



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – área de
concentração Biologia Celular e Molecular – PBC

III CURSO DE INVERNO

COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS DE FRUTAS

Laboratório de Bioquímica de Microrganismos

Dra. Cristina Giatti Marques de Souza
Dra. Rosane Marina Peralta

Bruna Polacchine da Silva
Fabiola Dorneles Inácio
Roselene Ferreira Oliveira
Rúbia Carvalho Gomes Corrêa
Verônica Sayuri Nishida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	2
METODOLOGIA	8
2.1 Materiais	8
2.2. Extração dos Compostos Fenólicos	Erro! Indicador não definido.
2.3. Determinação de Compostos Fenólicos por Folin-Ciocalteu's phenol	9
2.5. Determinação de Flavonóides Totais	10
2.6. Ensaio DPPH - Atividade Antioxidante	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

INTRODUÇÃO

A agroindústria tem se expandido cada vez mais para atender a crescente demanda populacional por alimentos. Dentro desse contexto, o Brasil, com sua economia fortemente baseada no agronegócio, contribui para a geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais resultantes das atividades de processamento (Albuquerque, 2009).

Esses resíduos, em muitas situações, representam um grave problema, pois, aparentemente sem aplicação viável são descartados diretamente no ambiente (Albuquerque, 2009).

Aproximadamente 64% do que se planta no Brasil é perdido ao longo da cadeia produtiva, sendo: 20% na colheita, 8% no transporte e armazenamento, 15% na indústria de processamento, 1% no varejo e 20% no processamento culinário e hábitos alimentares (Banco De Alimentos, 2006).

Os resíduos agroindustriais são constituídos pelos restos de plantas não aproveitados comercialmente ou condicionados pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (Matos, 2005).

A indústria alimentícia, que até então não demonstrava maior preocupação com o reaproveitamento de resíduos, vem se mostrando aberta ao diálogo para empregar os resultados das novas pesquisas nas etapas produtivas, uma vez que estão verificando a real possibilidade de agregar valor ao seu negócio (Alencar, 2009).

De acordo com Alencar (2009), do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da USP, muitos resíduos são ricos em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, tais como antioxidantes e antimicrobianos, representando, portanto, potenciais fontes naturais destas substâncias.

O estudo desses compostos bioativos de alimentos inspirou o conceito de alimentos funcionais. Compostos bioativos são constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos, o interesse neles cresce a cada ano (Alencar, 2009). Estas substâncias são sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta, em resposta a diferentes situações, tais como estresse e radiação UV, entre outros (Nacz & Shahidi, 2004).

Há várias classes de compostos fenólicos naturalmente presentes em frutos, entre essas os ácidos fenólicos e os flavonóides. Tais compostos agem como sequestrantes de ânions superóxido e outros compostos reativos, doando elétrons para os radicais livres convertendo-os em moléculas não nocivas (Nijveldt, 2001).

Os compostos fenólicos são um grupo de diferentes moléculas que tem uma grande variedade de estruturas e funções. Eles podem ser classificados em compostos solúveis em água (fenólicos ácidos, fenilpropanóides, flavonóides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados, lignina) (Rispaill *et al.*, 2005).

Do ponto de vista estrutural, pode-se definir composto fenólico como uma substância que possui um ou mais grupos hidroxila ligada a um anel aromático e sua estrutura pode ser simples até um polímero de alta massa molecular complexa. As plantas produzem diferentes grupos quimicamente heterogêneos desses compostos que, de acordo com sua diversidade química, desempenham inúmeras funções (Balasundram *et al.*, 2006).

De acordo com Soares (2002) os compostos fenólicos encontrados em muitas plantas possuem propriedades antioxidantes e alguns estudos avaliaram seu potencial antioxidante tanto na conservação de alimentos lipídicos quanto nos organismos.

Esses compostos englobam uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas) que são na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativas e suscetíveis à ação de enzimas. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: ácidos fenólicos e flavonóides (Soares, 2002).

Frutos contêm níveis consideráveis de compostos bioativos. A quantidade de tais fenólicos nos frutos se dá devido ao grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, geográfica localização e as condições de armazenamento, entre outros fatores (Belitz *et al.*, 2009).

Os compostos bioativos são classificados principalmente de acordo com o número de anéis que contêm fenol (ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas, flavonóides e taninos). Todas estas substâncias têm um ou mais grupos hidroxila diretamente ligados a um anel aromático, assim caracterizando uma estrutura fenólica (Vermerris & Nicholson, 2006).

Os compostos fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o elágico. Esses compostos são importantes na dieta alimentar para a diminuição da peroxidação lipídica (Halliwell et al., 1995). Os flavonóides miricetina, quercetina e rutina foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio - H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (Noorozi et al., 1998).

Os flavonóides são os principais compostos bioativos encontrados em frutas e estão distribuídos em seis subclasses: flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanols, flavonas e antocianinas. Os flavonóides representam cerca de dois terços dos os fenóis alimentares (Robbins, 2003)

O segundo grupo mais importante de fitoquímicos compreende os ácidos fenólicos, que representam quase o restante terço dos polifenóis, e que estão presentes em frutas em uma forma ligada e apresentam um carácter ácido devido à presença de um grupo carboxílico na molécula (Annie & Jean-Jacques, 2003). Estas substâncias são divididas em dois subgrupos: hidroxibenzoico (gálico, vanílico, elágico, ácidos sirínico, entre outros) e os ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico, ácido p-cumárico, cafeico, entre outros).

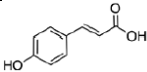
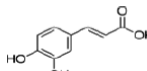
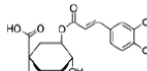
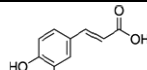
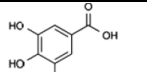
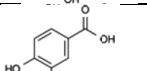
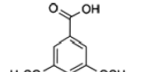
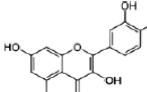
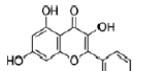
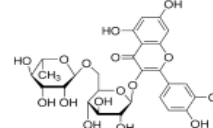
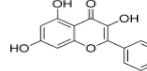
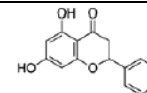
Taninos são a terceira classe de polifenóis encontrados em frutas, em sua maioria são fenólicos polímeros. São substâncias adstringentes e amargas de diferentes pesos moleculares, e alguns deles são solúveis em água (Schofield et al., 2001).

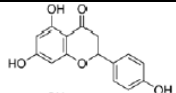
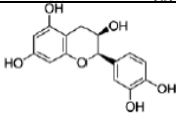
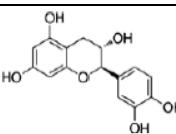
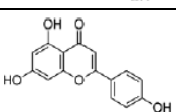
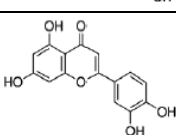
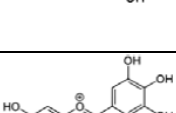
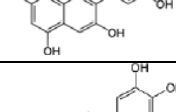
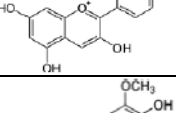
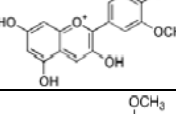
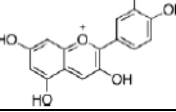
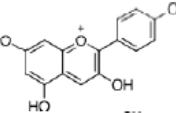
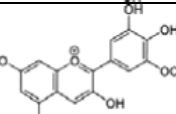
Estilbenos são um grupo hidrocarbonetos aromáticos de fórmula $C_{14}H_{12}$. São polifenóis naturais presentes em muitas famílias de plantas superiores (por exemplo, o trans-resveratrol da uva) (Goyal et al., 2012).

O quinto grupo de polifenóis é composto por lignanas, uma grande variedade de estruturas individuais, composta principalmente de duas porções ligadas por meio de sua fenilpropanóides da cadeia lateral de carbono (Aehle et al., 2011). São pouco encontradas em frutos, geralmente presentes em baixas concentrações em morangos (Meagher & Beecher, 2000). A maior quantidade destes compostos químicos é encontrada em linhaça (Moreno-Franco et al., 2011).

A composição dos compostos fenólicos em frutas varia consideravelmente. As frutas são fontes ricas de flavonóides e ácidos fenólicos. Vários estudos evidenciam que o consumo regular de frutos está relacionado à prevenção de várias doenças, devido a ingestão de polifenóis os quais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais fontes alimentares de polifenóis em frutas

Classe	Sub-Classe	Nome	Estrutura química	Fonte/frutos
Ácidos fenólicos	ácidos hidroxicinâmicos	Ácido p-cumárico		Laranja, groselha preta
		Ácido caféico		Carambola, mamão, pêsego, abacate
		Ácido clorogênico		Pêra, kiwi, maracujá, pêsego, mirtilo
		Ácido ferrúlico		Manga, araçá, mamão, abacaxi
	Ácidos hidroxibenzoico	Ácido gálico		Banana, pitaya, abacate
		Ácido vanílico		Abacate, morango
Ácido siríngico			Morango, uva	
Flavonóis	Flavonóis	Quercetina		Maracujá, jaca, romã, camu-camu
		Kaempferol		Figo, Cambuci
		Rutina		Uva tinta, Ameixa seca, blueberry
		Miricetina		Maçã, mamão
	Flavanonas	Hesperitina		Laranja, pomelo

Flavonoides		Naringenina		Laranja, pomelo	
	Flavanas	Epicatequina		Abacate, araçá amarelo	
		Catequina		Uva tinta, cereja	
	Flavonas	Apigenina		Manga, tangerina, durian	
		Luteolina		Limão, abacaxi, ameixa, Melancia, Laranja	
	Antocianinas	delfinidina		Pomelo, groselha, mirtilo	
		Cianidina		Framboesa, romã, acerola	
		Malvidina		Uva tinta, mirtilo,	
		Peonidina		Mirtilo, groselha preta	
		Pelargonidina		Morango, framboesa, manga verde	
		Petunidina		Maçã, mirtilo	
	Estilbenos	-	Resveratrol		Uva tinta, morango, cranberry

FONTE: Haminiuk *et al.*, 2012.

A extração dos compostos fenólicos é influenciada por vários parâmetros como temperatura, tempo, polaridade do solvente, entre outros, devido a isso se faz necessário selecionar as condições de extração mais adequadas. A preparação das amostras

desempenha um papel importante na quantificação de fitoquímicos das plantas, e é o processo mais importante, pois influencia na repetibilidade e precisão da análise (Zhao et al., 2011).

Para se obter uma boa extração recomenda-se que testar diferentes parâmetros, tais como: o solvente, agitação, tempo de extração, a razão de soluto/solvente, temperatura, a eficiência de transferência de massa e o tamanho das partículas, por exemplo (Haminiuk *et al.*, 2011).

Uma quantificação adequada de compostos bioativos é de importância crucial para a composição de tais compostos nos frutos. Uma das principais metodologias utilizadas para quantificar os compostos bioativos em frutas sé o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu que estima o total de polifenóis (Haminiuk *et al.*, 2011).

A quantificação de compostos fenólicos por espectrofotometria envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos contidos nos extratos das amostras com formação de complexo azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 760nm, tal coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Naczka & Shahidi, 2004).

Numerosos compostos redutores que não necessariamente precisam ter natureza fenólica podem interferir na quantificação de polifenóis quantificados pelo método colorimétrico (Haminiuk, *et al.*, 2011).

Flavonóides são susceptíveis a hidrólise dependendo a qual açúcar estão ligados, devendo-se levar em consideração a composição de solvente, tempo de extração, concentração do ácido empregado, temperatura de extração entre outros (Hoffmann-Ribani & Rodriguez-Amaya, 2008).

O teor total de flavonóides em frutas é estimado principalmente por um método colorimétrico realizado pela reação de cloreto de alumínio, nitrito de sódio e hidróxido de sódio. Nesta metodologia, o extrato de fruta é adicionado numa solução metanólica de cloreto de alumínio. A desvantagem desta metodologia é que ele só dá uma estimativa do total teor de flavonóides (Ignat et al., 2011). No entanto, esta é uma metodologia simples e eficiente para tal quantificação.

É importante avaliar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos encontrados nos frutos, a atividade antioxidante pode ser verificada por meio de determinação de compostos hidrofílicos e lipofílicos em extratos de frutos (Pulido, Hernandez-Garcia & Saura-Calixto, 2003).

Muitos métodos têm sido utilizados para avaliar e comparar a atividade antioxidante de frutas devido à complexidade dos substratos analisados (Szabo et al., 2007). A capacidade antioxidante é avaliada principalmente através de testes químicos.

Um dos testes mais utilizados para tal avaliação é o método que determina compostos hidrofílicos, o DPPH, ele determina o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados ou presentes em alimentos, é baseado na capacidade do radical livre, 1,1-difenil-2-picrilidrazil, reagir com compostos doadores de H^+ , o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia. O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento, mas não reage com flavonoides. É um radical que produz uma solução violeta a qual é reduzida na presença de antioxidantes (Yokozawa *et al.*, 1998; Von Gadow, Joubert & Hansmann, 1997).

2. METODOLOGIA

2.1. *Materiais*

Serão utilizados extratos de resíduos da casca e sementes de uva tinta derivados do processamento de suco de uva integral e extrato de suco de uva tinta integral.

2.2. *Extração dos Compostos Fenólicos*

A metodologia de extração de compostos fenólicos de frutas foi proposta por Rufino et al. (2010).

- Pesar 5g da amostra;
- Adicionar ao tubo 20 ml de solução metanol:água deionizada (50:50, v/v);
- Levar os tubos para agitação contínua, por 1h. Após este período, centrifugar a 6000 rpm por 15 min (temperatura ambiente);
- Pipetar o sobrenadante (**extrato 1**) e guardar o mesmo em recipiente bem tampado, ao abrigo da luz e em geladeira.

- Ao resíduo desta extração (o que ficou no fundo do tubo), adicionar 20ml de solução acetona:água deionizada (70:30, v/v).

- Repetir os processos de agitação por 1h e centrifugação. Realizar a coleta do sobrenadante (**extrato 2**);

- Combinar os dois extratos em balão de 50 ml, completar o balão com água deionizada e homogeneizar.

2.3. Determinação de Compostos Fenólicos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

Metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), adaptada por Daves (2003).

AMOSTRA:

- Pipetar 30 μL de extrato diluído adequadamente em tubo de ensaio;
- Pipetar 2,370 μL de água destilada e acrescentar ao tubo;
- Pipetar 150 μL do reagente Folin-Ciocalteu;
- Após um período de 2 minutos, adicionar 450 μL de carbonato de sódio (15%).

Agitar os tubos e acondicioná-los ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por duas horas. A absorbância deve ser medida em 765 nm.

BRANCO:

- Mesmo procedimento da amostra, apenas substituir o extrato por água.
- É utilizado apenas 1 branco, para zerar o espectrofotômetro.

Será utilizada uma curva padrão de ácido gálico (Figura 1) para a quantificação dos fenóis. Os resultados serão expressos em mg de ácido gálico por 100 g^{-1} de amostra (mg GAE/100g de amostra).

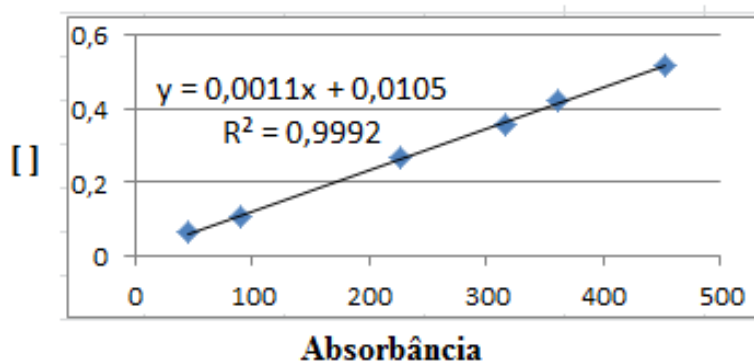


Figura 1 – Curva padrão de ácido gálico (concentração x absorbância).

2.4. *Determinação de Flavonóides Totais*

Metodologia proposta por Allothman, Bhat & Karim (2009).

• **Em cada tubo de ensaio pipetar:**

- 250 μL de amostra diluída adequadamente ou de cada padrão (No branco colocar água);
- 1000 μL água destilada;
- 75 μL NaNO_2 5% em água.

• **Após 5 min, adicionar:**

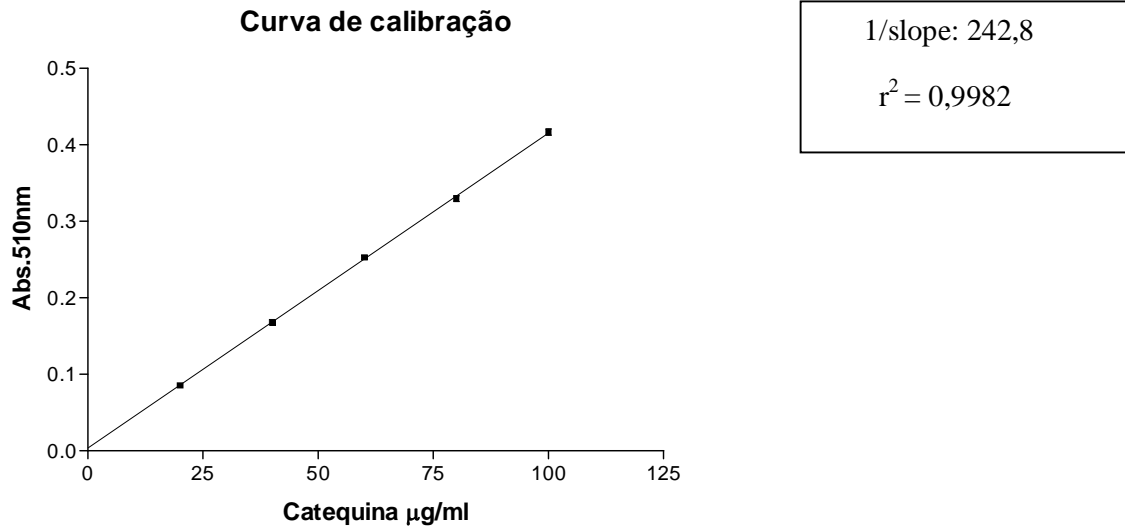
- 75 μL AlCl_3 10% em água.

• **Após 6 min, colocar:**

- 500 μL NaOH [1M];
- 600 μL de água destilada.

Agitar vigorosamente (vórtex) e ler a absorbância imediatamente a 150nm.

A catequina é utilizada como Padrão (Figura 2).



2.6. Determinação da Atividade Antioxidante - Ensaio DPPH

O método DPPH consiste na redução do radical DPPH de coloração púrpura, que, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, muda sua coloração de violeta para amarelo (difetil-piricril-hidrazina) (Figura 3), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância (Roginsky & Lissi, 2005).



Figura 3 – Redução do radical DPPH para amarelo.

A metodologia descrita a seguir foi proposta por Mensor *et al.* (2001).

Para o ensaio do DPPH deverão ser preparadas seis diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125 e 250 ppm, em etanol) do extrato, com base no valor de fenóis totais obtido previamente. BHT será utilizado como padrão na concentração de 100 ppm.

- 1) **PREPARO DO DPPH:** Diluir 0,012g de DPPH em 100mL de metanol (balão volumétrico).
- 2) **AMOSTRA:** 2,5mL de extrato de amostra + 1mL de solução DPPH;
- 3) **BRANCO:** 2,5mL de extrato de amostra + 1mL do mesmo solvente utilizado na extração (cada amostra e diluição terão seu branco para ser utilizado na escação final).
- 4) **CONTROLE (-):** 2,5mL do mesmo solvente utilizado na extração+ 1mL de solução DPPH;
- 5) **CONTROLE (+):** 2,5mL do padrão (BHT à 100ppm) + 1mL de solução de DPPH;

Após o preparo das amostras, armazená-las na ausência de luz durante 30 minutos, passado o tempo de reação medir a absorbância a 518 nm. Os valores de absorbância são utilizados para o cálculo da atividade antioxidante (%).

CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%)

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right]$$

onde $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra, Abs_{branco} é a absorbância do controle em branco e $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle negativo.

CÁLCULO DO EC₅₀

Os valores de EC₅₀ serão calculados por regressão linear de parcelas, onde a abscissa representa a concentração de extratos vegetais testados e a ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante de três ensaios separados (Sim & Sil, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLE, E., MULLER, U., EKLUND, P.C., WILLFOR, S.M., SIPPL, W. & DRAGER, B. (2011). Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, 72, 2396–2405.
- ALBUQUERQUE, C., *Aproveitamento de resíduos traz ganhos econômicos e ambientais*. Assessoria de Comunicação da Esalq, USP-Universidade de São Paulo SP, 2009.
- ALENCAR, S. M. *Esalq desenvolve pesquisa para reduzir resíduos da agroindústria*, Agrosoft, Universidade Estadual de São Paulo – USP, São Paulo SP, Brasil, 2009.
- ALOTHMAN, M., BHAT, R., KARIN, A. A. (2009). *Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*. *Food Chemistry*. 115:785-789.
- ANNIE, F. & JEAN-JACQUES, M. (2003). *Phenolic acids in fruits and vegetables. Flavonoids in Health and Disease*, 2nd edn. New York, USA: CRC Press.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. & SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- BANCO DE ALIMENTOS – *Dados da Fome*, 2006, Copyright, Disponível em: <<http://www.bancodealimentos.org.br>>.
- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. (2009). *Fruits and fruit products*. *Food Chemistry*. Pp. 807–861. Berlin: Springer.
- DAVES, J. W. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Copyright by John Wiley & Sons Inc, p. 1073-1080. California, 2003.
- GOYAL, S., LAMBERT, C., CLUZET, S., ME´ RILLON, J.M. & RAMAWAT, K.G. (2012). Secondary metabolites and plant defence. In: *Plant Defence: Biological Control* (edited by J.M.M. Me´ rillon & K.G.G. Ramawat). Pp. 109–138. Berlin: Springer.
- HALLIWELL, B., RAFTER, J. & JENNER, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect

- effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 268S–276S.
- HAMINIUK, C.W.I., PLATA-OVIEDO, M.S.V., GUEDES, A.R., STAFUSSA, A.P., BONA, E. & CARPES, S.T. (2011). Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1529–1537.
- HOFFMANN-RIBANI, R. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2008). 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*, 31, 1378-84.
- IGNAT, I., VOLF, I. & POPA, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.
- MATOS A. T., *Curso Sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais* - Fundação Estadual do Meio Ambiente, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- MEAGHER, L.P. & BEECHER, G.R. (2000). Assessment of data on the lignan content of foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 935–947.
- MENSOR, L. L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., dos SANTOS T.C., COUBE, C.S., LEITÃO, S. G. *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method*. *Phytother Res.* v.15 p.127-130, 2001.
- MORENO-FRANCO, B., GARCIA-GONZALEZ, A., MONTERO-BRAVO, A.M. ET AL.(2011). Dietary alkylresorcinols and lignans in the Spanish diet: development of the alignia database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9827–9834.
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.
- NIJVELDT, R.J. (2001) Mechanisms of Action and Potential Applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (4), 418-425.
- PULIDO, R, HERNANDEZ-GARCIA, M. & SAURA-CALIXTO, F. (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 1275–1282.
- RISPAIL, N., MORRIS, P. & WEBB, K. (2005). Phenolic compounds: extraction and analysis. In: *Lotus Japonicus Handbook* (edited by A. Marquez). Pp. 349–354. Berlin: Springer.
- ROBBINS, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866–2887.
- ROGINSKY, V. e LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235-254, 2005.
- RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. & MANCINI FILHO, J. (2010). Bioactive compounds and

- antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.
- SCHOFIELD, P., MBUGUA, D.M. & PELL, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 21–40.
- SIM, K.H. e SIL, H.Y. *Antioxidant activities of red pepper (Capsicum annuum) pericarp and seed extracts*. *International journal of food and science technology* v. 43, n°. 10, p. 1813-1823, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, p.144–158, 1965.
- SOARES, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidants. *Rev. Nutr.*, 15, 1, 71-81.
- SZABO, M., IDITOIU, C., CHAMBRE, D. & LUPEA, A. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61, 214–216.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & BYRNE, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. (2006). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic Compound Biochemistry*. Pp. 1–34. Berlin: Springer.
- VON GADOW, A., JOUBERT, E. & HANSMANN, C. F. (1997). Comparison of antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 632-38.
- YOKOZAWA, T., CHEN, C. P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G. I. & NISHIOKA, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56, 213–22
- ZHAO, J., LV, G.P., CHEN, Y.W. & LIS, P. (2011). Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7453–7475.