



UNICAMP

THAÍS CRISTINA LIMA DE SOUZA

**“PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE
FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS
(*PERESKIA ACULEATA* MILLER)”**

Campinas,

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

THAÍS CRISTINA LIMA DE SOUZA

**PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE ORA-
PRO-NÓBIS - (*PERESKIA ACULEATA* MILLER)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: PROF^a. DR^a. HELENA TEIXEIRA GODOY.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA THAÍS CRISTINA LIMA DE SOUZA, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. HELENA TEIXEIRA GODOY.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

So89p Souza, Thaís Cristina Lima, 1989-
Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis
(*Pereskia Aculeata* Miller) / Thaís Cristina Lima de Souza. – Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. *Pereskia Aculeata*. 2. Compostos fenólicos. 3. Cromatografia líquida
de ultra eficiência (CLUE). I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phenolic compounds extracted from leaves of ora-pro-nóbis
(*Pereskia Aculeata* Miller)

Palavras-chave em inglês:

Pereskia Aculeata

Phenolic compounds

Ultra performance liquid chromatography (UPLC)

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Adriana Dillenburg Meinhart

Daniele Rodrigues

Data de defesa: 22-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Helena Teixeira Godoy
(Orientadora)

Prof.^a. Dr.^a. Adriana Dillenburg Meinhart
(Membro Titular)
DCA – FEA – UNICAMP

Prof.^a. Dr.^a. Daniele Rodrigues
(Membro Titular)
Faculdade Max Planck

Prof.^a. Dr.^a Juliana Azevedo Lima Pallone
(Membro suplente)
DCA – FEA – UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Merenice Roberto Sobrinho
(Membro suplente)
SENAI – Campinas

RESUMO

O ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) é uma trepadeira arbustiva, pertencente à família Cactaceae. Suas folhas são muito utilizadas na culinária mineira, mas pouco usada e quase desconhecida pela população no resto do país. Dados referentes à composição de compostos fenólicos presentes em suas folhas inexistem na literatura, até onde se sabe. As informações sobre os fenólicos dessa planta podem auxiliando no resgate do OPN, estimulando e ampliando seu consumo, evitando assim, que a mesma sofra um processo de extinção, como tem ocorrido com outras espécies no Brasil. Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo otimizar um método de extração e hidrólise para os compostos fenólicos presentes nas folhas de OPN, bem como desenvolver e validar um método de cromatografia de ultra eficiência (UPLC), para separação e quantificação do perfil desses compostos. As variáveis estudadas para a otimização multivariada foram a concentração de metanol (%), concentração de ácido clorídrico (HCL) (mol.L^{-1}), tempo (min.) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de extração. A partir dos resultados obtidos para o planejamento empregado, a melhor condição escolhida para a realização da extração consistia em: água como solução extratora, com 1 mol.L^{-1} de HCl, temperatura igual a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo de 90 minutos. O método cromatográfico desenvolvido apresentou resultados satisfatórios em relação aos critérios de validação, mostrando-se adequado para a separação e quantificação dos compostos fenólicos estudados. As amostra de OPN apresentaram teores de compostos fenólicos variando entre 58,37 e 81,29 mg.100g^{-1} para o ácido clorogênico, 3,72 e 15,64 mg.100g^{-1} para o ácido caféico, 4,68 e 5,39 mg.100g^{-1} para o ácido *p*-coumárico e 3,72 e 5,15 mg.100g^{-1} para o ácido ferúlico. A presença desses ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados nas amostras indica que as mesmas podem possuem uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de análises adequadas para tal afirmação. Além disso, as concentrações encontradas para desses ácidos nas folhas foram superiores ao relatados para alguns vegetais amplamente consumidos no Brasil, caracterizando o OPN como uma importante fonte alternativa de fenólicos, podendo contribuir para uma dieta mais saudável.

Palavras-chave: *Pereskia Aculeata* Miller, compostos fenólicos, otimização multivariada, desenvolvimentos de método; UPLC.

ABSTRACT

Ora-pro-nobis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) is a climbing shrub belonging to the Cactaceae family, its leaves are widely used in traditional cooking of Minas Gerais, Brasil, however is less widely used and almost unknown by the population in the rest of the country. From what we know, data relating to the composition of phenolic compounds present in their leaves is unavailable in the literature. The information of this plant phenolics composition may help in the rescue of the OPN, since can stimulate and expand its consumption, avoiding its extinction process, as has happened with other species in Brazil. Therefore, the aim of this study was to optimize a method of extraction and hydrolysis to the phenolic compounds of leaves of OPN, as well as develop and validate a method of ultra performance liquid chromatography (UPLC) for separation and quantification of these phenolics. The variables studied for the multivariate optimization were the methanol concentration (%), the hydrochloric acid (HCL) concentration (mol L^{-1}), time (min.) and temperature ($^{\circ}\text{C}$). The results obtained for the optimization showed that the best condition to carry out the extraction were: water as extraction solution with 1 mol L^{-1} HCl, temperature of 80°C and 90 minutes. The chromatographic method developed showed satisfactory results regarding the validation criteria, revealed itself suitable for the separation and quantification of the phenolic compounds in OPN leaves. The samples of the OPN demonstrated levels of phenolic compounds ranging between 58.37 and 81.29 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for chlorogenic acid, 3.72 and 15.64 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for caffeic acid, 4.68 and 5,39 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for *p*-coumaric acid and 3.72 and 5.15 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for ferulic acid. The presence of these hydroxycinnamic acids and their derivatives indicates that the samples may have a high antioxidant activity, nevertheless, appropriate analysis should be run to justify this position. Furthermore, the concentrations obtained for the hydroxycinnamic acids and their derivatives in leaves were higher than those reported for some vegetables widely consumed in Brazil, featuring OPN as an important alternative source of phenolics compounds that can contribute to a healthier diet.

Keyword: *Pereskia Aculeata* Miller, phenolic compounds, multivariate optimization, method development; UPLC.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xi
LISTA DE FIGURA	xiv
LISTA DE TABELA	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - Ora-pro-nóbis e compostos fenólicos:
definição, propriedades e métodos de análise.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1 ORA-PRO-NÓBIS	9
1.1.1 Aspectos gerais	9
1.1.2 Composição nutricional.....	11
1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	12
1.2.1 Extração dos compostos fenólicos	14
1.2.2 Hidrólise	16
1.2.3 Separação e quantificação dos compostos fenólicos	18
1.3 EMPREGO DE TÉCNICAS MULTIVARIADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

CAPÍTULO II: Extração de compostos fenólicos de folhas de ora-pro-nóbis: otimização e
desenvolvimento de metodologia cromatográfica.

RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 AMOSTRAS	33
2.2 REAGENTES.....	33
2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO	34
2.3.1 Análise estatística	35
2.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR UPLC	35
2.4.1 Validação do método cromatográfico	36
2.4.1.1 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	37
2.4.1.2 Linearidade do sistema	37
2.4.3 Repetibilidade e precisão intermediária	37

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA	38
3.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	43
3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	44
4. CONCLUSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

CAPÍTULO III: Perfil dos compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis.

RESUMO.....	54
ABSTRACT	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 AMOSTRAS	58
2.2 REAGENTES.....	58
2.3 INSTRUMENTAÇÃO.....	59
2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS	59
2.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS	60
4. CONCLUSÃO.....	64
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64
CONCLUSÃO GERAL	68
TRABALHOS FUTUROS.....	68

Dedico este trabalho
aqueles que são essenciais para qualquer
conquista na minha vida e a quem tenho
a honra de chamar de família,
Carlos, Selma, Hugo e João Victor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado à oportunidade de ser aquilo que escolhi, e por todas as coisas maravilhas que tem feito em minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Selma, por todo amor, carinho, dedicação e sacrifício para prover tudo o que precisei até hoje. Ao meu irmão Hugo, pelo exemplo, proteção e pelos ensinamentos acadêmicos e de vida. Ao meu querido irmão João Victor, por todas as alegrias, conselhos de “homem feito” e por me fazer lembrar e dar graças a tudo que já conquistei. Vocês são aqueles que mais amo, meu maior tesouro, hoje e sempre.

A prof^a. Dra. Helena Godoy, pela cordial orientação, pela confiança depositada, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos, pelo carinho, e por ter cumprido seu papel, como orientadora, professora e pessoa, de forma exemplar. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, Dr^a Adriana Meinhart, Dr^a Daniele Rodrigues, Dr^a Merenice Sobrinho e Prof^a Dr^a Juliana Pallone, pelas valiosas correções e contribuições, que colaboraram grandemente para o aprimoramento deste trabalho. Igualmente ao Prof^o Dr^o Marcelo Prado, membro da banca de qualificação, que prestou importantes contribuições para o projeto do trabalho.

A amiga Tayse Ferreira (fofinha mor) pela ajuda prestada durante todo o trabalho, pelo incentivo, por ouvir meus desabafos, pela amizade de anos e, principalmente, por ter sido uma irmã para mim. Mil vezes obrigada, fofis!

A Dani, Polly e Janclei pela ajuda prestada com a instrumentação. A Elenice por fornecer amostras para o trabalho. Ao Danilo, Maria Rosa, Mateus e Wellington por todas as dicas e ajuda oferecida durante a realização dos experimentos, por todos os momentos de alegria e descontração. A amizade de todos vocês foi ferramenta fundamental para tornar a conclusão desse trabalho mais prazerosa.

A todos os demais colegas de laboratório, Alane, Cristiano, Dani Bio, Leonardo, Marla, Milene e Stefany, pela convivência e conhecimento compartilhado. Especialmente a Marla, pela ajuda prestada e companhia durante as análises.

Aos técnicos Renata, Marcela, Miriam e Sr. Dirceu que prestaram grande auxílio para a conclusão desse trabalho.

A minha cunhada Ádria, por ser um exemplo de dedicação e de profissional.

Aos amigos que acumulei durante todo o mestrado, fora e dentro da UNICAMP, muito obrigada pelo estímulo durante essa jornada. Aos amigos que acumulei durante a vida, a amizade de vocês me deu forças para chegar até aqui.

A todos os professores e profissionais da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos, paciência e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Empenhem-se para acrescentar à sua fé a virtude;
à virtude o conhecimento; ao conhecimento o
domínio próprio; ao domínio próprio a
perseverança; à perseverança a piedade; à piedade
a fraternidade; e à fraternidade o amor.”
(2 Pe 1:5-8)

LISTA DE FIGURA

Figura 1.1 Ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Miller)	9
Figura 1.2. Fórmulas estruturais dos compostos fenólicos	13
Figura 3.1. Cromatogramas obtidos para a amostra de folhas de OPN.....	61

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1. Variáveis e níveis experimentais para o planejamento composto central rotacional 2^4	34
Tabela 2.2. Variáveis, níveis codificados e respostas obtidas para a otimização multivariada da extração e hidrólise dos compostos fenólicos presentes em folhas de OPN.	40
Tabela 2.3. Resumo dos resultados obtidos para ANOVA: significância estatística da regressão e ajuste dos modelos quadráticos, tendo as concentrações dos ácidos fenólicos (clorogênico, caféico, p-coumárico, ferúlico) e kaempferol como respostas.	42
Tabela 2.4. Faixa de linearidade das curvas de trabalho desenvolvidas para 5 compostos fenólicos, bem como seus respectivos limites de detecção e quantificação.	44
Tabela 2.5. Valores dos coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediária, para três diferentes níveis das curvas dos fenólicos estudados.	45
Tabela 2.6. Valores dos coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediária avaliados para o método de extração de fenólicos definido.....	46
Tabela 3.1. Concentração dos compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas de OPN.	62

INTRODUÇÃO GERAL

Os compostos fenólicos são um grupo de componentes orgânicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxila, estão amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem parte essencial da dieta humana. (DAI; MUMPER, 2010; BALASUNDRAM et al., 2006; SHAHIDI; NACZK, 2005). Esses compostos têm recebido atenção considerável, devido, principalmente, suas funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimutagênica e antitumoral (HAM et al., 2009; PARVATHY et al., 2009; WILDAMAN; KELLY, 2007; HERCBERG et al., 1998). Estudos comprovam seu potencial no combate aos radicais livres, que causam estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos a tecidos e biomoléculas do organismo humano. Dessa forma, os compostos fenólicos apresentam importante papel na prevenção de distúrbios patológicos, tais como a aterosclerose, disfunção cerebral e câncer. Além disso, esses compostos possuem grande aplicação industrial, sendo utilizados como corantes naturais e conservantes de alimentos, ou na produção de tintas, papel e cosméticos (IGNAT et al., 2011; WILDMAN; KELLEY, 2007; SHAHIDI; NACZK, 2005; NAGAI et al., 2003).

Pesquisas demonstram que vegetais de folhas verdes contêm importantes componentes bioativos tais como, β -caroteno, ácido ascórbico, riboflavina, ácido fólico e sais minerais, além de apresentarem grande quantidade de polifenóis como, ácidos fenólicos, flavonoides, e compostos aromáticos (KOBORI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; KIM, 2013). Entretanto, alguns desses vegetais são pouco explorados no Brasil, sendo classificadas como hortaliças não-convencionais, culturas que não estão organizadas enquanto cadeia produtiva propriamente dita, mas que possuem importante papel na complementação da alimentação e economia familiar de populações de baixa renda, além de serem importantes para a expressão cultural de determinados locais, estando presentes na culinária típica dos mesmos (SOUZA, 2009; BRASIL, 2010; SANTOS et al., 2012).

Dentre essas hortaliças não convencionais, encontra-se a ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller), uma trepadeira arbustiva que tem suas folhas e frutos utilizados na culinária brasileira. Embora esteja amplamente distribuída no Brasil, entre os estados da Bahia ao Rio Grande do Sul, não foram encontrados, até onde se sabe, trabalhos referentes o perfil de compostos fenólicos

exibido por essa planta (TAKEITI et al., 2009; VIEIRA et al., 2010; AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

A extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais, ou alimentícias é, geralmente, um pré-requisito para qualquer análise química, no que se refere ao estudo da concentração e composição dos mesmos (TURA; ROBARDS, 2002). Técnicas de extração convencionais sólido-líquido ou líquido-líquido, que utilizam como solução extratora solventes orgânicos e/ou ácidos, são comumente empregadas para isolar compostos fenólicos (ZHANG et al. 2007). No entanto, a obtenção de um extrato que seja representativo da amostra, isto é, que contenha todos os componentes fenólicos de interesse e livre de substâncias interferentes, é influenciada, grandemente, pelas condições aplicadas durante o processo de extração, tais como a concentração do solvente, o tempo de extração, a temperatura, o pH, a relação sólido/líquido e o tamanho de partícula (RADOJKOVIĆ et al., 2012; SPIGNO et al., 2007, STALIKAS, 2007).

Por essas razões e pela diversidade de compostos fenólicos presentes nas diferentes fontes naturais, bem como suas diferentes estruturas e propriedades físico-químicas, não existe um protocolo universal adequado ou completamente satisfatório para a extração de todos os fenólicos ou uma classe específica desses compostos para as diferentes matrizes alimentícias. Como consequência, processos de extração específicos devem ser idealizados e otimizados para cada fonte de fenólicos estudada (SILVA et al., 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Nesse contexto, a otimização multivariada tem sido amplamente empregada para potencializar a extração de compostos fenólicos em folhas (AYBASTIER et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; ŞAHIN; ŞAMLI, 2013; ZHOU et al., 2013; WANG et al., 2013; RADOJKOVIĆ et al., 2012; SILVA et al., 2007), uma vez que permite avaliar vários parâmetros e as interações entre estes com reduzido número de ensaios experimentais, consistindo em uma metodologia menos trabalhosa e onerosa do que as abordagens univariadas utilizadas para otimização de processos de extração (FERREIRA et al, 2007; LEE et al., 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) é uma das técnicas mais utilizadas para separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Contudo, o tempo de análise e a resolução obtidos a partir de métodos que empregam a HPLC são limitados pelo tamanho de partícula das colunas e pela instrumentação dessa técnica cromatográfica (CHEN; KORD, 2009). O

desenvolvimento da técnica de cromatografia de ultra eficiência (UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*) possibilitou um melhoramento nos métodos analíticos para matrizes de amostras complexas, tais como matrizes alimentícias e biológicas, a qual emprega colunas com diâmetro interno menor, fases estacionárias com tamanho de partícula abaixo de 2,0 µm, e sistemas operando em altas pressões (até 1300 bar ou 15.000 psi) (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012; EPRILIATI, et al., 2010; WELCH et al., 2010; CHEN; KORD, 2009), resultando em análises com melhor resolução, separações mais rápidas, menor consumo de fase móvel, menor quantidade de resíduos gerados e menor custo com solventes (MOLTIVA et al., 2013; CHEN; KORD, 2009).

Com base nos princípios expostos acima, o presente trabalho teve como objetivo otimizar um método de extração para os compostos fenólicos presentes em folhas de OPN, empregando, para isso, metodologia de superfície de resposta, bem como, desenvolver e validar um método cromatográfico, por UPLC, para separação e identificação do perfil de fenólicos presentes em extratos obtidos a partir de folhas de OPN, visando gerar mais informações sobre essa planta, e assim, estimular o seu consumo e emprego em diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B. DA. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.1, p.234–238, 2012.

AYBASTIER, O.; IŞIK, E.; ŞAHİN, S.; DEMİR, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p.558– 565, 2013.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191–203, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças não-convencionais**. Brasília: Mapa/ACS, 2010, 92 p.

CHEN, S.; KORD, A. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 6204–6209, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313–7352, 2010.

EPRILIATI, I.; KERVEN, G.; D'ARCY, B.; GIDLEY, M. J. Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC. **Analytical Methods**, v.2, p.1606-1613, 2010.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; BRANDÃO, G. C.; DAVID, J. M.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta** v.597, p.179–186, 2007.

HAM, S. S.; KIM, S-H.; MOON, S-Y.; CHUNG, M. J.; CUI, C-B.; HAN, E-K.; CHUNG, C-K.; CHOE, M. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inooutus obliquus*) extract. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.672, p.55 – 59, 2000.

HERCENBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ALFAREZ, M. J.; VAZQUEZ, C. The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. **Nutrition**, v.14, n.6, p.499 – 506, 1998.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

KIM, S.; CHO, A. R.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v.29, n.1, p.112-120, 2013.

KOBORI, C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Uncultivated Brazilian Green leaves are richer sources of carotenoids than are commercially produced leafy vegetables. **Food and Nutrition Bulletin**, v.29, n.4, p.320-328, 2008.

LEE, J.; YE, L.; WILLIAM, O.L.; EITENMILLER JR.; RONALDO, R. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.45–57, 2000.

MOLTIVA, M-J.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. **Journal of Chromatography A**, V.1292, p.66–82, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NAGAI T.; REIJI I.; HACHIRO I.; NOBUTAKA S. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p.29–33, 2003.

PARVATHY, K. S.; NEGI, P. S.; SRINIVAS, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curumin- β -diglucoside. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p.265 – 271, 2009.

PEREIRA, P.; BERNARDO-GIL, M. G.; CEBOLA, M. J.; MAURICIO, E.; ROMANO, A. Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. **Journal of Supercritical Fluids** v. 83, p.57-64, 2013.

RADOJKOVIĆ, M.; ZEKOVIĆ, Z.; JOKIĆ, S.; VIDOVIĆ, S.; LEPOJEVIĆ, Z.; MILOŠEVIĆ, S. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. **Food Technology and Biotechnolog**, v.50, n.2, p.167 – 176, 2012.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v.1224, p.1-10, 2012.

ŞAHIN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p. 595–602, 2013.

SANTOS, I. C.; PEDROSA, M. W.; CARVALHO, O. C.; GUIMARÃES, C. D. C.; SILVA, L. S. Ora-pro-nóbis: da cerca à mesa. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG**. Circular Técnica, n.177, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. In: ÖTLES, S. **Methods of analysis of food components and additives**. Boca Raton: CRC Press, 2005, p. 199-260.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga Edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.55, p.381–187, 2007.

SOUZA, M. R. M.; CORREA, E. J. A; GUIMARÃES, G.; PERREIRA, P. R. G. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.3550–3554, 2009.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.200–208, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, n.18, p.3268–3295, 2007.

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M. P., COLLARES-QUEIROZ, F. P., PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60(S1), p.148 – 160, 2009.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 71–93, 2002.

VIEIRA, D. A.; SANTOS, P. S.; HAMINIUK, C. W. I; PLATA-OVIEDO, M. S. V. Avaliação da atividade antioxidante das folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.1, n.2, p.129-134, 2010.

WANG, C.; SHI, L.; FAN, L.; DING, Y.; ZHAO, S.; LIU, Y.; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.587– 594, 2013.

WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p.667-680, 2010.

WILDMAN, R. E. C.; KELLEY, M. In: WILDMAN, R. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 1-21.

ZHANG, S.; BI, H.; LIU, C. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. **Separation and Purification Technology**, v.57, n.2, p. 277–282, 2007.

ZHOU, J.; ZHENG,X.; YANG, Q.; LIANG, Z.; LI, D.; YANG, X.; XU, J. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and radical-scavenging capacity of phenols and flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves. **Plos one**, v.8, n.7, p. 1–8, 2013.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ORA-PRO-NÓBIS E COMPOSTOS FENÓLICOS: DEFINIÇÃO, PROPRIEDADES E MÉTODOS DE ANÁLISE.

Thaís Cristina Lima de Souza¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ORA-PRO-NÓBIS

1.1.1 Aspectos gerais

O ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) é uma trepadeira arbustiva, pertencente à família Cactaceae, originária das Américas, onde se relata sua presença desde a Califórnia, nos Estados Unidos, até o Rio Grande do Sul, no Brasil. Caracteriza-se como uma planta perene, rústica, resistente à seca, que suporta chuvas contínuas e geadas brandas. Possui folhas verdadeiras (Fig. 1.1A), falsos espinhos no caule (Fig. 1.1B), flores pequenas e brancas (Fig. 1.1C), e frutos amarelados (Fig. 1.1D) (SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010; PEREIRA et al., 2007).

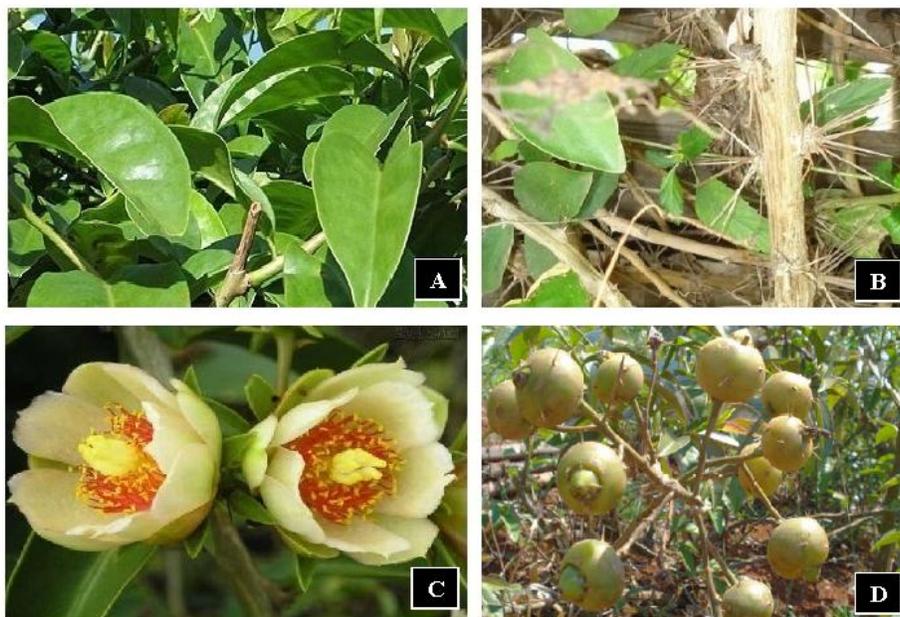


Figura 1.1 Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller): A – Folhas; B – Caule lignificado com espinhos em forma de agulha; C – Flores e D – Frutos imaturos. Fonte: Adaptado de O BOM DAQUI (2014); ORATÓRIO ALIMENTOS (2014); SANTOS et al. (2012).

No Brasil, essa planta encontra-se amplamente distribuída entre os estados da Bahia ao Rio Grande do Sul, mas seu uso é mais difundido no estado de Minas Gerais, onde ocorre anualmente o “Festival do Ora-pro-nóbis”, no município de Sabará (ALMEIDA; CORRÊA, 2012; SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010). Além de ser denominada ora-pro-nóbis, essa planta também é popularmente conhecida como lobrobrô, groselha das Américas, rosa-madeira, jumbeba, guaiapá (nome indígena que significa fruta que tem espinhos) e trepadeira limão. Em outros países recebe os nomes de: *barbados gooseberry* (Estados Unidos), *ramo de novia* (Cuba), *guamacho* (Venezuela), *buganvilla blanca* (Chiapas, México) e *bladappel* (República do Suriname) (SANTOS et al., 2012; MORTON, 1987).

As folhas de OPN são macias, de cor verde-escura, carnosas e suculentas, e constituem a parte da planta mais utilizada para consumo humano, podendo ser consumidas cruas ou cozidas. Suas folhas fazem parte da classificação de hortaliças não-convencionais, isto é, espécies que não recebem devida atenção por parte da comunidade técnico-científica e da sociedade como um todo, o que reflete no seu consumo por apenas parte da população de certas localidades ou regiões do país. As hortaliças não convencionais são culturas que não estão organizadas enquanto cadeia produtiva propriamente dita, mas que possuem importante papel na complementação da alimentação e economia familiar de populações de baixa renda, além de serem importantes para a expressão cultural de determinados locais, estando presentes na culinária típica dos mesmos. Como é o caso do OPN, que compõe pratos típicos da culinária mineira, como o frango caipira com OPN, item obrigatório nos cardápios dos restaurantes de Diamantina, Tiradentes, São João del-Rei e Sabará, cidades históricas do interior do Estado de Minas Gerais (SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010; SOUZA et al., 2009).

Além da alimentação, o OPN também é utilizado como planta ornamental, devido sua bela floração, que ocorre nos meses de janeiro a abril, ou de dezembro a maio, em regiões mais quentes e úmidas, resultando em pequenas flores brancas com o miolo laranja (Fig. 1.1C), perfumadas, ricas em pólen e néctar. Sendo também cultivadas para fins de produção de mel, devido à atração que exercem sobre muitos insetos, entre eles, as abelhas. Somando à rusticidade, a presença de grande número de espinhos no caule (Fig. 1.1B) e a beleza da floração, o OPN constitui-se também, como uma excelente alternativa para formação de cercas vivas (SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010).

Na medicina popular, as folhas do OPN são ainda, utilizadas como emoliente no tratamento de tumores, no abrandamento de processos inflamatórios e na recuperação da pele em casos de queimadura. Seus frutos são empregados como agentes expectorantes e antissifilíticos (SANTOS et al., 2012).

1.1.2 Composição nutricional

Uma importante característica nutricional das folhas de OPN refere-se ao seu conteúdo proteico, com cerca de 15 a 28 %, que pode ser considerado elevado quando comparado com outros vegetais usualmente consumidos no Brasil, como a couve (1,6%), o alface (1,3%) e o milho (10,0 %) (MERCÊ et al., 2001). Essa composição rica em proteína lhe rendeu a denominação de "carne dos pobres" em muitas comunidades pobres brasileiras, visto que o consumo de suas folhas constitui uma importante fonte de proteínas para essas populações (KINUPP, 2006).

Suas proteínas apresentam ainda, alta digestibilidade (75,9%) e excelente perfil de aminoácidos, dentre eles, aminoácidos essenciais como lisina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina e treonina, em níveis, com exceção da metionina e lisina, superiores a quantidade mínima diária recomendada pela FAO (2002), para um indivíduo adulto (TAKEITI et al., 2009; ALBUQUERQUE, 1991; DAYRELL; VIEIRA, 1977; ALMEIDA FILHO; CAMBRAIA, 1974).

De acordo com Takeiti et al. (2009) as folhas de OPN contêm valores de fibras totais igual a 3,8 g/100g e um alto teor de fibra dietética solúvel (5,2 g/100 g). Sua concentração de lipídeos encontra-se em torno de 6.3 – 6.8% (m/m). Suas folhas frescas possuem β -caroteno, vitamina C e ácido fólico em concentrações de 4,2 mg/100, 185.8 mg/100g e 19,3 mg/g, respectivamente. Possuem ainda, elevados níveis de minerais como, manganês (46,4 mg /100 g), zinco (26,71 mg/100 g), ferro (14,18 mg/100 g) e cálcio (3,420 mg/100 g).

Segundo Santos et al. (2012), a concentração de ferro presente nas folhas de OPN contribui de forma significativa para o suprimento das necessidades diárias deste mineral. Por esse motivo, somado ao alto conteúdo de proteínas, as folhas de OPN são utilizadas no preparo de farinhas múltiplas para o combate à fome e à anemia, podendo ainda, sofrer processo de desidratação para preparo de flocos (como de orégano), empregados para elevar o valor

nutricional de pães, bolos, omeletes, bolinho de vegetais, tortas salgadas, sopas e outros alimentos.

Suas folhas destacam-se ainda por possuírem um conteúdo mucilaginoso, devido à presença de arabinogalactana, um polissacarídeo que confere propriedades físicas úteis, como formação de géis e mudanças na viscosidade, destacando assim, uma possível utilização dessa planta em processos industriais, tais como fabricação de papel, tinta, fármacos e produtos alimentícios (BEMILLER; HUBER, 2010; MERCÊ et al., 2001; SIERAKOWSKI et al., 1987).

1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são comumente definidos como metabólitos secundários que apresentam em sua estrutura um anel aromático, possuindo um ou mais grupos hidroxila. Entretanto, essa definição não é totalmente satisfatória, uma vez que, inclui compostos não fenólicos, de variadas origens biossintéticas, tais como a estrona, um hormônio sexual feminino e o gossipol, um terpenóide derivado do algodão (QUINDEAU et al., 2001; RYAN et al., 1999). Por este motivo, Quideau et al. (2001) propôs uma definição mais abrangente para os compostos fenólicos, como sendo metabólitos secundários derivados exclusivamente dos fenilpropanóides e policetídeos originados a partir da via do ácido chiquímico.

Os fenólicos constituem um grupo com estruturas amplamente diversificadas, com mais de 8000 moléculas correntemente conhecidas, que podem variar desde moléculas fenólicas simples, como ácido gálico (Fig. 1.2A) e ácido caféico (Fig. 1.2B), até compostos altamente polimerizados, como as procianidinas (Fig. 1.2C) (CHEYNIER, 2012; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Os compostos fenólicos são ubíquos em todos os órgãos vegetais, podendo ser classificados como simples fenóis, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, ligninas e lignanas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Esses compostos são sintetizados durante o desenvolvimento e reprodução das plantas, e desempenham importantes funções para as mesmas, tais como: defesa contra patógenos, parasitas e predadores; proteção contra radiação ultravioleta (UV); atração de polinizadores; ação antioxidante, além de contribuir para características sensoriais das frutas e vegetais, como adstringência, amargura,

sabor, cor, aroma e estabilidade contra oxidação (CHEYNIER, 2012; IGNAT et al., 2011; WILDMAN; KELLEY, 2007; SHAHIDI; NACZK, 2004). Sua ocorrência em tecidos animais, geralmente, é devido à ingestão de alimentos de origem vegetal ou devido o consumo de alimentos, aos quais fenólicos sintéticos foram incorporados à formulação (SHAHIDI; NACZK, 2004).

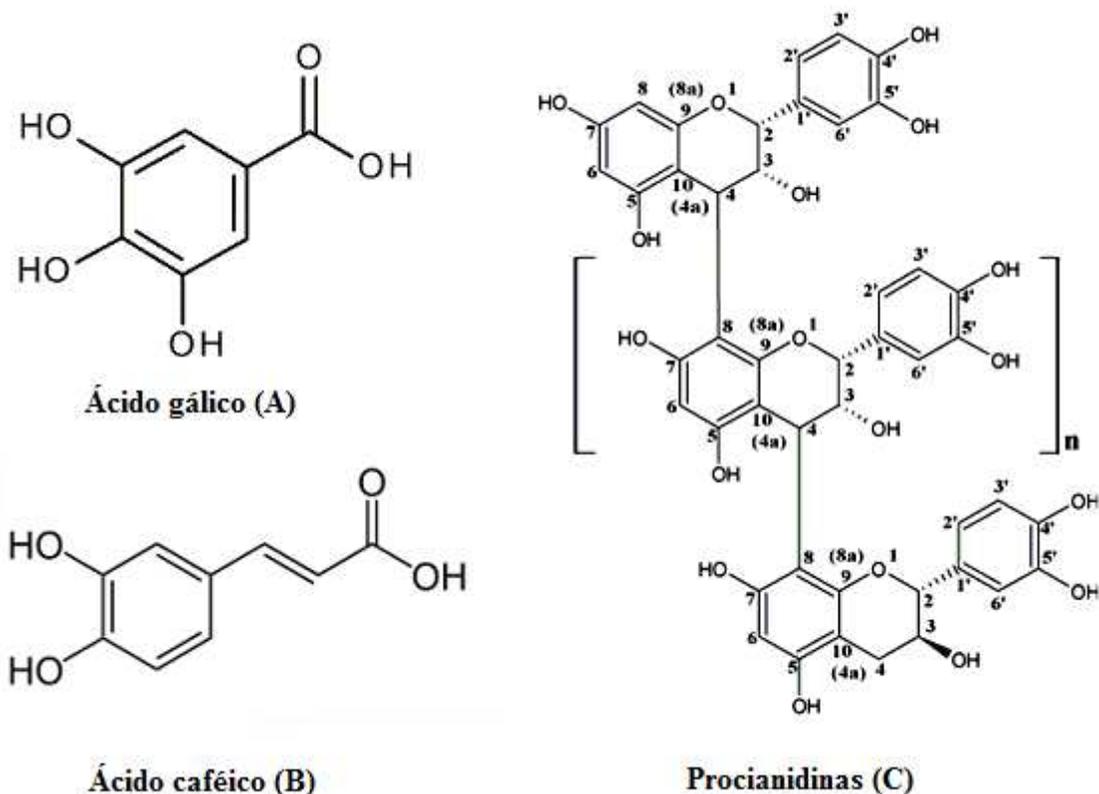


Figura 1.2. Fórmulas estruturais dos compostos fenólicos: A – Ácido gálico; B – Ácido caféico; e C – Procianidinas. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA; BASTOS, 2011; BATTESTIN et al., 2004; QUEIROZ et al., 2002.

Os fenólicos têm recebido atenção considerável, devido, principalmente, suas funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimutagênica e antitumoral. Estudos comprovam seu potencial no combate aos radicais livres, que causam estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos a tecidos e biomoléculas do organismo humano. Os fenólicos desempenham um

importante papel na prevenção de distúrbios patológicos, tais como a aterosclerose, disfunção cerebral e câncer. Além disso, os compostos fenólicos possuem grande aplicação industrial, sendo utilizados como corantes naturais e conservantes de alimentos, ou na produção de tintas, papel e cosméticos (IGNAT et al., 2011; WILDMAN; KELLEY, 2007; SHAHIDI; NACZK, 2005; NAGAI et al., 2003).

Devido aos efeitos benéficos atribuídos ao consumo dos compostos fenólicos, grande esforço tem sido realizado para caracterizar suas estruturas presentes nos tecidos de diferentes plantas (MAKRIS; ROSSITER, 2001). Dessa forma, a caracterização e quantificação dos compostos fenólicos de vegetais subutilizados, tais como o OPN, sobre o qual não foram encontrados dados na literatura referentes à composição fenólica, podem gerar importantes informações para ampliação da ingestão dessa planta, como fonte alternativa desses compostos potencialmente benéficos, especialmente, pela população de baixa renda, bem como, para a aplicação desses compostos extraídos da mesma em diversos setores industriais.

A extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais ou alimentícias é, geralmente, um pré-requisito para qualquer análise química, no que se refere ao estudo da concentração e composição dos mesmos (TURA; ROBARDS, 2002). A obtenção de um extrato que seja representativo da amostra, isto é, que contenha todos os componentes fenólicos de interesse e livre de substâncias interferentes é influenciada, grandemente, pelas condições aplicadas durante o processo de extração (STALIKAS, 2007). Portanto, a extração representa uma importante etapa de manipulação da amostra, na qual o método e os parâmetros para a realização da mesma devem ser escolhidos de forma adequada, tendo em vista as diferenças químicas e a distribuição irregular dos fenólicos nas matrizes vegetais.

1.2.1 Extração dos compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos desempenha um papel importante para a quantificação e caracterização destes a partir de uma matriz vegetal, constituindo, geralmente, o primeiro e o mais importante processo, podendo interferir na exatidão e precisão das análises posteriores. A extração é influenciada por vários parâmetros, como a natureza química dos fenólicos, o método de extração utilizado, o tamanho de partícula da amostra, bem como, pela

presença de substâncias interferentes (HAMINIUK et al., 2012; ZHAO et al., 2011; STALIKAS, 2007).

Diversos solventes são utilizados para alcançar uma extração adequada, a escolha do solvente mais apropriado depende da sua seletividade, miscibilidade, densidade, recuperação, pressão de vapor, viscosidade, preço e estabilidades química e térmica (HAMINIUK et al., 2012). Os solventes mais comumente empregados nos processos de extração são: metanol, etanol, acetona, éter etílico, acetato de etila, propanol, dimetil formaldeído e combinações entre eles (HAMINIUK et al., 2012; NACZK; SHAHIDI, 2006). Alguns compostos fenólicos com alta polaridade, como alguns ácidos fenólicos (ácido cinâmico, benzoico e clorogênico), podem não ser adequadamente extraídos com solventes orgânicos puros, sendo assim, as soluções extratoras consistem, normalmente, nos solventes citados acima contendo diferentes frações aquosas (SULTANA et al., 2009; STALIKAS, 2007; NACZK; SHAHIDI, 2006).

Além da solubilidade, outro parâmetro de grande relevância para obtenção dos extratos fenólicos consiste no tempo de extração, podendo variar de 1 minuto até 72 horas (PALACIOS et al., 2011; NACZK et al., 1992; PRICE; BUTLER, 1977). Contudo, de acordo com Naczk e Shahidi (2006), tempos de extração superiores à 24h aumentam as chances de ocorrer oxidação dos fenólicos, e por esse motivo, devem ser evitados. Além disso, segundo Silva et al. (2007), um excessivo tempo de extração não aumenta a quantidade de fenólicos extraídos, visto que, com um certo tempo, alcança-se um equilíbrio entre a concentração de solutos presente na matriz sólida e na solução extratora, promovendo reduzido aumento no rendimento de fenólicos totais.

A extração dos compostos fenólicos também pode ser influenciada pela razão solvente:amostra empregado no sistema (NACZK; SHAHIDI, 2006). De acordo com alguns autores, Wong et al. (2013), Zhang et al. (2007) e Pinelo et al. (2005), quanto maior a proporção solvente:amostra utilizada, maior a quantidade de fenólicos totais obtida. Isso porque, quando a quantidade de solvente aumenta, aumenta-se a chance de componentes bioativos entrarem em contato com o solvente de extração, resultando em maiores rendimentos de fenólicos, até que se alcance um equilíbrio no gradiente de concentração entre o sólido (amostra) e o solvente extrator.

O tamanho de partícula do material vegetal também é um parâmetro que exerce grande influência sobre a extração. Com menores tamanhos de partícula, aumenta-se a extração de compostos fenólicos, haja visto que ocorre um aumentando na área da superfície da amostra bem

como um processo de ruptura da parede da celular da planta (KIM; LEE, 2001). A temperatura é outra variável que deve ser controlada durante os processos de extração, uma vez que o aumento desta promove um acréscimo na taxa de extração, em decorrência do aumento da solubilidade do analito e maior taxa de transferência de massa, bem como, da diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente extrator, facilitando sua penetração na matriz em análise. No entanto, deve-se ter em mente que muitos dos compostos fenólicos são facilmente oxidados, dessa forma, tempos longo de extração sob alta temperatura podem levar a degradação dos mesmos (DAI; MUMPER, 2010; SILVA et al., 2007).

As matrizes alimentícias são sistemas muito complexos, possuindo variada concentração e perfil de fenólicos. Esses compostos fenólicos por sua vez, encontram-se, muitas vezes, na forma de complexos ligados por meio de ligações éster e ligações glicosídicas, a polímeros da parede celular (carboidratos e proteínas) dos vegetais, originando estruturas que podem ser bastante insolúveis, e que dessa forma, necessitam de uma etapa complementar de extração, isto é, um processo de hidrólise (ácido, básico ou enzimático) visando à liberação desses fenólicos complexados (IGNAT et al., 2011; NACZK; SHAHIDI, 2006; MATTILA; KUMPULAINEN, 2002).

1.2.2 Hidrólise

Os compostos fenólicos raramente estão presentes nos vegetais em sua forma livre, mas comumente, apresentam-se em sua forma glicosilada (ANNEGOWDA et al., 2010). Dessa forma, devido à inexistência de padrões comerciais apropriados, e um vasto número de fenólicos glicosilados, o emprego de processos hidrolíticos permite a liberação dos glicosídeos em suas respectivas agliconas, permitindo assim, sua identificação e quantificação, bem como, auxiliam na elucidação estrutural e caracterização de suas correspondentes formas glicosiladas. O processo de hidrólise também auxilia posteriores análises cromatográficas, visto que, minimiza a quantidade de compostos interferentes extraídos (NUUTILA et al., 2002; TURA; ROBARDS, 2002). Numerosos processos hidrolíticos são descritos na literatura, empregando a utilização de ácidos, como ácido clorídrico (HCL), bases, como hidróxido de sódio (NaOH) e enzimas, como β -glucuronidase e β -glucosidase (SAMANIDOU et al., 2012).

O processo de hidrólise ácida envolve o tratamento do extrato ou da matriz vegetal com soluções aquosas ou alcoólicas (nas quais o metanol é comumente empregado) contendo ácido orgânico, como o ácido clorídrico (HCL), submetidas à temperatura de refluxo, ou superior a esta. A faixa de concentração da solução ácida empregada descrita na literatura é muito vasta, variando de 1 a 2 M, na maioria dos processos (KOMES et al., 2011; STALIKAS, 2007; RUSAK et al., 2008; NUUTILA et al., 2002) ou de 1 a 6 M em outros estudos (SAMANIDOU et al., 2012; MATTILA; KUMPULAINEN, 2002). O tempo de reação também varia grandemente, no entanto a faixa mais utilizada vai de 30 minutos à 2 horas (STALIKAS, 2007; NUUTILA et al., 2002).

A hidrólise básica consiste no tratamento da amostra com solução contendo um álcali, normalmente hidróxido de sódio (NaOH), com concentração de 1 a 4 M, em geral, mas podendo alcançar concentrações até 10 M, como aplicado por Mattila e Kumpulainen (2002). Segundo Stalikas (2007), a maioria das reações é realizada a temperatura ambiente, durante 15 minutos até 12 horas (*overnight*).

A hidrólise enzimática é uma técnica alternativa utilizada para a quebra das ligações glicosídicas, no entanto, não muito empregada devido seu custo elevado. As enzimas comumente aplicadas nesse processo de hidrólise são as pectinases, celulasas e amilases (STALIKAS, 2007; ROBBINS, 2003).

Não existe um único método de hidrólise que seja adequado para todos os grupos de fenólicos contidos em diversas matrizes, devido à diferença existente entre suas estruturas químicas e sensibilidade em relação às condições de hidrólise utilizadas. Os parâmetros (composição do solvente, concentração do ácido empregado, tempo e temperatura de extração, entre outros) empregados no processo de hidrólise podem promover degradação parcial de alguns fenólicos ou/e hidrólise incompleta de alguns glicosídeos. Dessa forma, a otimização de um método de extração e de hidrólise é de suma importância para análise das diferentes classes de fenólicos. Essa otimização pode ser obtida a partir do emprego de técnicas multivariadas, que permitem o estudo de diferentes fatores sobre a resposta para o processo, bem como as interações entre eles, empregando o mínimo de experimentos possíveis (MICHIELS et al., 2012; HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; BARROS NETO et al., 2007; NUUTILA et al., 2002; TURA; ROBARDS, 2002).

1.2.3 Separação e quantificação dos compostos fenólicos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas para separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Contudo, o tempo de análise e a resolução obtidos a partir de métodos que empregam a HPLC são limitados pelo tamanho de partícula das colunas e pela instrumentação dessa técnica cromatográfica (CHEN; KORD, 2009). Por esse motivo, nos últimos anos, progressos referentes ao desenvolvimento de novas fases estacionárias com tamanho de partícula menores têm sido realizados, com o objetivo de desenvolver colunas mais eficientes. Nesse contexto, se encontra inserida a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), a qual emprega colunas com diâmetro interno menor, fases estacionárias com tamanho de partícula abaixo de 2,0 μm , e sistemas que operam a altas pressões (até 1300 bar ou 15.000 psi) (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012; EPRILIATI, et al., 2010; WELCH et al., 2010; CHEN; KORD, 2009).

As principais vantagens da UPLC sobre as técnicas de HPLC são melhor resolução, maior eficiência na separação, menor tempo de análise e menor consumo de solvente, o que resulta em menor custo com a aquisição de solventes e tratamento dos resíduos. Além disso, como consequência da maior eficiência de separação, os picos obtidos são mais estreitos e simétricos, levando a limites de detecção mais baixos, demonstrando uma maior sensibilidade por parte da técnica de UPLC em comparação com a técnica de HPLC (MOLTIVA et al., 2013; CHEN; KORD, 2009).

A maioria dos métodos descritos na literatura para análise de fenólicos por UPLC emprega, quase que exclusivamente, colunas de fase reversa, na qual a fase estacionária é menos polar que a fase móvel. Para essas colunas analíticas, a eluição dos compostos fenólicos baseia-se na polaridade dos mesmos, sendo assim, compostos de menor polaridade, como miricertina, quercetina e kaempferol, possuem tempo de retenção maior que os compostos de maior polaridade, como o ácido gálico, ácido protocatecuico e epigalocatequina (HAMINIUK et al., 2012; CHEN; KORD, 2009). A C18 é a coluna de fase reversa mais comumente empregada para análise de fenólicos (MOLTIVA et al., 2013; HAMINIUK et al., 2012; CHEN; KORD, 2009).

Para a separação de compostos fenólicos por UPLC, sistemas de eluição por gradiente são mais frequentemente empregados do que os sistemas isocráticos. Dentre esses sistemas por

gradiente, a eluição por gradiente linear é majoritariamente utilizada, envolvendo, normalmente, como fase móvel um sistema binário, constituído por uma solução aquosa acidificada, com ácido fórmico, fosfórico ou acético; juntamente com acetonitrila ou metanol, como o solvente orgânico (HAMINIUK et al., 2012; DAI; MUMPER, 2010; ROBBINS, 2003). A adição de pequena quantidade de ácido se faz necessário para suprimir a ionização dos grupos fenólicos e carboxílicos melhorando assim, certos parâmetros analíticos, tais como o tempo de retenção e a resolução (HÄKKINEN, 2000). De acordo com Roggero et al. (1990), a manutenção da temperatura constante durante a análise é um importante fator para a reprodutibilidade do método. As temperaturas empregadas nos métodos descritos na literatura variam entre 20 a 45 °C (HAMINIUK et al., 2012).

Dada à existência de ligações duplas conjugadas e anéis aromáticos nas estruturas moleculares dos compostos fenólicos, estes possuem capacidade de absorver na região do ultravioleta (UV), podendo chegar à região do visível (VIS) e alguns poucos, possuem até fluorescência. Deste modo, os detectores mais utilizados para a análise de fenólicos são: UV/VIS, arranjo de diodos (DAD), fluorescência e espectrômetro de massas. Embora os detectores eletroquímicos, por índice de refração, e por espalhamento de luz também sejam utilizados para detecção de fenólicos que possuam ou não grupo cromóforo (HAMINIUK et al., 2012; DAI; MUMPER, 2010).

Os detectores de massas (MS) têm sido largamente utilizados para a identificação de compostos fenólicos provenientes de matrizes alimentícias, uma vez que esses detectores fornecem abundantes informações para a elucidação estrutural desses compostos químicos e a identificação precisa dos mesmos, especialmente quando um padrão puro não se encontra disponível comercialmente (MOLTIVA; MACIÀ, 2013; GUILLARME et al., 2010; YE et al., 2007). No entanto, os detectores de MS apresentam um elevado valor de mercado, o que geralmente limita o acesso a esse tipo de equipamento pela maioria dos pesquisadores. Neste contexto, os detectores por arranjo de diodos (DAD) são mais amplamente empregados para a identificação de compostos fenólicos, devido seu baixo custo e boa sensibilidade, além de permitir a varredura da faixa do UV/VIS de todos os solutos que passam pelo detector, gerando mais informações para misturas complexas, como extratos vegetais brutos, possibilitando a

determinação do comprimento de onda máximo dos fenólicos em apenas uma única corrida (HAMINIUK et al., 2012; DAI; MUMPER, 2010).

1.3 EMPREGO DE TÉCNICAS MULTIVARIADAS PARA OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Considerando a diversidade de compostos fenólicos presentes nas diferentes fontes naturais, bem como suas estruturas e propriedades físico-químicas, não existe um protocolo universal adequado ou completamente satisfatório para a extração de todos os fenólicos ou uma classe específica desses compostos presentes em diferentes matrizes. Como consequência, processos de extração específicos devem ser idealizados e otimizados para cada fonte de fenólicos estudada (SILVA et al., 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004)

Para qualquer estudo de otimização, um projeto experimental apropriado é necessário, e os dois modelos mais comumente utilizados para tal são, experimentos univariados e metodologia de superfície de resposta (MSR) (ZHOU et al., 2013). Nos experimentos univariados, cada parâmetro em estudo (temperatura, tempo, solvente, etc) é modificado individualmente, enquanto as demais variáveis são mantidas fixas (BEZERRA et al., 2008). De acordo com Şahin e Şamli (2013) e Leardi (2009), estudos univariados somente são válidos se as variáveis a serem otimizadas forem totalmente independentes uma das outras, caso contrário, um ponto ótimo pode não ser atingido, levando a conclusões enganosas sobre os parâmetros de otimização. Além disso, metodologias que empregam otimização univariada são demoradas e caras, devido ao maior número de experimentos e consumo de reagentes e materiais (BEZERRA et al., 2008).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que são baseadas no ajuste de modelos empíricos para os dados experimentais obtidos a partir do planejamento fatorial desenhado. Funções matemáticas lineares, quadráticas ou cúbicas são empregadas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, para explorar (modelagem e deslocamento) as condições experimentais até sua otimização (BEZERRA et al., 2008; BARROS NETO et al, 2007). A MSR tem sido amplamente utilizada para analisar ou otimizar os fatores que influenciam o rendimento de extração ou os perfis de

extratos de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais (WANG et al., 2013). Isso porque, permite avaliar vários parâmetros e suas interações, com reduzidos números de ensaios experimentais, sendo assim, uma metodologia menos trabalhosa e onerosa do que a abordagem univariada (FERREIRA et al, 2007; LEE et al., 2000).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. G. P. T.; SABAA SRUR, A. U. O.; FREIMAN, L. O. Composição centesimal e escore de amino-ácidos em três espécies de Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill. *P. bleu* de Candolle e *P. pereskia* (L) Karsten). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.7-12, 1991.

ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do “Ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Mill.). **Revista Ceres**, v.21, p.105-111, 1974.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.751-756, 2012.

ANDERSEN, O.; MARKHAM, K. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

ANNEGOWDA, H. V.; NEE, C. W.; MORDI, M. M.; RAMANATHAN, S.; MANSOR, S. M. Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extracts of *Terminalia catappa* L. leaf. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.8 p. 479–485, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 3ª edição, 2007.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanase em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.63–72, 2004.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. In.: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p.75-130.

BEZERRA, M. A. SANTELLI, R. E.; ELIANE PADUA OLIVEIRA, E. P.; LEONARDO SILVEIRA VILLAR, L. S.; LUCIANE AMÉLIA ESCALEIRA, L. A. Response surface

methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, n.5, p. 965–977, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças não-convencionais**. Brasília: Mapa/ACS, 2010, 92 p.

CHEN, S.; KORD, A. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 6204–6209, 2009.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v.11, n.2-3, p.153–177, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313–7352, 2010.

DAYRELL, M. S.; VIEIRA, E. C. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia Aculeata* Mill. I. Extraction and composition. **Nutrition Reports International**, v.1977, p.529-537, 1977.

EPRILIATI, I.; KERVEN, G.; D'ARCY, B.; GIDLEY, M. J. Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC. **Analytical Methods**, v.2, p.1606-1613, 2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2002.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; BRANDÃO, G. C.; DAVID, J. M.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta** v.597, p.179–186, 2007.

GUILLARME, D.; SCHAPPLER, J.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J-L, Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p15–27, 2010.

HÄKKINEN, S. **Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products**. Kuopio: Department of Bioanalytics, University of Kuopio, p. 90, 2000.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; M. S. V. PLATA-OVIEDO; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.2023–2044, 2012.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v.31, n.6, p. 1378–1384, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

KIM, D.O.; LEE, C.Y. Extraction and isolation of polyphenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2001.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p.846-857, 2008.

KOMES, D.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D.; RUSAK, G.; LIKIĆB, S.; BERENDIKA, M. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. **Phytochemical Analysis**, v.22, p. 172–180, 2011.

LEARDI, R. Experimental desing in chemistry: A tutorial. **Analytical Chimica Acta**, v.652, p.161–172, 2009.

LEE, J.; YE, L.; WILLIAM, O.L.; EITENMILLER JR.; RONALDO, R. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.45–57, 2000.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p. 3216-3222, 2001.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3660–3667, 2002.

MERCÊ, A. L. R.; LANDALUZE, J. S.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} **Bioresource Techonology**, v.76, n.1, p.29-37, 2001.

MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v.130, p.986–993, 2012.

MORTON, J. Barbados Gooseberry. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource Systems, p. 349–351, 1987.

MOTILVA, M-J; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. **Journal of Chromatography A**, v.1292, n.31, p.66–82, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523–1542, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; SULLIVAN, A. Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. **Food Chemistry**, v.45, p.51–54, 1992.

NAGAI T.; REIJI I.; HACHIRO I.; NOBUTAKA S. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p.29–33, 2003.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, v.76, p.519–525, 2002.

O BOM DAQUI. **Flor do ora-pro-nóbis**. Disponível em: http://www.obomdaqui.com/?attachment_id=1194. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Phenolic acids bioavailability. **Química Nova** v.34, n.6, p.1051–1056, 2011.

ORATÓRIO ALIMETOS. **Ora-pro-nobis: uma santa erva**. Disponível em: <http://www.oratorioalimentos.com.br/orapronobis.asp>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.

PALACIOS, I.; LOZANO, M.; MORO, C.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v.128, p. 674–678, 2011.

PEREIRA, O. L.; BARRETO, R.W.; CAVALLAZZI, J. R. P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity** v. 25, p. 127-140, 2007.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JORGE SINEIRO. M. J.; NÚÑEZ, M. J. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity

of Extracts from Different Components of Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p. 2111–2117, 2005.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.25, p.1268–1273.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4, p.493–497, 2002.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, p. 586–621, 2011.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v.1224, p.1-10, 2012.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2866–2887, 2003.

ROGGERO, J.-P.; COEN, S.; ARCHIER, P. Wine phenolics: Optimization of HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2593–2603, 1990.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIĆ, S.; HORŽIĆ, D.; KOVAČ, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v.110, p. 852–858, 2008.

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n.5, p. 362–372, 1999.

ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p. 595–602, 2013.

SAMANIDOU, V.; TSAGIANNIDIS, A.; SARAKATSIANOS, I. Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Separation Science**, v.35, p.608–615, 2012.

SANTOS, I. C.; PEDROSA, M. W.; CARVALHO, O. C.; GUIMARÃES, C. D. C.; SILVA, L. S. Ora-pro-nóbis: da cerca à mesa. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG**. Circular Técnica, n.177, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Biosynthesis, Classification, and Nomenclature of Phenolics in Food and Nutraceuticals. In: **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. CRC Press: Boca Raton, 2004. 1ª Edição. p. 1–18.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. In: ÖTLES, S. **Methods of analysis of food components and additives**. Boca Raton: CRC Press, 2005, p. 199-260.

SIERAKOWSKI, M-R.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeate*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6. p. 1709-1713, 1987.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga Edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.55, p.381–187, 2007.

SOUZA, M. R. M.; CORREA, E. J. A; GUIMARÃES, G.; PERREIRA, P. R. G. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.3550–3554, 2009.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, n.18, p.3268–3295, 2007.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**, v.14, p.2167– 2180, 2009.

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M. P., COLLARES-QUEIROZ, F. P., PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60(S1), p.148 – 160, 2009.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 71–93, 2002.

WANG, C.; SHI, L.; FAN, L.; DING, Y.; ZHAO, S.; LIU, Y.; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, v.42, p.587– 594, 2013.

WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p.667-680, 2010.

WILDMAN, R. E. C.; KELLEY, M. In: WILDMAN, R. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 1-21.

WONG, B.Y.; TAN, C.P.; HO, C.W. Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “*Dukung Anak*” (*Phyllanthus niruri*). **International Food Research Journal**, v.20, n.1, p. 25–330, 2013.

YE, M.; HAN, J.; CHEN, H.; ZHENG, J.; GUO, D. Analysis of Phenolic Compounds in Rhubarbs Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 1, p. 82–91, 2007.

ZHANG, S.; BI, H.; LIU, C. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. **Separation and Purification Technology**, v.57, n.2, p. 277–282, 2007.

ZHAO, J.; LV, G; CHEN, Y.; LI, S. Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.42, p.7453–7475, 2011.

ZHOU, J.; ZHENG,X.; YANG, Q.; LIANG, Z.; LI, D.; YANG, X.; XU, J. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and radical-scavenging capacity of phenols and flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves. **Plos one**, v.8, n.7, p. 1–8, 2013.

CAPÍTULO II

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS: OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA*

Thaís Cristina Lima de Souza¹, Tayse Ferreira Ferreira da Silveira¹, Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

***Artigo em preparação para ser submetido ao periódico Food Chemistry**

RESUMO

Nos últimos anos, ampla atenção tem sido dada aos compostos fenólicos, em consequência da sua capacidade de promover benefícios à saúde humana. Por essa razão, existe um grande interesse na busca por fontes naturais ricas nesses compostos. Nesse contexto, se insere o ora-pro-nóbis (OPN), uma planta sobre a qual a composição de fenólicos não se encontra descrita na literatura. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método de cromatografia líquida de ultra eficiência e otimizar um processo de extração e hidrólise simultâneo para a análise de compostos fenólicos presentes nas folhas de OPN. Para a otimização da extração e hidrólise, um planejamento multivariado foi empregado, variando as concentrações de metanol e ácido clorídrico, bem como o tempo e temperatura da extração. Os modelos ajustados aos resultados obtidos gerados pelo planejamento apresentaram falta de ajuste significativa, para um intervalo de confiança de 95%. Por esse motivo, as respostas experimentais obtidas foram analisadas uma a uma, e as condições de extração escolhida foram: água como solução extratora, com 1 mol.L⁻¹ de HCl, temperatura igual a 80 °C e tempo de 90 minutos. O método cromatográfico desenvolvido possibilitou a separação de 18 compostos fenólicos, e apresentou valores de repetibilidade e precisão intermediária satisfatórios, além de baixo limite de detecção de quantificação, indicando sua adequação para a separação e quantificação dos fenólicos extraídos das folhas de OPN.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata* Miller; otimização multivariada; desenvolvimento de método; UPLC

ABSTRACT

In last decades large attention has been given to the phenolic compounds, due their ability to promote human health benefits. For this reason, there is great interest in the search field for natural sources which are rich in these compounds. In this context, the plant of ora-pro-nóbis (OPN) has vast potential, since its composition of phenolic compounds has not been described in the literature yet. Therefore, the aim of this study was to develop a method of ultra performance liquid chromatography for the separation and quantification of phenolic compounds from leaves of OPN and optimize a process for the extraction and hydrolysis simultaneous of these phenolics. A multivariate experimental design was employed, in which the parameters referring of the concentrations of methanol and hydrochloric acid, as well as the time and temperature of extraction were studied. The models fitted to the results provided significant lack of fit, in a 95% confidence interval. For this reason, the experimental responses were analyzed one by one and the extraction conditions were chosen as: water as the extraction solution with 1 mol.L⁻¹ of HCl, temperature of 80 °C and time equal to 90 minutes. The chromatographic method developed enabled the separation of 18 phenolic compounds, and values presented satisfactory repeatability and intermediate precision, and also low detection limit of quantification, indicating its suitability for the separation and quantification of phenolics extracted from the leaves of OPN.

Keywords: *Pereskia aculeata* Miller, multivariate optimization, method development; UPLC.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são um grupo de componentes orgânicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxila. Encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem uma parte essencial da dieta humana. Os fenólicos são os metabolitos secundários mais abundantes das plantas, com mais de 8000 estruturas correntemente conhecidas, que podem variar desde moléculas fenólicas simples, até compostos altamente polimerizados (DAI; MUMPER, 2010; BALASUNDRAM et al., 2006; SHAHIDI; NACZK, 2005).

Os compostos fenólicos têm recebido uma atenção considerável nas últimas décadas, devido aos seus efeitos benéficos a saúde humana, atribuídos ao seu consumo, e que estão relacionados, principalmente, com suas atividades biológicas, tais como capacidade antioxidante, antimutagênica e antitumoral (HAM et al., 2009; PARVATHY et al, 2009; WILDAMAN; KELLY, 2007; HERCBERG et al., 1998). Por essa razão, grande esforço tem sido realizado para isolar, identificar, caracterizar e purificar os fenólicos presentes nos tecidos de diferentes plantas, especialmente daquelas que ainda não foram adequadamente estudadas (KHANAM et al., 2012; ROBBINS, 2003; MAKRIS; ROSSITER, 2001), como é caso do ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller), muito utilizada na culinária mineira, mas que tem perdido espaço no consumo e no mercado para as hortaliças convencionais. Não foram encontrados, até onde se sabe, dados referentes à composição dos compostos fenólicos presentes nas folhas dessa planta. O conhecimento referente a esses compostos podem gerar importantes informações para ampliar a ingestão e utilização dessa planta em diversos setores industriais.

Considerando a diversidade na composição das fontes de fenólicos, bem como em suas estruturas e propriedades físico-químicas, um protocolo universal de extração não é concebível, e processos de extração específicos devem ser idealizados para cada matriz em estudo (SILVA et al., 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004). Técnicas de extração convencionais sólido-líquido ou líquido-líquido, que utilizam como solução extratora solventes orgânicos e/ou ácidos, são comumente empregadas para isolar compostos fenólicos (ZHANG et al. 2007). No entanto, muitos fatores, tais como a concentração do solvente, o tempo de extração, a temperatura, o pH, a

relação sólido/líquido e o tamanho de partícula, podem influenciar de forma significativa nos resultados dessas extrações (RADOJKOVIĆ et al., 2012; SPIGNO et al., 2007).

Diante do exposto, a metodologia de superfície de resposta (MSR) tem sido amplamente empregada para otimização da extração de compostos fenólicos em folhas (AYBASTIER et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; ŞAHIN; ŞAMLI, 2013; ZHOU et al., 2013; WANG et al., 2013; RADOJKOVIĆ et al., 2012; SILVA et al., 2007), uma vez que permite avaliar vários parâmetros e as interações entre estes com reduzido número de ensaios experimentais, consistindo em uma metodologia menos trabalhosa e onerosa quando comparado com abordagens univariadas (FERREIRA et al, 2007; LEE et al., 2000).

Os extratos fenólicos obtidos de diversas matrizes alimentícias são, em sua maioria, analisados qualitativamente e quantitativamente por HPLC (cromatografia de alta eficiência). Entretanto, análises de amostras complexas, tais como extratos vegetais, exigem longo tempo de análise, o que pode ser um fator limitante para a utilização dessa técnica quando se tem um grande número de amostras (MOLTIVA et al., 2013). O desenvolvimento da técnica de cromatografia de ultra eficiência (UPLC) possibilitou um melhoramento nos métodos analíticos para matrizes de amostras complexas, tais como matrizes alimentícias e biológicas, a qual emprega colunas com diâmetro interno menor, fases estacionárias com tamanho de partícula abaixo de 2,0 µm, e sistemas operando em altas pressões (até 1300 bar ou 15.000 psi) (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012; EPRILIATI, et al., 2010; WELCH et al., 2010; CHEN; KORD, 2009). Resultando em análises com melhor resolução, separações mais rápidas, menor consumo de fase móvel, menor quantidade de resíduos gerados e menor custo com solventes (MOLTIVA et al., 2013; CHEN; KORD, 2009).

Diversos métodos para separação de fenólicos por UPLC são descritos na literatura (KOOLEN et al., 2013; ORHAN et al., 2013; CHANDEL et al., 2012; FARAG et al., 2012; CHUA, et al., 2011; DARTORA et al., 2011; LOU et al., 2010), os quais empregam, basicamente, coluna reversa C₁₈ e fase móvel com um sistema binário, constituído por uma solução aquosa (solvente A) e um solvente orgânico (solvente B), normalmente acetonitrila ou metanol. Alguns métodos utilizam ainda, fase móvel acidificada, fazendo uso de ácido fórmico, fosfórico ou acético.

Com base nos princípios expostos acima, o presente trabalho teve como objetivo otimizar um método de extração para os compostos fenólicos presentes em folhas de OPN, empregando, para isso, um planejamento multivariado. Bem como, desenvolver e validar um método cromatográfico, por cromatografia de ultra eficiência (UPLC), para a separação e quantificação de quatro compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos das folhas de OPN.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

As folhas de OPN utilizadas para otimização da extração e hidrólise dos fenólicos foram adquiridas nas Campinas – SP (colhidas em outubro/2012), Mairiporã – SP (colhidas em março/2013), Ubá – MG (colhidas em abril/2013) e Guiricema – MG (abril/2013). As folhas foram, inicialmente, lavadas em água corrente, em seguida foram congeladas (-18 °C) e liofilizadas. Posteriormente ao processo de liofilização, as folhas foram moídas, em moinho analítico (IKA[®], modelo A-11), embaladas a vácuo e congeladas (-18 °C). Para a realização dos ensaios do planejamento experimental, as amostras provenientes das diferentes localidades foram misturas, em igual parte (1:1:1:1, m/m).

2.2 REAGENTES

Os padrões de ácido caféico, *p*-coumárico, ferúlico e kaempferol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão do ácido clorogênico foi adquirido da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). Os reagentes empregados no trabalho foram metanol PA (Synth, Brasil), ácido clorídrico PA (Chemco, Brasil), ácido fórmico PA (Ecibra, Brasil), metanol grau cromatográfico (Merck, Alemanha) e acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, USA). A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Direct Q3 UV[®] (Millipore Corporation, France). Para a análise cromatográfica, todas as soluções foram filtradas em

membrana de 0,22 μm (Millipore) e degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) previamente à injeção.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol, na concentração de 1000 mg.L^{-1} . Já as soluções de trabalho foram preparadas em metanol:água (30:70 v/v), em concentrações que variavam de 0,05-20 mg.L^{-1} , dependendo do padrão em questão. Ambas as soluções, tanto de estoque quanto de trabalho, foram armazenadas em freezer (-18 °C) protegidas da luz e previamente filtradas (0,22 μm) e degaseificadas antes da injeção.

2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

Para a otimização da extração e hidrólise dos compostos fenólicos presentes nas folhas de OPN, foi aplicada uma otimização multivariada, visando como resposta o maior número de compostos fenólicos, isto é, a obtenção de um ponto que descrevesse qualitativamente o perfil de fenólicos das folhas, mesmo que este não apresentasse maior concentração de fenólicos. Para isso, um planejamento fatorial 2^4 com composto central rotacional (CCR), com 25 níveis foi empregado, no qual foram realizados ensaios em duplicatas em todas as combinações de níveis, com exceção do ponto central, que foi obtido em triplicata, totalizando assim, 51 experimentos, conduzidos em ordem aleatória.

As variáveis estudadas foram concentração de metanol (%), concentração de ácido clorídrico (mol.L^{-1}), tempo de extração (minutos), e temperatura (°C). Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Variáveis e níveis experimentais para o planejamento composto central rotacional 2^4 .

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	+2
Metanol (%)	0	25	50	75	100
HCL (mol.L^{-1})	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Tempo (m.)	30	60	90	120	150
Temperatura (°C)	70	75	80	85	90

m. = minutos.

Para a realização dos experimentos de extração, um sistema de refluxo, composto de um banho de aquecimento com condensadores de bolas, foi utilizado. Em um balão de fundo redondo, foram pesados 0,250 g de amostra e posteriormente, 5 mL da solução extratora foi adicionada, mantendo uma proporção sólido:líquido de 1:20 (m/v) de acordo com o recomendado por Silva et al. (2007). A solução extratora continha concentrações de metanol e ácido clorídrico referente ao ensaio do planejamento em questão. Os balões, contendo a amostra e o solvente extrator, foram então acoplados ao sistema de refluxo e mantidos sob temperatura e tempo conforme as condições do ensaio.

Após o processo de extração, os extratos foram filtrados e o volume final ajustado para 25 mL, com metanol e água ultra pura, resultando em um extrato com concentração final de metanol:água igual a 30:70 (v/v). Os extratos obtidos foram, posteriormente, filtrados com Millex (Millipore) 0,22 μm e armazenados sob congelamento (-18 °C), até o momento da análise cromatográfica.

2.3.1 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). Os modelos matemáticos gerados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) para a falta de ajuste e significância da regressão, ao nível de 95% de confiança.

2.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA POR UPLC

Um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi utilizado para análise dos compostos fenólicos. O equipamento utilizado refere-se ao Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M, equipado com um sistema quaternário de bombas, injetor automático e detector de arranjo de diodos.

Para o desenvolvimento de um método de cromatografia líquida de ultra eficiência, foram realizados testes univariados, visando a obtenção de uma corrida que possibilitasse a melhor

separação do *pool* de padrões utilizado, o qual continha dezoito fenólicos, sendo eles os ácidos: gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, clorogênico, vanílico, caféico, siríngico, sinápico, ferúlico, 3,5 e 4,5-dicafeolquínico, *o* e *p*-coumárico, , cinâmico; os flavonoides: epicatequina, quercetina, e kaempferol; e a flavona apigenina. Os fenólicos selecionados para constituição do *pool*, foram àqueles mais comumente encontrados para folhas (FRANCESCATO et al., 2013; KOOLEN et al., 2013; KUKULA-KOCH et al., 2013; LUO et al., 2013; SALDANHA et al., 2013; WONG et al., 2013; XIONG et al., 2013; ZHOU et al., 2013 (b); MEDA et al., 2011). Os parâmetros testados para o desenvolvimento do método cromatográfico foram fluxo da fase móvel e gradiente de eluição. Os valores assumidos para os parâmetros iniciais basearam-se em metodologias descritas na literatura (FARAG et al., 2013; KOOLEN et al., 2013; ORHAN, et al., 2013; CHANDEL et al., 2012; CHUA et al., 2011; DARTORA et al., 2011; LOU et al., 2010).

Para o desenvolvimento do método todas as análises foram realizadas por fase reversa, utilizando-se uma coluna Hypersil Gold C₁₈, com 10 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,9 µm de tamanho de partícula. Com temperatura da coluna mantida a 35 °C. A fase móvel empregada consistia em água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B), ambos acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, cada um. O volume de injeção foi igual a 10 µL. A detecção foi realizada a 280 nm e 325 nm, de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima de cada composto.

2.4.1 Validação do método cromatográfico

O método cromatográfico desenvolvido para análise de fenólicos dos extratos de folhas de OPN por UPLC foi validado de acordo com as recomendações da Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), em relação aos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e precisão intermediária. Os parâmetros de validação foram aplicados aos cinco compostos fenólicos encontrados em amostras testes de folhas de OPN, sendo eles: ácido clorogênico, ácido caféico, *p*-coumárico, ferúlico e kaempferol.

2.4.1.1 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para os ensaios dos limites de detecção e quantificação foram preparadas 10 soluções padrões, replicatas verdadeiras, contendo os cinco fenólicos estudados, as quais foram diluídas sucessivamente até a obtenção de uma concentração cujo sinal analítico fosse de 3 vezes a relação sinal/ruído, estimado como o limite de detecção; e uma concentração com sinal 5 vezes a relação sinal/ruído, foi estimada como o limite de quantificação.

2.4.1.2 Linearidade do sistema

A linearidade do sistema foi verificada para cada um dos compostos através de uma curva de trabalho, construída com soluções padrões, em 7 diferentes pontos, igualmente espaçados entre si, preparados em triplicatas verdadeiras, e injetados em ordem aleatória. Os pontos inferiores das curvas consistiam nos valores referentes aos limites de quantificação relativos a cada um dos fenólicos; os pontos intermediários foram definidos de forma a abranger a maior parte das concentrações esperadas para as amostras, baseadas em amostras teste; e os pontos superiores foram determinados de acordo com as faixas lineares, cujo modelo apresentasse ajuste adequado. Os modelos matemáticos gerados a partir das curvas analíticas foram avaliados quanto à falta de ajuste e significância da regressão por meio da análise de variância (ANOVA), realizada com auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

2.4.3 Repetibilidade e precisão intermediária

Para a avaliação da repetibilidade do método cromatográfico, foram realizadas 10 injeções consecutivas, isto é, em um mesmo dia, as quais incluíam as concentrações referentes ao limite de quantificação, de um ponto intermediário da curva de trabalho e da extremidade superior da curva. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se 5 injeções, nos mesmos níveis de concentração utilizados para a repetibilidade, determinadas em 3 dias diferentes, com intervalo de dois dias entre eles. A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas tanto

para o método cromatográfico (pela utilização de soluções padrões), quanto para o método de extração dos compostos fenólicos, escolhido com base no planejamento experimental.

A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas pelos coeficientes de variação (CV). Foram considerados aceitáveis coeficientes de variação menores ou iguais a 15%, com exceção dos pontos analisados nos limites de quantificação, considerados como aceitáveis valores inferiores ou iguais a 20%, segundo o estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

Os resultados obtidos a partir do planejamento experimental demonstraram a presença de quatro fenólicos, dentre os dezoito estudados, nas folhas de OPN, sendo esses os ácidos clorogênico, caféico, *p*-coumárico, ferúlico e o kaempferol. A Tabela 2.2 apresenta a concentração desses fenólicos para cada nível do planejamento aplicado, os valores representam a média de uma duplicata verdadeira realizada para cada nível, com exceção do ponto central, o qual foi realizado em triplicata.

A aplicação do planejamento experimental teve como objetivo maximizar, simultaneamente, as concentrações dos fenólicos encontrados nas folhas de OPN, isto é, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico e kaempferol, entretanto, os modelos linear e quadrático ajustados aos resultados obtidos apresentaram falta de ajuste significativa, para um intervalo de confiança de 95%, uma vez que os valores de F obtidos para as respostas foram superiores ao valor de $F_{\text{crítico}}$ (2,22), como pode ser observado na Tabela 2.3, que demonstra os resultados da ANOVA para os modelos ajustados às concentrações dos cinco fenólicos estudados. Desse modo, apesar de todos os modelos apresentarem regressão significativa (com valores de MQR / MQ_r superiores ao valor de $F_{\text{crítico}} = 1,978$), os modelos não podem ser utilizados, de forma confiável, para predição das condições ótimas de extração. Bizzotto e colaboradores (2012) também relataram problemas referentes à falta de ajuste

significativa para modelos de regressão ajustados a dados experimentais de hidrólise, para fenólicos extraídos de erva mate.

Com base nisso, as respostas experimentais obtidas foram analisadas uma a uma, objetivando escolher uma condição de extração que resultasse em um extrato com um perfil qualitativo de fenólicos mais rico, isto é, que contemplasse o maior número de compostos fenólicos possível. Analisando a Tabela 2.2, pode-se observar que os ensaios 3, 6, 8, 11, 14, 16, 19 e 21 apresentaram o maior número de fenólicos, tendo como resposta quatro dos cinco fenólicos estudados. Dentro desse critério, as condições do ensaio 19 foram escolhidas para a performance da extração, visto que este ensaio apresentou um conteúdo de fenólicos superior aos outros 7 ensaios referidos acima. Desse modo, a condição de extração escolhida empregou solução aquosa, com 1 mol.L^{-1} de HCl, com temperatura igual a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de 90 minutos.

Tabela 2.2. Variáveis, níveis codificados e respostas obtidas para a otimização multivariada da extração e hidrólise dos compostos fenólicos presentes em folhas de OPN.

Ensaio	Variáveis				Concentração (mg.g ⁻¹)				
	HCl (Mol/L)	Metanol (%)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Ácido Clorogênico	Ácido Caféico	Ácido <i>p</i> - coumárico	Ácido Ferúlico	Kaempferol
1	-1	-1	-1	-1	4,72139	0,18958	0,00002	0,31435	0,00002
2	1	-1	-1	-1	4,47646	0,79453	0,00002	0,57752	0,00002
3	-1	1	-1	-1	2,85780	0,13042	0,00002	0,32572	0,15495
4	1	1	-1	-1	2,51130	0,54805	0,00002	0,38568	0,00002
5	-1	-1	1	-1	2,30226	0,23435	0,00002	0,36126	0,00002
6	1	-1	1	-1	3,12247	1,05212	0,47353	0,64356	0,00002
7	-1	1	1	-1	4,68652	0,36579	0,00002	0,35138	0,00002
8	1	1	1	-1	0,39897	0,00002	0,42804	0,43581	0,00002
9	-1	-1	-1	1	4,88876	0,29755	0,00002	0,29908	0,00002
10	1	-1	-1	1	2,41932	0,00002	0,00002	0,74900	0,00002
11	-1	1	-1	1	2,14303	0,23444	1,86779	0,00002	0,25830
12	1	1	-1	1	0,79496	0,00002	0,00002	0,35210	0,00002
13	-1	-1	1	1	4,03481	0,52552	0,00002	0,34610	0,00002
14	1	-1	1	1	2,90803	1,63876	0,62858	0,73310	0,00002
15	-1	1	1	1	1,46647	0,31105	0,00002	0,31599	0,00002

Os valores de concentração expressam a média de duplicatas verdadeiras, com exceção do ponto referente ao ponto central (ensaio 25), que representa a média de uma triplicata.

Valores iguais a 0,0002 representam o limite de quantificação para os cinco compostos fenólicos estudados.

Tabela 2.2. Variáveis, níveis codificados e respostas obtidas para a otimização multivariada da extração e hidrólise dos compostos fenólicos presentes em folhas de OPN.

Ensaio	Variáveis				Concentração (mg.g ⁻¹)				
	HCl (Mol/L)	Metanol (%)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Ácido Clorogênico	Ácido Caféico	Ácido <i>p</i> - coumárico	Ácido Ferúlico	Kaempferol
16	1	1	1	1	0,68005	0,10296	0,50396	0,44182	0,00002
17	-2	0	0	0	2,41539	0,00002	0,00002	0,00002	0,00002
18	2	0	0	0	2,08037	1,39046	0,00002	0,66357	0,00002
19	0	-2	0	0	6,16512	0,92060	0,39825	0,57243	0,00002
20	0	2	0	0	0,96125	0,39526	0,00002	0,28524	0,00002
21	0	0	-2	0	3,94971	0,44883	0,00002	0,43052	0,07087
22	0	0	2	0	2,46351	0,71363	1,93243	0,00002	0,00002
23	0	0	0	-2	0,00002	0,00002	1,54818	1,30274	0,00002
24	0	0	0	2	2,15883	0,81635	0,00002	0,42645	0,00002
25	0	0	0	0	1,73779	0,62723	0,00002	0,43009	0,00002

Os valores de concentração expressam a média de duplicatas verdadeiras, com exceção do ponto referente ao ponto central (ensaio 25), que representa a média de uma triplicata.

Valores iguais a 0,0002 representam o limite de quantificação para os cinco compostos fenólicos estudados.

Tabela 2.3. Resumo dos resultados obtidos para ANOVA: significância estatística da regressão e ajuste dos modelos quadráticos, tendo as concentrações dos ácidos fenólicos (clorogênico, caféico, *p*-coumárico, ferúlico) e kaempferol como respostas.

Resposta	Regressão		Falta de ajuste	
	MQ_R/MQ_r	$F_{\text{crítico}14, 36 (95\%)}$	$MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$	$F_{\text{Crítico}10, 26 (95\%)}$
Ácido clorogênico	6.59	1,978	32,9150	2,22
Ácido caféico	5.65		114.18	
Ácido <i>p</i> -coumárico	2.48		277.14	
Ácido ferúlico	8.62		63.78	
Kaempferol	6.26		15.75	

MQ_R = Média quadrática da regressão; MQ_r = Média quadrática do resíduo; MQ_{faj} = Média quadrática da falta de ajuste e MQ_{ep} = Média quadrática do erro puro.

A partir da análise dos resultados obtidos no planejamento (Tabela 2.2), pôde-se verificar que, ao diminuir a concentração de metanol para seu nível mais baixo (-2), isto é, utilizando apenas água como solvente extrator, um aumento na concentração de ácido clorogênico foi observado. Esse fato está de acordo com o descrito na literatura que aponta a alta solubilidade desse ácido fenólico em água quente (UPADHYAY et al., 2012; BUDRYN et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Em relação ao ácido clorogênico também foi possível observar que o aumento da concentração de ácido (HCl) na reação afetou negativamente seu rendimento, talvez por condições mais extremas dessa variável proporcionar maior hidrólise do ácido clorogênico, resultando em maior concentração de ácido caféico, fenólico o qual, juntamente com o ácido quínico, dá origem ao ácido clorogênico (GARAMBONE; ROSA, 2007). Os resultados apresentados pelo ensaio 17 reforçam essa ideia, uma vez que nesse nível não foi empregado ácido (nível correspondente a 0 mol.L⁻¹), e observa-se que não foi possível quantificar ácido caféico sob essas condições. Além disso, os resultados contidos na Tabela 2.3 mostram que, para a obtenção de maiores concentrações de ácido caféico, são necessários maiores tempo de extração, temperatura e concentração de ácido.

Notou-se também que a concentração de kaempferol foi afetada positivamente pelo aumento de MeOH na solução extratora, isso pode ser explicado pelo fato do kaempferol apresentar baixa solubilidade em água (HUMAM METABOLOME DATABASE, 2014). Além

disso, os resultados mostraram que o aumento da concentração de ácido e do tempo de hidrólise diminuiu o rendimento de kaempferol, evidenciado pela análise dos ensaios 3, 11 e 21.

3.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O primeiro teste (T1) realizado para a obtenção de um método por cromatografia líquida de ultra eficiência para a separação dos dezoito fenólicos, empregava fase móvel consistindo de água (H₂O) (Solvente A) e acetonitrila (ACN) (Solvente B), ambos acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, com um gradiente linear que consistia em: início com 100 – 0% de A em 30 minutos.

Partindo do cromatograma obtido para MT1, algumas modificações foram aplicadas, visando melhorar a separação dos picos dos compostos fenólicos. Nesse contexto, testes que consistiam no aumento do fluxo da fase móvel e na mudança do gradiente foram aplicados, até a obtenção de um método que possibilitou a separação de todos os compostos fenólicos, sem a ocorrência de co-eluição. Esse método empregou como fase móvel água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B), ambos acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, cada um. Um gradiente linear, com fluxo de 0,220 mL.min⁻¹, iniciando com 100 – 64,5% de A em 22 minutos; em seguida, retorno para condição inicial (100% de A), que foi mantida por 5 minutos para recondicionar a coluna para as corridas posteriores. O volume de injeção foi igual a 10 µL. A detecção foi realizada a 280 nm e 325 nm, de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima de cada composto.

3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Os resultados de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para a validação do método cromatográfico desenvolvido encontram-se na Tabela 2.4. A análise de variância (ANOVA) aplicada aos resultados das concentrações das curvas de trabalho obtidas para cada composto fenólico estudado, demonstrou que a regressão linear foi significativa ($p < 0,05$), e os modelos matemáticos não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$), estando, dessa forma, hábeis para serem utilizadas na quantificação dos fenólicos.

Tabela 2.4. Faixa de linearidade das curvas de trabalho desenvolvidas para 5 compostos fenólicos, bem como seus respectivos limites de detecção e quantificação.

Composto fenólico	Faixa de linearidade (mg.g ⁻¹)	R ²	LD (mg.g ⁻¹)	LQ (mg.g ⁻¹)
Ácido clorogênico	0,00002 – 0,0150	0,9969	0,000004	0,00002
Ácido caféico	0,00002 – 0,0125	0,9985	0,000004	0,00002
Ácido <i>p</i> -coumárico	0,00002 – 0,00625	0,9981	0,000004	0,00002
Ácido Ferúlico	0,00002 – 0,00625	0,9977	0,000002	0,00001
Kaempferol	0,00002 – 0,00125	0,9940	0,000004	0,00002

R²= coeficiente de determinação; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Os valores dos coeficientes de variação (CV) para os limites de quantificação dos cinco fenólicos apresentaram valores inferiores a 14%; já para os limites de detecção, esse valores encontraram-se abaixo de 20%.

A Tabela 2.5 apresenta os valores dos coeficientes de variação (CV) para repetibilidade e precisão intermediária obtidos para 3 diferentes níveis das curvas de trabalho correspondentes a cada fenólico. O método cromatográfico apresentou coeficiente de variação, para repetibilidade e precisão intermediária, com valores inferiores a 10% para todos os pontos, exceto no nível 1 (LQ) para o ácido clorogênico, podendo assim, ser utilizado para a determinação dos fenólicos estudados, uma vez que se encontra em conformidade com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 2.5. Valores dos coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediária, para três diferentes níveis das curvas dos fenólicos estudados.

Composto	Nível da* curva	Concentração (mg.g ⁻¹)	Coeficiente de variação (%)	
			Repetibilidade n = 10	Precisão intermediária n = 3
Ácido clorogênico	1	0.00002	13,59	4,07
	2	0.00750	3,97	1,12
	3	0.01500	3,40	1,01
Ácido caféico	1	0.00002	4,22	9,62
	2	0.00750	2,12	1,64
	3	0.01250	2,28	2,55
Ácido <i>p</i> - coumárico	1	0.00002	7,83	9,92
	2	0.00317	2,54	4,07
	3	0.00625	2,70	4,45
Ácido Ferúlico	1	0.00002	3,33	9,16
	2	0.00317	2,51	3,60
	3	0.00625	2,84	2,61

* Nível: 1 = ponto referente a concentração do limite de quantificação dos compostos; 2 = ponto referente a concentração central da curva de trabalho linear; 3 = ponto referente a concentração na extremidade superior da curva de trabalho linear.

n = número de ensaios realizados, para o caso da precisão intermediária, n = 3, significando 5 injeções realizadas em 3 diferentes dias.

A repetibilidade e precisão intermediária não foram realizadas para o kaempferol, visto que o método de extração escolhido não permitia a quantificação desse composto.

A condição de hidrólise escolhida com base no planejamento experimental, também foi submetida à análise de repetibilidade e precisão intermediária. Os dados obtidos para esses parâmetros de validação encontram-se descritos na Tabela 2.6. Com base nos resultados observados, pode-se afirmar que o método de extração escolhido possui boa repetibilidade, uma vez que seus coeficientes de variação apresentaram-se todos abaixo de 5%, em conformidade com as exigências da legislação (BRASIL, 2003).

Tabela 2.6. Valores dos coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediária avaliados para o método de extração de fenólicos definido.

Composto	Coeficiente de variação (%)	
	Repetibilidade	Precisão intermediária
	n = 10	n = 3
Ácido clorogênico	4,69	4,81
Ácido caféico	3,44	3,92
Ácido <i>p</i> -coumárico	2,55	4,83
Ácido Ferúlico	3,68	4,20

n = número de ensaios realizados, para o caso da precisão intermediária, n = 3, significando 5 injeções realizadas em 3 diferentes dias.

4. CONCLUSÃO

A otimização multivariada foi fundamental para a determinação das condições experimentais referentes à extração de fenólicos de OPN, visto que, com apenas 25 combinações entre as variáveis, foi possível avaliar certos efeitos nas respostas experimentais, causados por quatro diferentes parâmetros (concentração de metanol, concentração de ácido clorídrico, tempo de extração e temperatura) e assim, obter uma condição adequada para a extração e hidrólise das folhas estudadas.

O método de cromatografia de ultra eficiência desenvolvido para a análise de compostos fenólicos apresentou resultados satisfatórios, em relação aos critérios de validação, mostrando-se adequado para a separação e quantificação dos ácidos clorogênico, caféico, *p*-coumárico e ferúlico, possuindo a vantagem de ser um método cromatográfico com menor tempo de corrida, quando comparado a métodos que empregam HPLC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYBASTIER, O.; IŞIK, E.; ŞAHİN, S.; DEMİR, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p.558– 565, 2013.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191–203, 2006.

BIZZOTTO, C. S.; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; BOGUZ JUNIOR, S.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v.48, p.763–768, 2012.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acessado em 30 de janeiro de 2013.

BUDRYN, G.; NEBESNY, E.; PODSEDEK, A.; ŻYŻELEWICZ, D.; MATERSKA, M.; JANKOWSKI, S.; JANDA, B. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. **European Food Research and Technology**, v.228, n.6, p. 913–922, 2009.

CHANDEL, M.; SHARMA, U.; KUMAR, N.; SINGH, B.; KAUR, S. Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of *Anthocephalus cadamba* by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.5, n.12, p.977–985, 2012.

CHEN, S.; KORD, A. Theoretical and experimental comparison of mobile phase consumption between ultra-high-performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 6204–6209, 2009.

CHUA, L. S.; LATIFF, N. A.; LEE, S. Y.; LEE, C. T.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). **Food Chemistry**, v.127, p.1186–1192, 2011.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313–7352, 2010.

DARTORA, N.; DE SOUZA, L. M.; SANTAN-FILHO, A. P.; LACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v.129, p.1453–1461, 2011.

EPRILIATI, I.; KERVEN, G.; D'ARCY, B.; GIDLEY, M. J. Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC. **Analytical Methods**, v.2, p.1606-1613, 2010.

FARAG, M. A.; ELDIN, M. G. S.; KASSEM, H.; EL FETOUH, M. A. Metabolome classification of *Brassica napus* L. organs via UPLC-QTOF-PDA-MS and their anti-oxidant potential. **Phytochemical Analysis**, v.14, n.3, p.277 – 287, 2013.

FARAG, M. A.; ELDIN, M. G. S.; KASSEM, H.; FETOUH, M. A. Metabolome classification of *Brassica napus* l. organs via UPLC-QTOF-PDA-MS and their anti-oxidant potential. **Phytochemical Analysis**, v.24, p .277-287, 2012.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; BRANDÃO, G. C.; DAVID, J. M.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta** v.597, p.179-186, 2007.

FRANCESCATTO, L. N.; DEBENEDETTI, S. L.; SCHWANZ, T. G.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v.105, p.192-203, 2013.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.2, p.229-253, 2007.

HAM, S. S.; KIM, S-H.; MOON, S-Y.; CHUNG, M .J.; CUI, C-B.; HAN, E-K.; CHUNG, C-K.; CHOE, M. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inootus obliquus*) extract. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.672, p.55 – 59, 2000.

HERCENBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ALFAREZ, M. J.; VAZQUEZ, C. The potencial role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. **Nutrition**, v.14, n.6, p.499 – 506, 2000.

HUMAM METABOLOME DATABASE. **Metabocard for Kaempferol (HMDB05801)**. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB05801>. Acesso em: 26 de janeiro de 2014.

KHANAMA, U. K., S; OBAB, S.; YANASEB, E.; MURAKAMIC, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.979-987, 2012.

KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51, p.467–473, 2013.

KUKULA-KOCH, W.; ALIGIANNIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A-L.; GLOWNIAK, K.; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. **Food Chemistry**, v.138, p.406–413, 2013.

LEE, J.; YE, L.; WILLIAM, O.L.; EITENMILLER JR.; RONALDO, R. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.45–57, 2000.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; ZHANG, M.; GAO, Y.; MA, C.; WANG, Z. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2441–2446, 2010.

LUO, C.; WANG, X.; GAO, G.; WANG, L.; LI, Y.; SUN, C. Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS. **Food Chemistry**, v.141, p.2697–2706, 2013.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p. 3216-3222, 2001.

MEDA, R. N. T.; VLASE, L.; LAMIEN-MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; MUNTEA, D.; TIPERCIUC, B.; ONIGA, I.; NACOUKMA, O. G. Identification and quantification of phenolic compounds from *Balanites aegyptiaca* (L) Del (Balanitaceae) galls and leaves by HPLC–MS. **Natural Product Research**, v.25, n.2, 93–99, 2011.

MOLTIVA, M-J.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. **Journal of Chromatography A**, V.1292, p.66–82, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

ORHAN, N.; ASLAN, M.; ŞÜKÜROĞLU, M.; ORHAN, D. D. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC–TOF–MS analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, p.859–865, 2013.

PARVATHY, K. S.; NEGI, P. S.; SRINIVAS, P. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curumin- β -diglucoside. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p.265 – 271, 2009.

PEREIRA, P.; BERNARDO-GIL, M. G.; CEBOLA, M. J.; MAURICIO, E.; ROMANO, A. Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. **Journal of Supercritical Fluids** v. 83, p.57-64, 2013.

RADOJKOVIĆ, M.; ZEKOVIĆ, Z.; JOKIĆ, S.; VIDOVIĆ, S.; LEPOJEVIĆ, Z.; MILOŠEVIĆ, S. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. **Food Technology and Biotechnolog**, v.50, n.2, p.167 – 176, 2012.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v.1224, p.1-10, 2012.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2866–2887, 2003.

ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p. 595–602, 2013.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v.18, p.8402-8416, 2013.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. In: ÖTLES, S. **Methods of analysis of food components and additives**. Boca Raton: CRC Press, 2005, p. 199-260.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga Edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.55, p.381–187, 2007.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.200–208, 2007.

UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, v.130, p. 184–188, 2012.

WANG, C.; SHI, L.; FAN., L.; DING, Y.; ZHAO, S.; LIU, Z.; MA, C. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products** v.42, p.587– 594, 2013.

WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p.667-680, 2010.

WILDMAN, R. E. C.; KELLEY, M. In: WILDMAN, R. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 1-21.

WONG, J. Y.; MATANJUN, P.; OOI, Y. B. H.; CHIA, K. F. Characterization of phenolic compounds, carotenoids, vitamins and antioxidant activities of selected Malaysian wild edible plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.64, n. 5, p.621–631, 2013.

XIONG, J.; LI, S.; WANG, W.; HONG, Y.; TANG, K.; LUO, Q. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. Leaves. **Food Chemistry**, v.138, p.327–333, 2013.

ZAHANG, B.; YANG, R.; LIU, C. Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. **Separation and Purification Technology**, v.62, p.480–483, 2008.

ZHANG, B.; YANG, R.; LIU, C. Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. **Separation and Purification Technology**, v.62, p.480–483, 2008.

ZHANG, S.; BI, H.; LIU, C. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. **Separation and Purification Technology**, v.57, n.2, p. 277–282, 2007.

ZHOU, H.; LIANG, J.; LV, D.; HUM, Y.; ZHUN, Y.; SI, J.; WU, S. Characterization of phenolics of *Sarcandra glabra* by non-targeted high-performance liquid chromatography fingerprinting and following targeted electrospray ionisation tandem mass spectrometry/time-of-flight mass spectrometry analyses. **Food Chemistry**, v.138, p. 2390–2398, 2013 (b).

ZHOU, J.; ZHENG,X.; YANG, Q.; LIANG, Z.; LI, D.; YANG, X.; XU, J. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and radical-scavenging capacity of phenols and flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz leaves. **Plos one**, v.8, n.7, p. 1–8, 2013.

CAPÍTULO III

PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE ORA- PRO-NÓBIS*

Thaís Cristina Lima de Souza¹, Tayse Ferreira Ferreira da Silveira¹, Helena Teixeira
Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121,
13083-862, Campinas, SP, Brasil.

***Artigo em preparação para ser submetido ao periódico Food Research International**

RESUMO

A investigação de compostos com funções biológicas, tais como os compostos fenólicos, apresenta extrema relevância na atualidade, devido estes possuírem atividades antioxidante, anticarcinogênica, antiantitumoral e antimicrobiana. Por essa razão, existe um grande interesse na busca por fontes naturais ricas em compostos fenólicos. Nesse contexto, não foram encontrados trabalhos na literatura, até onde se sabe, referentes ao perfil de compostos fenólicos apresentado pelas folhas de ora-pro-nóbis (OPN). Por essa razão, o objetivo do presente trabalho consistiu em promover a identificação e quantificação dos fenólicos presentes em extratos aquosos obtidos de folhas de OPN, a partir do emprego de hidrólise ácida. Para tal, amostras de folhas de OPN foram adquiridas nas cidades de Campinas, Mairiporã, Ubá e Guiricema. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de ultra eficiência. A análise dos extratos demonstrou a presença dos ácidos fenólicos: clorogênico, caféico, *p*-coumárico e ferúlico. Os teores desses fenólicos nas amostras variaram entre 58,37 e 81,29 mg.100g⁻¹ para o ácido clorogênico, 3,72 e 15,64 mg.100g⁻¹ para o ácido caféico, 4,68 e 5,39 mg.100g⁻¹ para o ácido *p*-coumárico e 3,72 e 5,15 mg.100g⁻¹ para o ácido ferúlico. A presença desses ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados nas amostras indica que as mesmas podem possuir uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de análises adequadas para tal afirmação.

Palavras chave: *Pereskia aculeata* Miller; compostos fenólicos; hidrólise ácida; UPLC

ABSTRACT

The study of compounds with biological functions, such as phenolic compounds, has great relevance nowadays, since they possess antioxidant, anticarcinogenic, antitumour and antimicrobial activities. For this reason, there is great interest in the search field for natural sources that are rich in phenolic compounds. In this context, no studies were found in the literature, from what we know, regarding the composition of phenolic compounds of ora-pro-nóbis (OPN) leaves. For this reason, the aim of this study was to promote the identification and quantification of phenolics in aqueous extracts of OPN leaves, employing acid hydrolysis. To this aim, samples of OPN leaves were collected in the cities of Campinas, Mairipora, Ubá and Guiricema. The extracts were analyzed by ultra performance liquid chromatography. The extracts analysis showed the presence of chlorogenic, caffeic, p-coumaric and ferulic phenolic acids. The levels of these phenolics in the samples ranged between 58.37 and 81.29 mg.100g⁻¹ for chlorogenic acid, 3.72 and 15.64 mg.100g⁻¹ for caffeic acid, 4.68 and 5.39 mg.100g⁻¹ for p-coumaric acid and 3.72 and 5.15 mg.100g⁻¹ for ferulic acid. The presence of these hydroxycinnamic acids and their derivatives indicates that the samples may have a high antioxidant activity; nevertheless appropriate analysis should be run to justify this position.

Keywords: *Pereskia aculeata* Miller; phenolic compounds, acid hydrolysis; UPLC.

1. INTRODUÇÃO

O ora-pro-nóbis (OPN) (*Pereskia aculeata* Miller) é uma trepadeira arbustiva, pertencente à família Cactaceae, originária das Américas, onde se relata sua presença desde a Califórnia, nos Estados Unidos, até o Rio Grande do Sul, no Brasil, onde se encontra amplamente distribuída entre os estados da Bahia ao Rio Grande do Sul, mas seu uso é mais difundido no estado de Minas Gerais, onde ocorre anualmente o “Festival do Ora-pro-nóbis”, no município de Sabará (ALMEIDA; CORRÊA, 2012; SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010; PEREIRA et al., 2007).

As folhas de OPN são macias, de cor verde-escura, carnosas e suculentas. Constituem a parte da planta mais utilizada para consumo humano, sendo consumidas como hortaliças não convencionais, fazendo parte da dieta de populações rurais e urbanas, em especial, de baixa renda (ROCHA et al., 2008). As hortaliças não convencionais são culturas que não estão organizadas enquanto cadeia produtiva propriamente dita, resultado da globalização e do crescente uso de alimentos industrializados, o que provocou mudanças no comportamento alimentar dos brasileiros, levando a perda de espaço e mercado destas plantas, para as hortaliças convencionais. No entanto, possuem importante papel na complementação da alimentação e economia familiar de populações de baixa renda, além de serem importantes para a expressão cultural de determinados locais. Como é o caso do OPN, que compõe pratos típicos da culinária mineira (SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2010; SOUZA et al., 2009).

Uma importante característica nutricional das folhas de OPN refere-se ao seu conteúdo proteico, com cerca de 15 a 28 %, que pode ser considerado elevado quando comparado com outros vegetais usualmente consumidos no Brasil (MERCÊ et al., 2001). Além disso, suas proteínas apresentam alta digestibilidade (75,9%) e excelente perfil de aminoácidos, dentre eles, aminoácidos essenciais como lisina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina e treonina. Contém ainda notável teor de fibras dietética solúvel (5,2 g/100 g) e elevados níveis de minerais como, manganês (46,4 mg /100 g), zinco (26,71 mg/100 g), ferro (14,18 mg/100 g) e cálcio (3,420 mg/100 g) (TAKEITI et al., 2009; ALBUQUERQUE, 1991; DAYRELL; VIEIRA, 1977; ALMEIDA FILHO; CAMBRAIA, 1974).

A investigação de compostos com atividades biológicas, especialmente, atividade antioxidante, apresenta extrema relevância na atualidade, uma vez que em sistemas biológicos, antioxidantes de origem externa são necessários devido o estresse oxidativo, isto é, quando a quantidade de radicais livres formados, em consequência da respiração aeróbica celular, está acima da capacidade que o sistema de defesa humano possui em combatê-los. O estresse oxidativo por sua vez, está relacionado com o desenvolvimento de inúmeras doenças, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas, envelhecimento celular, etc (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SUBHASREE et al., 2009).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras caracterizadas pela presença de anel(is) aromático(s) em suas estruturas químicas que, devido à ressonância do anel aromático, originam intermediários das reações de oxidação relativamente estáveis, desempenhando assim, importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Por essa razão, existe um grande interesse na busca por fontes naturais ricas em compostos fenólicos que possuam a capacidade de eliminar os radicais livres e prevenir o estresse oxidativo (HASLAM, 1996; MADSEN; BERTEISEN, 1995; GRAF, 1992).

No que se refere aos compostos bioativos, não foram encontrados trabalhos na literatura, até onde se sabe, sobre o perfil de compostos fenólicos apresentado pelas folhas de OPN. Por essas razões, o objetivo do presente trabalho foi promover a identificação e quantificação dos fenólicos presentes em extratos aquosos, obtidos a partir de folhas de OPN, visando gerar mais informações sobre essa planta, e assim, estimular a ampliação do consumo e utilização da mesma em diversos setores industriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

As folhas de OPN foram adquiridas nas cidades de Campinas – SP (colhidas em outubro/2012), Mairiporã – SP (colhidas em março/2013), Ubá – MG (colhidas em abril/2013) e Guiricema – MG (abril/2013). As folhas foram, inicialmente, lavadas em água corrente, em seguida foram congeladas (-18 °C) e liofilizadas. Posteriormente ao processo de liofilização, as folhas foram moídas, em moinho analítico (IKA[®], modelo A-11), embaladas a vácuo e congeladas (-18 °C) até o início das análises.

2.2 REAGENTES

Os padrões de ácido caféico, *p*-coumárico e ferúlico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão do ácido clorogênico foi adquirido da Biopurify phytochemicals Ltd. (Chengdu, China). Os reagentes empregados no trabalho foram metanol PA (Synth, Brasil), ácido clorídrico PA (Chemco, Brasil), ácido fórmico PA (Ecibra, Brasil), metanol grau cromatográfico (Merck, Alemanha) e acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, USA). A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Direct Q3 UV (Millipore Corporation, France). Para a análise cromatográfica, todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) e degaseificadas em ultrassom (Microsonic SX-20, Arruda Ultra-sons LTDA, Brasil) previamente à injeção.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol, na concentração de 1000 mg.L⁻¹. Já as soluções de trabalho foram preparadas em metanol:água (30:70 v/v), em concentrações que variavam de 0,05-20 mg.L⁻¹, dependendo do padrão em questão. Ambas as soluções, tanto de estoque quanto de trabalho, foram armazenadas em freezer (-18 °C) protegidas da luz e previamente filtradas (0,22 µm) e degaseificadas antes da injeção.

2.3 INSTRUMENTAÇÃO

Para a análise dos extratos fenólicos obtidos a partir das folhas de OPN, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) Acquity Waters, modelo UPA, série J08UPA 905M, equipado com um sistema quaternário de bombas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD). Foi empregada uma coluna de fase reversa, Hypersil Gold C₁₈, com 10 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,9 µm de tamanho de partícula. A coluna foi mantida a temperatura constante e igual a 35 °C. A fase móvel empregada consistia em água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B), ambos os solventes foram acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico cada um. Um gradiente linear, com fluxo de 0,220 mL.min⁻¹, foi empregado, nas seguintes condições: início com 100 – 64,5% de A em 22 minutos; em seguida, retorno para condição inicial (100% de A), que foi mantida por 5 minutos para recondicionar a coluna para as corridas posteriores. O volume de injeção foi de 10 µL. A detecção foi realizada a 280 nm e 325 nm, de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima de cada composto.

A identificação de cada composto foi realizada por co-cromatografia, comparação entre o tempo de retenção dos compostos presentes na amostra e dos padrões puros, analisados sob as mesmas condições, bem como da comparação entre seus espectros de absorção. A quantificação foi realizada através de padronização externa, utilizando-se a faixa linear de curvas de trabalho construídas a partir de padrões puros.

2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS

Para a obtenção dos extratos fenólicos das folhas de OPN foi empregado um sistema de refluxo, composto de um banho de aquecimento com condensadores de bolas. Em um balão de fundo redondo, foram pesados 0,250 g de amostra e, posteriormente, 5 mL de solução aquosa, contendo 1 mol.L⁻¹ de HCl, foi adicionada, mantendo uma proporção sólido:líquido de 1:20 (m/v). Os balões, contendo a amostra e o solvente extrator, foram então acoplados ao sistema de refluxo e mantidos sob temperatura igual a 80 °C por 90 minutos. A obtenção dos extratos foi realizada em triplicata para todas as mostras estudadas.

Após o processo de extração, os extratos foram filtrados e o volume final ajustado para 25 mL, com metanol e água ultra pura, resultando em um extrato com concentração final de metanol:água igual a 30:70 (v/v). Os extratos obtidos foram, posteriormente, filtrados com Milex (Millipore) 0,22 μm e armazenados sob congelamento (-18 °C), até o momento da análise cromatográfica.

2.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos para as concentrações dos compostos fenólicos das amostras foram avaliados através da análise variância (ANOVA), e as médias comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS

Os extratos fenólicos obtidos para as folhas de OPN estudadas apresentaram em sua composição a presença dos ácidos hidroxicinâmicos caféico, ferúlico e *p*-coumárico, bem como, o seu derivado conjugado, o ácido clorogênico, como pode ser observado na Figura 3.1, que apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras de folhas de OPN e na Tabela 3.1, que exhibe as concentrações encontradas para dos fenólicos encontrados.

O ácido sinapínico foi o único ácido hidroxicinâmico não detectado para as folhas de OPN. No entanto, isso pode ser justificado pelo fato deste ácido ser mais abundantemente encontrado em cereais do que em vegetais, segundo El-Seedi et al., 2012.

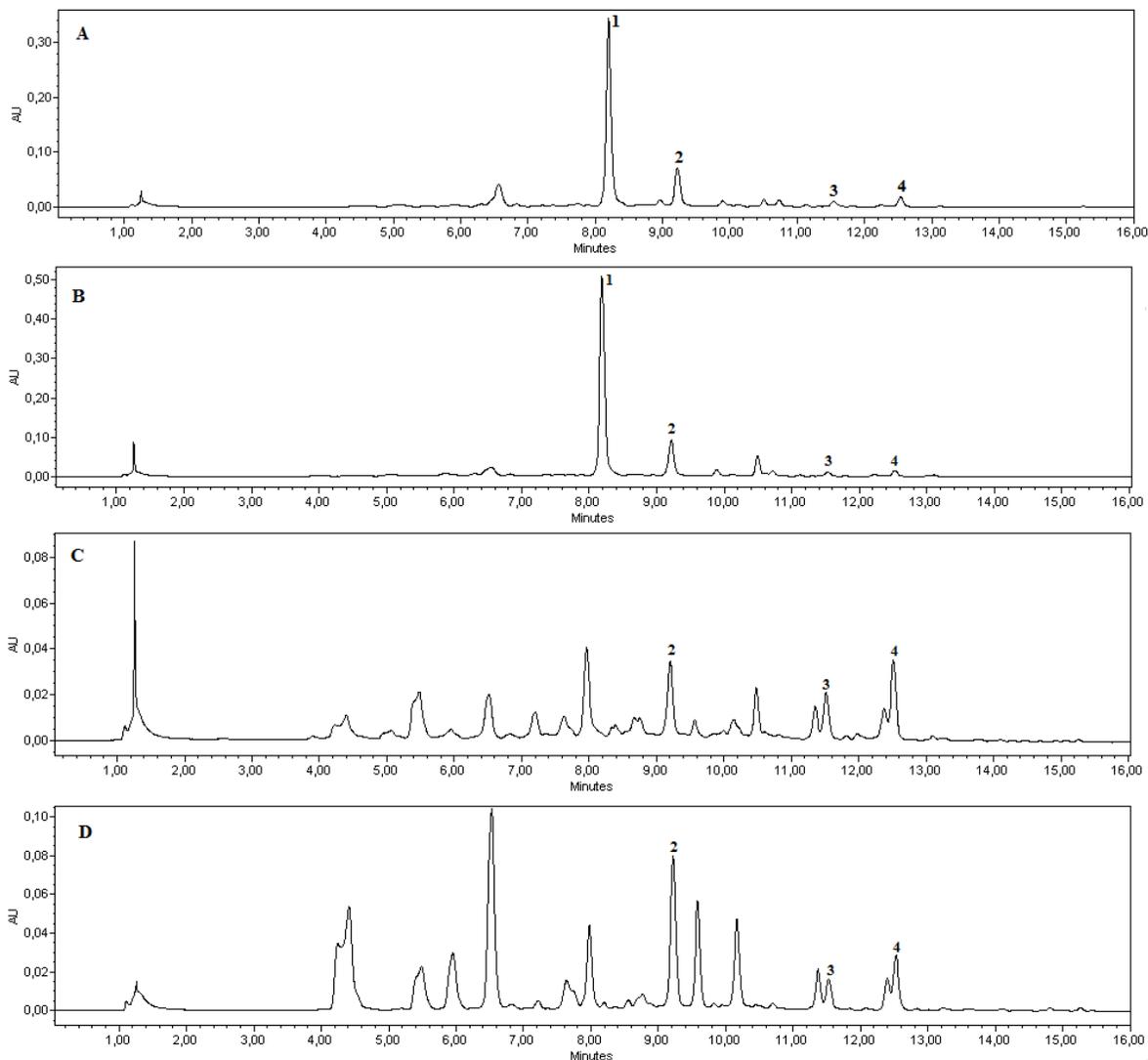


Figura 3.1. Cromatogramas obtidos para a amostra de folhas de OPN provenientes de: A – Ubá (MG); B – Campinas (SP); C – Mairiporã (SP) e D –Guiricema (MG).

Onde: 1 – Ácido clorogênico, 2 – Ácido caféico, 3 – Ácido *p*-coumárico e 4 – Ácido ferúlico.

As amostras de folhas provenientes de Ubá e Campinas apresentaram os quatro compostos em sua composição (ácidos clorogênico, caféico, ferúlico e *p*-coumárico). Já para as amostras adquiridas em Mairiporã e Guiricema não foram detectadas a presença de ácido clorogênico. De acordo com os resultados, verificou-se uma grande variação do teor dos compostos fenólicos entre as diferentes amostras. O teste de Tukey aplicado para as amostras mostrou que, as folhas provenientes das diferentes localidades apresentam

diferença significativa, a nível de 95% de confiança, para as concentrações dos compostos fenólicos encontrados.

O teor de fenólicos encontrado variou entre 58,37 e 81,29 mg.100g⁻¹ para o ácido clorogênico, 3,72 e 15,64 mg.100g⁻¹ para o ácido caféico, 4,68 e 5,39 mg.100g⁻¹ para o ácido *p*-coumárico e 3,72 e 5,15 mg.100g⁻¹ para o ácido ferúlico. No que se refere à somatória dos fenólicos encontrados (coluna Σ, Tabela 3.1), a amostra proveniente de Campinas apresentou mais concentração, igual a 78,94 mg.100g⁻¹, enquanto que a amostra de Mairiporã, exibiu menor concentração, igual a 13,59 mg.100g⁻¹. De acordo com a literatura, os níveis de fenólicos e as variações nos perfis destes para uma mesma planta, podem variar grandemente, devido às técnicas de cultivo, condições de desenvolvimento do vegetal, época de colheita e formas de armazenamento (NACZK; SHAHIDI, 2006).

Tabela 3.1 Concentração dos compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas de OPN.

Amostra	Compostos fenólicos (mg.100g ⁻¹ de folha fresca)				
	Ácido clorogênico	Ácido caféico	Ácido <i>p</i> -coumárico	Ácido ferúlico	Σ
Ubá	58,37 ± 4,18 ^a	10,85 ± 0,60 ^a	4,68 ± 0,26 ^a	5,05 ± 0,19 ^a	78,94 ^a
Campinas	81,29 ± 4,37 ^b	15,64 ± 0,39 ^b	5,39 ± 0,13 ^b	3,72 ± 0,14 ^b	106,04 ^b
Mairiporã	n.d.	3,72 ± 0,17 ^c	5,03 ± 0,38 ^c	4,84 ± 0,31 ^c	13,59 ^c
Guiricema	n.d.	12,57 ± 0,36 ^d	4,96 ± 0,10 ^d	5,15 ± 0,13 ^d	22,68 ^d

Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.

Os valores das médias na mesma coluna seguidos por letras subscritas diferentes, diferem entre si a nível de 95% de significância, de acordo com o teste t de Student.

n.d. = não detectado.

Σ = somatório das concentrações dos fenólicos encontrados.

O teor dos fenólicos encontrados nas folhas de OPN provenientes de Ubá e Campinas apresentaram-se muito superiores ao descrito na literatura, para vegetais comumente consumidos no Brasil, tais como espinafre (2,9 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco), alface (18,2 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco), brócolis (12 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco), couve-flor (1,9 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco), cenoura (39 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco) e tomate (2,6 mg.100g⁻¹ de vegetal fresco); e apesar das amostras de Mairiporã e Guiricema

exibirem níveis de concentração de fenólicos mais baixos que as amostras provenientes de Ubá e Campinas, os extratos obtidos das mesmas também exibiram níveis de concentração superiores às aquelas relatadas para os vegetais comumente consumidos no Brasil descritos acima, com exceção do alface e da cenoura (LLRORACH et al., 2008; MATTILA; HELLSTRÖM, 2007), demonstrando o potencial do OPN como uma fonte alternativa de fenólicos, especialmente para populações mais carentes, uma vez que essa planta, por ser rústica, resistente a seca e geadas, adaptável a diversos tipos de solo e não exigente quanto a fertilidade, pode ser facilmente cultivada em diversas localidades dos países (BRASIL, 2010).

Para as amostras provenientes de Ubá e Campinas, o ácido clorogênico foi o fenólico encontrado em maior concentração. A literatura não relata, até onde se sabe, trabalhos referentes à identificação de fenólicos em folhas de OPN, no entanto, Vagiri et al. (2012) descrevem um perfil de ácidos fenólicos similar ao obtidos nesse trabalho para folhas de groselha-preta, denotando os ácidos hidroxicinâmicos constituem o principal grupo de ácidos fenólicos para essas folhas, dos quais o ácido neo-clorogênico (5-*O*-cafeoilquínico) e o ácido clorogênico (3-*O*-cafeoilquínico) se apresentam como os ácidos fenólicos majoritários. Clifford (1999) e Herrmann (1989) afirmam que os ácidos clorogênicos representam a maior porção, dentre os ácidos hidroxicinâmicos, encontrada em vegetais e frutas.

O perfil de fenólicos encontrado para as folhas de OPN também foi similar ao descrito por Bravo e Lecumberri (2007) para erva mate. Segundo esses autores, a alta atividade antioxidante da erva mate pode ser atribuída aos principais constituintes fenólicos presentes nessa planta, que são derivados de ácidos hidroxicinâmicos: *p*-coumárico, caféico, ferúlico e ácido sinapínico. Esses ácidos, com exceção do ácido sinapínico, foram encontrados no presente trabalho para as folhas de OPN, o que pode indicar que as mesmas devem possuir uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de análises adequadas para tal afirmação. Além disso, relatos indicam que o ácido caféico e o ácido clorogênico, ambos encontrados em concentrações significativas nas folhas de OPN, inibem a geração de espécies reativas de oxigênio (PEREZ-GARCIA et al., 2000), bem como, estão relacionados com a proteção ao estresse oxidativo induzido *in vitro*, dos

hepatócitos de ratos (GEBHARDT, 1997), aumentando as indicações da importância bioativa de extratos obtidos de folhas de OPN.

Alguns outros estudos indicam ainda, que o consumo de ácidos hidroxicinâmicos inibe significativamente a absorção intestinal de glicose e aumenta a produção do hormônio GLP-1 (do inglês, *glucagon-like peptide-1*), sugerindo um papel potencial desses ácidos fenólicos na prevenção contra a diabetes do tipo 2 (BASSOLI et al. 2008; JOHNSTON et al. 2005, 2003; 2002; MCCARTY 2005).

4. CONCLUSÃO

As amostras provenientes das diferentes localidades apresentaram diferença significativa, a nível de 95% de confiança, para as concentrações dos compostos fenólicos estudados. O perfil de fenólicos encontrado para as folhas de OPN apresentou similaridade a outros estudos relatados para folhas. As concentrações de fenólicos encontradas nas folhas de OPN foram expressivas e superiores ao descrito para diversos vegetais comumente consumidos no Brasil.

Os resultados obtidos apontam o OPN como uma fonte alternativa de compostos fenólicos, podendo ser incluído de forma mais eficiente na alimentação dos brasileiros, contribuindo para uma dieta mais saudável, especialmente para populações de baixa renda, além de fornecer importantes informações para auxiliar no resgate dessa hortaliça não-convencional, evitando o seu processo de extinção, como ocorrido com outra espécie no Brasil.

A presença de ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados nas amostras indica que as mesmas podem possuir uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de análises adequadas para tal afirmação, podendo ser aplicadas, não somente na indústria alimentícia, mas também nos setores farmacêuticos e de cosméticos.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, M. G. P. T.; SABAA SRUR, A. U. O.; FREIMAN, L. O. Composição centesimal e escore de amino- ácidos em três espécies de *Ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata*

Mill. *P. bleu* de Candolle e *P. pereskia* (L) Karsten). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.7-12, 1991.

ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do “Ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Mill.). **Revista Ceres**, v.21, p.105-111, 1974.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.751-756, 2012.

BASSOLI, B. K; CASSOLLA, P; BORBA-MURAD, G. R; CONSTANTIN, J; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L; BAZOTTE, R. B; DA SILVA, R.S; DE SOUZA, H. M, Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function**, v.26, n.3,p.320–328, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Brasília: Mapa/ACS, 2010, 92p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças não-convencionais**. Brasília: Mapa/ACS, 2010, 92 p.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p.393–405, 2007.

CLIFOORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science of Food Agriculture**, v.79, n.3. p. 362–372, 1999.

DAYRELL, M. S.; VIEIRA, E. C. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia Aculeata* Mill. I. Extraction and composition. **Nutrition Reports International**, v.1977, p.529-537, 1977.

EL-SEEDI, B. R.; EL-SAID, A. M. A.; KHALIFA, S. A. M.; GÖRANSSON, U.; BOHLIN, L.; BORG-KARLSON, A. K.; VERPOORTE, B. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.44, p. 10877 – 19895, 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidant, oxidative stress and biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239–247, 2000.

GEBHARDT, R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.286, p.1122–1128, 1998.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.13, n.4, p.435 – 448, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.205 – 215, 1996.

HERRMANN, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.4, p.315–347, 1989.

JOHNSTON K, SHARP P, CLIFFORD MN, MORGAN L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal caco-2 cells. **FEBS Letters**, v.579, n.7, p.1653–1657, 2005.

JOHNSTON, K. L, CLIFFORD, M.N., MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Society for Clinical Nutrition**, v.78, n.4, p.728–733, 2003.

JOHNSTON, K. L; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.82, n.15, p.1800–1805, 2002.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. T.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n.3, p.1028 – 1038, 2008.

MADSEN, H. L; BERTEISEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, n.8, p.271–277, 1995.

MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3-4, p.152 – 160, 2007.

MCCARTY, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. **Medical Hypotheses**, v.64, n.4, p. 848–853, 2005.

MERCÊ, A. L. R.; LANDALUZE, J. S.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} **Bioresource Techonology**, v.76, n.1, p.29-37, 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523–1542, 2006.

ORČIĆ, D.; FRANCIŠKOVIĆ, M.; BEKVALAC, K.; SVIRČEV, E.; BEARA, I.; LESJAK, M.; MIMICA-DUKIĆ, N. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v.143, p.48–53, 2014.

PEREIRA, O. L.; BARRETO, R.W.; CAVALLAZZI, J. R. P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity** v. 25, p. 127-140, 2007.

PEREZ-GARCIA, F.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Activity of artichoke extract on reactive oxygen species in human leukocytes. **Free Radical Research**, v.33, p. 661–665, 2000.

ROCHA, D.R.C. Macarrão adicionado de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p.459-465, 2008.

SANTOS, I. C.; PEDROSA, M. W.; CARVALHO, O. C.; GUIMARÃES, C. D. C.; SILVA, L. S. Ora-pro-nóbis: da cerca à mesa. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais –EPAMIG**. Circular Técnica, n.177, 2012.

SOUZA, M. R. M.; CORREA, E. J. A; GUIMARÃES, G.; PERREIRA, P. R. G. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.3550–3554, 2009.

SUBHASREE, B., BASKAR, R., LAXMI KEERTHANA, R., LIJINA SUSAN, R., RAJASEKARAN, P. Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. **Food Chemistry**, v.115, p.1213-1220, 2009.

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M. P., COLLARES-QUEIROZ, F. P., PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60(S1), p.148 – 160, 2009.

VAGIRI, M.; EKHOLM, A.; ANDERSSON, S.C.; JOHANSSON, E.; RUMPUNEN, K. An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.10501–10510, 2012.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos apontam o OPN como uma fonte alternativa rica em compostos fenólicos, podendo ser incluído de forma mais eficiente na alimentação dos brasileiros, contribuindo para uma dieta mais saudável, especialmente para populações de baixa renda, devido sua rusticidade de plantio. Além disso, os resultados gerados a partir desse trabalho fornecem importantes informações para auxiliar no resgate e valorização dessa hortaliça não-convencional, representam ganhos importantes do ponto de vista cultural, econômico, social e nutricional considerando a tradição do seu emprego em pratos típicos regionais, seu cultivo por várias comunidades, e sua contribuição em termos nutricional.

A presença de ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados nas amostras indica que as mesmas podem ainda, possuir uma alta atividade antioxidante, embora seja necessária a realização de análises adequadas para tal afirmação, podendo ser aplicadas, não somente na indústria alimentícia, mas também nos setores farmacêuticos e de cosméticos.

TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação do efeito do cozimento (no preparo doméstico e industrial) sobre os compostos fenólicos presentes nas folhas de OPN.
- Avaliação da estabilidade de extratos obtidos a partir de folhas de OPN.
- Aplicação de métodos de avaliação do potencial antioxidante que empregam radicais livres gerados nos organismos vivos.