



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**VICTÓRIA PULS RAIMUNDO**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA  
ATENDER A DEMANDA DO LABORATÓRIO DO INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
(HPLC-ESI-QToF-MS)**

Porto Alegre

2018

Victória Puls Raimundo

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA  
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA  
ATENDER A DEMANDA DO LABORATÓRIO DO INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
(HPLC-ESI-QToF-MS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues.

Porto Alegre

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, Eliseu Rodrigues, por todos ensinamentos, paciência e por me dar confiança de que tudo daria certo ao longo deste projeto.

Agradeço à toda minha família, por toda compreensão em momentos de ausência e em especial à minha mãe, à minha irmã e ao meu cunhado por todo apoio e por sempre fazerem de tudo por mim.

Ao Thomas, por todo carinho, compreensão, e ajuda nas horas mais difíceis.

E por último, mas não menos importante, à Pâmela, por estar presente em todos os momentos, pela parceria nas noites e dias de estudo, pois sem ela tudo seria mais difícil e menos colorido na graduação.

## RESUMO

Na literatura científica há evidências de que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos está associado à diminuição de doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns tipos de câncer. Essas doenças possuem a sua etiologia relacionada ao estresse oxidativo e nitrosativo. Por hipótese, os compostos fenólicos presentes nos alimentos seriam capazes de auxiliar na manutenção do equilíbrio redox no organismo, através da desativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Neste contexto, o conhecimento do perfil completo de compostos fenólicos presentes nos alimentos é de grande relevância para a compreensão do papel desses compostos para a saúde humana. Atualmente as duas técnicas mais utilizadas para quantificar os compostos fenólicos são a espectrofotometria, utilizando o método *Folin-Ciocalteu*, e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD). O método Folin-Ciocalteu possui como principal limitação a sua grande susceptibilidade a interferentes presentes nos alimentos, o que acarreta superestimação nos resultados de compostos fenólicos totais. Os métodos baseados em HPLC-DAD possuem como principal limitante o grande número de coeluições observado no cromatograma obtido durante a separação desses compostos, o que impossibilita a quantificação de maneira confiável. Além disso, a HPLC-DAD possui limites de detecção e quantificação elevados, permitindo apenas a quantificação dos compostos fenólicos majoritários. Com o objetivo de superar essas limitações, nesse trabalho foi validado um método de HPLC acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. A validação foi conduzida utilizando 10 padrões de compostos fenólicos, nomeadamente: ácido gálico (padrão interno), ácido hidroxibenzoico, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina e quercetina-3-O-glicosídeo. Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), repetibilidade e recuperação. O método apresenta boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) e baixos limites de detecção ( $0,02-1,73 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e quantificação ( $0,07- 5,24 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Esses valores de LD e LQ são cerca de 2 a 30 vezes menores do que aqueles obtidos pelo método de HPLC-DAD, o qual foi utilizado como referência nesse trabalho. Os resultados de recuperação foram aceitáveis para os três níveis de concentração testadas, variando de 65 a 123%. Os resultados de repetibilidade, estimados pelas triplicatas das recuperações, variaram de 2 a 13%. Por fim, o método validado foi aplicado em uma amostra de maçã e foram quantificados os dois compostos fenólicos majoritários, epicatequina e ácido clorogênico os quais apresentaram concentrações similares ao do método de referência HPLC-DAD e ao relatado na literatura. Assim, o método validado nesse trabalho pode ser utilizado para a quantificação de compostos fenólicos em alimentos, com a grande vantagem de não apresentar as coeluições apresentadas no método convencional de quantificação.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos. Frutas. Saúde.

## ABSTRACT

In the scientific literature there is evidence that the consumption of foods rich in phenolic compounds is associated with the decrease of chronic-degenerative diseases, such as cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and some types of cancer. These diseases have their etiology related to oxidative and nitrosative stress. By hypothesis, the phenolic compounds present in foods would be able to assist in the maintenance of the redox balance in the organism, through the deactivation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS). In this context, knowledge of the complete profile of phenolic compounds present in foods is of great relevance for understanding the role of these compounds in human health. Currently the two most used techniques to quantify phenolic compounds are spectrophotometry, using the Folin-Ciocalteu method, and high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD). The Folin-Ciocalteu method has as main limitation its great susceptibility to interferences present in food, which causes overestimation of the results of total phenolic compounds. The HPLC-DAD-based methods have as main limitation the large number of coelutions observed in the chromatogram obtained during the separation of these compounds, which makes it impossible to quantify in a reliable way. In addition, HPLC-DAD has high detection and quantification limits, allowing only the quantification of the major phenolic compounds. Currently, the most widely used technique for quantifying phenolic compounds in foods is high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD). The major limitation of this technique is the large number of coelutions observed in the chromatogram obtained during the separation of these compounds, which makes it impossible to quantify in a reliable manner. In addition, HPLC-DAD has high detection and quantification limits, allowing only the quantification of major phenolic compounds. In order to overcome these limitations, an HPLC method coupled with high resolution mass spectrometry was validated in this work. The validation was carried out using 10 standards of different classes of phenolic compounds, namely gallic acid (internal standard), hydroxybenzoic acid, catechin, epicatechin, chlorogenic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, rutin and quercetin-3-O- glycoside. The following analytical parameters were evaluated: linearity, limits of detection (LD) and quantification (LQ), repeatability and recovery. The method has good linearity ( $R^2 > 0.99$ ) and low detection limits ( $0.02 - 1.73 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and quantification ( $0.07 - 5.24 \text{ mg.L}^{-1}$ ). These LD and LQ values are about 2 to 30 times lower than those obtained by the HPLC-DAD method, which was used as reference in this work. The recovery results were acceptable for the three concentration levels tested, ranging from 65 to 123%. The repeatability results were estimated by the triplicates of the recoveries, and these values ranged from 2 to 13%. Finally, the validated method was applied in an apple sample and the two major phenolic compounds, epicatechin and chlorogenic acid, were quantified, which presented similar concentrations to the HPLC-DAD reference method and to that reported in the literature. Thus, the validated method in this work can be used for the quantification of phenolic compounds in foods, with the great advantage of not presenting the coelutions presented in the conventional method of quantification.

**Keywords:** Bioactive Compounds. Fruits.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos flavonoides .....	14
Figura 2 - Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas.....	19
Figura 3 - Esquema de um espectrômetro de massa com analisadores tipo Quadrupolo/TOF .....	22
Figura 4 - Gráfico da intensidade do sinal versus a voltagem do capilar para os nove padrões fenólicos .....	30
Figura 5 - Gráfico do acurácia versus a voltagem do capilar para os nove padrões fenólicos.....	31
Figura 6 - Estrutura química dos padrões de compostos fenólicos .....	33
Figura 7 - Cromatogramas de íon extraído dos padrões fenólicos injetados em HPLC-ESI-qToF-MS processados no DataAnalysis 4.3 .....	34
Figura 8 - Curvas analíticas dos padrões fenólicos construídas a partir de padronização externa: .....	35
Figura 9 - Curva analítica do padrão fenólico epicatequina construída no mesmo dia no equipamento.....	35
Figura 10 - Curvas analíticas via padronização interna dos padrões fenólicos: .....	36
Figura 11 - Curvas analíticas via padronização interna dos padrões fenólicos: .....	37
Figura 12 - Curva analítica via padronização interna do padrão fenólico epicatequina .....	37
Figura 13 - Estrutura química do cartucho de SPE Oasis® MAX .....	42
Figura 14 - Cromatogramas extraídos do ácido 5-cafeiolquínico sobrepostos, em azul sem SPE e em vermelho com SPE .....	43
Figura 15 - Cromatogramas de íon extraído dos compostos fenólicos identificados na amostra de maçã injetada em HPLC-ESI-qToF-MS processados no DataAnalysis 4.3.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos flavonoides e alguns exemplos .....	14
Tabela 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos (não-flavonoides).....	16
Tabela 3 - Faixas de concentração das curvas analíticas e concentração das soluções-estoque dos padrões de compostos fenólicos.....	24
Tabela 4 - Gradiente de eluição utilizado no método HPLC-ESI-MS.....	25
Tabela 5 - Massa exata e acurada dos compostos fenólicos, juntamente com o erro obtido no sistema HPLC-ESI-QToF-MS .....	32
Tabela 6 - Dados obtidos das curvas analíticas de padrões fenólicos obtidos por HPLC-ESI-qToF-MS e HPLC-DAD.....	38
Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação de trabalhos relatados na literatura.....	39
Tabela 8 - Recuperação e Repetibilidade do método analítico - não determinado.....	40
Tabela 9 - Composição centesimal da maçã .....	42
Tabela 10 - Comparação da concentração da epicatequina e do ácido clorogênico na maçã por HPLC-ESI-qToF-MS e HPLC-DAD.....	44
Tabela 11 - Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico.....	45
Tabela 12 - Avaliação de custos fixos.....	47
Tabela 13 - Avaliação de custos para a análise de uma amostra em triplicata .....	47

## LISTA DE SIGLAS

ROS – *Reactive oxygen species*  
RNS – *Reactive nitrogen species*  
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*  
DAD – *Diode Array Detector*  
MS – *Mass spectrometry*  
C18 – Octadecilsilano  
UV-Vis – Espectroscopia Ultravioleta no Visível  
EI – Ionização por elétrons  
APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*  
MALDI – *Matrix-assisted laser desorption/ionization*  
ESI – *Electrospray Ionization*  
QToF – *Quadrupole-Time-of-flight*  
QIT – *Quadrupole Ion Trap*  
P.A. – Pureza analítica  
PTFE – Politetrafluoretileno  
SPE – Extração em Fase Sólida  
MAX – *Mixed-Mode Anion-Exchange and Reversed-Phase Solvent*  
 $R^2$  – Coeficiente de determinação  
LD – Limite de Detecção  
LQ – Limite de Quantificação  
DPR – Desvio-padrão Relativo  
v/v – Volume por Volume  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
AOAC – *Association of Official Agricultural Chemists*  
USDA – *United States Department of Agriculture*  
 $m/z$  – Razão massa/carga

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	14
3.1.1 Estrutura química e fontes.....	14
3.1.2 Efeitos benéficos à saúde humana.....	17
3.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
3.2.1 Método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.....	18
3.2.2 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos.....	18
3.2.3 Espectrometria de massas .....	19
3.2.3.1 Fontes de ionização.....	20
3.2.3.2 Analisadores de massa.....	20
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
4.1 MATERIAIS .....	23
4.1.1 Reagentes e padrões.....	23
4.1.2 Amostras.....	23
4.2. MÉTODOS .....	23
4.2.1 Preparo das soluções-estoque.....	23
4.2.2 Preparo das curvas analíticas .....	23
4.3. EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO .....	24
4.3.1 Avaliação preliminar das condições operação do espectrômetro de massas.....	25
4.4 QUANTIFICAÇÃO .....	25
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	26
4.5.1 Limites de detecção e quantificação.....	26
4.5.2 Exatidão e repetibilidade .....	26
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	26
4.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	27
4.8 UTILIZAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO.....	27

<b>4.8.1</b>	<b>Extração dos compostos fenólicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Purificação do extrato de compostos fenólicos .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1	OTIMIZAÇÃO DA VOLTAGEM DO CAPILAR DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	29
5.2	EXPERIMENTOS INICIAIS .....	32
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	36
5.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	41
5.5	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE CUSTOS .....	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais está relacionado à diminuição do risco de surgimento de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (1, 2). Por hipótese, os compostos fenólicos presentes nesses alimentos são os responsáveis por esse efeito benéfico à saúde. Os mecanismos envolvidos na prevenção dessas doenças ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, envolve a redução ou inibição de reações oxidativas, induzidas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) durante o estresse oxidativo e/ou nitrosativo (3).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, ou seja, são produzidos em momentos de estresse, e não são utilizados no seu crescimento ou desenvolvimento. Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila ligados em sua estrutura. Na literatura já foram relatados mais de 8000 compostos fenólicos. Estes compostos estão normalmente associados a açúcares e são classificados em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (1, 4).

A compreensão da importância e dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos no organismo humano depende essencialmente do conhecimento do perfil quali e quantitativo desses compostos nos alimentos. A determinação dos compostos fenólicos em alimentos sempre foi um desafio, devido à diversidade estrutural, complexidade da matriz, e da interação desses compostos com outros componentes celulares (5).

Para determinar a concentração dessa classe de compostos nos alimentos já foram utilizados diferentes técnicas com destaque para a técnica espectrofotométrica de *Folin-Ciocalteu* e a técnica de HPLC-DAD (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector*), sendo a última a mais utilizada atualmente. A primeira técnica é baseada na oxi-redução de elétrons dos compostos fenólicos presentes nos alimentos para o reagente *Folin-Ciocalteu*, gerando óxidos azuis que absorvem em 765 nm, o que torna possível a quantificação por espectrofotometria (6). Este método possui as vantagens de ser simples e barato. Porém, é muito susceptível a interferentes presentes na matriz, o

que acarreta uma superestimação dos resultados (7). A segunda técnica se baseia no princípio da cromatografia, que permite separar os compostos de acordo com sua interação com a fase estacionária e móvel e detectá-los por sua absorção na região do UV-vis. A técnica de HPLC-DAD possui a vantagem de separar os compostos individualmente, não trazendo apenas um dado sobre a concentração total de compostos fenólicos, mas sim, uma quantificação individual. Entretanto, esta possui algumas desvantagens, tais como a coeluição de vários compostos fenólicos e, também, os altos limites de detecção e quantificação que por vezes inviabiliza a determinação de algumas classes de compostos fenólicos presentes nos alimentos (8).

Uma alternativa as duas técnicas relatadas previamente é a união das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas, visto que esta é bem estabelecida, pois permite analisar amostras complexas como alimentos, tornando as análises cada vez mais confiáveis (9). Isso traz algumas vantagens, pois ao utilizá-la aliada à técnica de cromatografia, os dados gerados são mais confiáveis visto que eliminam os falsos positivos na identificação dos compostos (10). Além disso, a união das duas técnicas torna viável resolver problemas de coeluição, visto que o processamento dos dados pode ser feito com a ferramenta de extração da razão massa/carga de cada composto gerando um cromatograma extraído individual. Ainda, como principal vantagem tem-se a alta sensibilidade do espectrômetro de massas, o que produz baixos limites de detecção e quantificação (8).

Apesar dessas vantagens, há poucos trabalhos na literatura relatando a aplicação da HPLC-MS para quantificação de compostos fenólicos em alimentos. Para ter uma ideia da dimensão, em uma pesquisa na base de dados *Web Of Science* com a palavra-chave "phenolic compounds", um total de 63 mil resultados foram encontrados. Quando a pesquisa foi refinada, buscando apenas os trabalhos que utilizaram a espectrometria de massas, com a palavra-chave "HPLC-MS", encontrou-se apenas de 650 resultados, ou seja, cerca de 1% do total. Assim, neste trabalho será apresentada a validação de um método de quantificação de compostos fenólicos utilizando a união das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas de alta resolução.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo geral deste trabalho foi validar um método analítico para quantificar compostos fenólicos em alimentos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas de alta resolução, atendendo à necessidade do laboratório de antioxidantes naturais do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Para atingir este objetivo, o trabalho subdividiu-se nos seguintes objetivos específicos: (1º) pesquisa na literatura sobre os métodos de determinação de compostos fenólicos publicados, (2º) otimização das condições do espectrômetro de massas, (3º) validação do método de quantificação de compostos fenólicos utilizando 10 padrões, onde foram avaliadas os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e exatidão (através de testes de recuperação), (4º) aplicação do método validado em amostra de maçã.

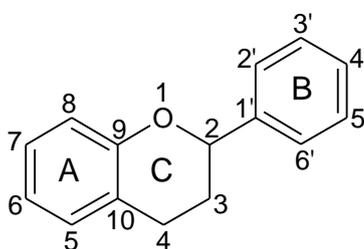
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

##### 3.1.1. Estrutura química e fontes

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas (4). Eles são classificados em dois grandes grupos: flavonoides e não-flavonoides, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 1 e nas Tabelas 1 e 2.

**Figura 1 – Estrutura geral dos flavonoides**



Fonte: PubChem.

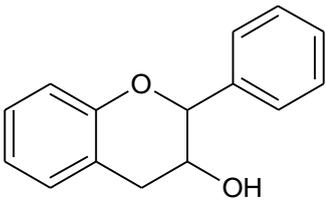
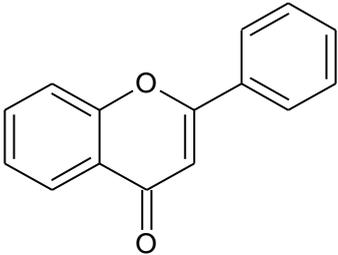
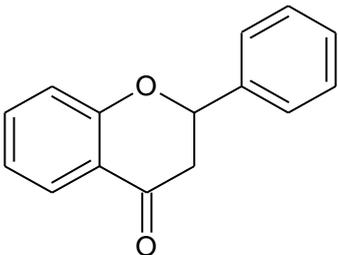
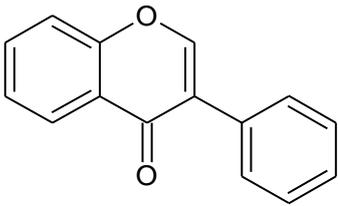
**Tabela 1 - Estrutura química dos flavonoides e alguns exemplos**

(continua)

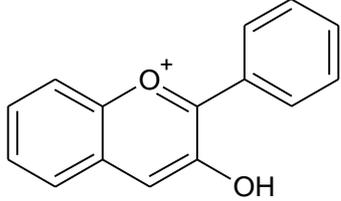
Flavonoide	Substituição	Composto
 Flavonol	3,5,7,3',4' – OH	Quercetina
	3,5,7,4' – OH	Kaempferol
	5,7,3',4' – OH; 3 - rutinose	Rutina
	-	-

**Tabela 1 – Estrutura química dos flavonoides e alguns exemplos**

(continuação)

<b>Flavonoide</b>	<b>Substituição</b>	<b>Composto</b>
<p><b>Flavanol</b></p> 	3,5,7,3',4' – OH	Catequina
	3,5,7,3',4' – OH	Epicatequina
	5,7,3',4' – OH; 3 – O-glicosídeo	Catequina 3-O-glicosídeo
<p><b>Flavona</b></p> 	5,7,4' – OH	Apigenina
<p><b>Flavanona</b></p> 	5,4' – OH; 7-rhamnoglicose	Naringina
	3,5,3' – OH; 4 – OCH <sub>3</sub> ; 7 - rutinose	Hesperidina
	5,7,4' – OH	Naringenina
	3,5,7,3',4' – OH	Taxifolin
<p><b>Isoflavona</b></p> 	5,7,4' – OH	Genisteina

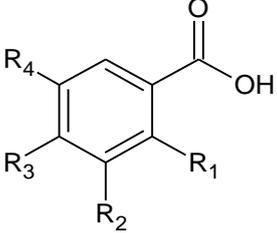
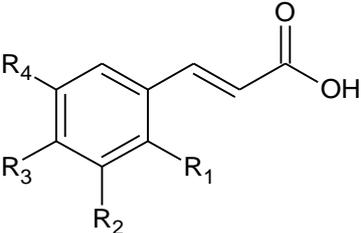
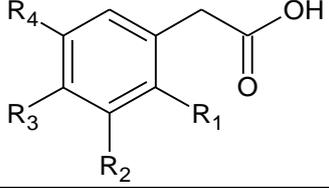
**Tabela 1 – Estrutura química dos flavonoides e alguns exemplos**

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

(conclusão)

Fonte: O autor, 2018.

**Tabela 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos (não-flavonoides)**

Ácidos fenólicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Composto
<p><b>Ácidos Hidroxibenzóicos</b></p> 	H	H	OH	H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	H	OH	OH	OH	Ácido gálico
	H	OH	OH	OH	Ácido protocatecuíco
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ácido vanílico
<p><b>Ácidos Hidroxicinâmicos</b></p> 	H	H	OH	H	Ácido <i>p</i> -cumárico
	H	H	OH	OH	Ácido caféico
	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	Ácido ferúlico
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Ácido sináptico
<p><b>Ácidos Hidroxifenilacéticos</b></p> 	H	H	OH	H	Ácido 4-hidroxifenilacético
	H	OH	H	H	Ácido 3-hidroxifenilacético
	OH	H	H	H	Ácido 2-hidroxifenilacético
	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	Homovanílico

Fonte: PubChem.

Os flavonoides englobam o maior número de compostos fenólicos, estando, portanto, presente em diversos alimentos e são caracterizados por possuírem 15 carbonos (C6-C3-C6) em sua estrutura. Esta classe é ainda subdividida em flavonóis, o grupo mais amplamente distribuído no reino vegetal, exceto em algas, como o kaempferol e a quercetina; flavonas, como a apigenina, encontradas em algumas ervas; flavan-3-óis, como a catequina e epicatequina, presentes em chás e chocolates; antocianidinas, responsáveis pela coloração acentuada dos alimentos onde estão presentes, por exemplo, em uvas, como a malvidina; flavononas, como a herperidina, encontradas em frutas cítricas e as isoflavonas, como a daidzeína, encontrada exclusivamente em leguminosas, como a soja. Já a classe dos não flavonoides são caracterizados por um grupo aromático com estruturas: C6-C1, os ácidos fenólicos, como os ácidos gálico e elágico, encontrados em frutas vermelhas, como morangos, framboesas e mirtilo e em chás preto e verde; C6-C3, os hidroxicinamatos, como os ácidos cafeico e cumárico, encontrados em maçãs e cereais; e C6-C2-C6, os estilbenos, como o resveratrol, encontrado em uvas e seus derivados e amendoim (1).

### **3.1.2 Efeitos benéficos à saúde humana**

O consumo de frutas e vegetais está relacionado à diminuição do risco de surgimento de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (1, 2).

O mecanismo de ação dos compostos fenólicos na diminuição da incidência de doenças crônico-degenerativas é através da sua característica antioxidante – devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destes compostos – pois ao reagirem com os radicais livres no organismo, formam radicais que não são reativos o suficiente para propagar a reação em cadeia que seria prejudicial às células (6).

A ingestão de alimentos é a principal fonte dessa classe de compostos no organismo e por isso se torna interessante o conhecimento do perfil de compostos fenólicos nestes para possibilitar correlacionar a sua presença com seu efeito benéfico à saúde (5). O café é uma das principais fontes da ingestão de compostos fenólicos e no Japão o chá verde é responsável por 34% do consumo destes

compostos em bebidas. Há estudos que evidenciam que o galato de epigallocatequina, presente no chá verde, pode ser o responsável pela indução da apoptose em tumores cancerígenos (1, 12). Maçãs são uma importante fonte de flavonóis como quercetina-3-O-glicosídeo e flavan-3-óis como a epicatequina, que na indústria da sidra, bebida alcoólica produzida pela fermentação de maçãs, além de promover efeitos benéficos à saúde conta com aspectos sensoriais como sabores adstringentes. O principal composto fenólico encontrado em maçãs é o ácido 5-O-cafeiolquínico (ácido clorogênico) (1).

## 3.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

### 3.2.1 Método espectrofotométrico *Folin-Ciocalteu*

O reagente *Folin-Ciocalteu* é uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, onde ambos os metais encontram-se no estado de oxidação +VI. Para que a 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 ocorre uma reação de oxi-redução entre os compostos fenólicos e o reagente de *Folin-Ciocalteu*, gerando óxidos azuis com absorção máxima a 765 nm. Este método é o mais largamente utilizado, pois é simples e gera resultados reprodutíveis, entretanto, está sujeito a interferentes. O *Folin-Ciocalteu* pode reagir com qualquer espécie facilmente oxidável presente no meio, gerando resultados superestimados. Soma-se a isso o fato de gerar um resultado da concentração total de compostos fenólicos, e nenhuma informação sobre a concentração individual. Por exemplo, no trabalho de Escarpa e González (2001), foram encontradas no método *Folin-Ciocalteu* concentrações de compostos fenólicos 5 vezes superiores aquelas encontradas pelo método HPLC-DAD (6, 7).

### 3.2.2 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

Analisando os trabalhos publicados na literatura que utilizam como forma de determinação de compostos fenólicos a HPLC-DAD, observa-se duas grandes dificuldades: (1º) devido à complexidade tanto da matriz quanto da composição da amostra, há um grande número de coeluições dos compostos fenólicos, o que

dificulta a sua quantificação (13, 14, 15), e (2º) o método é pouco sensível, apresentando elevados limites de detecção e quantificação.

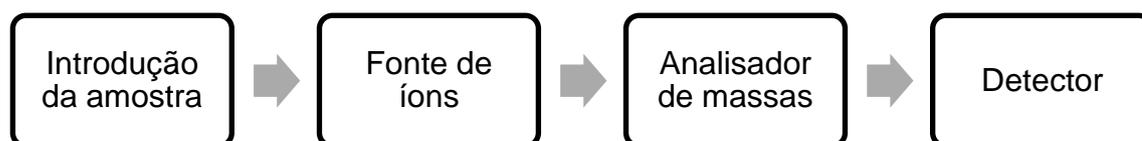
Em geral, o tipo de coluna cromatográfica utilizada nos métodos para identificação e/ou quantificação desta classe de compostos é de fase reversa, majoritariamente colunas de octadecilsilano (C18). Já a fase móvel deste tipo de análise é uma solução aquosa, podendo possuir algum aditivo que auxilie na separação dos compostos, como os ácidos fórmico ou acético, juntamente com um gradiente de uma fase móvel orgânica, como acetonitrila ou metanol com estes mesmos aditivos. No aspecto dos detectores, o mais utilizado é o detector de arranjo de diodos (DAD), pois permite uma varredura completa da absorção dos compostos na região do UV-vis, sendo a faixa mais utilizada de 200 a 800 nm (5).

Por estes motivos, o HPLC é considerado um método versátil, preciso, e de relativo baixo custo.

### 3.2.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica amplamente utilizada na identificação e também na quantificação de compostos de diferentes classes químicas (8). Um espectrômetro de massas possui quatro partes fundamentais, nomeadamente: (1) fonte de ionização, onde os íons são gerados, (2) um analisador de massas onde os íons gerados são separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e um detector (Figura 2). Este equipamento opera sob vácuo, salvo algumas fontes de ionização que operam à pressão atmosférica. A introdução da amostra no equipamento pode se dar de forma direta ou após separação mediante o uso de técnicas cromatográficas (8, 16).

**Figura 2 - Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas**



Fonte: SKOOG.

### 3.2.3.1 Fontes de ionização

A fonte de ionização é o local onde os analitos da amostra são transferidos para a fase gasosa e ionizados. Existem diversos tipos de fontes de ionização, sendo os mais utilizados o impacto eletrônico (EI), a ionização química à pressão atmosférica (APCI), e electrospray (ESI) (16).

Na ionização por *electrospray*, a amostra é introduzida através de uma agulha capilar que com o auxílio de gás ( $N_2$ ), é nebulizada. Uma alta voltagem é aplicada e conseqüentemente é formado o cone de Taylor. Posteriormente, as gotas são dessolvatadas com o auxílio do gás secante ( $N_2$ ). Pela perda do solvente, a densidade de cargas da gota aumenta e ocorre a explosão Coulombica gerando íons na fase gasosa, os quais são conduzidos até o analisador de massas (8, 16). No modo de ionização negativo são formados íons do tipo  $[M-H]^-$  pela desprotonação do analito ou adutos com ânions como cloreto, nitrato ou acetato. No modo de ionização positivo são formados íons do tipo  $[M+H]^+$  ou adutos com cátions como sódio, amônio ou potássio (10). O modo escolhido para operação da fonte de ionização depende estrutura química da molécula a ser ionizada, avaliando qual gera uma análise mais sensível. Como a forma de ionização é branda, não devem, na maior parte dos casos, ocorrer fragmentações na fonte. Pela ionização ser realizada à pressão atmosférica, pode ser acoplada à um cromatógrafo a líquido de alta eficiência. A grande desvantagem dessa fonte é sua susceptibilidade à supressão iônica, gerando uma redução na sensibilidade. Trata-se de um efeito de matriz muito comum, onde há a competição de componentes da matriz que coeluem com os compostos a serem analisados (17).

### 3.2.3.2 Analisadores de massa

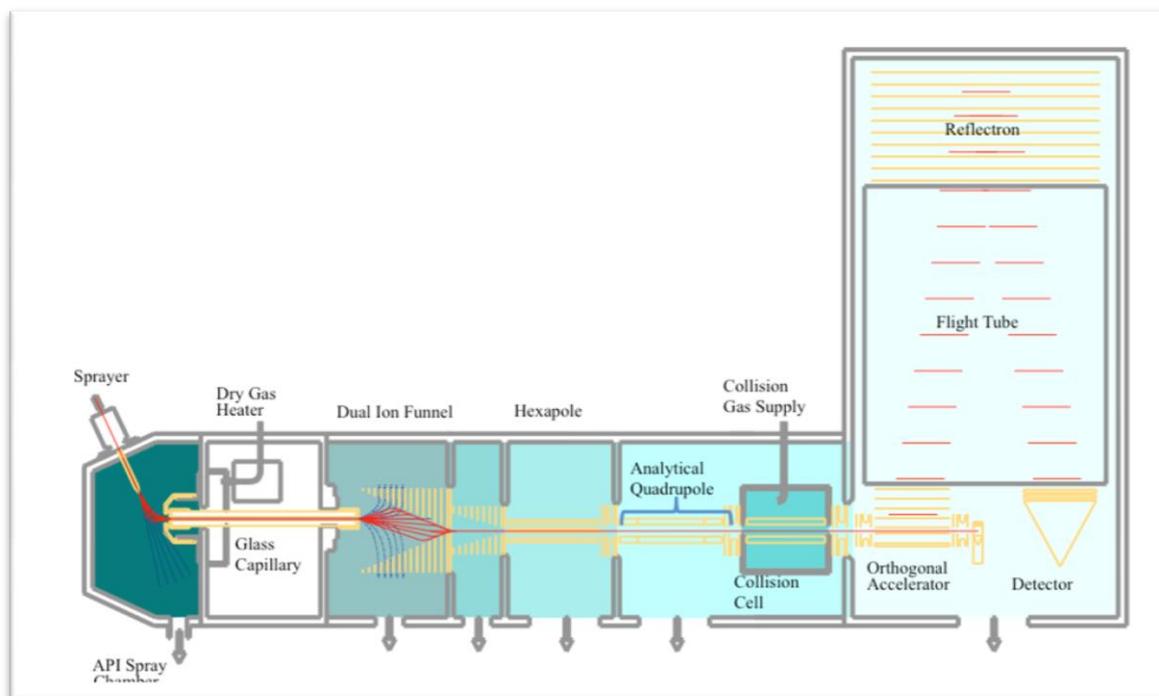
Os analisadores de relação massa/carga são os responsáveis por separar os íons gerados na fonte de ionização para posterior detecção. Dentre os analisadores mais comuns estão o quadrupolo, o tempo de voo (*TOF* – do inglês: *Time of Flight*), o quadrupolo *ion trap* (QIT – do inglês: *Quadrupole Ion Trap*) ou ainda, a versão híbrida que consiste em juntar dois analisadores para obter uma melhor resolução (8, 16).

O princípio do analisador por tempo de voo é separar moléculas de acordo com a diferença de tempo entre o pulso inicial e o pulso gerado quando o íon chega ao detector. Quando os íons saem da região de aceleração, eles possuem energia cinética igual, porém, velocidades diferentes de acordo com sua relação  $m/z$ , conseqüentemente, terão tempos de voo distintos, possibilitando a separação. A conversão de tempo em massa é dada pela injeção de um calibrante, que contém íons com massas conhecidas. No TOF de alta resolução é utilizado um refletor que permite a correção das velocidades iniciais, pelo fato de que um íon mais leve e conseqüentemente mais rápido, penetra mais profundamente no campo e com isso, sua trajetória é maior, levando um tempo de voo maior até o detector (8, 16).

O quadrupolo consiste em quatro hastes posicionadas em paralelo e ligadas eletricamente em pares, com sinais opostos e amplitudes iguais, combinando corrente direta e radiofrequência, o que faz com que em determinados valores previamente estipulados, somente íons com uma faixa de razão  $m/z$  restrita consigam atravessá-lo, e os demais são ejetados não chegando até o detector, agindo como uma espécie de filtro de íons (8, 16).

A forma híbrida de um analisador de massas é o Q-TOF, que une as vantagens do tempo de voo (TOF) e do quadrupolo, conforme demonstrado na Figura 3 (ver página seguinte) (8, 16).

**Figura 3 - Esquema de um espectrômetro de massa com analisadores tipo Quadrupolo/TOF**



Fonte: adaptado de BRUKER.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Reagentes e padrões**

Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), metanol grau HPLC (J.T. Baker), acetato de sódio trihidratado P.A (Neon), ácido fórmico P.A. (Merck), ácido clorídrico 6M (Neon), carbonato de sódio anidro (Dinâmica), Folin-Ciocalteu (Fator 1). Água ultrapura (Milli-Q) foi produzida por sistema Millipore (Bedford, USA). Os filtros utilizados para filtrar as fases móveis foram acetato de celulose (Sartorius) e PTFE (Sartorius Stedim). Para as amostras aquosas foram utilizados filtros de seringa do tipo PTFE-hidrofílico (0,22  $\mu\text{m}$ ) (Allcrom). Os padrões analíticos dos compostos fenólicos (ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina e quercetina-3-O-glicosídeos) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para a limpeza foram utilizados cartuchos SPE Oasis<sup>®</sup> MAX, 30 mg (mixed-mode anion-exchange and reversed-phase solvent) da Waters (Milford, USA).

#### **4.1.2 Amostras**

O método foi aplicado em uma amostra de maçã. A maçã Fuji foi adquirida no supermercado Zaffari em Porto Alegre (maio de 2018).

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Preparo das soluções-estoque**

As soluções-estoque dos dez padrões fenólicos foram preparadas na concentração aproximada de 1000  $\text{mg/L}^{-1}$  em metanol (J.T. Baker).

#### **4.2.2 Preparo das curvas analíticas**

As curvas analíticas foram construídas a partir da análise de sete pontos nas faixas de concentração descritas na Tabela 3. Os pontos da curva analítica foram preparados a partir da diluição dos padrões na fase móvel A (água acidificada com

0,5% de ácido fórmico). A cada ponto foi adicionando o ácido gálico como padrão interno (2 mg.L<sup>-1</sup>).

**Tabela 3 - Faixas de concentração das curvas analíticas e concentração das soluções-estoque dos padrões de compostos fenólicos**

<b>Padrão Fenólico</b>	<b>Faixa de concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração da solução estoque</b>
Ácido ferúlico	0,15 – 11	1000
Ácido cafeico	0,063 – 4,1	1040
Ácido cumárico	0,10 – 6,0	1000
Ácido clorogênico	0,038 – 8,0	1000
Ácido hidroxibenzóico	1,1 – 13	1080
Quercertina-3-O-glicosídeo	0,073 – 23	900
Epicatequina	0,073 – 15	1000
Catequina	0,10 – 10	1020
Rutina	0,073 – 5,0	1000

Fonte: O autor, 2018.

#### 4.3 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Os compostos fenólicos foram separados por cromatografia à líquido de alta eficiência em um HPLC da Shimadzu, contendo duas bombas (20AD), um injetor automático (SIL-20A), um degaseificador (DGU-20A3), um forno (CTO-20A). Este equipamento contava com um detector de arranjo de diodos (SPDM-20A). Também tal equipamento estava acoplado, na sequência, a um espectrômetro de massas Bruker microTOF II, com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

A separação dos compostos fenólicos foi realizada em uma coluna C<sub>18</sub> Synergi Phenomenex (250 mm x 4,6 mm x 4 µm), com um fluxo de 0,7 mL/min<sup>-1</sup> e temperatura de 29 °C. A fase móvel A foi composta de água e a fase móvel B

acetonitrila, ambas acidificadas com 0,5% de ácido fórmico. Os compostos fenólicos foram separados utilizando o gradiente de eluição apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4 - Gradiente de eluição utilizado no método HPLC-ESI-MS**

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Porcentagem da fase móvel A</b>	<b>Porcentagem da fase móvel B</b>
0,01	99	1
50	50	50
55	1	99
60	1	99
62	99	1
67	99	1

Fonte: O autor, 2018.

#### **4.3.1 Avaliação preliminar das condições operacionais do espectrômetro de massas**

Um total de nove padrões fenólicos (catequina, rutina, quercetina-3-O-glicosídeo e os ácidos gálico, hidroxibenzóico, cumárico, clorogênico, cafeico e ferúlico) foram utilizados para realizar a otimização das condições do espectrômetro de massas. O efeito da voltagem do capilar, de 1000 a 6000 V, sobre a acurácia e intensidade do sinal foi avaliada.

Após essa rápida avaliação preliminar, o espectrômetro de massas foi operado no modo negativo, sendo as demais condições, as seguintes: *dry gas* = 310 °C e fluxo de 8 L.min<sup>-1</sup>, voltagem do capilar = 3000 V, pressão do gás nebulizador = 4 bar.

#### **4.4 QUANTIFICAÇÃO**

A quantificação foi realizada por padronização interna utilizando as curvas analíticas dos 9 padrões de compostos fenólicos e o ácido gálico como padrão interno.

## 4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método validado foi baseado no método de determinação de compostos fenólicos descrito por Chisté and Mercadante (2012) (18). A validação foi realizada utilizando 10 padrões analíticos, nomeadamente: ácido gálico (padrão interno), ácido hidroxibenzóico, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina e quercetina-3-O-glicosídeo. Os parâmetros de validação analisadas foram linearidade ( $R^2$ ), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), repetibilidade e recuperação.

### 4.5.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através da Equação 1 e 2, respectivamente (19).

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde  $s$  é o erro-padrão da curva analítica e  $S$  é a inclinação da mesma.

### 4.5.2 Exatidão e repetibilidade

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação, nos quais foram preparadas soluções com concentrações conhecidas dos diferentes padrões analíticos: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. Para a recuperação foram executados 3 experimentos independentes, sendo os resultados utilizados para estimar a variabilidade do método.

## 4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando as informações de os tempos de retenção ( $t_R$ ), comprimentos de onda de absorção máxima no UV-vis ( $\lambda$ ), a massa acurada (MS) e as características de fragmentação (MS/MS) dos compostos fenólicos.

## 4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados iniciais de HPLC-MS foram primeiramente processados no software Data Analysis<sup>®</sup> e posteriormente no software Quant Analysis<sup>®</sup>. Além disso, o excel foi utilizado para a construção dos gráficos das curvas analíticas. Para a comparação dos resultados obtidos por HPLC-MS e HPLC-DAD foi aplicado a ANOVA, seguida do teste de Tukey.

## 4.8. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO

### 4.8.1 Extração dos compostos fenólicos

A amostra de maçã foi inicialmente cortada, congelada em ultrafreezer (T = -80°C), liofilizada e depois triturada em um mini-processador de alimentos (Mondial).

A extração exaustiva já era utilizada no laboratório de Antioxidantes Naturais/ICTA em diversas matrizes. O procedimento consiste em colocar cerca de 0,1 g de amostra triturada em um tubo de ensaio e adicionar 5 mL de solução metanol:água (8:2 v/v). Na sequência essa mistura é agitada em vortex (AP 56 - Phoenix Luferco) durante 5 minutos. Posteriormente, a solução é centrifugada a 3000 g durante 10 minutos (4°C). O sobrenadante é recolhido para realização do teste de exaustão.

O teste de exaustão consistiu na transferência de 1 mL do sobrenadante em um balão volumétrico, e adição de 9 mL de água destilada e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, e agitação. Após quatro minutos, adicionou-se 10 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% e o balão foi avolumado. Nos extratos contendo compostos fenólicos, observou-se o aparecimento da coloração azul. Como no quarto teste a coloração azul não foi observada, concluiu-se que o procedimento deveria ser realizado três vezes para garantir a extração exaustiva desses compostos.

O procedimento de extração foi realizado em triplicata. Os sobrenadantes foram recolhidos em um balão e o metanol foi removido com o auxílio de um evaporador rotatório. O extrato concentrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, adicionado 20 µL de padrão interno (ácido gálico com concentração de 1000 mg/L<sup>-1</sup>) e este foi avolumado com fase móvel A. Uma alíquota

foi retirada, filtrada com filtro seringa PTFE-hidrofílico (0,22  $\mu\text{m}$ ) para vial e injetada no HPLC-MS.

#### **4.8.2 Purificação do extrato de compostos fenólicos**

O extrato de compostos fenólicos da maçã foi submetido a processo de limpeza. Para isso fez-se a extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos MAX (*mixed-mode anion-exchange and reversed-phase*).

O extrato de compostos fenólicos da maçã foi inicialmente concentrado para a remoção do metanol presente. Essa etapa é fundamental para evitar a interferência desse solvente na interação dos compostos fenólicos com o cartucho de SPE. Posteriormente, o conteúdo foi avolumado em um balão de 10 mL com fase móvel A e uma alíquota de 1 mL foi acidificada com 34  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 38%(m/v) e foi transferida para o cartucho, que foi previamente ativado com 1 mL de metanol e condicionado com solução de acetato de sódio 50 mM (com pH 7,0). Posteriormente, foi realizada a etapa de lavagem da amostra, para retirada de interferentes, com uma solução de acetato de sódio 50 mM (pH 7,0) com 5% de metanol. Em seguida, os compostos fenólicos foram eluídos com 1800  $\mu\text{L}$  de metanol acidificado com 2% de ácido fórmico e recolhidos em frasco âmbar. Este extrato purificado foi concentrado e reconstituído em 1 mL de fase móvel A, filtrado com filtro seringa PTFE-hidrofílico (0,22  $\mu\text{m}$ ) e analisado por HPLC-MS (21).

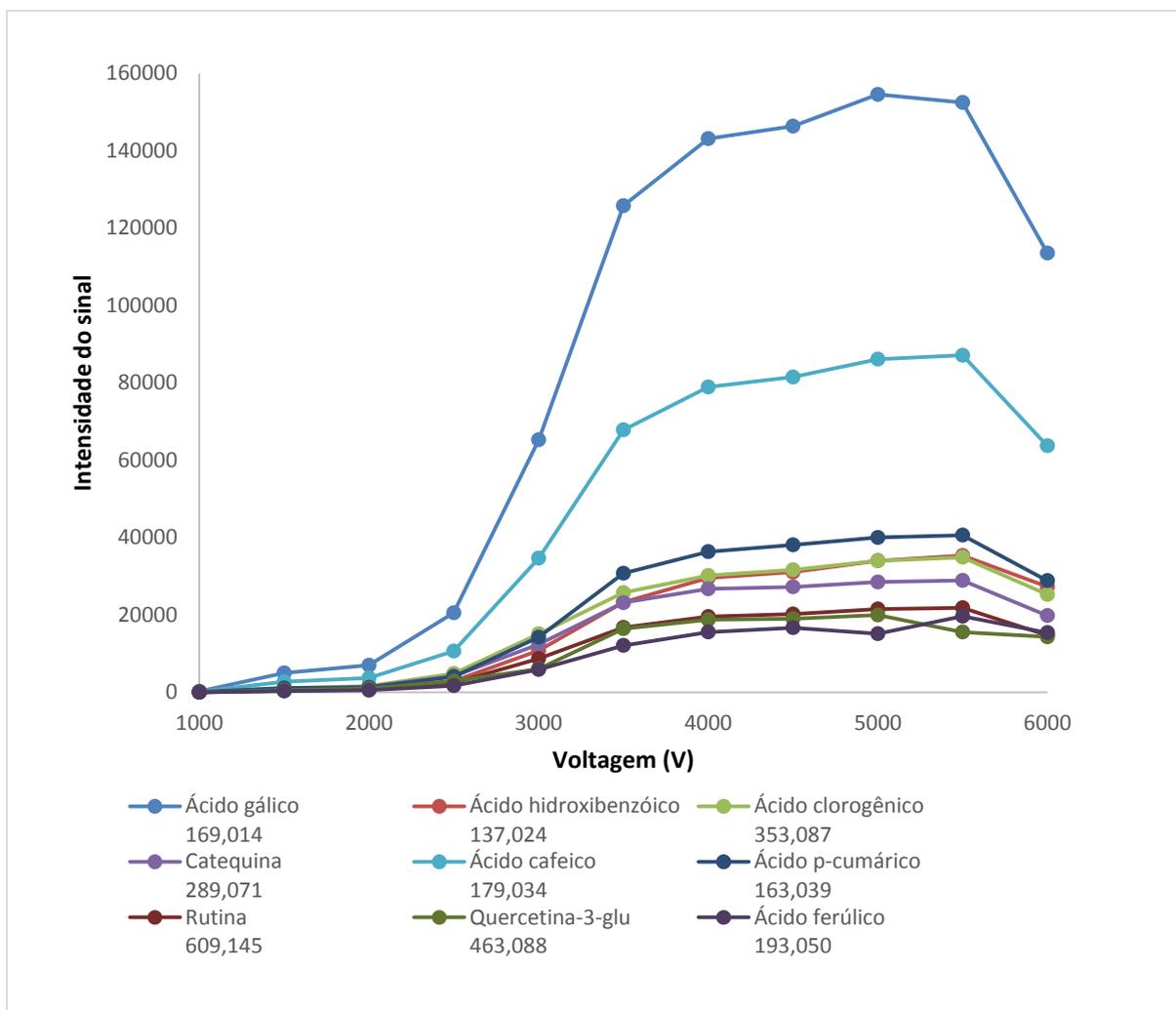
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DA VOLTAGEM DO CAPILAR DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Um total de nove padrões de compostos fenólicos foram utilizados para otimizar a voltagem do capilar da fonte ESI do MS. Como os compostos fenólicos desprotonam mais facilmente do que protonam, o modo negativo foi escolhido para a realização da otimização. Esse experimento indicou que em voltagens até 2500 V, a intensidade do sinal aumenta linearmente como o aumento dos valores de voltagem, porém, os valores de intensidade de sinal são baixos. A partir do valor de 2500 V, os valores de intensidade de sinal continuam aumentando, com a diferença de que a taxa de aumento é muito superior. Esse aumento no sinal continua até 5000 V, onde começa um decaimento na intensidade do sinal, conforme a Figura 4.

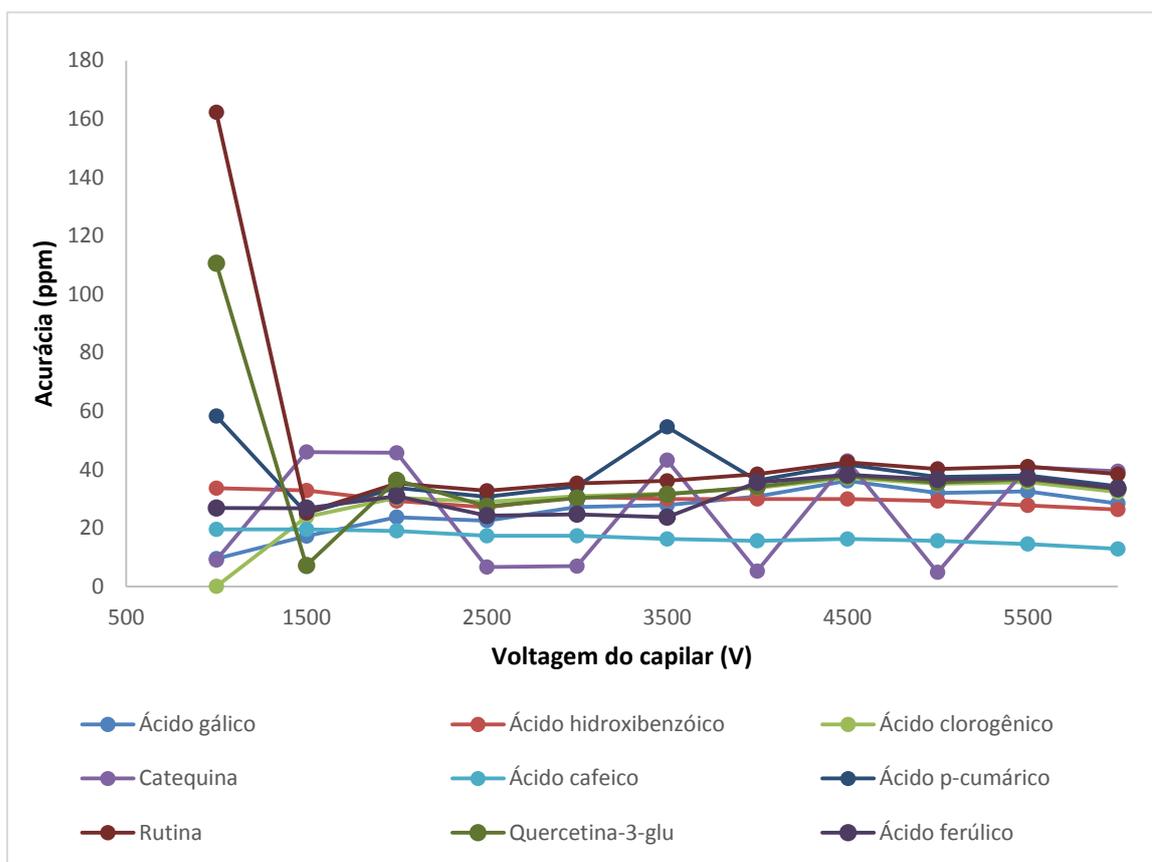
Além da intensidade do sinal, também foi avaliada a acurácia, demonstrada na Figura 5. A análise conjunta da influência da voltagem sobre esse dois parâmetros, permitiu chegar ao valor de 3000 V para a voltagem do capilar da fonte ESI.

**Figura 4 - Gráfico da intensidade do sinal versus a voltagem do capilar para os nove padrões fenólicos**



Fonte: O autor, 2018.

**Figura 5 - Gráfico do acurácia versus a voltagem do capilar para os nove padrões fenólicos**



Fonte: O autor, 2018.

A aplicação da condição preliminar avaliada aos padrões de compostos fenólicos gerou a Tabela 5. A massa exata de cada composto fenólico foi obtida da *ChemSpider* e diminuída da massa exata do hidrogênio, o qual é perdido pela desprotonação na fonte ESI. Uma análise desses resultados permite afirmar que o equipamento apresenta uma elevada exatidão, com os valores de erro (ppm) abaixo de 5 ppm para todos os compostos fenólicos analisados.

**Tabela 5 - Massa exata e acurada dos compostos fenólicos, juntamente com o erro obtido no sistema HPLC-ESI-QToF-MS**

<b>Composto</b>	<b>Massa exata<sup>a</sup> (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa acurada (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro (ppm)</b>
<b>Ácido gálico</b>	170,02153	170,0217	1,2
<b>Ácido hidroxibenzóico</b>	138,031693	138,0315	1,3
<b>Catequina</b>	290,079041	290,0778	4,4
<b>Ácido clorogênico</b>	354,095093	354,0950	0,2
<b>Ácido cafeico</b>	180,042252	180,0422	0,2
<b>Epicatequina</b>	290,079041	290,0778	4,4
<b>Ácido cumárico</b>	164,047348	164,0477	2,1
<b>Rutina</b>	610,153381	610,1532	0,4
<b>Quercetina-3-glicosídeo</b>	464,09549	464,0969	3,1
<b>Ácido ferúlico</b>	194,057907	194,0572	3,6

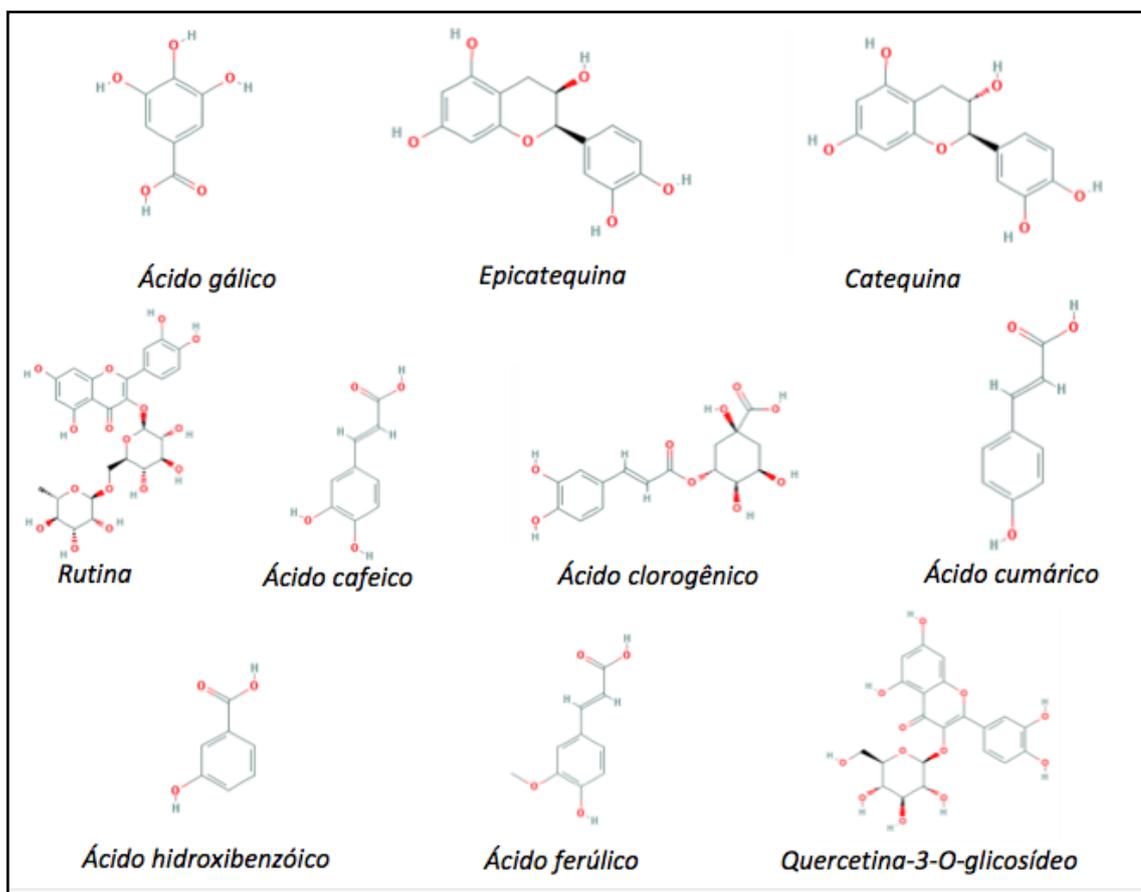
**Legenda:** <sup>a</sup>ChemSpider.

Fonte: O autor, 2018

## 5.2 EXPERIMENTOS INICIAIS

As estruturas químicas dos compostos fenólicos utilizados neste método estão demonstradas na Figura 6. Nas condições de operação do sistema HPLC-DAD-MS já otimizadas, foi possível detectar e separar os padrões de compostos fenólicos testados, que estão demonstrados na Figura 6. A partir da Figura 6 pode-se observar que alguns padrões fenólicos possuem o mesmo tempo de retenção, ou seja, coeluem. No método HPLC-DAD, a coeluição é um problema, pois não permite a quantificação destes compostos. Já no método desenvolvido, como os cromatogramas gerados são cromatogramas extraídos com a razão massa/carga acurada de cada composto, este problema é eliminado.

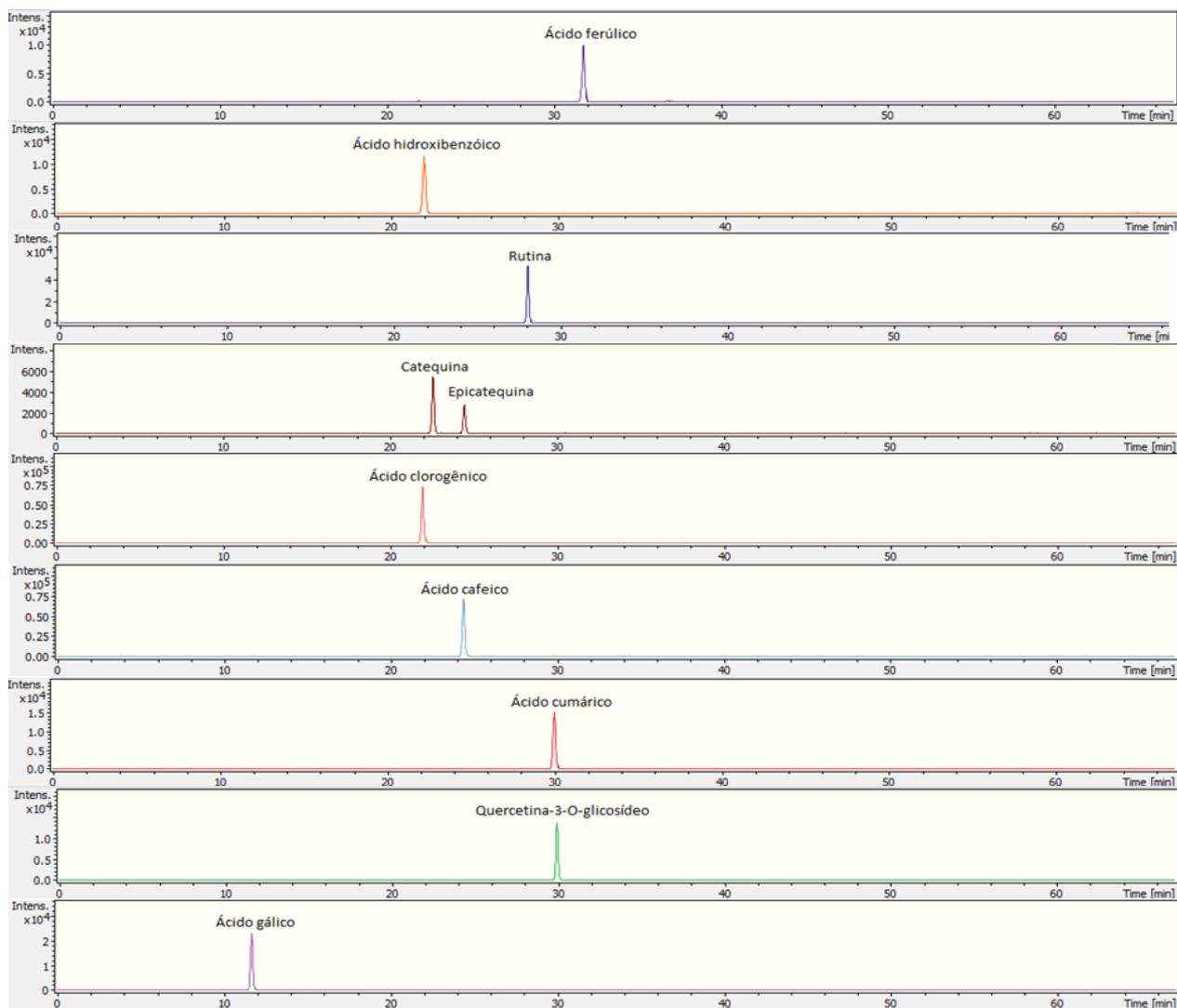
**Figura 6 - Estrutura química dos padrões de compostos fenólicos**



Fonte: PubChem.

Em uma primeira tentativa de validação foram construídas curvas analíticas por padronização externa, utilizando os padrões epicatequina, catequina, rutina, quercetina-3-O-glicosídeo, e os ácidos ferúlico, hidroxibenzóico, clorogênico, cafeico e cumárico (Figura 6). A análise dos resultados indicou uma baixa linearidade na curva de alguns padrões analíticos ( $0,41 < R^2 < 0,99$ ). Essa baixa linearidade provavelmente está relacionada a variação na eficiência de ionização inter-dia do equipamento. Essa hipótese foi reforçada quando verificamos que os pontos analíticos da curva produzidos no mesmo dia apresentavam linearidade, como demonstrado na curva da epicatequina da Figura 7. Assim, verificamos a necessidade de utilizar um padrão interno para corrigir essas variações na resposta do analito, resultado da variabilidade instrumental (21).

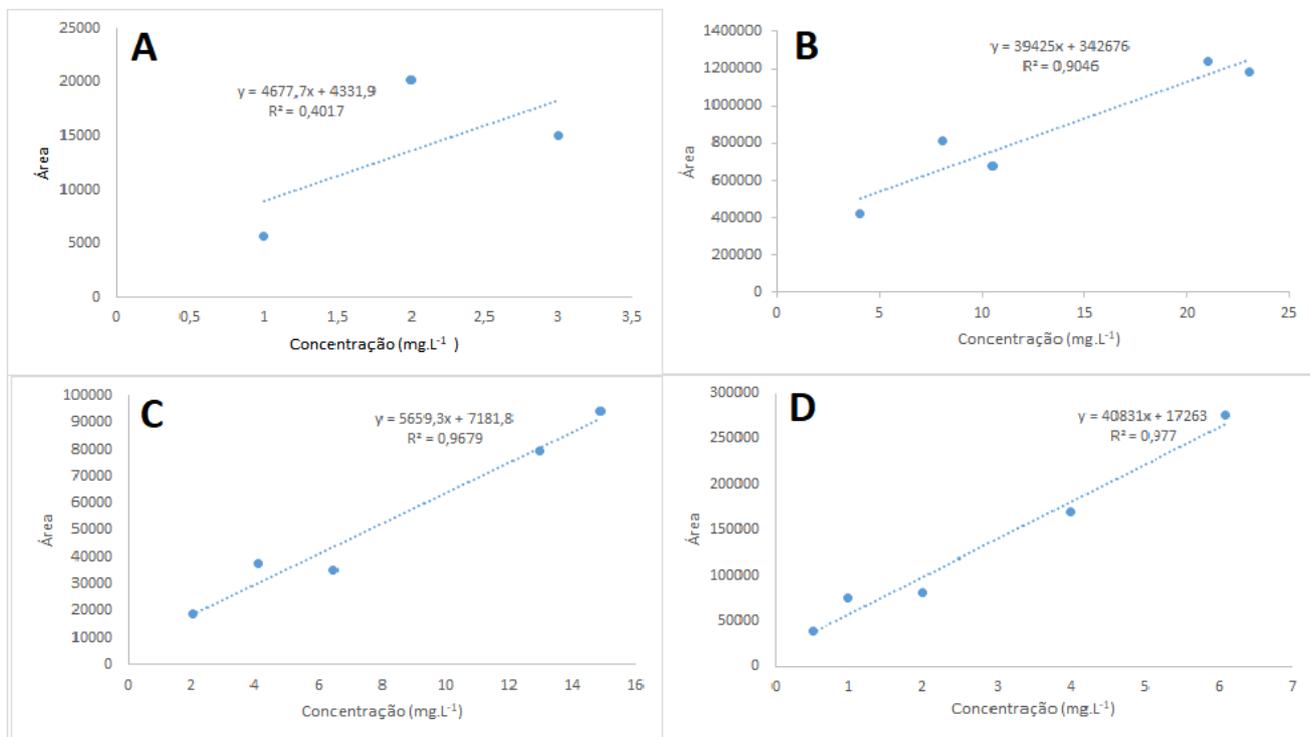
**Figura 7 - Cromatogramas de íon extraído dos padrões fenólicos injetados em HPLC-ESI-qToF-MS processados no DataAnalysis 4.3**



Fonte: O autor, 2018.

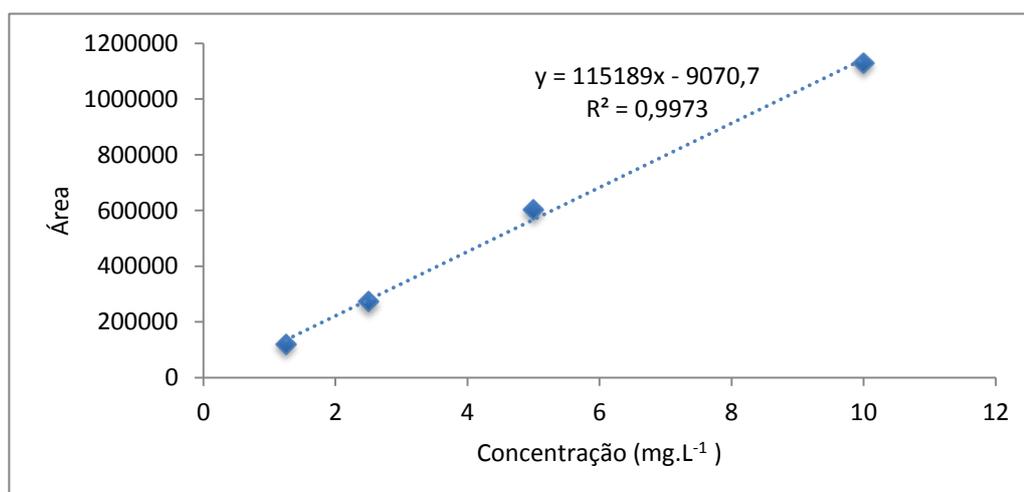
**Figura 8 - Curvas analíticas dos padrões fenólicos construídas a partir de padronização externa:**

**A) ácido ferúlico B) catequina C) ácido hidroxibenzoico D) ácido clorogênico**



Fonte: O autor, 2018.

**Figura 9 - Curva analítica do padrão fenólico epicatequina construída no mesmo dia no equipamento**



Fonte: O autor, 2018.

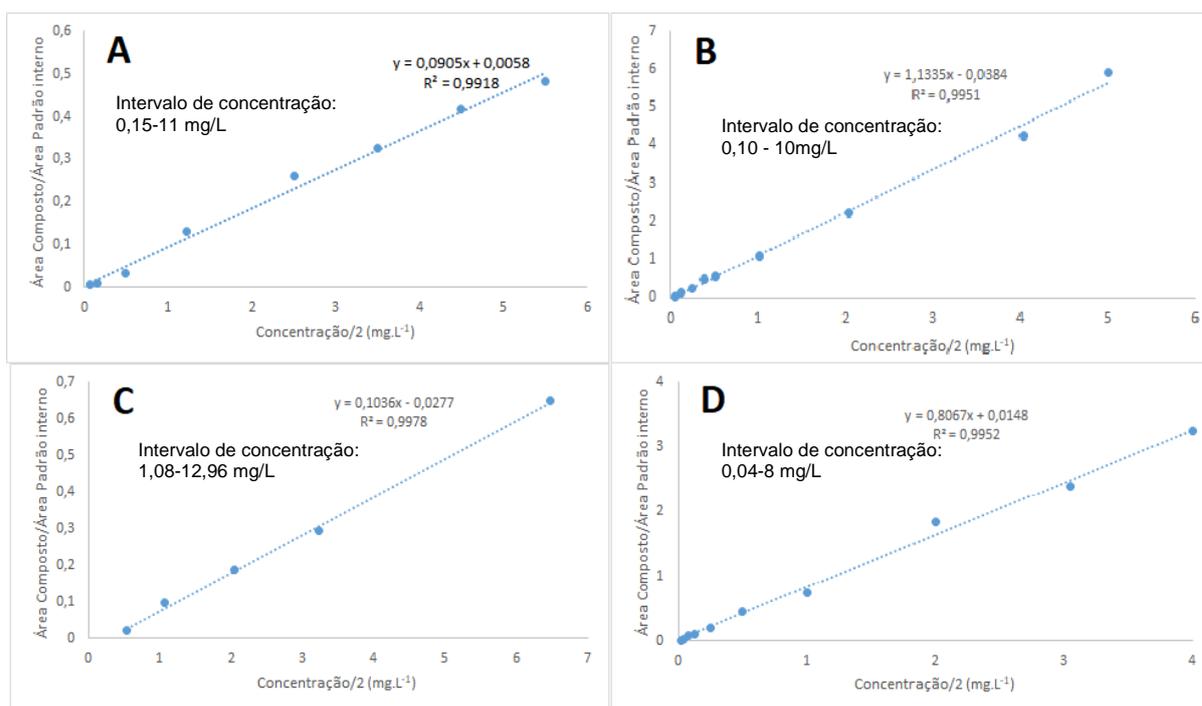
O padrão interno escolhido foi o ácido gálico, pois é um composto fenólico, apresenta elevada solubilidade na fase móvel utilizada, não está presente normalmente em amostras de frutas, ioniza facilmente e é barato.

### 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A partir das áreas dos picos do cromatograma de íon extraído de cada concentração analisada foi possível construir as curvas analíticas. As curvas analíticas construídas por padronização interna estão demonstradas nas Figuras 10, 11 e 12.

**Figura 10 - Curvas analíticas via padronização interna dos padrões fenólicos:**

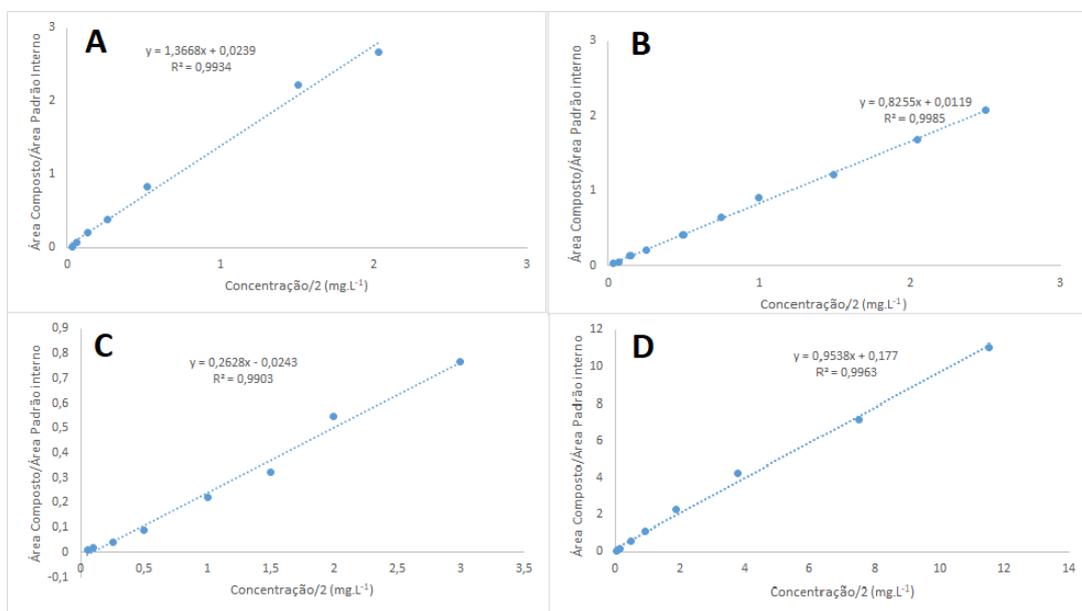
**A) ácido ferúlico B) catequina C) ácido hidroxibenzóico D) ácido clorogênico**



Fonte: O autor, 2018.

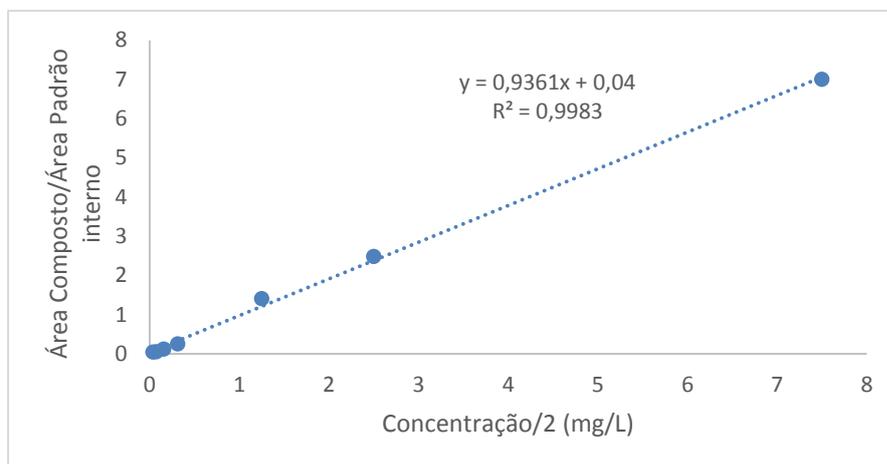
**Figura 11 - Curvas analíticas via padronização interna dos padrões fenólicos:**

**A) ácido cafeico B) rutina C) ácido cumárico D) quercetina-3-O-glicosídeo.**



Fonte: O autor, 2018.

**Figura 12 - Curva analítica via padronização interna do padrão fenólico epicatequina**



Fonte: O autor, 2018.

O método validado apresentou boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) nos intervalos de concentração estudados, de acordo com parâmetros estabelecidos pelo Inmetro ( $R^2 > 0,90$ ) e Anvisa ( $R^2 > 0,99$ ), conforme pode ser observado na Tabela 6 (19).

**Tabela 6 - Dados obtidos das curvas analíticas de padrões fenólicos obtidos por HPLC-ESI-qToF-MS e HPLC-DAD.**

Padrão	Inclinação		Intercepto		LD <sup>a</sup> (mg/L)		LQ <sup>b</sup> (mg/L)		R <sup>2c</sup>	
	HPLC-DAD	HPLC-MS	HPLC-DAD	HPLC-MS	HPLC-DAD	HPLC-MS	HPLC-DAD	HPLC-MS	HPLC-DAD	HPLC-MS
Ácido ferúlico	1,79x10 <sup>5</sup>	0,09	-1,01x10 <sup>5</sup>	0,01	0,52	0,28	1,57	0,84	0,9956	0,9918
Ácido cafeico	1,47x10 <sup>5</sup>	1,37	-2,74x10 <sup>3</sup>	0,02	0,18	0,03	0,53	0,08	0,9996	0,9934
Ácido cumárico	1,83x10 <sup>5</sup>	0,26	-1,38x10 <sup>4</sup>	-0,02	0,28	0,14	0,85	0,43	0,9986	0,9903
Ácido clorogênico	8,54x10 <sup>4</sup>	0,81	-2,53x10 <sup>3</sup>	0,01	0,97	0,04	2,93	0,11	0,9922	0,9952
Ácido hidroxibenzóico	4,29x10 <sup>4</sup>	0,10	-7,31x10 <sup>3</sup>	-0,03	0,94	0,42	2,86	1,29	0,9984	0,9978
Quercertina-3-O-glicosídeo	6,32x10 <sup>4</sup>	0,95	-2,27x10 <sup>4</sup>	0,18	0,77	0,02	2,35	0,07	0,9993	0,9963
Epicatequina	2,12x10 <sup>4</sup>	0,94	-3,05x10 <sup>3</sup>	0,04	0,30	0,13	0,91	0,41	0,9989	0,9983
Catequina	2,16x10 <sup>4</sup>	1,13	-5,17x10 <sup>3</sup>	-0,04	0,21	0,09	0,64	0,27	0,9995	0,9951
Rutina	4,18x10 <sup>4</sup>	0,83	-5,16x10 <sup>3</sup>	0,01	0,24	0,07	0,72	0,21	0,9923	0,9985

**Legenda:** <sup>a</sup>LD: limite de detecção <sup>b</sup>LQ: limite de quantificação <sup>c</sup>R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação. Fonte: O autor, 2018.

Ao comparar os dois métodos, HPLC-DAD e HPLC-MS, através da Tabela 6, observa-se que os limites de detecção e quantificação do método desenvolvido são muito menores (cerca de 2 até 30 vezes) do que no método HPLC-DAD. Assim, o método desenvolvido torna-se interessante na análise de amostras com baixos níveis de compostos fenólicos na sua composição. Ainda, buscando por valores de limites de detecção e quantificação em trabalhos reportados literatura, estes apresentados na Tabela 7, observa-se que alguns são menores e outros maiores do que o método desenvolvido nesse trabalho (23, 24, 25).

**Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação de trabalhos relatados na literatura**

Composto Fenólico	LD (mg/L <sup>-1</sup> )				LQ (mg/L <sup>-1</sup> )			
<b>Catequina</b>	0,09 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,166 <sup>d</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,502 <sup>d</sup>
<b>Ácido cafeico</b>	0,03 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,10 <sup>c</sup>	0,142 <sup>d</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,021 <sup>b</sup>	0,12 <sup>c</sup>	0,430 <sup>d</sup>
<b>Rutina</b>	0,07 <sup>a</sup>	0,010 <sup>b</sup>	-	0,228 <sup>d</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,035 <sup>b</sup>	-	0,692 <sup>d</sup>

**Legenda:** <sup>a</sup>Este trabalho; <sup>b</sup>Moreira e Dias (2018); <sup>c</sup>Padilha et al. (2017); <sup>d</sup>Pereira et al. (2010).

Fonte: O autor, 2018.

**Tabela 8 - Recuperação e Repetibilidade do método analítico - não determinado**

<b>Padrão</b>	<b>Nível</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Repetibilidade (%)</b>
<b>Catequina</b>	1	11,00	85	6
	2	1,53	96	5
	3	0,31	123	4
<b>Ácido clorogênico</b>	1	5,00	90	11
	2	1,50	77	3
	3	0,10	77	4
<b>Ácido cafeico</b>	1	5,51	83	7
	2	1,50	82	2
	3	0,15	74	3
<b>Rutina</b>	1	4,50	70	12
	2	2,50	66	5
	3	0,25	65	6
<b>Quercetina-3-O-glicosídeo</b>	1	20,07	83	13
	2	5,04	83	8
	3	0,51	-	-
<b>Epicatequina</b>	1	12,5	86	8
	2	3,00	88	8
	3	0,17	-	-

Fonte: O autor, 2018.

Na Tabela 8 pode-se observar que a maioria dos valores estão próximos dentro da faixa de 80-115% de recuperação, o que é considerando aceitável segundo AOAC (26).

A repetibilidade do método, estimada pelas triplicatas das recuperações, está entre 2 a 13%, próximo ao valor estabelecido pela AOAC (6%), indicando também valores aceitáveis (26).

#### 5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

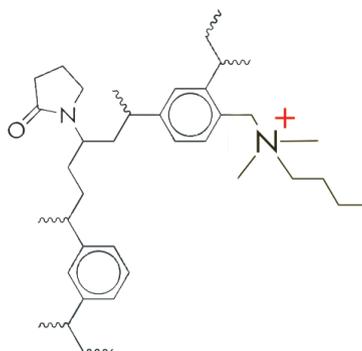
O método foi aplicado em uma amostra de maçã do tipo Fuji. Esta foi extraída exaustivamente e foi tentativamente purificada por extração em fase sólida.

A extração da classe de compostos específica que será analisada é de fundamental importância, pois é esta que determina a precisão e por vezes até é o que viabiliza a análise.

A limpeza é, muitas vezes, necessária, pois evita o entupimento da coluna de HPLC e da agulha de nebulização do espectrômetro de massas, apesar de que haja uma etapa de limpeza antes e após a utilização do equipamento. Ainda esta etapa tem a finalidade de retirar parte da matriz, diminuindo os seus prováveis efeitos.

Então, foi considerado o uso da etapa de limpeza na amostra para diminuir este efeito. A limpeza realizada se deu através da extração em fase sólida, a qual permite que os compostos a serem analisados sejam seletivamente retidos e concentrados no eluato. Foi utilizado um cartucho específico para este tipo de analito, o cartucho MAX (mixed-mode anion-exchange and reversed-phase solvent), específico para compostos ácidos, que é capaz de reter os analitos por meio de dois mecanismos: por sua característica polimérica e capacidade de troca iônica dada pela amina quaternária, que são posteriormente recuperados por um eluente acidificado, no caso, metanol acidificado com 2% ácido fórmico. A estrutura química deste cartucho está demonstrada na Figura 13 (27).

**Figura 13 - Estrutura química do cartucho de SPE Oasis® MAX**  
**OASIS MAX**



Fonte: Oasis®.

Os principais interferentes da amostra podem ser observados na Tabela 9. Estes compostos competem com os compostos fenólicos na ionização realizada na fonte de ionização do espectrômetro de massas.

**Tabela 9 - Composição centesimal da maçã**

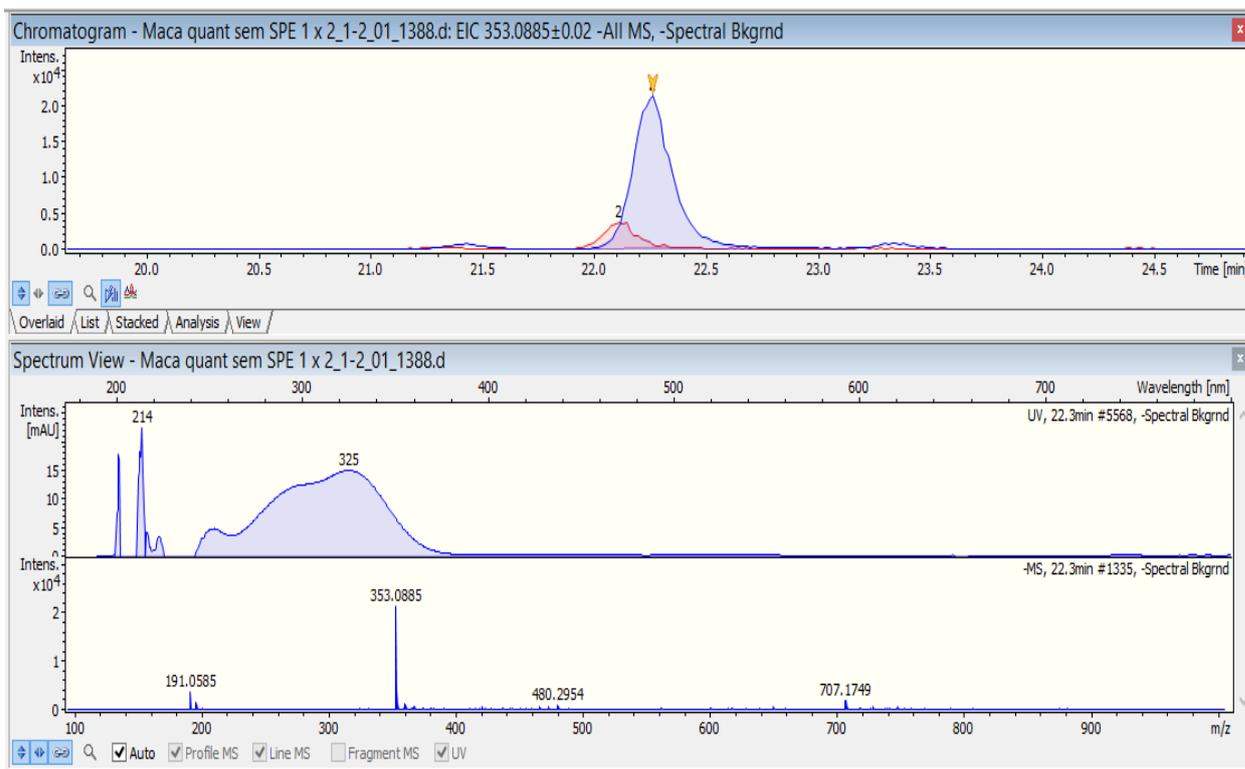
Componente	Quantidade (g)
<b>Água</b>	85,56
<b>Proteínas</b>	0,26
<b>Gorduras totais</b>	0,17
<b>Carboidratos</b>	13,81
<b>Fibras</b>	2,4

Fonte: USDA.

A partir dos dados obtidos pelas amostras purificadas foi observado que houve uma grande perda de algumas classes de compostos, como os ácidos clorogênicos. Por exemplo, o ácido 5-cafeiolquínico (ácido clorogênico), onde a diminuição da área (cerca de 85%) deste composto está demonstrada na Figura 12. A hipótese é que por se tratar de um composto muito solúvel, foi perdido na etapa de lavagem da limpeza. Portanto, as condições de SPE devem ainda ser otimizadas

para as diferentes classes de compostos fenólicos envolvidos ou devem ser utilizadas outras técnicas de limpeza.

**Figura 14 - Cromatogramas extraídos do ácido 5-cafeiolquínico sobrepostos, em azul sem SPE e em vermelho com SPE**



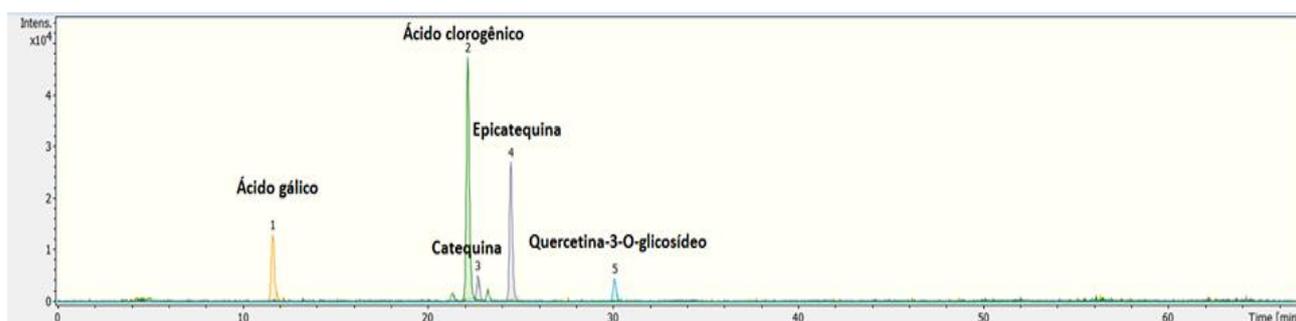
Fonte: O autor, 2018.

Como o método de limpeza deve ser otimizado, a amostra foi analisada diretamente, com diluição de dez vezes, no sistema HPLC-MS. A amostra também foi analisada no HPLC-DAD para comparação dos valores das concentrações dos compostos fenólicos encontrados neste método e no método proposto (HPLC-ESI-QToF-MS).

Foram detectados, em ambos os métodos, a catequina, epicatequina, ácido 5-cafeiolquínico e quercetina-3-O-glicosídeo, conforme demonstrado na Figura 13. Porém, os limites de quantificação de ambos os métodos não permitiram a quantificação destes, com a exceção da epicatequina e do ácido 5-cafeiolquínico. Na Tabela 10, estão demonstradas as concentrações encontradas dos compostos fenólicos na amostra de maçã, em ambos os métodos de quantificação. Pode-se perceber que os valores são próximos, demonstrando a validade do método. Além

disso, os valores encontrados são compatíveis com valores apresentados na literatura, sendo eles: 59,53 mg de epicatequina e 95,09 mg de ácido clorogênico a cada 100 g de amostra em base seca (29). O teste de Tukey demonstrou que os valores de ambos os métodos são similares.

**Figura 15 - Cromatogramas de íon extraído dos compostos fenólicos identificados na amostra de maçã injetada em HPLC-ESI-qToF-MS processados no DataAnalysis 4.3**



Fonte: O autor, 2018.

**Tabela 10 - Comparação da concentração da epicatequina e do ácido clorogênico na maçã por HPLC-ESI-qToF-MS e HPLC-DAD**

Composto	CONCENTRAÇÃO (mg/100g DW <sup>a</sup> )			
	HPLC-DAD SEM SPE	HPLC-DAD COM SPE	HPLC-MS SEM SPE	HPLC-MS COM SPE
<b>Epicatequina</b>	20,67 ± 2,44	23,56 ± 5,47	23,73 ± 8,20	15,27 ± 7,16
<b>Ácido clorogênico</b>	74,66 ± 3,70	1,52 ± 13,74	60,99 ± 25,56	1,88 ± 6,55

Legenda: <sup>a</sup>DW: Dry Weight (Dry Basis). Fonte: O autor, 2018.

## 5.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE CUSTOS

A avaliação de custos foi dada considerando o desenvolvimento de uma curva analítica com 7 pontos e a triplicata de uma amostra. Os preços dos reagentes foram baseados nas cotações da empresa Hexis, com a marca J.T. Baker (30). Os custos derivados da etapa de limpeza da amostra, a extração em fase sólida, não foram

considerados visto que esta etapa não foi utilizada na utilização do método, somente foi testada inicialmente.

Os padrões das marcas Sigma-Aldrich e Fischer Scientific e as membranas filtrantes da Sartorius (31, 32, 33).

**Tabela 11 - Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico**

**PARTE I - Reagentes**

Reagentes	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)
Acetonitrila (Grau HPLC)	4L	118,25 <sup>a</sup>	1L	29,56
Metanol (Grau HPLC)	4L	59,97 <sup>a</sup>	144,4 mL	2,16
Ácido fórmico (98-100%)	1L	247,41 <sup>a</sup>	12 mL	0,49
Acetato de sódio tri-hidratado	500 g	155,11 <sup>a</sup>	1,36 g	0,42
Ácido clorídrico	1L	65,24 <sup>a</sup>	0,102 mL	0,0067

**PARTE II - Padrões**

Padrões	Tamanho da embalagem	Preço (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)
Ácido gálico	100 mg	500,00 <sup>b</sup>	10	50
Ácido ferúlico	5000 mg	333,00 <sup>b</sup>	10	0,666
Ácido cafeico	2000 mg	363,00 <sup>b</sup>	10	1,815
Ácido cumárico	1000 mg	89,00 <sup>b</sup>	10	0,89
Ácido clorogênico	250 mg	322,00 <sup>b</sup>	10	12,88
Ácido hidroxibenzóico	50 mg	411,00 <sup>b</sup>	10	82,2
Quercertina-3-O-glicosídeo	50 mg	1307,00 <sup>b</sup>	10	261,4
Epicatequina	1000 mg	1119,00 <sup>b</sup>	10	11,19

<b>Catequina</b>	25 mg	1579,00 <sup>b</sup>	10	631,6
<b>Rutina*</b>	5000 mg	47,72 <sup>c</sup>	10	0,09544

**Tabela 11 – Avaliação de custos para o desenvolvimento do projeto tecnológico**

**PARTE III - Materiais**

<b>Materiais</b>	<b>Tamanho da embalagem</b>	<b>Preço (R\$)</b>	<b>Quantidade utilizada</b>	<b>Custo (R\$)</b>
<b>Membrana de acetato de celulose 0,22 µm</b>	Caixa com 100 unid.	120,00 <sup>d</sup>	1	1,2
<b>Membrana filtrante acetato de celulose 0,22 µm</b>	Caixa com 100 unid.	251,00 <sup>d</sup>	10	25,10
<b>Membrana Teflon (PTFE) 0,22 µm</b>	Caixa com 100 unid.	490,00 <sup>d</sup>	1	4,90
-	-	<b>Total</b>	-	1116,15

Legenda: <sup>a</sup>J.T.Baker (Hexis); <sup>b</sup>Sigma-Aldrich; <sup>c</sup>Fischer Scientific; <sup>d</sup>Sartorius. Fonte: O autor, 2018.

Além dos gastos com reagentes e materiais, deve-se considerar gastos como energia consumida dos equipamentos utilizados, conforme descrito na Tabela 12. Os valores calculados tiveram como base o custo de energia (kWh) atual de R\$ 0,61 para cada 1 kWh, conforme CEEE, empresa distribuidora de Porto Alegre (34).

**Tabela 12 - Avaliação de custos fixos**

<b>Equipamento</b>	<b>Consumo (kWh)</b>	<b>Preço por hora (R\$)</b>	<b>Tempo utilizado (h)</b>	<b>Custo (R\$)</b>
<b>HPLC-ESI-qToF-MS</b>	4,85	2,9585	11	32,54
<b>Centrifuga</b>	0,13	0,0793	1,5	0,12
<b>Vortex</b>	0,25	0,1525	0,75	0,11
<b>Computador</b>	0,25	0,1525	11	1,67
<b>Lâmpada D2 (Deutério)</b>	2,03	1,2383	11	13,62
<b>Lâmpada W (tungstênio)</b>	0,11	0,0671	11	0,74
-	-	-	<b>Total</b>	48,8

Fonte: O autor, 2018.

Para se ter um valor mais aproximado do custo para cada amostra, se considera que as análises que serão repetidas serão apenas as triplicatas de cada amostra, não havendo o custo da curva analítica, visto que pode-se utilizar a curva analítica para diversas análises. Portanto, os cálculos foram refeitos utilizando apenas os custos das triplicatas das amostras, conforme Tabela 13 – partes I, II e III.

**Tabela 13 - Avaliação de custos para a análise de uma amostra em triplicata****PARTE I - Reagentes**

<b>Reagente</b>	<b>Tamanho da embalagem</b>	<b>Preço (R\$)</b>	<b>Quantidade utilizada</b>	<b>Custo (R\$)</b>
<b>Acetonitrila (Grau HPLC)</b>	4L	118,25	1L	29,56
<b>Metanol (Grau HPLC)</b>	4L	59,97	144,4 mL	2,16
<b>Ácido fórmico (98-100%)</b>	1L	247,41	12 mL	0,49
<b>Acetato de sódio tri-hidratado</b>	500 g	155,11 <sup>a</sup>	1,36 g	0,42
<b>Ácido clorídrico</b>	1L	65,24	0,102 mL	0,0067

**Tabela 13 – Avaliação de custos para a análise de uma amostra em triplicata**

**PARTE II - Materiais**

<b>Material</b>	<b>Tamanho da embalagem</b>	<b>Preço (R\$)</b>	<b>Quantidade utilizada</b>	<b>Custo (R\$)</b>
<b>Membrana de acetato de celulose 0,22 m</b>	Caixa com 100 unid.	120,00 <sup>d</sup>	1	1,20
<b>Membrana filtrante acetato de celulose</b>	Caixa com 100 unid.	251,00 <sup>d</sup>	3	7,53
<b>Membrana Teflon (PTFE) 0,22m</b>	Caixa com 100 unid.	490,00 <sup>d</sup>	1	4,90

**PARTE III - Equipamentos**

<b>Equipamentos</b>	<b>Consumo (kWh)</b>	<b>Preço por hora (R\$)</b>	<b>Tempo utilizado (h)</b>	<b>Custo (R\$)</b>
<b>HPLC-ESI-qToF-MS</b>	4,85	2,9585	3,35	9,91
<b>Centrifuga</b>	0,13	0,0793	1,5	0,12
<b>Vortex</b>	0,25	0,1525	0,75	0,11
<b>Computador</b>	0,25	0,1525	3,35	0,51
<b>Lâmpada D2 (Deutério)</b>	2,03	1,2383	3,35	4,15
<b>Lâmpada W (tungstênio)</b>	0,11	0,0671	3,35	0,22
-	-	-	<b>Total</b>	60,87

Fonte: O autor, 2018.

O custo estimado da curva analítica e da triplicata das amostras resultou em R\$ 1164,95. Porém, se considera que a curva analítica possui estabilidade para que possa ser utilizada para outras amostras. Portanto, o custo estimado da análise da triplicata de uma amostra se torna apenas R\$ 60,87, que é considerado um valor acessível, levando em consideração o custo-benefício da análise.

## 6 CONCLUSÃO

O método analítico para quantificação de compostos fenólicos, baseado em HPLC-MS, foi validado e apresentou boa linearidade, baixos limites de detecção e quantificação, boa recuperação e repetibilidade. Além disso, foi aplicado com sucesso na quantificação dos compostos fenólicos da maçã.

Nesse contexto, o método validado nesse trabalho pode ser utilizado para a quantificação de compostos fenólicos em maçã, com a grande vantagem de não apresentar as coeluições apresentadas no método convencional de quantificação e também por possuir menores valores de limites de detecção e quantificação quando comparado ao método por HPLC-DAD.

O custo da análise se torna acessível uma vez que o equipamento de espectrometria de massas é adquirido e as curvas de calibração estão prontas, tendo um custo estimado de cerca de 60 reais, um excelente custo-benefício.

## REFERÊNCIAS

- (1) CROZIER, Alan; JAGANATH, Indu B.; CLIFFORD, Michael N. **Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.** Natural Product Reports, [s.l.], v. 26, n. 8, p.965-1096, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). Acesso em: 20 ago. 2018
- (2) KRIS-ETHERTON, Penny M. et al. **Recent discoveries in inclusive food-based approaches and dietary patterns for reduction in risk for cardiovascular disease.** Current Opinion In Lipidology, [s.l.], v. 13, n. 4, p.397-407, ago. 2002. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). Acesso em: 22 ago. 2018
- (3) ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK, Magdalena; DWIECKI, Krzysztof; LEWKO, Katarzyna. **Modification of soybean and lupine sprouting conditions:** influence on yield, ROS generation, and antioxidative systems. European Food Research And Technology, [s.l.], v. 244, n. 11, p.1945-1952, 26 jun. 2018. Springer Nature America, Inc. Acesso em: 25 ago. 2018.
- (4) CROZIER, Alan; CLIFFORD, Michael N.; ASHIHARA, Hiroshi. **Plant Secondary Metabolites:** Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p. 383.
- (5) MOTILVA, Maria-josé; SERRA, Aida; MACIÀ, Alba. **Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry:** An overview. Journal Of Chromatography A, [s.l.], v. 1292, p.66-82, maio 2013. Elsevier BV. Acesso em: 20 ago. 2018.
- (6) OUSA, Cleyton Marcos de M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Química Nova, [s.l.], v. 30, n. 2, p.351-355, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). Acesso em: 20 ago. 2018
- (7) A ESCARPA; GONZÁLEZ, M.c. **Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods.** Analytica Chimica Acta, [s.l.], v. 427, n. 1, p.119-127, jan. 2001. Elsevier BV. Acesso em: 18 jun. 2018.

(8) SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

(9) LABARBERA, Giorgia et al. **Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages**. Food Research International, [s.l.], v. 100, p.28-52, out. 2017. Elsevier BV. Acesso em: 25 jun. 2018.

(10) KRUYE, Anneli et al. **Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I**. Analytica Chimica Acta, [s.l.], v. 870, p.29-44, abr. 2015. Elsevier BV. Acesso em: 20 jul. 2018

(11) **Pubchem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

(12) LIN, Yung-sheng et al. **Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves**. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, [s.l.], v. 51, n. 7, p.1864-1873, mar. 2003. American Chemical Society (ACS). Acesso em: 20 set. 2018

(13) MEZNI, Faten et al. **Phenolic profile and effect of growing area on Pistacia lentiscus seed oil**. Food Chemistry, [s.l.], v. 257, p.206-210, ago. 2018. Elsevier BV. Acesso em: 20 jun. 2018

(14) MESQUITA, E.; MONTEIRO, M. **Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice**. Food Research International, [s.l.], v. 106, p.54-63, abr. 2018. Elsevier BV. Acesso em: 20 jun. 2018

(15) LIU, Zhi et al. **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, [s.l.], v. 9, n. 22, p.3361-3374, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). Acesso em: 20 jun. 2018

(16) WESTMAN-BRINKMALM, Ann; BRINKMALM, Gunnar. Frontmatter. **Mass Spectrometry**, [s.l.], p.15-87, 26 mar. 2008. John Wiley & Sons, Inc. Acesso em: 20 jul. 2018

(17) **Decodificando a Espectrometria de Massas: supressão iônica**. Disponível em: <<https://www.labnetwork.com.br/noticias/decodificando-a-espectrometria-de-massas-supressao-ionica/>>. Acesso em: 30 out. 2018.

(18) CHISTÉ, Renan Campos; MERCADANTE, Adriana Zerlotti. **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, [s.l.], v. 60, n. 23, p.5884-5892, 4 jun. 2012. American Chemical Society (ACS). Acesso em: 10 ago. 2018.

(19) RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina S. Fontes; MELO, Lúcio Flávio Costa. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, Vol.27, pág 771-780, 2004.

(20) **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

(21) EDINA-REMÓN, Alexander et al. **Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake**. Analytica Chimica Acta, [s.l.], v. 634, n. 1, p.54-60, fev. 2009. Elsevier BV. Acesso em: 20 ago. 2018

(22) BRONSEMA, Kees J.; BISCHOFF, Rainer; MERBEL, Nico C. van de. **Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry**. Journal Of Chromatography B, [s.l.], v. 893-894, p.1-14, abr. 2012. Elsevier BV. Acesso em: 20 ago. 2018

(23) MOREIRA, Gisele Chagas; DIAS, Fabio de Souza. **Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic**

**acid, rutin, catechin and trans -cinnamic acid in Physalis angulata L. and determination by HPLC-DAD.** Microchemical Journal, [s.l.], v. 141, p.247-252, set. 2018. Elsevier BV. Acesso em: 20 jun. 2018

(24) PADILHA, Carla Valéria da Silva et al. **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, [s.l.], v. 228, p.106-115, ago. 2017. Elsevier BV. Acesso em: 20 jun. 2018

(25) PEREIRA, Vanda et al. **HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples.** Journal Of Separation Science, [s.l.], p.1204-1215, 16 mar. 2010. Wiley. Acesso em: 28 jun. 2018

(26) **AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.** Disponível em: [https://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)>. Acesso em: 16 set. 2018.

(27) **Oasis Sample Extration Products.** Disponível em: <https://kinesis.co.uk/media/wysiwyg/knowledgebase/pdf/720001692en-New-Oasis-brochure.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2018.

(28) **U.S. Department of Agriculture (USDA).** Basic Report: 09003, Apples, raw, with skin (Includes foods for USDA's Food Distribution Program). Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09003?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=apple+raw&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

(29) **Phenol Explorer:** Polyphenols found in Apple [Dessert], whole, raw. Disponível em: <http://phenol-explorer.eu/contents/food/23>>. Acesso em: 09 set. 2018.

(30) **My Hexis.** Disponível em: <http://www.myhexis.com.br/>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

(31) **Phytochemical Standards.** Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-standards/phytochemical-standards.html>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

(32) **Rutin, 97+%, ACROS Organics™.** Disponível em:  
<<https://www.fishersci.com/shop/products/rutin-97-acros-organics-3/AC132390050#?keyword=rutin>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

(33) **Sartorius.** Disponível em: <<https://www.sartoriusglobal.com/sartorius/pt/EUR>>.  
Acesso em: 8 nov. 2018.

(34) **Valor simplificado da conta.** Disponível em:  
<<http://www.ceee.com.br/pportal/ceee/Component/Controller.aspx?CC=1248>>.  
Acesso em: 8 nov. 2018.