

Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão

Phenolic compounds in foods – A brief review

RIALA6/1095

Priscila Milene ANGELO¹, Neuza JORGE²

* Endereço para correspondência: UNESP – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jd. Nazareth 15054-000, São José do Rio Preto/SP. Telefone (17) 3221-2200 Ramal: 2715, e-mail: pmileneangelo@yahoo.com.br.

¹ Mestranda em Engenharia e Ciência dos Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Bolsista FAPESP*.

² Prof^a. Dr^a. do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

Recebido: 27/01/2006 – Aceito para publicação: 17/07/2006

RESUMO

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural. Considerando-se a importância dos compostos fenólicos, o presente trabalho apresenta uma revisão sobre os fenólicos mais comuns em plantas e as principais metodologias usadas em análises de alimentos, na identificação e quantificação desses compostos. Há ainda a necessidade de estabelecer uma investigação sistemática para preparação de amostra e na determinação de fenólicos em alimentos, uma vez que as metodologias correntemente utilizadas para a análise de fenólicos não são totalmente padronizadas, tampouco divulgadas por órgãos oficiais.

Palavras-chave. compostos fenólicos, flavonóides, ácidos fenólicos, análises de fenólicos.

ABSTRACT

Phenolic compounds are chemical structures that are composed of hydroxyls and aromatic rings, in a simple or polymery forms, which confer antioxidant characteristic. These products can be natural or synthetic. Phenolic compounds may be found in vegetables, and in free form or bound to sugars and proteins. Among them, flavonoids, phenolic acids, tannins, and tocopherols are pointed out as the most common natural source of anti-oxidant phenolics. Taking into account of the importance of phenolic antioxidants, this study presents a review on the most common phenols in plants as well as the main methodologies to be employed for identifying and quantifying those compounds in foods. Furthermore, it is still under the necessity of a systematic investigation for performing phenolic sample preparation and for determining phenolic compounds in foods, since the methodologies currently used for analyzing phenolic component have not been totally standardized, and have not been made public by official organizations.

Key words. phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, phenolic analyses.

INTRODUÇÃO

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de ervas como alecrim¹, coentro², sálvia³, tomilho e manjerição⁴ têm sido estudados devido o poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos⁵.

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros⁶.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos⁷.

Esses compostos encontram-se largamente em plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação⁸. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma⁹ e estabilidade oxidativa⁶.

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas à exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos¹⁰.

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais⁴. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis⁸.

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas¹¹.

Ribéreau-Gayon¹² classificou estes compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina¹³.

Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Este grupo, pode-se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas¹⁴.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lípídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete¹⁵.

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação¹⁶.

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autooxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio¹⁷. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos^{16,18}.

Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer^{19,20}.

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis¹⁰.

Considerando a abundância na natureza e a importância dos compostos fenólicos devido a sua influência na qualidade dos alimentos, este trabalho apresenta uma revisão sobre compostos fenólicos e as principais metodologias usadas em análises de alimentos.

Tipos de compostos fenólicos

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 1^{21,22}. Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural¹⁴.

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆²².

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 1). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina²³. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas²⁴. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides²⁴. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação²⁴.

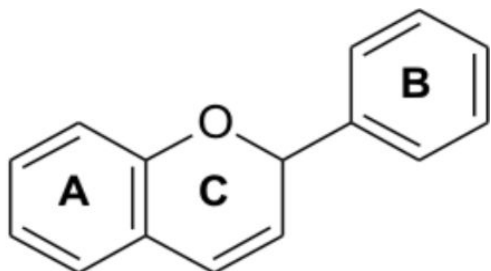
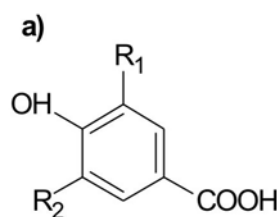


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais¹³.

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 2). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C₆-C₁²⁶; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns¹¹.

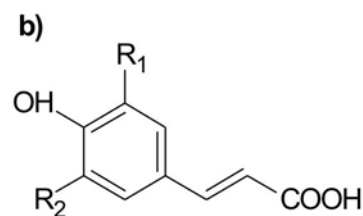


Ácido p-hidroxibenzóico: R₁ = R₂ = H

Ácido protocatecuico: R₁ = OH, R₂ = H

Ácido vanílico: R₁ = OCH₃, R₂ = H

Ácido siríngico: R₁ = R₂ = OCH₃



Ácido p-cumárico: R₁ = R₂ = H

Ácido caféico: R₁ = OH, R₂ = H

Ácido ferúlico: R₁ = OCH₃, R₂ = H

Figura 2. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Os ácidos sinápticos, ferúlico e p-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatecuico, siríngico e vanílico²⁶. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica²⁷.

Os taninos possuem o peso molecular relativamente alto, constituem uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura

química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis²⁸.

Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (Figura 3). As proantocianidinas, assim denominadas, provavelmente pelo fato apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos²⁹.

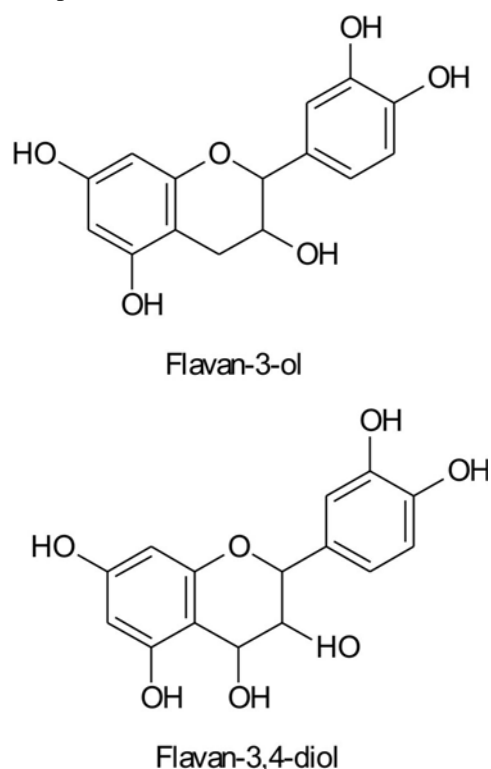


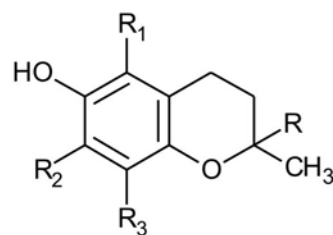
Figura 3. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenólico do ácido hexaidroxidifenólico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos^{14,30,31}.

Os tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que possuem atividade antioxidante e de vitamina E. Eles estão agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis (Figura 4). Os compostos da série tocóis possuem em cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis, enquanto que os da série tocotrienóis possuem cadeia

insaturada¹⁶. A nomenclatura desses compostos recebem o prefixo de α , β , γ , δ dependendo do número e posição do grupo metila ligado ao anel aromático. O α -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E³².

A atividade antioxidante dos tocoferóis decresce do composto δ para o α -tocoferol, assim, o δ -tocoferol é o mais efetivo antioxidante, o β e γ -tocoferol têm atividade intermediária e o α -tocoferol apresenta a mais baixa atividade antioxidante^{32,33}.



α - toco: $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

β - toco: $R_1 = R_3 = CH_3 = CH_3$; $R_2 = H$

γ - toco: $R_2 = R_3 = CH_3$; $R_1 = H$

δ - toco: $R_1 = R_2 = H_3$; $R_3 = CH$

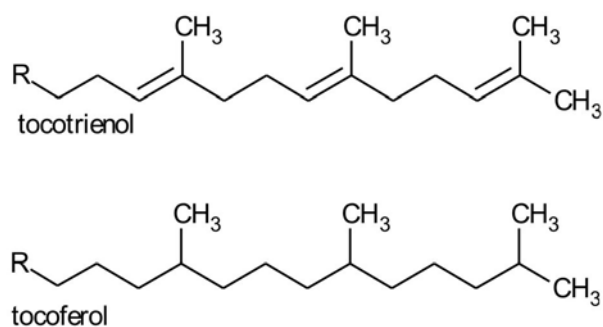


Figura 4. Estrutura química do tocoferol e tocotrienol.

Análise e quantificação de fenólicos

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas¹⁴.

Os métodos realizados em análises de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos³⁴.

A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o

tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas⁸.

Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações⁶.

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido a complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes³⁵.

Métodos espectrofotométricos

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos têm sido desenvolvidos. Esses métodos são baseados em diferentes princípios e são usados para quantificar fenólicos totais^{36,37}, determinar um composto fenólico específico^{37,38} ou uma classe de fenólicos^{39,40}.

O método de Folin-Denis é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais⁸. Este método descrito por Swain e Hillis³⁷ baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados.

Um aspecto importante a ser considerado neste método é a escolha do padrão. Os mais utilizados têm sido o ácido tânico e a catequina, entretanto, estes compostos apresentam reatividades diferentes frente ao reagente de Folin-Denis⁴¹.

Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu⁴². Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença de ácido hidrocloreídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin-Ciocalteu^{39,43}.

Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH

alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato⁸.

Este método espectrofotométrico, independente do tipo de reagente utilizado, Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo aquelas proteínas extraíveis. Outra desvantagem é a interferência de reduzir substâncias como ácido ascórbico⁶.

Price e Butler³⁶ desenvolveram um método fundamentado na redução do íon férrico a íon ferroso pelas hidroxilas fenólicas, seguido pela formação de um complexo de ferrocianeto ferroso, conhecido como azul da Prússia, que apresenta um máximo de absorção a 720 nm. A habilidade dos compostos fenólicos reduzirem o íon férrico depende da hidroxilação e do grau de polimerização destes compostos. Além da falta de especificidade, este método apresenta problemas como a instabilidade de soluções diluídas de cloreto férrico, aumento da absorbância na presença de solventes orgânicos e a impregnação da cor azul na vidraria utilizada, inclusive nas cubetas do espectrofotômetro.

O teste da vanilina, descrito por Swain e Hillis³⁷, é largamente utilizado para quantificar proantocianinas (taninos condensados) em vegetais⁷, particularmente em grão⁴⁴. Baseia-se na reação da vanilina a 1% com o fenólico em meio fortemente ácido, um composto colorido com máximo de absorção a 500 nm⁴⁵. Este teste é específico para flavan-3-ols, di-hidrochalconas e proantocianinas que possuem uma ligação simples na posição 2-3 e uma hidroxila livre na posição meta do anel B⁴⁶.

Price et al.⁴⁰ estudaram sobre o uso do teste de vanilina para a determinação de taninos. Os autores recomendaram um tempo mais curto na extração das amostras, a redução da concentração da vanilina (0,5%) e do ácido clorídrico (4%), a fixação da temperatura em 30°C e a utilização do extrato o mais rápido possível. Além disso, mostraram que a inclinação da curva na reação entre a catequina e a vanilina é diferente do que entre o tanino e a vanilina e que ao se utilizar a catequina como padrão para a dosagem de taninos estes são superestimados.

Dentre os métodos de dosagem dos taninos que fazem uso da complexação com proteínas, o de Hagerman e Butler⁴⁷ tem sido o mais utilizado. Através da adição de uma solução padrão de proteína ao extrato contendo tanino forma-se um complexo que após separação por centrifugação é dissolvido com dodecil sulfato de sódio (SDS) em meio alcalino. Adiciona-se solução de cloreto férrico que reage com o tanino formando um composto colorido com um máximo de absorção a 510nm. A absorbância é uma função linear do teor de tanino ou de ácido tânico para quantidades que variam de 0,20 a 1,00mg.

Vários estudos foram realizados para desenvolver um método espectrofotométrico UV simples e satisfatório⁴⁸. Os fenólicos simples possuem absorção máxima entre 220 e 280nm⁴⁹, porém sua absorção é afetada pela natureza do solvente empregado e o pH da solução. Além disso, a possibilidade de

interferência dos raios UV sobre proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos devem ser considerados. Diante disso, o desenvolvimento de um UV satisfatório é uma tarefa difícil, além do material a ser analisado. Ambas as técnicas, espectrofotométricas UV e espectroscópicas visíveis, são freqüentemente usados para identificação de combinações fenólicas isoladas, particularmente flavonóides e também para identificar a presença de combinações fenólicas predominantes³⁵.

Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos também são muito úteis na análise de fenólicos em alimentos. Estes métodos podem ser utilizados para determinar o potencial redutor de compostos fenólicos, identificar mecanismos de oxidação, identificar flavonóides através da comparação com um padrão e determinar o potencial redutor de um fenólico desconhecido. O conhecimento do potencial redutor é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois fenólicos oxidados podem afetar negativamente a qualidade de vinhos, cervejas, sucos de uva, etc^{8,50,51}.

Métodos cromatográficos

A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas usadas tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos. A elucidação de estruturas tem sido realizada através da combinação de GC e CLAE com a espectrometria de massa, além de outras técnicas relevantes⁸.

Diversas técnicas de CG têm sido empregadas na separação e quantificação de ácidos fenólicos^{52,53}, isoflavonas⁵⁴, aldeídos fenólicos⁵⁵ e monômeros de taninos condensados⁵⁶. Inovações na CG como colunas de alta temperatura, controladores de pressão e detectores eletrônicos melhoraram significativamente a resolução e também têm aumentado o alcance de substâncias de alto peso molecular que podem ser analisadas por GC. A preparação de amostras para CG poder incluir a remoção de lipídios do extrato, liberação de fenólicos de éster e glicosídeo titulados por álcali^{52,53}, ácidos e hidrólises enzimáticas⁵⁴.

Há algumas metodologias descritas para a análise de compostos fenólicos por cromatografia a gás, baseada nas suas características de polaridade. Os ácidos fenólicos, muito presentes em especiarias, são substâncias que possuem alta polaridade e baixa pressão de vapor. Tais características levaram alguns autores a descrever processos distintos para derivatização e condições de análises cromatográficas, objetivando uma melhor técnica de isolamento e caracterização destes compostos⁷.

As técnicas de CLAE são extensamente usadas tanto na separação quanto na quantificação de combinações fenólicas. Várias fases móveis estão disponíveis para a análise de antocianinas, procianidinas, flavononas e flavonóis, flavonas e ácidos fenólicos^{57,58}. A introdução de colunas de fase reversa na CLAE tem consideravelmente realçado a separação de diferentes classes de combinações fenólicas^{59,60}.

Em uvas, vinhos e sucos a análise dos compostos fenólicos individuais é comumente realizada por CLAE^{61,62}.

A CLAE com detector eletroquímico tem sido satisfatoriamente aplicada na detecção, identificação e quantificação de flavonóides e não flavonóides em vinho⁶³. De acordo com Chaviari, Concialini e Galletti⁶⁴, o detector eletroquímico é uma alternativa útil em relação à detecção UV, pois é mais seletivo.

McMurtrey et al.⁶⁵ desenvolveram um método que consiste na aplicação direta de CLAE utilizando coluna de fase reversa e detector eletroquímico para a quantificação de resveratrol em vinhos. Este método mostrou-se bastante sensível para a análise de trans-resveratrol e diminuiu consideravelmente o tempo necessário para a realização das análises já que as amostras não passaram por nenhum pré-tratamento.

Alto desempenho da CLAE em combinação com a espectrometria de massa tem sido comumente utilizado para caracterização estrutural de fenólicos. A espectrometria de massa também tem sido empregada para confirmação estrutural de fenólicos em ameixas, pêssegos, nectarinas⁶⁶, cacau⁶⁷, azeite de oliva⁶⁸ e em outros alimentos, tendo estes trabalhos demonstrados que há complexação de flavonóides com Cu²⁺.

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa também tem sido utilizada na quantificação de resveratrol em vinhos^{69,70}.

Outras técnicas cromatográficas tais como as cromatografias em papel e em camada delgada são bastante utilizadas na purificação e isolamento de antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos em alimentos^{71,72,73}.

Outros métodos usados para a detecção de fenólicos é a técnica de detecção de reação química⁷⁴ e detector fluorimétrico⁷⁵.

CONCLUSÃO

As diversas publicações sobre análises de fenólicos em alimentos surgiram há muitos anos. Entretanto, não há ainda disponível um método padronizado para preparação de amostra e extração. Portanto, há necessidade de uma investigação sistemática para preparação de amostra e determinação de fenólicos em alimentos, seja quantificação total, individual e/ou de um grupo ou classe de componentes fenólicos. Além disso, as metodologias utilizadas para análise de fenólicos não são totalmente padronizadas, sendo deste modo, de extrema importância o desenvolvimento e divulgação de métodos por órgãos oficiais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado, processo 05/52732-9.

REFERÊNCIAS

1. Ramalho V.C. Ação antioxidante de α -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação [Dissertação de Mestrado]. São José do Rio Preto, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2005. 154 pp.
2. Melo EA, Mancini-Filho J, Guerra NB, Maciel GR. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). *Ci Tecnol Aliment* 2003; 23 (suppl): 195-9.
3. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem* 2001; 75 (2): 197-202.
4. Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 2005; 91(1): 131-7.
5. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (5): 1801-12.
6. Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054 (1/2): 95-111.
7. Moreira AVB, Mancini-Filho J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutr* 2004; 17 (4): 411-24.
8. Shahidi F, Naczek M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.
9. Peleg H, Bodine KK, Noble AC. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. *Chem Senses* 1998; 23 (3): 371-8.
10. Pimentel CVMB, Francki VM, Gollücke APB. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.
11. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutr Rev* 1998; 56 (11): 317-33.
12. Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod; 1968.
13. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15 (1): 71-81.
14. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 1999; 50 (2): 213-8.
15. Adegoke GO, Vijay Kumar M, Gopala Krishna AG, Varadaraj MC, Sambaiah K, Lokesh BR. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol* 1998; 35 (4): 283-398.
16. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992; 32 (1): 67-103.
17. Decker EA. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol* 1998; 9 (6): 241-8.
18. Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL. Lipid oxidation in biological and foods systems. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editores. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 5-62.
19. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 29 (4): 273-300.
20. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Nutr* 1995; 6 (3): 75-82.
21. Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne JB, editor. Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 1-28.
22. Harborne JB, Baxter H, Moss GP, editores. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.
23. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (3): 577-99.
24. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37 (9/10): 937-42.
25. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63 (7): 1035-42.
26. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99 (1): 191-203.
27. Wanasundara U, Amarowicz R, Shahidi F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *J Agric Food Chem* 1994; 42 (6): 1285-90.
28. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem* 2007; 100 (2): 579-83.
29. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova* 2005; 28 (5): 892-6.
30. Burns RE, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolics content of red wines. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (2): 220-30.
31. Porter LG. Tannins. In: Harborne JB, editor. Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 389-419.
32. Six P. Current research in natural food antioxidants. *Food Technol* 1994; 5 (6): 679-87.
33. Hemeda HM, Klein BP. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J Food Sci* 1990; 55 (1): 184-5.
34. Moure A, Cruz JM, Franco D; Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72 (2): 145-71.

35. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton: CRC Press; 1990.
36. Price ML, Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1977; 25 (6): 1268-70.
37. Swain T, Hillis WE. The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10 (1): 63-8.
38. Burns RE. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agron J* 1971; 63: 511-2.
39. Brune M, Hallberg L, Skanberg AB. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *J Food Sci* 1991; 56(1): 128-130.
40. Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (5): 1214-8.
41. Coelho JV. Fenólicos totais e taninos durante o desenvolvimento e o armazenamento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tese de Doutorado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1987. 151 pp.
42. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16 (3): 144-6.
43. Maxson ED, Rooney LW. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem* 1972; 49: 719-22.
44. Goldstein JL, Swain T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 1963; 2 (4): 371-5.
45. Broadhurst RB, Jones WT. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric* 1978; 29: 788-90.
46. Sarkar SK, Howarth RE. Specificity of vanillin test for flavonols. *J Agric Food Chem* 1976; 24 (2): 317-9.
47. Hagerman AE, Butler LG. Protein precipitation method for the quantitative determinations of tannins. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (4): 809-12.
48. Hoff JF, Singleton KI. A method for determination of tannin in foods by means of immobilized enzymes. *J Food Sci* 1977; 42 (6): 1566-70.
49. Owades JL, Rubin G, Brenner MW. Determination of food tannins by ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem* 1958; 6 (1): 44-8.
50. Aaby K, Hvattum G, Skrede G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (15): 4595-603.
51. Mattila P, Astola J, Kumpulainen J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (12): 5834-41.
52. Dabrowski JK, Sosulski FW. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1984; 32 (1): 123-7.
53. Krygier K, Sosulski F, Hogge L. Free esterified and bound phenolic acids. Extraction and purification. *J Agric Food Chem* 1982; 30 (2): 330-4.
54. Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham SA. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 1998; 264 (1): 1-7.
55. Friedman M, Kozukue N, Harden LA. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (11): 5702-9.
56. Hemes PJ, Hedges JI. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. *Anal Chem* 2000; 72 (20): 5115-24.
57. Gómez-Alfonso S, Salvador MD, Fregapane J. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (23): 6812-7.
58. Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. Phenolic compounds of the mesocarp of cresthaven peaches during storage and ripening. *J Food Sci* 1989; 54 (5): 1259-62.
59. Ricardo da Silva JM, Rosec JP, Bourzeix M; Heredia N. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *J Sci Food Agric* 1990; 53 (1): 85-92.
60. Tarnawski M, Depta K, Grejciun D, Szelepin B. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract – a natural immunomodulator. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41 (1):182-8.
61. Lamuela-Raventós RM, Romero-Perez AI, Waterhouse AL, Torre-Boronat MC. Direct HPLC analysis of cis and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem* 1995; 43 (2): 281-3.
62. Oszmianski J, Lee CY. Isolation and HPLC determinations of phenolic compounds in red grapes. *Am J Enol Vitic* 1990; 41 (3): 204-6.
63. Woodring PJ, Edwards PA, Chisholm MG. HPLC determination of non-flavonoid phenols in vidal blanc wine using electrochemical detection. *J Agric Food Chem* 1990; 38 (3): 729-42.
64. Chaviari G, Concialini V, Galletti GC. Electrochemical detection in the high performance liquid chromatographic analysis of plant phenolics. *Analyst* 1988; 113 (1): 91-4.
65. McMurtrey KD, Minn J, Pobanz k, Schultz TP. Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem* 1994; 42 (10): 2077-80.
66. Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (10): 4748-60.
67. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (2): 490-6.

68. Romero C, Brenes M, Garcia P, Garrido A. Hydroxytyrosol 4-b-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (13): 3835-9.
69. Goldberg DM, Yan J, Ng E, Diamandis EP, Karumanchiri A, Soleas G et al. Direct injection gas chromatographic mass spectrometric assay for trans-resveratrol. *Anal Chem* 1994; 66 (22): 3959-63.
70. Martínez-Ortega MV, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chem Acta* 2004; 502 (1): 49-55.
71. Mazza G. Anthocyanins and other phenolic compounds of Saskatoon berries. *J Food Sci* 1986; 51 (5): 1260-4.
72. Schmidtlein H, Herrmann K. Quantitative analysis for phenolic acids by thin-layer chromatography. *J Chrom* 1975; 115 (1): 123-8.
73. Schulz JM, Herrmann K. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. I. Sample preparation and thin-layer chromatography. *J Chrom* 1980; 195 (1): 85-94.
74. Pascual-Teresa S, Treutter D, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *J Agric Food Chem* 1998; 46 (10): 4209-13.
75. Carando S, Teissedre PL, Pascual-Martinez L, Cabanis JC. Levels of flavan-3-ols in french wines. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (10): 4161-6.