compounds.....	20
3.1.4.1 Classes.....	20
3.1.4.2 NEPC extraction methods.....	21
3.1.4.2.1 Acid hydrolysis.....	53
3.1.4.2.2 Alkaline hydrolysis.....	53
3.1.4.2.3 Enzymatic hydrolysis.....	55
3.1.4.2.4 Use of emerging technologies.....	55
3.1.5 Methods for quantification and identification.....	57
3.1.6 Strategies to overcome analytical drawbacks.....	58
3.1.7. Concluding remarks.....	59
Conflicts of interest.....	60
Acknowledgments.....	60
References.....	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
4.1 Amostras.....	91
4.2 Reagentes e Padrões Analíticos.....	92
4.3 Métodos de Extração.....	92
4.3.1 Extração Exaustiva dos CFE.....	92
4.3.2 Obtenção dos CFNE.....	93

4.3.2.1 Etapa 1 – Efeito da Concentração de Ácido.....	94
4.3.2.2 Etapa 2 – Efeito da Temperatura.....	96
4.3.2.3 Etapa 3 – Efeito do Tempo.....	96
4.4 Análise dos Compostos Fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS .....	96
4.4.1 Identificação .....	96
4.4.2 Quantificação .....	97
4.4.2.1 Preparo das Soluções-Estoque .....	97
4.4.2.2 Preparo das Curvas Analíticas.....	98
4.5 Análise Estatística .....	99
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101
5.1 <i>Acid hydrolysis conditions affect the non-extractable phenolic compounds composition from grape peel and seed</i> .....	101
Abstract.....	101
5.1.1. Introduction .....	101
5.1.2. Material and methods .....	103
5.1.2.1. <i>Chemicals</i> .....	103
5.1.2.2. <i>Samples</i> .....	103
5.1.2.3. <i>Extraction of phenolic compounds</i> .....	104
5.1.2.3.1. <i>Extractable phenolic compounds</i> .....	104
5.1.2.3.2. <i>Extraction of non-extractable phenolic compounds</i> .....	104
5.1.2.4. <i>A model system with analytical standards</i> .....	105
5.1.2.5. <i>HPLC-DAD-ESI-QTOF analysis</i> .....	106
5.1.2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	107
5.1.3. Results and discussion.....	108
5.1.3.1. <i>Effect of hydrolysis conditions on nepc total content</i> .....	108
5.1.3.2. <i>Effect of hydrolysis conditions on nepc composition</i> .....	110
5.1.3.3. <i>Effect of hydrolysis times on nepc</i> .....	115
5.1.4. Conclusion.....	127
Acknowledgment .....	127
Supplementary material.....	128
6 CONCLUSÕES .....	140
REFERÊNCIAS .....	142
APÊNDICE A - Curvas Analíticas e Parâmetros MS .....	145

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos (CF) são encontrados em alimentos de origem vegetal, tais como frutas, legumes e cereais. Diversos estudos demonstram que uma dieta rica nesses alimentos possui um efeito positivo à saúde humana, com destaque para a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (FRAGA et al., 2019; HERNANDES et al., 2014; LAGE et al., 2021; LUDWIG et al., 2018). Esse efeito positivo está relacionado aos diferentes mecanismos de ação dos CF, incluindo a sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória (CHENG et al., 2016), sua interação com a microbiota intestinal (TOMÁS-BARBERÁN; SELMA; ESPÍN, 2016) e seus efeitos dentro das vias de sinalização intra e intercelulares (FRAGA et al., 2019).

A compreensão do papel e dos mecanismos envolvidos na ação dos CF na saúde humana passam, invariavelmente, pelo conhecimento, amplo e acurado, dos CF presentes nos alimentos. Nos últimos 20 anos, foram publicados mais 100 mil trabalhos buscando compreender a relação entre os CF e a saúde humana. Em muitos desses trabalhos, foram aplicadas técnicas avançadas de extração e de análise de CF. Os resultados encontrados permitem explicar as mais diferentes propriedades biológicas encontradas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Contudo, em grande parte desses trabalhos, um grupo importante dos CF foi ignorado. Essa fração é conhecida como “compostos fenólicos não extraíveis” ou “ligados” à matriz do alimento.

Os CF podem ser divididos em dois grandes grupos: compostos fenólicos extraíveis (CFE) e compostos fenólicos não extraíveis (CFNE). Como indicado pela nomenclatura atribuída, os CFE são todos os CF que são extraídos diretamente da matriz pela aplicação de solventes orgânicos ou misturas de solventes orgânicos e água. Os CFNE, por outro lado, permanecem no resíduo após a extração com solventes orgânicos aquosos (GONZALES et al., 2015). Esses compostos fenólicos ficam retidos devido à forte interação com a matriz ou devido a insolubilidade no solvente de extração (ARRANZ; SAURA CALIXTO, 2010; WANG et al., 2020).

Nos últimos 10 anos, os números de trabalhos com os CFNE têm aumentado, permitindo um maior conhecimento sobre sua representatividade frente aos compostos fenólicos totais. Por exemplo, os CFNE representam aproximadamente 15 % dos CF totais em cascas de jabuticaba (QUATRIN et al., 2019), cerca de 35 % dos CF presentes em araçá amarelo e vermelho (MALLMANN et al., 2020) e 80 a 84 % dos CF encontrados em frações de farelo de trigo enriquecidas em aleurona (MARTÍN-GARCÍA et al., 2021).

Vale ressaltar que esses trabalhos realizaram a extração exaustiva dos CFE, evitando, dessa forma, a superestimação da fração não extraível.

A literatura recente também demonstra que os CF presentes na fração CFNE apresentam um perfil qualitativo distinto da fração extraível. MALLMANN et al. (2020) encontram somente ácido gálico e ácido elágico em ambas as frações em aração vermelho e amarelo. De forma semelhante, apenas os ácidos cafeico, vanílico e sinápico foram encontrados nas frações CFE e CFNE obtidas a partir de trigo (MARTÍN-GARCÍA et al., 2021). Outro ponto de destaque na literatura é que esses compostos chegam ao cólon praticamente intactos, onde passam por uma extensa transformação pela microflora. No cólon, os CFNE são liberados de sua matriz em metabólitos com potencial de absorção por meio da fermentação colônica (PÉREZ-JIMÉNEZ; DÍAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO, 2013).

O estudo da fração CFNE enfrenta uma grande barreira que impede um conhecimento mais aprofundado da natureza desses compostos nos alimentos vegetais. A grande maioria dos estudos realizados utilizou os métodos de hidrólise ácida ou alcalina para extração dos CF ligados à matriz. No método da hidrólise ácida, os CFNE são comumente liberados pela aplicação de ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), em altas temperaturas e longos tempos de hidrólise. Pode-se observar uma grande variação dos parâmetros utilizados na hidrólise ácida, sendo comumente encontrado a utilização de solventes metanólicos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % (BALLI et al., 2020; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; PLAZA; MARINA, 2021; SU et al., 2021) e HCl 2 M (DZAH et al., 2021; NARVEKAR; THARAYIL, 2021; YOU et al., 2021). Nesses estudos, o tempo variou de 30 min até 24 horas e a temperatura de 62 °C à 85 °C. Essas condições são capazes de promover a liberação dos CFNE, porém, promovem também a sua posterior sua degradação (MOUSSA-AYOUB et al., 2011; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2015).

A hidrólise química gera também uma grande quantidade de resíduos, que precisa ser descartada de forma adequada. Dessa forma, as condições da hidrólise, como concentração de ácido ou base, temperatura, tempo, razão amostra/solvente, entre outras, precisam ser otimizadas para reduzir as perdas por degradação e os resíduos gerados. Além disso, os métodos necessitam ser padronizados para permitir a comparação dos CFNE em diferentes matrizes. Neste contexto, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito de diferentes condições de hidrólise ácida da fração CFNE em casca e semente de uva, propondo modificações no método que permitam a identificação e quantificação dos

compostos com o menor grau de degradação possível. As amostras de casca e semente de uva foram escolhidas como objeto de estudo devido ao conhecimento prévio de que elas são ricas em diferentes classes de compostos fenólicos, o que irá facilitar, posteriormente, a identificação dos compostos e a discussão dos resultados obtidos.

O presente texto está estruturado da forma descrita a seguir. No Capítulo 2 são apresentados os objetivos gerais e específicos do trabalho. Posteriormente, o Capítulo 3 apresenta os fundamentos teóricos sobre os compostos fenólicos, com ênfase nos CFNE, na forma de um artigo de revisão. No Capítulo 4, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho são apresentados. Os Capítulos 5 e 6 apresentam os resultados e discussão, contemplados em formato de artigo, e as conclusões gerais do trabalho, respectivamente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o efeito das condições de hidrólise na composição dos CFNE da casca e semente de uva e desenvolver um método de extração menos agressivo que evite a degradação desses compostos, possibilitando sua correta caracterização.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- extrair a fração CFE dos compostos fenólicos presentes na semente e na casca de uva, utilizando um método de extração exaustiva com solventes orgânicos;
- identificar e quantificar os CFE por HPLC-DAD-ESI-MS/MS;
- obter exaustivamente os CFNE presentes na semente e na casca de uva pela aplicação da técnica de hidrólise ácida, método tradicionalmente utilizado;
- identificar, quantificar e caracterizar os CFNE por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.
- avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido, temperatura e tempo da hidrólise ácida na composição do CFNE;
- propor um método alternativo de hidrólise ácida menos agressivo que evite a degradação desses compostos, possibilitando sua correta caracterização.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo é apresentada uma revisão sobre os CF, com ênfase nos CFNE, foco do presente trabalho. O conteúdo será apresentado na forma de artigo de revisão. O artigo será posteriormente submetido a um periódico internacional indexado.

#### 3.1 New insights into non-extractable phenolic compounds: how to overcome the analytical challenges

##### Abstract

Although phenolic compounds (PC) have been studied for many years, some unanswered questions concerning non-extractable phenolic compounds (NEPC) need to be elucidated. These compounds remain in food-matrix after the conventional extraction, and their importance has been shown in recent studies with fruit and vegetables. In this review, 182 studies published in the last five years about NEPC in foods were evaluated, focusing on critical points of the applied extraction methods. Analytical pitfalls were pointed out, and strategies to overcome them were proposed. First, free PC exhaustive extraction should be performed before hydrolysis processes to avoid overestimation of the NEPC fraction. NEPC extraction by aggressive methods modifies their original structure and makes their complete elucidation difficult. These methods must be optimized considering the research objective, as different conditions may result in different amounts and profile of compounds. Concerning quantification and identification, the widely used spectrophotometric method is not able to identify individual compounds and leads to overestimation. Liquid chromatography can be improved, especially regarding standards availability. Identification through mass spectrometry combined with bioinformatics may be used to explore data generated.

**Keywords:** bioactive compounds, bound phenolic, macromolecular antioxidants, fruits.

##### 3.1.1 Introduction

Phenolic compounds (PC) are secondary metabolites of plants, covering many structures, some of which are ubiquitous in plants. In contrast, others are restricted to specific families or species (Tarascou et al., 2010). They can be synthesized via the phenylpropanoid pathway and have at least one aromatic ring attached to one or more



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas as condições experimentais utilizadas no desenvolvimento do trabalho. A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Antioxidantes Naturais e no Laboratório de Processamento e Química de Alimentos, ambos situados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 4.1 Amostras

As amostras de casca e semente de uva orgânica em pó foram doadas pela empresa Econatura Produtos Ecológicos e Naturais Ltda - Uva'Só Produtos Orgânicos. A Figura 1 apresentam casca e semente de uva em pó, respectivamente. As cascas e sementes são de uvas orgânicas da variedade “bordô”, proveniente da produção de suco de uva da empresa. As uvas foram produzidas em sete municípios da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. Após a prensagem das uvas para a extração do suco, o bagaço resultante é peneirado para separação das cascas e sementes. As cascas e sementes tiveram a sua umidade reduzida utilizando um secador com circulação de ar quente. Posteriormente, as cascas foram moídas e embaladas. Para as sementes, o óleo foi extraído a frio antes da moagem e embalagem.



**Figura 1.** Casca e semente de uva em pó.

Fonte: autora.

As amostras foram embaladas na empresa e transportadas até o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA). No laboratório, as amostras foram fracionadas (porções de 20 g), embaladas à vácuo em embalagens plásticas e armazenadas na geladeira ( $5 \pm 1$  °C) até o momento das análises.

## 4.2 Reagentes e Padrões Analíticos

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados: água ultrapura, acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), metanol grau HPLC (J.T. Baker), metanol P.A. (Dinâmica), ácido clorídrico P.A. (Química Moderna), ácido fórmico P.A. (Neon), carbonato de sódio (Neon) e reagente *Folin-Ciocalteu*. A água ultrapura (Milli-Q) foi purificada por um sistema Millipore. As fases móveis foram filtradas em sistema de filtração com filtros de acetato de celulose e PTFE (Politetrafluoretileno) para fase aquosa e orgânica, respectivamente. Os extratos produzidos foram filtrados em filtros PTFE (hidrofílico) de 0,22 µm.

Para a quantificação, foram obtidas curvas analíticas de 13 padrões de compostos fenólicos (pureza  $\geq 90\%$ , Sigma-Aldrich), nomeadamente: ácido cafeico, ácido 5-cafeioilquínico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, apigenina, catequina, cianidina 3-O-glicosídeo, epicatequina, naringenina e quercetina.

## 4.3 Métodos de Extração

### 4.3.1 Extração Exhaustiva dos CFE

Os CFE foram extraídos a partir 0,5 g de amostra (casca de uva ou semente de uva em pó) e 10 mL de uma mistura metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O) (MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2, v/v) acidificada com 0,35 % de ácido fórmico. Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix Luferco, 3800 rpm) por 3 minutos. O extrato obtido foi centrifugado (Centrífuga HITACHI) a 25.000 g por 5 minutos à 4 °C, e o sobrenadante foi retirado. Esse procedimento foi repetido até a extração exhaustiva dos compostos fenólicos, e o resíduo sólido (*pellet*) foi armazenado para a extração dos CFNE.

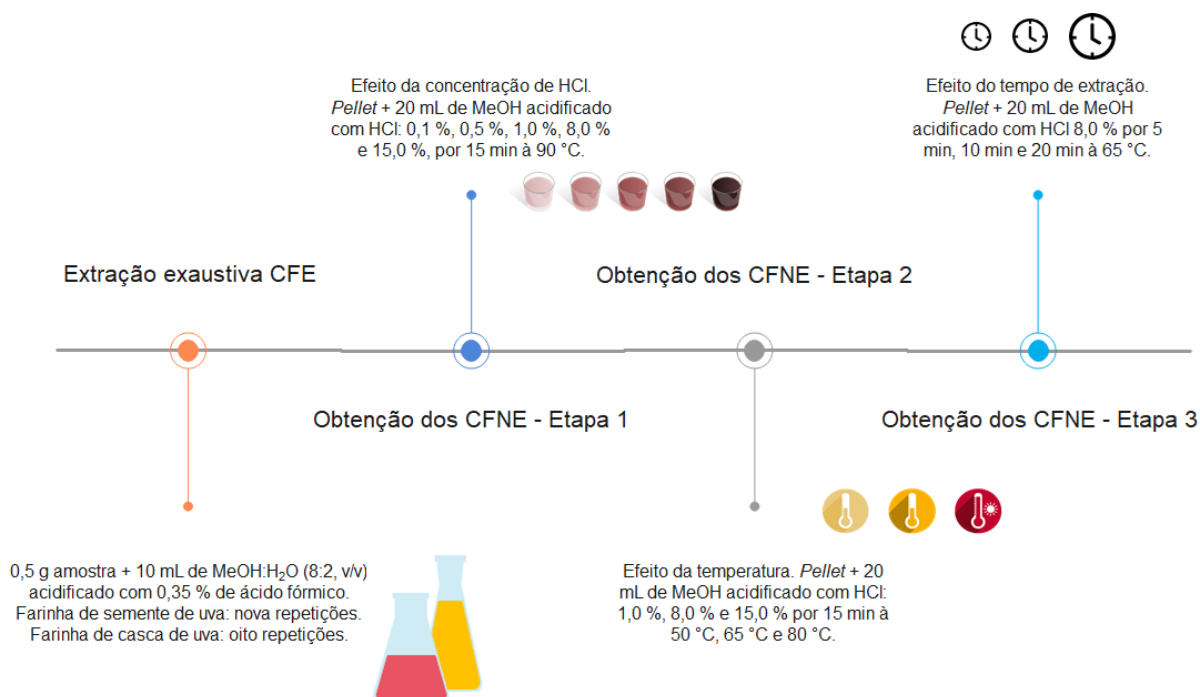
A extração exhaustiva foi avaliada pela reação dos sobrenadantes obtidos com o reagente *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON e ROSSI, 1965), sendo a não geração de produtos de coloração azul o indicativo de extração exhaustiva dos compostos fenólicos da amostra. Um total de nove repetições foram necessárias para retirar a fração extraível da semente de uva em pó e oito repetições para casca de uva em pó. Os extratos obtidos, para cada matriz,

foram combinados, filtrados (PTFE hidrofílico, 0,22  $\mu\text{m}$ ) e analisados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Os extratos foram obtidos, no mínimo, em triplicata.

#### 4.3.2 Obtenção dos CFNE

Os CFNE foram obtidos a partir do resíduo sólido (*pellet*) gerado na extração dos CFE. O método de hidrólise ácida descrito por MALLMANN et al. (2020) foi utilizado como referência para a obtenção do CNFE. Esse método é uma adaptação da proposta por PÉREZ-RAMÍREZ et al. (2018) e foi utilizado como referência para a definição das condições de concentração de HCl, temperatura e tempo de extração a serem estudadas. Destaca-se que, para garantir a temperatura constante durante todo o processo, neste trabalho foram utilizados banhos termostáticos conectados a um sistema *by-pass*, descrito na seção 4.3.2.1.

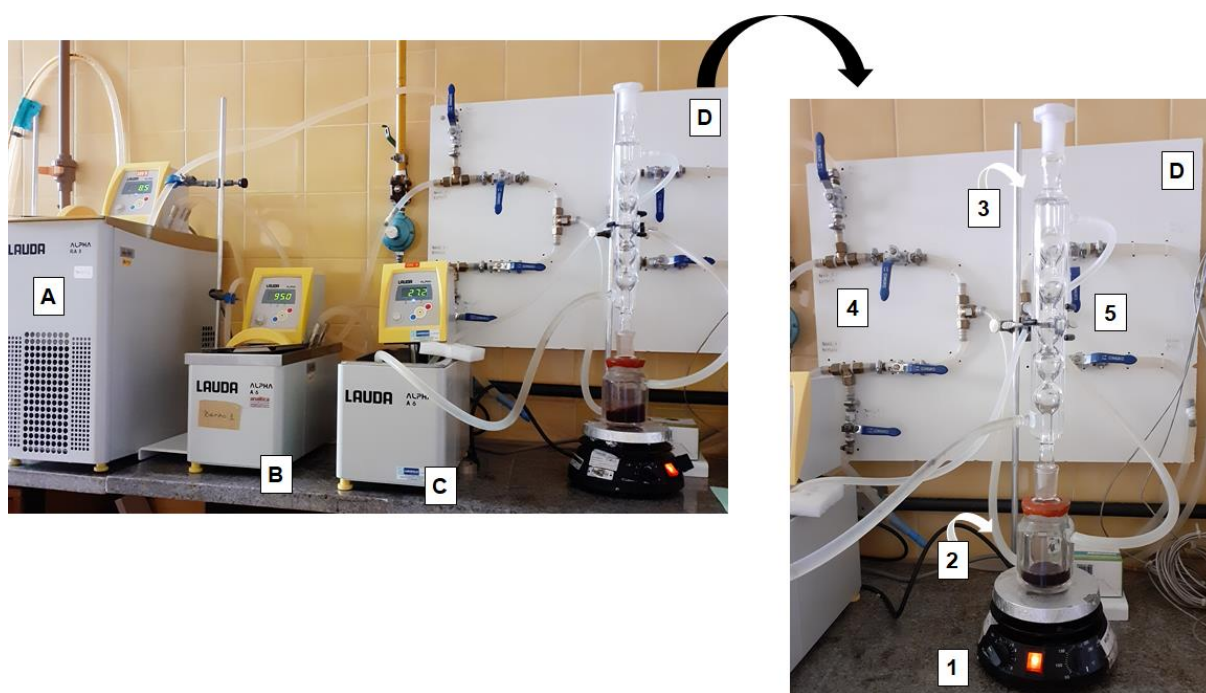
Resumidamente, as condições para a obtenção dos CFNE foram avaliadas em três etapas: (1°) efeito da concentração de HCl, (2°) efeito da temperatura e (3°) efeito do tempo de extração. Na Figura 2, está representado o diagrama destes experimentos, que serão detalhados nas próximas seções.



**Figura 2.** Diagrama das etapas experimentais realizadas no presente trabalho. Fonte: autora.

### 4.3.2.1 Etapa 1 – Efeito da Concentração de Ácido

Na primeira etapa, o *pellet* resultante da extração do CFE foi submetido à hidrólise utilizando 20 mL de metanol acidificado com quatro diferentes concentrações de HCl (0,1, 0,5, 8,0 e 15,0 %, v/v) por 15 min a 90 °C. Para a realização do processo, um sistema *by-pass* foi utilizado. Esse sistema pode ser visualizado na Figura 3. A amostra com o solvente foi submetida à aquecimento sob agitação até temperatura de 90°C utilizando o banho B, sendo mantida nessa temperatura por 15 min. Após esse período, o banho A foi utilizado para rapidamente diminuir a temperatura da amostra para valores próximos a temperatura ambiente. O banho C foi utilizado conectado ao condensador para permitir a recuperação do solvente utilizado.

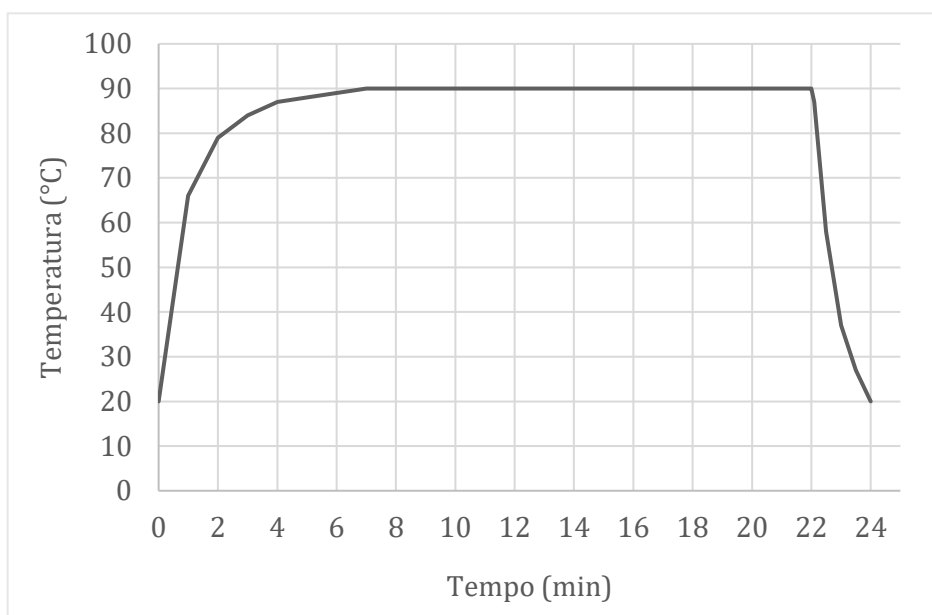


**Figura 3.** Sistema *by-pass* utilizado na hidrólise ácida: banho de resfriamento (Figura A), banho de aquecimento (B), banho ligado ao condensador (C), painel com o sistema *by-pass* (D), agitador magnético (1), célula de vidro encamisada (2), condensador (3), mangueiras e válvulas de entrada (4) e saída (5) de água. Fonte: autora.

O extrato obtido foi filtrado em papel filtro qualitativo, o resíduo foi recolhido e, então, o procedimento repetido. Após a segunda hidrólise, o *pellet* foi extraído com metanol até garantir a extração exaustiva dos CFNE, avaliada através do método de *Folin-Ciocalteu*. Os extratos obtidos foram combinados, filtrados em filtro PTFE (hidrofílico, 0,22  $\mu\text{m}$ ) e

utilizados para a análise por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. O procedimento de hidrólise foi realizado, no mínimo, em triplicata.

Sensores de temperatura do tipo Pt-100 com haste de aço inoxidável foram utilizados para medir a temperatura durante o processo de hidrólise. O perfil de temperaturas obtido é representado na Figura 4. Como pode ser observado, foi necessário um tempo de 07 minutos para o extrato atingir a temperatura desejada de 90 °C, 15 minutos de hidrólise, e por fim, 2 minutos para o resfriamento (20 °C), totalizando 24 minutos de processo.



**Figura 4.** Perfil de temperatura obtido durante a hidrólise ácida dos compostos fenólicos não extraíveis. Fonte: autora.

Com o objetivo de verificar a degradação dos compostos fenólicos no processo de hidrólise, o mesmo procedimento descrito (com exceção da repetição da hidrólise) foi realizado utilizando um sistema modelo com uma mistura de padrões. Essa mistura de padrões foi composta de: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-cumárico, apigenina, cloreto de cianidina 3-O-glicosídeo, epicatequina, naringenina e quercetina. Essa solução foi produzida na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, com exceção da cianidina 3-O-glicosídeo (32 mg L<sup>-1</sup>). As concentrações iniciais e finais dos padrões (após o procedimento de hidrólise) foram avaliadas utilizando curvas analíticas construídas.

#### 4.3.2.2 Etapa 2 – Efeito da Temperatura

Com base nos resultados da etapa 1, foram definidas três concentrações de ácido (1,0, 8,0 e 15,0 %) para realizar os experimentos da etapa 2. Nesta etapa foram avaliadas três temperaturas inferiores aos 90 °C: 50, 65 e 80 °C.

#### 4.3.2.3 Etapa 3 – Efeito do Tempo

Com base nos resultados da etapa 2, foram definidas as condições de concentração de HCl (8,0 %) e temperatura (65 °C), para avaliar o efeito do tempo de hidrólise: 5, 10 e 20 min.

### 4.4 Análise dos Compostos Fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu (Quioto, Japão), contendo os seguintes módulos: duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU20A, injetor automático SIL20AHT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (DAD) e forno de coluna CTO-20A. Para a identificação, o HPLC 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).

As condições de separação cromatográfica dos compostos fenólicos foram descritas previamente por RODRIGUES; MARIUTTI e MERCADANTE (2013). Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Phenomenex C18 de 4 µm (250 x 4,6 mm), fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup> a 35 °C, com fase móvel consistindo em água Milli-Q (acidificada com 0,1% de ácido fórmico) (fase móvel A) e acetonitrila (acidificada com 0,1% de ácido fórmico) (fase móvel B) em gradiente linear. Destaca-se que foram realizadas pequenas modificações em relação ao método referenciado, no fluxo da fase móvel (0,9 para 0,7 mL min<sup>-1</sup>), temperatura (29 para 35 °C) e concentração de ácido fórmico (0,5 para 0,1%).

#### 4.4.1 Identificação

Para identificação, 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 0,35 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, voltagem do capilar de 4000 Volts, faixa de varredura (*scan range*) de  $m/z$  50 a 1000, temperatura e fluxo do gás ( $N_2$ ) secante de 310 °C e 8 L  $min^{-1}$ , pressão do gás nebulizador de 4 bar. A fragmentação dos compostos fenólicos foi realizada no modo automático com *threshold* de 1500 *counts* e a definição de três íons precursores. A energia de fragmentação para os diferentes compostos fenólicos foi definida previamente em testes com padrões de compostos fenólicos. A calibração do equipamento foi realizada semanalmente com formiato de sódio como calibrante. Além disso, para cada corrida uma calibração interna foi realizada com esse mesmo calibrante.

A identificação foi realizada utilizando duas abordagens. A primeira foi uma análise manual dos resultados, onde a identificação foi realizada considerando os seguintes parâmetros: massa acurada, padrão de fragmentação, ordem de eluição em coluna C18 e características de absorção no UV-vis. Essas informações foram comparadas com resultados de padrões, com a literatura e também com a biblioteca MassBank of North America (MoNA). Na segunda abordagem, utilizou-se o software Sirius 4 para auxiliar na identificação dos compostos fenólicos. Esse software identifica moléculas com base no padrão isotópico e no padrão de fragmentação. As duas abordagens permitiram identificar os compostos com diferentes níveis de confiança (Schymanski et al, 2014), nomeadamente L1 a L5.

#### 4.4.2 Quantificação

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por padronização externa através da construção de curvas de treze padrões analíticos, nomeadamente: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, apigenina, catequina, cloreto de cianidina 3-O-glicosídeo, epicatequina, naringenina e quercetina.

Os compostos fenólicos não extraíveis foram separados em cinco grandes grupos: taninos hidrolisáveis, ácidos hidroxibenzóicos, taninos condensáveis (flavan-3-óis, derivados e proantocianidinas), ácidos hidroxicinâmicos e antocianinas. Para cada grupo, os compostos foram quantificados com seu padrão correspondente ou equivalente.

##### 4.4.2.1 Preparo das Soluções-Estoque

As soluções-estoque de compostos fenólicos (1000 mg  $L^{-1}$ ) foram preparadas pela pesagem de 10 mg de padrão diretamente em balão volumétrico de 10 mL e dissolução com

metanol. O volume de metanol foi adicionado em duas etapas. Após a adição de cerca de 5 mL de metanol, a suspensão obtida foi submetida a 2 min de agitação em ultrassom para auxiliar a dissolução do padrão. Após a completa dissolução, o volume restante de metanol foi adicionado. Devido a sua baixa solubilidade, a solução-estoque do ácido elágico foi preparada em uma concentração dez vezes menor, 100 mg L<sup>-1</sup> em metanol.

O padrão de cianidina 3-glicosídeo foi preparado de maneira diferente. Primeiramente, todo o conteúdo do padrão foi dissolvido em 10 mL de uma solução metanólica acidificada com HCl (0,10 %). Uma alíquota dessa solução concentrada foi transferida para um balão de 10 mL e diluída com a solução de metanol acidificado. A absorbância dessa solução foi lida a 529 nm e a concentração foi calculada utilizando a Equação 1:

$$Cianidina (mg/L) = \frac{A \times MM \times FD \times 1000}{\varepsilon} \quad (1)$$

onde *A* é a absorbância a 529 nm (deve estar entre 0,2 e 0,9), *MM* a massa molar da cianidina (287 g mol<sup>-1</sup>), *FD* o fator de diluição e *ε* a absorvidade molar da cianidina (34300 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

A Tabela 1 mostra as concentrações das soluções-estoque e as faixas de concentração das curvas analíticas dos padrões de compostos fenólicos.

#### 4.4.2.2 Preparo das Curvas Analíticas

Para onzes dos compostos, as curvas analíticas foram construídas a partir das injeções de doze (pontos), concentrações na faixa de 0,047 a 96 mg L<sup>-1</sup>. Para o ácido elágico, a curva foi construída em dez concentrações, na faixa de 0,047 a 24 mg L<sup>-1</sup>. Para a curva do cloreto de cianidina 3-O-glicosídeo, foram utilizadas nove concentrações entre 0,156 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Estas faixas podem ser observadas na Tabela 1.

Os pontos das curvas analíticas foram preparados a partir da diluição das soluções dos padrões na fase móvel A (água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico) para onze dos padrões, mistura de metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O) (MeOH:H<sub>2</sub>O 90:10, v/v) para o padrão ácido elágico, e por fim, solução de metanol acidificado (0,1 % de ácido clorídrico) para o padrão cloreto de cianidina 3-O-glicosídeo.



**Tabela 1.** Faixas de concentração das curvas analíticas e concentração das soluções-estoque dos padrões de compostos fenólicos.

Padrão	Faixa de concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração da solução-estoque (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Gálico	0,047 – 96	1000
Ácido Clorogênico	0,047 – 96	1000
Catequina	0,047 – 96	1000
Epicatequina	0,047 – 96	1000
Ácido Vanílico	0,047 – 96	1000
Ácido Cafeico	0,047 – 96	1000
Ácido p-cumárico	0,047 – 96	1000
Ácido Elágico	0,047 – 24	100
Ácido Ferúlico	0,047 – 96	1000
Quercetina	0,047 – 96	1000
Naringenina	0,047 – 96	1000
Apigenina	0,047 – 96	1000
Cianidina 3-O-glicosídeo	0,156 – 25	320

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  $s$  é o erro padrão da curva analítica e  $b$  a inclinação da curva analítica.

Os dados obtidos com a construção das curvas analíticas e parâmetros da espectrometria de massas avaliados estão apresentados como anexo (Apêndice A).

#### 4.5 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata para cada parâmetro avaliado no processo de hidrólise ácida. A comparação dos valores médios entre os tratamentos foi realizada por análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica<sup>®</sup> (versão 14.0.0.15, TIBCO Software Inc, CA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, estão apresentados os resultados obtidos no estudo da hidrólise ácida. O conteúdo será apresentado na forma de artigo. O artigo será posteriormente submetido a um periódico internacional indexado.

### ***5.1 Acid hydrolysis conditions affect the non-extractable phenolic compounds composition from grape peel and seed***

#### **Abstract**

Phenolic compounds are present as extractable or non-extractable phenolic compounds. The non-extractable fraction is usually obtained through the application of chemical, acidic or basic hydrolysis. The major limitation of the hydrolysis process is the degradation of the compounds, impairing their complete elucidation. In this work, we evaluated the effect of acid hydrolysis on non-extractable phenolic compounds and evaluated the application of less aggressive conditions to obtain it. Different concentrations of hydrochloric acid (0.1 to 15.0 %), temperatures (50 to 90 °C) and times (5 to 20 min) were evaluated by HPLC-DAD-ESI-QTOF. The use of concentrations of 1.0 and 8.0% of HCl (v/v) and temperatures (65 and 80 °C) were able to obtain higher concentrations and a larger set of compounds. Under these conditions of concentration and temperature, NEPC represented 39 and 22 % (*m/m*) of the total PC for the grape peel and seed powder, respectively. NEPC had a 1.2 times increase in time from 5 to 20 min of hydrolysis, however, degradations were observed in the grape peel and seed powder. The results allowed us to conclude that the acid hydrolysis method should be optimized according to the objective of the study, such as the NEPC class of interest, and the composition of the food matrix.

**Keywords:** bioactive compounds, bound phenolic compounds, mass spectrometry, bioinformatics

#### **5.1.1. Introduction**

Phenolic compounds (PC) found in fruit and vegetables are associated with a reduced risk of developing certain non-communicable diseases, such as cardiovascular diseases and some types of cancer (Crozier et al., 2009). This effect is hypothesized due

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar métodos de extração de compostos fenólicos não extraíveis (CFNE) e avaliar o efeito de diferentes condições de hidrólise ácida da fração CFNE em casca e semente de uva em pó, propondo modificações no método que permitam a identificação e quantificação dos compostos com o menor grau de degradação possível.

A revisão de literatura indicou que CFNE são uma fração importante de PC na matriz alimentar. Para sua extração, é fundamental garantir a remoção completa dos fenólicos livres, que podem ser extraídos por meio de solventes, como o metanol. Executar a quantificação e identificação sem esta etapa inicial superestima o conteúdo de NEPC. Essa superestimação gera resultados errôneos e dificulta um entendimento quantitativo e qualitativo completo da fração de NEPC.

Outro ponto a ser destacado é que não existe um método adequado para extração de CFNE. Atualmente, o método mais aplicado para extração de CFNE é a hidrólise química, que pode ser ácida ou básica. Essa técnica pode gerar grandes quantidades de resíduos e degradação dos compostos. Essas mudanças estruturais durante a extração dificultam a correta obtenção desses compostos, uma vez que os compostos fenólicos obtidos serão, em sua maioria, derivados de ácidos fenólicos e outros produtos de degradação. Além disso, a falta de padronização do método pode levar a resultados diferentes. Os métodos devem ser padronizados de acordo com o objetivo do estudo e a composição da matriz alimentar. As condições operacionais, como concentração de ácido ou base, temperatura, tempo, entre outras, precisam ser otimizadas para reduzir as perdas durante a hidrólise e extração.

Os métodos de quantificação de compostos fenólicos devem ser capazes de considerar as classes de compostos analisados, bem como os compostos individuais. HPLC-MS é uma boa alternativa para quantificação desses compostos, pois permite a identificação e quantificação de compostos individuais com erros reduzidos. Metodologias como essas devem ser amplamente desenvolvidas em relação a sistematização da análise de dados resultantes, ainda pouco explorada na área dos alimentos. A construção de bibliotecas, hoje praticamente inexistentes, bem como o uso de *softwares* para auxílio na identificação, como abordado neste trabalho, são etapas importantes que devem ser consideradas.

No estudo experimental, o conteúdo de CFNE foi afetado pela concentração de HCl e pela temperatura. O uso de concentrações de 1,0 e 8,0 % de ácido clorídrico (v/v), consideradas baixas, bem como o uso de menores temperaturas (65 e 80 °C) e tempos de hidrólise reduzidos

(5 e 20 min), foram capazes de obter maiores concentrações e um conjunto maior de compostos, em relação as condições mais agressivas testadas e encontradas na literatura. Essas condições promovem um equilíbrio entre a liberação/extração e degradação, maximizando o conteúdo de CFNE nos extratos. Nessas condições, foi extraído o maior conteúdo de NEPC, que representa 39 e 22 % (*m/m*) do PC total para casca e semente de uva em pó, respectivamente.

Avaliando cada classe de CFNE separadamente para as duas matrizes, observou-se que essas condições amenas foram capazes de extrair grandes concentrações de taninos condensados, que é a principal classe desses compostos em ambas as matrizes. Além disso, os resultados indicam que as condições de hidrólise podem ser moduladas para a obtenção de extratos ricos em uma classe específica. Taninos hidrolisáveis e ácidos hidroxibenzoicos, por exemplo, foram melhor extraídos usando concentrações de ácido mais altas e temperaturas mais altas. Já os taninos condensados apresentaram maiores concentrações quando se aplicaram os valores intermediários de temperatura e concentração de ácido.

Para a casca da uva em pó, 8,0 % da concentração de HCl, 65 °C e 20 min foram as melhores condições de hidrólise. Para o pó de semente de uva, as melhores condições foram 1,0 % da concentração de HCl a 80 °C por 5 min. Os resultados deste trabalho demonstram que a fração CFNE pode ser obtida a partir das matrizes estudadas com a aplicação de condições de hidrólise mais brandas, com menor degradação. Os resultados permitiram concluir que o método de hidrólise ácida deve ser otimizado de acordo com o objetivo do estudo, como a classe de CFNE de interesse, e a composição da matriz alimentar. A falta de otimização e padronização pode levar a resultados diferentes. A melhor condição será alcançada quando ocorrer um equilíbrio entre a liberação/extração e a degradação, que é dependente das condições de hidrólise.

Diante do exposto, algumas perspectivas foram pensadas ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, como a aplicação de metodologias alternativas de extração dos CFNE, como o uso de tecnologias enzimáticas e emergentes. Também, entender a bioacessibilidade *in vitro* e *in vivo* dos CFNE, efeitos na microbiota intestinal, determinação do percentual de absorção e o comportamento durante a digestão gastrointestinal, é fundamental para completa compreensão destes compostos para a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

ARRANZ, S.; SAURA CALIXTO, F. 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**, v. 51, n. 3, p. 313–318, 2010.

BALLI, D. et al. Optimized hydrolytic methods by response surface methodology to accurately estimate the phenols in cereal by HPLC-DAD: The case of millet. **Food Chemistry**, v. 303, n. August 2019, p. 125393, 2020.

CHENG, A. et al. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages via the NF- $\kappa$ B signalling pathway. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3393–3400, 2016.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, G.; PLAZA, M.; MARINA, M. L. High-performance thin-layer chromatography and direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry of non-extractable polyphenols from tropical fruit peels. **Food Research International**, v. 147, p. 110455, 2021.

DZAH, C. S. et al. Effects of pretreatment and type of hydrolysis on the composition, antioxidant potential and HepG2 cytotoxicity of bound polyphenols from Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* L. Gaerth) hulls. **Food Research International**, v. 142, n. August 2020, p. 110187, 2021.

FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 514–528, 2019.

GONZALES, G. B. et al. 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**, v. 1402, p. 60–70, 2015.

HERNANDES, L. C. et al. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 121–127, 2014.

LAGE, N. N. et al. Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Peel Supplementation Prevents Hepatic Steatosis through Hypolipidemic Effects and Cholesterol Metabolism Modulation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Rat Model. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, n. 9, p. 968–977, 2021.

LUDWIG, I. A. et al. Metabolic Fate of Extractable and Non-extractable Polyphenols. In:

**Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health.** [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2018. p. 220–240.

MALLMANN, L. P. et al. Comprehensive identification and quantification of unexploited phenolic compounds from red and yellow araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 131, n. January, p. 108978, 2020.

MARTÍN-GARCÍA, B. et al. Distribution of free and bound phenolic compounds, and alkylresorcinols in wheat aleurone enriched fractions. **Food Research International**, v. 140, n. October 2020, 2021.

MOUSSA-AYOUB, T. E. et al. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1177–1184, 2011.

NARVEKAR, A. S.; THARAYIL, N. Nitrogen Fertilization Influences the Quantity, Composition, and Tissue Association of Foliar Phenolics in Strawberries. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. April, p. 1–16, 2021.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SAURA-CALIXTO, F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. **Nutrition Research Reviews**, v. 26, n. 2, p. 118–129, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables : Intake in four European countries. **Food Research International**, v. 74, p. 315–323, 2015.

PÉREZ-RAMÍREZ, I. F. et al. 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**, v. 66, n. 3, p. 661–673, 2018.

QUATRIN, A. et al. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, n. January, p. 59–74, 2019.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. 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**, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3,

p. 144 LP – 158, 1 jan. 1965.

SU, J. et al. Four phenolic acids from purple sweet potato and their effects on physicochemical, digestive and structural characteristics of starch. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 4, p. 1896–1904, 2021.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 471–476, 2016.

WANG, Z. et al. A review of distribution, extraction methods and health benefits of bound phenolics in food plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2020.

YOU, B. et al. Effect of thermal and dry salt-curing processing on free and bound phenolics and antioxidant activity in *Prunus mume* fruits together with the phenolic bioaccessibility. **Lwt**, v. 145, n. March, 2021.



## APÊNDICE A - Curvas Analíticas e Parâmetros MS

O método de HPLC utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos apresentou boa linearidade ( $R^2 > 0,98$ ) nas faixas de concentração estudadas e baixos valores limites de detecção e quantificação (Tabela S1, Figuras S1-S4).

**Tabela S1.** Dados obtidos das curvas analíticas de padrões fenólicos obtidos HPLC.

Padrão	Inclinação	Intercepto	LD <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	LQ <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2,c</sup>
Ácido Gálico	97266	3887,9	0,05	0,15	0,99
Ácido Clorogênico	89881	32854	0,13	0,40	0,99
Catequina	21559	1931,3	0,07	0,20	0,99
Epicatequina	22728	2363,1	0,16	0,49	0,99
Ácido Vanílico	64384	11603	0,03	0,08	0,99
Ácido Cafeico	167223	9699,33	0,05	0,14	0,99
Ácido <i>p</i> -cumárico	201000	22899	0,05	0,15	0,99
Ácido Elágico	143636	30872	0,30	0,90	0,99
Ácido Ferúlico	168216	3071,3	0,06	0,19	0,99
Quercetina	113536,24	157893,10	0,64	1,95	0,99
Naringenina	100180,50	6235,49	0,05	0,15	0,99
Apigenina	143975	63815	0,60	1,82	0,99
Cianidina 3-O-glicosídeo	117148	21745	0,09	0,28	0,99

<sup>a</sup>Limite de detecção (LD), <sup>b</sup>Limite de quantificação (LQ), <sup>c</sup>Coefficiente de determinação.

Entre os parâmetros testados no MS, a fragmentação foi avaliada, permitindo a construção da Tabela S2. A energia de colisão e fragmentos dos padrões de compostos fenólicos utilizados como referência foram avaliados no modo negativo e no modo positivo. Na Tabela S2, os resultados da otimização destes compostos estão apresentados no modo negativo, com exceção da cianidina (modo positivo). Além disso, a otimização foi realizada com os padrões em 20 mg L<sup>-1</sup> em MeOH, utilizando a estratégia de 20 % de íons percursores.

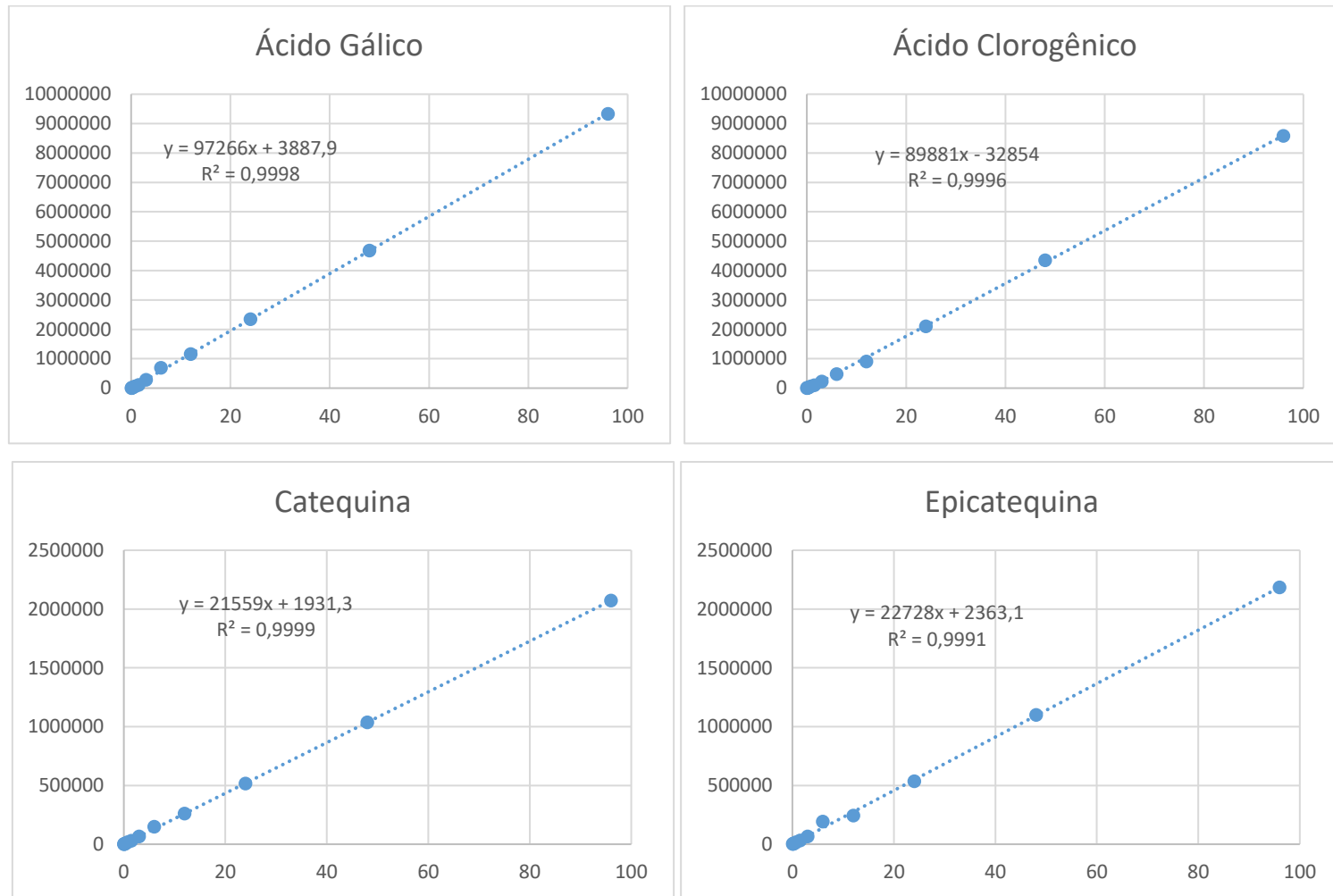
**Tabela S2.** Otimização da fragmentação dos padrões.

Composto	Colisão	Fragmentos MS <sup>2</sup> (-) ( <i>m/z</i> )
Ácido Gálico	26,2	125,0253
Ácido Clorogênico	26,2	191,0558
Catequina	29,2	109,0294/203,0701
Epicatequina	29,2	109,0294/203,0699
Ácido Vanílico	23,2	108,0214/152,0117
Ácido Cafeico	26,2	135,0455
Ácido <i>p</i> -cumárico	23,2	119,0504
Ácido Elágico	59,7	117,0362/145,0299
Ácido Ferúlico	23,2	134,0375/178,0269
Quercetina	32,2	121,0301/151,0042
Naringenina	29,2	119,0460/151,0037
Apigenina	38,4	117,0346/151,0037
Cianidina 3-O-glicosídeo	26,3	287,0638

Além disso, a calibração interna também foi avaliada para diminuir o erro entre a massa teórica e experimental. Na Tabela S3 estão apresentados estes resultados para os padrões de compostos fenólicos utilizados como referência na identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de casca e semente de uva em pó.

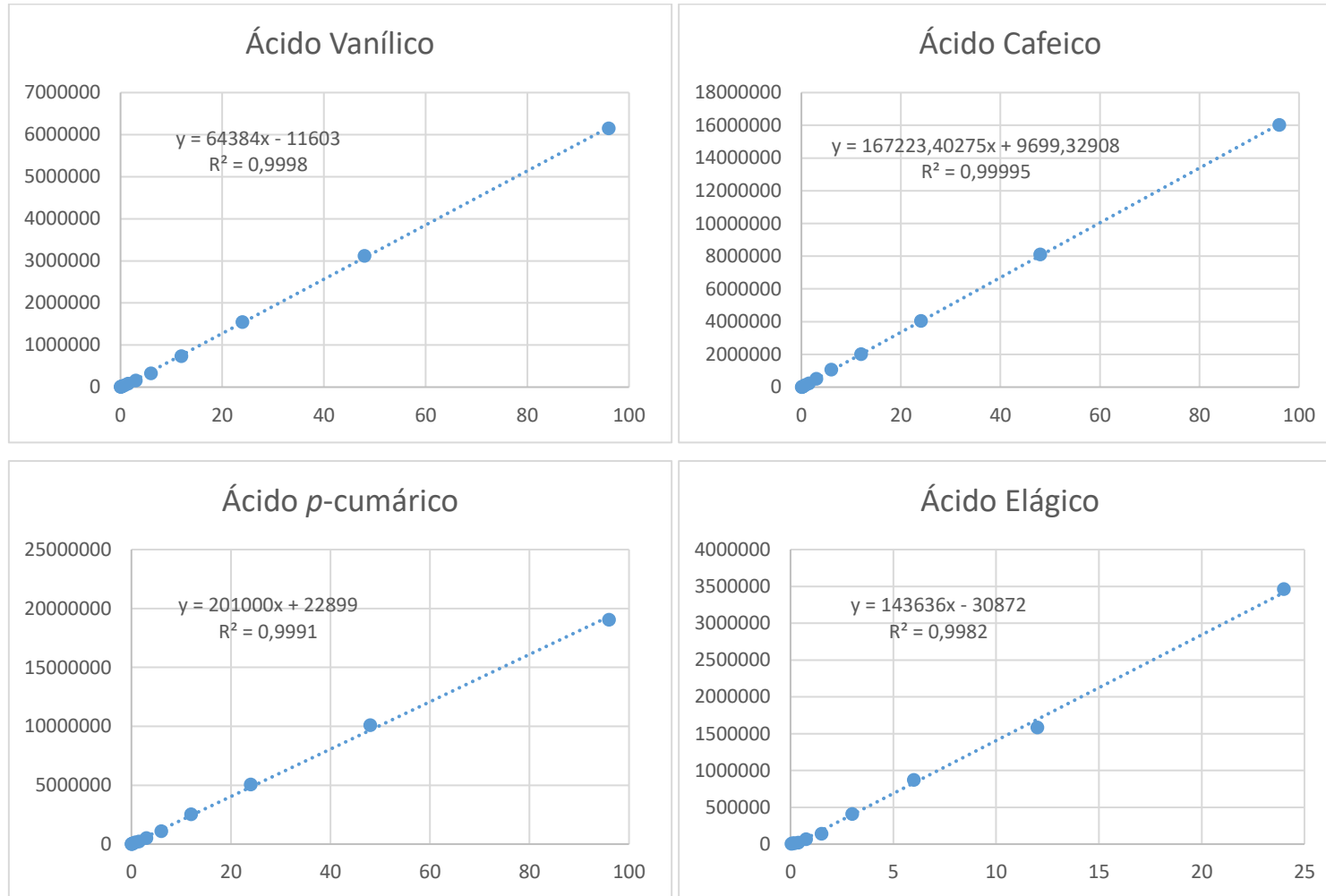
**Tabela S3.** Erros obtidos após a calibração interna HPLC-MS.

Composto	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> teórica	[M-H] <sup>-</sup> experimental	Erro (ppm)
Ácido Gálico	11.7	270	169,0142	169,0142	-0,28
Catequina	20.3	279	289,0718	289,0713	-1,60
Cianidina 3-O-glicosídeo	20.4	279, 517	449,1084	-	-
Ácido Clorogênico	20.4	325	353,0878	353,0869	-2,57
Epicatequina	23.0	279	289,0718	289,0711	-2,29
Ácido Cafeico	23.1	288, 324	179,0350	179,0350	0,09
Ácido Vanílico	23.2	260, 292	167,0350	167,0352	1,30
Ácido <i>p</i> -cumárico	28.3	309	163,0401	163,0399	-1,03
Ácido Elágico	28.8	253	300,9990	300,9988	-0,63
Ácido Ferúlico	30.1	322	193,0506	193,0502	-2,24
Quercetina	40.1	370	301,0354	301,0353	-0,26
Naringenina	44.2	288	271,0612	271,0613	0,38
Apigenina	45.2	267, 336	269,0455	269,0455	-0,17



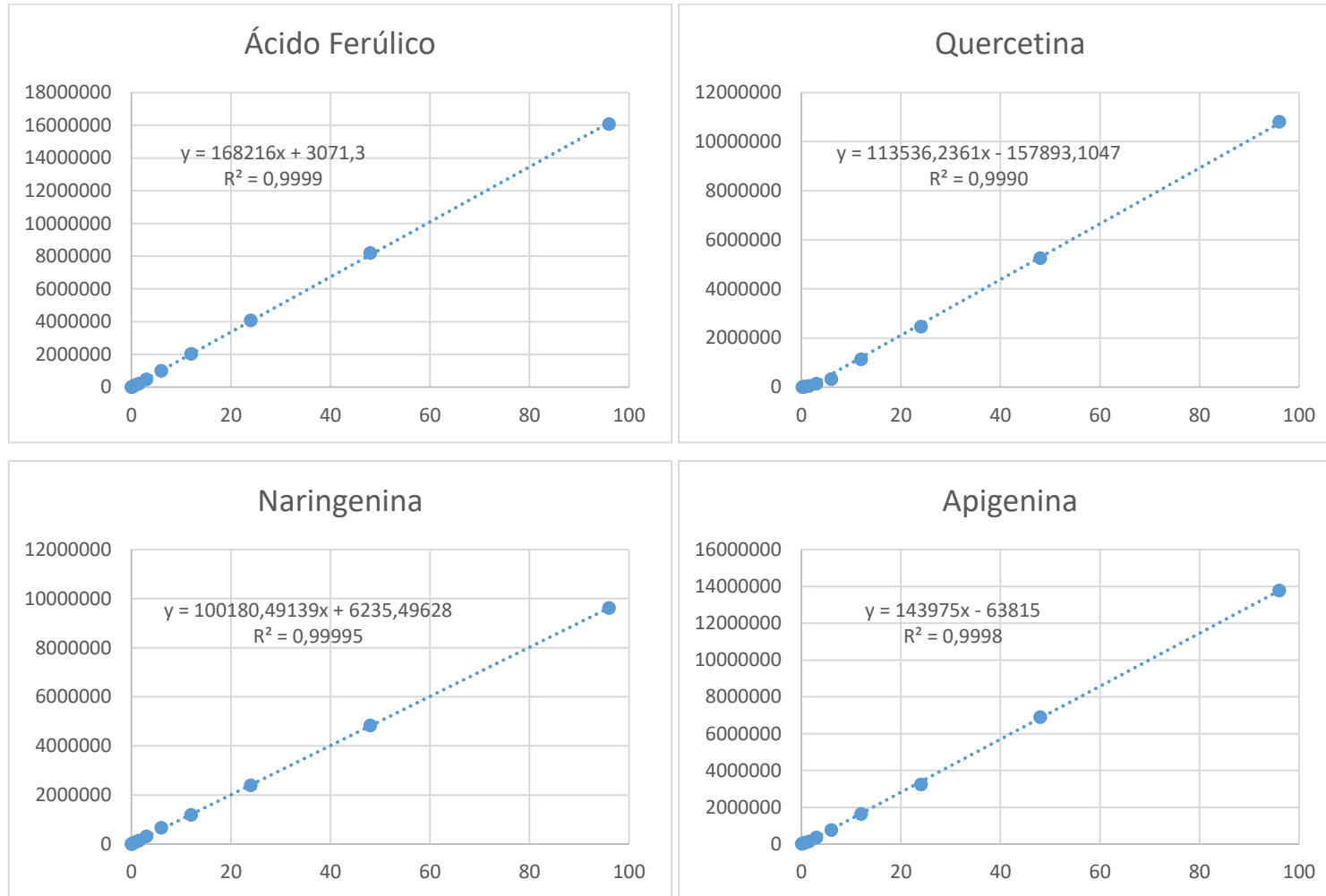
**Figura S1.** Curvas analíticas dos padrões dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido clorogênico, catequina e epicatequina.

Fonte: autora.



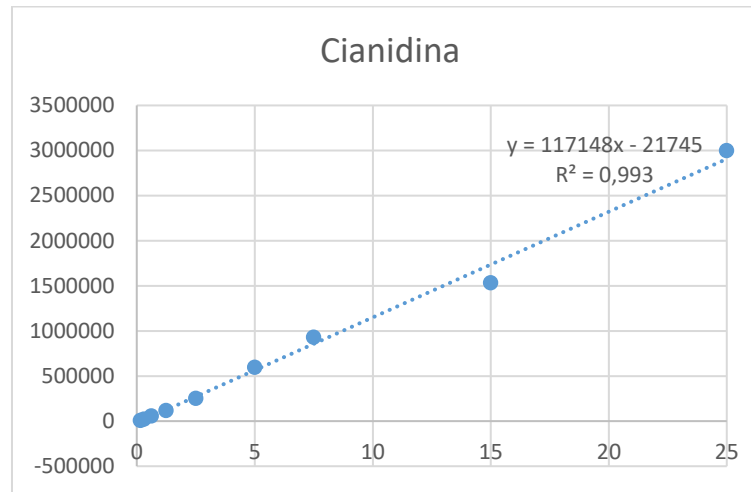
**Figura S2.** Curvas analíticas dos padrões dos compostos fenólicos ácido vanílico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido elágico.

Fonte: autora.



**Figura S3.** Curvas analíticas dos padrões dos compostos fenólicos ácido ferúlico, quercetina, naringenina e apigenina.

Fonte: autora.



**Figura S4.** Curva analítica do padrão do composto fenólico antociânico cianidina 3-O-glicosídeo.

Fonte: autora.