



ISSN: 2230-9926

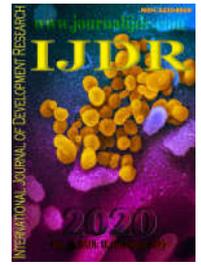
Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 11, pp. 42364-42367, November, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.20408.11.2020>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES MACROMOLECULARES: ESTUDO COM FRUTAS TROPICAIS BRASILEIRAS

Maria do Socorro Moura Rufino^{1,2,*}, Joilna Alves da Silva¹, Francisco Acácio de Sousa¹, Antônio Maurício Sousa Lima¹ and Isla Simplicio Teixeira²

¹Programa de mestrado acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS), Universidade Internacional Integração da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção-CE, Brasil.

²Instituto de Desenvolvimento Rural (IDR), Universidade Internacional Integração da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção-CE, Brasil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 03rd August, 2020

Received in revised form

07th September, 2020

Accepted 19th October, 2020

Published online 30th November, 2020

Key Words:

validação Analítica,
Frutas Tropicais,
Macroantioxidantes.

*Corresponding author:

Maria do Socorro Moura Rufino

ABSTRACT

Frutas e hortaliças são fontes importantes de compostos bioativos, dentre estes os polifenóis que compreendem o maior grupo nos vegetais, tendo-lhes sido atribuído várias propriedades biológicas benéficas à saúde. Descobertas recentes mostraram que os alimentos vegetais contêm quantidades abundantes de outros tipos de antioxidantes de alto peso molecular, denominados antioxidantes macromoleculares (MACAN), com propriedades promissoras relacionadas à saúde gastrointestinal. Estes podem ser divididos principalmente em duas frações: polifenóis hidrolisáveis (HPP), que são compostos fenólicos de baixo peso molecular fortemente associados a polissacarídeos ou proteínas; e proantocianidinas não extraíveis (NEPA), que são estruturas de alto peso molecular. Este trabalho tem como escopo apresentar a metodologia analítica de determinação do conteúdo de antioxidantes macromoleculares, onde o arcabouço teórico apresenta a metodologia original desenvolvida por Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2015), com adaptações às nossas frutas tropicais brasileiras. A metodologia MACAN mostrou-se eficiente quando validada em frutas tropicais brasileiras, podendo ser integrada entre os diferentes grupos de frutas tropicais

Copyright © 2020, Maria do Socorro Moura Rufino et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Maria do Socorro Moura Rufino, Joilna Alves da Silva, Francisco Acácio de Sousa, Antônio Maurício Sousa Lima and Isla Simplicio Teixeira. "Validação de metodologia analítica para determinação de antioxidantes macromoleculares: estudo com frutas tropicais brasileiras", *International Journal of Development Research*, 10, (11), 42364-42367.

INTRODUCTION

Um maior consumo de frutas e hortaliças tem sido relacionado, com diferentes níveis de evidência, a reduções no risco de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e algumas doenças cognitivas (Estruch *et al.*, 2013). Entre os diferentes componentes responsáveis por esses efeitos benéficos, os fitoquímicos e, em particular os polifenóis, apresentam um papel importante na composição nutricional de diversos alimentos. Os polifenóis são uma família de centenas de compostos antioxidantes constituídos por diferentes subclasses (flavonóides, ácidos fenólicos, stilbenos, lignanas e outros), para os quais vários possuem efeitos sobre a saúde, tais como a prevenção de diferentes doenças crônicas foram amplamente relatados (Del Rio *et al.*, 2013; González *et al.*, 2011).

No entanto, a maioria dos estudos de polifenóis baseia-se em centenas de polifenóis subestimados, porque incluem apenas os polifenóis que se encontram nos sobrenadantes derivados de extrações aquoso-orgânicas de alimentos, ou seja, polifenóis extraíveis (EPP), que nos estudos são considerados o teor de polifenóis totais. No entanto, pesquisas relatam que uma fração significativa de polifenóis permanece nos resíduos das extrações de polifenóis, denominados polifenóis não extraíveis (NEPP) ou antioxidantes macromoleculares (MACAN) (Arranz, *et al.*, 2009). São chamados de MACAN, devido a algumas características diferenciais específicas que possuem, tais como: polifenóis poliméricos ou polifenóis simples ligados a constituintes de alimentos macromoléculas; não são extraídos por procedimentos aquosos-orgânicos comuns; são acessíveis e biodisponíveis apenas no intestino grosso.

Em contraste, os polifenóis solúveis (EPP) são principalmente estruturas de baixo peso molecular, solúveis em misturas aquoso-orgânicas e potencialmente biodisponíveis no intestino delgado (Pérez-Jiménez, *et al.*, 2013). Ressalta-se que as duas classes apresentam uma capacidade antioxidante significativa. O MACAN pode ser dividido principalmente em duas frações: polifenóis hidrolisáveis (HPP), que são compostos fenólicos de baixo peso molecular fortemente associados a polissacarídeos ou proteínas; e proantocianidinas não extraíveis (NEPA), que são estruturas de alto peso molecular. Apesar de o MACAN ter sido comumente ignorado na análise química, quando os alimentos vegetais são consumidos, tanto o EPP quanto o MACAN são ingeridos. Isso implica que os efeitos relatados sobre a saúde de polifenóis alimentares podem ser devidos, pelo menos parcialmente, ao MACAN. Na verdade, esses macroantioxidantes atingem o cólon intactos onde produzem diferentes metabólitos biodisponíveis através da ação da microbiota intestinal (Choy, Jagers, *et al.*, 2013; Mateos-Martín *et al.*, 2012). Embora os estudos sobre os efeitos do MACAN acerca da saúde sejam escassos, eles mostraram resultados promissores em relação à saúde gastrointestinal, incluindo câncer colorretal (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

Os antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos têm sido cada vez mais estudados quanto à sua eficácia e emprego (SHAHIDI, 1997). Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo frequente de antioxidantes naturais está associado com a baixa incidência de doenças degenerativas incluindo o câncer, inflamações, artrites, declínio do sistema imune, disfunção cerebral, doenças cardiovasculares, diabetes, mal de Alzheimer e alguns tipos de catarata (OLIVEIRA *et al.*, 2011). As frutas, principalmente as que apresentam a coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares (VASCO *et al.*, 2008). A uva representa uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinase flavonóides), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000). Em função da elevada atividade antioxidante que possuem, esse grande e complexo grupo de metabólitos secundários faz parte dos constituintes de uma variedade de frutas, hortaliças e produtos industrializados. De acordo com Souza (2008), os sucos de uva possuem um maior teor de compostos fenólicos glicosilados em relação aos vinhos e por isso podem ser mais facilmente absorvidos pelo organismo do que suas respectivas agliconas. Sendo o suco de uva uma fonte apreciável de compostos fenólicos, diversos estudos têm demonstrado o seu potencial antioxidante e sugerem que o seu consumo habitual pode se relacionar a menores riscos de desenvolvimentos de doenças crônicas (O'BYRNE *et al.*, 2002).

A pesquisa sobre polifenóis concentra-se no estudo de uma fração de polifenóis alimentares que permanecem nos resíduos das extrações de polifenóis, os chamados polifenóis não extraíveis ou macroantioxidantes (PÉREZ-JIMÉNEZ; *et al.*, 2015). Os antioxidantes macromoleculares ou macroantioxidantes têm uma alta atividade biológica e antioxidante e exibem propriedades promissoras relacionadas à saúde. O seu maior tamanho molecular confere-lhes algumas características fisiológicas específicas e mecanismos de ação, que os diferencia dos antioxidantes de baixo peso molecular. A maioria dos antioxidantes de baixo peso molecular é absorvido no intestino delgado durante a digestão e passa para a corrente

sanguínea entre 0,5 e 2 horas após a ingestão, produzindo um aumento no estado antioxidante (concentração antioxidante do sangue) e sendo distribuído para células e órgãos alvo. Ao contrário do que acontece com os antioxidantes macromoleculares, que cruza intacto o estômago e intestino delgado e atinge o cólon onde eles interagem com a microbiota colônica em um processo fermentativo que quebra as macromoléculas, resultando em um alto estado antioxidante intestinal e a produção de metabólitos antioxidantes. Estes metabólitos são absorvidos através da mucosa colônica e atingem a corrente sanguínea cerca de oito horas após a ingestão, sendo distribuídos para células e tecidos onde podem ter efeitos sistêmicos. Isso indica que antioxidantes macromoleculares podem aumentar e prolongar o estado antioxidante e os efeitos da saúde associados à ingestão de antioxidantes alimentares (SAURA-CALIXTO, 2017). O conteúdo de macroantioxidantes inclui macromoléculas, tais como proantocianidinas de alto peso molecular e compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos associados a macromoléculas, principalmente constituintes de polissacarídeos de fibras dietéticas e proteínas (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Com relação à sua natureza química, os macroantioxidantes compreendem principalmente polifenóis, como proantocianidinas, outros flavonóides, ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011).

O processo sugerido por Pérez-Jiménez, Díaz-Rubio e Saura-Calixto (2015) para a análise do conteúdo de MACAN entre as diferentes famílias de alimentos vegetais (cereais, frutas, vegetais, legumes) estabelece que uma extração química com solventes aquoso-orgânicos é realizada no alimento, que libera o conteúdo de EPP (polifenóis extraíveis) na fração sobrenadante e também produz um precipitado. O precipitado é então submetido à hidrólise química, realizada em duas etapas, a fim de liberar o conteúdo de HPP (polifenóis hidrolisáveis) e NEPA (proantocianidinas não extraíveis). Os hidrolisados obtidos após estes tratamentos são então analisados utilizando técnicas espectrofotométricas. Para a análise do conteúdo de HPP, inicialmente o precipitado é submetido à hidrólise ácida durante 1h a 85°C com a mistura de metanol e ácido sulfúrico, misturados gota a gota cuidadosamente (HARTZFELD *et al.*, 2002). O pH é ajustado posteriormente com hidróxido de sódio para 5,5. Logo após o ajuste do pH, a análise segue com as indicações para a determinação do conteúdo de EPP, usando o ácido gálico como padrão. A determinação do teor de HPP é medida por espectrofotometria a uma absorvância de 750 nm.

A absorvância das frações de NEPA é medida nos comprimentos de onda de 555 e 450 nm (ZURITA; *et al.*, 2012), a fim de detectar antocianinas e compostos de xantílio, respectivamente. Os resultados são comparados com um padrão de proantocianidina (*Ceratoniasiliqua*L. – Nestlé Ltda), que é rico em proantocianidinas de alto peso molecular. A soma das frações de HPP e NEPA correspondem ao conteúdo de macroantioxidantes evidentes na matriz alimentar (PÉREZ-JIMÉNEZ; *et al.*, 2015). Para entender os possíveis efeitos sobre a saúde associados à ingestão de qualquer composto bioativo e, portanto, de MACAN, é necessário ter conhecimento dos diferentes eventos que ocorrem ao longo do intestino humano (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2013). A maioria do conteúdo de macroantioxidantes passará pelo intestino delgado sem qualquer transformação. Uma vez no cólon, e principalmente através da ação da microbiota intestinal, o

MACAN é liberado e novos compostos se formam. Alguns destes metabólitos microbianos podem ser absorvidos através da veia porta, atingindo o fígado, onde ocorrem vários processos relacionados, dando origem a metabólitos de fase II. Uma vez formados, esses metabólitos podem retornar ao tubo digestivo através da bile ou passar para a corrente sanguínea como um primeiro passo para atingir os tecidos alvo e finalmente ser excretado na urina (PÉREZ-JIMÉNEZ; *et al.*, 2013). Portanto, quantidades significativas das diferentes classes de MACAN aparecem no intestino grosso diariamente como compostos bioacessíveis, incluindo os compostos que foram solubilizados no intestino delgado, mas que não foram absorvidos, bem como aqueles liberados no intestino grosso. Uma vez que o conteúdo do MACAN é integrado entre os diferentes grupos de alimentos vegetais, uma dieta diversificada garantiria um fornecimento contínuo de compostos bioacessíveis benéficos através do trato digestivo. Obviamente, uma fração de polifenóis extraíveis não absorvida anteriormente no intestino delgado também chega como compostos bioacessíveis no intestino grosso (SAURA-CALIXTO *et al.*, 2007). Nessa perspectiva, os avanços significativos em metodologias experimentais podem permitir o estabelecimento de um conhecimento completo das propriedades e efeitos à saúde dos antioxidantes macromoleculares para o desenvolvimento de pesquisas e aplicações como um novo tipo de ingrediente para as indústrias de alimentos. Esta revisão tem como escopo apresentar a metodologia de determinação do conteúdo de antioxidantes macromoleculares, segundo a original descrita por Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2015), validando o método analítico, quando adaptado às frutas tropicais produzidas no Brasil, em especial o açaí e a uva. Destaca-se que são denominados MACAN devido a alguns diferenciais específicos que possuem, tais como: são polifenóis poliméricos ou polifenóis únicos ligados a constituintes macromoleculares dos alimentos e não são extraídos por procedimentos orgânicos aquosos comuns. Portanto, com essa metodologia pode-se analisar a maior parte dos compostos que são acessíveis e biodisponíveis apenas no intestino grosso.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho constituiu-se por intermédio de uma revisão de literatura, no qual foi efetuada uma consulta em artigos da área, cujo as propostas referentes a análises e determinações dos polifenóis extraíveis e não extraíveis encontrados em frutas tropicais. Pesquisas sobre identificação e avaliação desses compostos antioxidantes em frutas tropicais, ainda são escassas no Brasil. Para selecionar os artigos estudados, foi utilizado o seguinte critério: averiguar os resultados expostos nos artigos selecionados, a fim de relatar os resultados obtidos através da metodologia sugerida por Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2015). Posteriormente, buscou-se interpretar os principais fundamentos encontrados nos artigos selecionados, para alcançar uma melhor compreensão sobre o resultado de MACAN encontrados nas frutas tropicais brasileiras, bem como o método utilizado para a sua análise.

RESULTADO E DISCUSSÕES

Nesta pesquisa, foram selecionados três artigos, apresentando como base as suas análises quantitativas referentes às concentrações de compostos macroantioxidantes encontradas em frutas tropicais brasileiras. Dito isso, os autores Silva *et al*

(2020), Lima *et al* (2020) e Sousa *et al* (2020), analisaram o resíduo da uva (casca e semente) e o suco clarificado do açaí, ambos provenientes da indústria, quantificando os polifenóis extraíveis totais, a atividade antioxidante e principalmente os compostos macroantioxidantes (MACAN), encontrados nos frutos, de acordo com a metodologia sugerida por Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2015). Para a realização do estudo, Silva *et al* (2020), utilizaram o resíduo de uva fornecido por indústrias localizadas no município de São Vale do Francisco, Brasil. As amostras foram recolhidas durante um período de funcionamento regular das empresas, segundo disponibilidade de variedades ao longo do ano de 2015. Lima *et al* (2020), utilizaram amostras de bagaço de uva, de diversos ciclos de produção de colheita de 2015. Na pesquisa de Sousa *et al* (2020), utilizaram amostras de suco clarificado de açaí, cujo processamento foi realizado entre março e julho de 2018. Os resultados dos três estudos serão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teor de macroantioxidantes encontrados nas amostras de frutas tropicais.

AMOSTRAS	HPP	NEPA	MACAN
Uva BRS Magna ¹	284.63	326.12	610.75
Uva Alicante Bouschet casca ²	236.97	362.50	599.47
Uva Tempranillo semente ²	314.62	299.37	613.99
Suco clarificado de açaí ³	443.10	337.01	780.11

Valor médio, n = 3.

¹Silva (2020), ²Lima *et al* (2020), ³Sousa *et al* (2020)

Segundo o estudo realizado por Silva *et al* (2020), através da avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS, a variedade BRS Magna (1º ciclo), destacou-se dentre as demais variedades de uva analisadas. MAZZA (1995) ressalta que os compostos fenológicos da uva podem variar de acordo com a variedade, a maturidade, região e período de cultivo. ABEL *et al* (2007), relatam que existe uma correlação entre os compostos fenológicos e a capacidade antioxidante presente na uva. Segundo os autores, uma vez que essa fruta é a principal matéria-prima para a produção de vinhos e sucos, é importante ressaltar que, quanto mais intensa for a cor da uva, mais interessante ela se tornará no ponto de vista funcional, visto que as uvas mais escuras apresentam maiores teores de compostos fenológicos e compostos antioxidantes. Os resultados encontrados por Lima *et al* (2020), demonstraram que a casca da uva Alicante Bouschet e a semente da uva Tempranillo, apresentam alto teor de compostos fenológicos. Os resultados apresentados por este autor são superiores aos realizados por Pérez-Jiménez *et al.* (2014), que realizou um levantamento sobre o conteúdo de MACAN em vários alimentos no Mediterrâneo e encontrou 146 mg/100g em uva vermelha. Essas pesquisas demonstram que as frutas tropicais possuem um alto índice de polifenóis não extraíveis, contribuindo significativamente com a comprovação dos resultados relacionados com o conteúdo de MACAN presentes nas cascas e sementes de uvas exposto por Lima *et al* (2020). Por fim, Sousa *et al* (2020), ressalta que o suco de açaí concentrado e clarificado a 24º Brix, demonstra possuir alto índice de polifenóis não extraíveis. No estudo realizado por Pérez-Jiménez; Diaz-Loira; Saura-Calixto (2013), onde foi realizado a avaliação do conteúdo de polifenóis não extraíveis em frutas vermelhas, como citado anteriormente, foi encontrado no açaí fresco 1.240 mg/100g de matéria seca para o teor de polifenóis hidrolisados (HPP) e para o conteúdo de proantocianinas (NEPA) foi obtido o valor de 1210/100g. Sousa *et al* (2020), compara a sua pesquisa com outros estudos, como por exemplo, um estudo realizado por Rufino *et*

al. (2010), no qual, é analisado os resíduos das frutas Acerola e Caju, no qual é determinado os polifenóis não extraíveis encontrados nessas frutas tropicais. Neste estudo, são encontrados valores de 12,1 g.Kg⁻¹ de seco matéria para conteúdo de (HPP) no caju, e nos resíduos da acerola foram obtidos 3,9g Kg⁻¹ de matéria seca. Para o conteúdo do NEPA, não houve resultados significativos para a acerola, no entanto o caju demonstrou teores de 52 g Kg⁻¹ de matéria seca. Deste modo, esta pesquisa demonstra que as frutas tropicais possuem altos níveis de polifenóis não extraíveis, mas que os estudos sobre os macro antioxidantes em alimentos e bebidas ainda são bastante limitados quando comparadas aos estudos de polifenóis extraíveis, tornando necessários mais estudos sobre o assunto, principalmente com as frutas tropicais.

Conclusões

Dentre as amostras analisadas, através da metodologia sugerida por Pérez-Jiménez e Saura-Calixto (2015), a metodologia MACAN mostrou-se eficiente quando validada em frutas brasileiras, podendo ser integrada entre os diferentes grupos de frutas tropicais.

Agradecimentos

À EMBRAPA e UNILAB pelo apoio financeiro. Ao Grupo de Pesquisa em Polifenóis, Antioxidantes e Fibra Dietética na Saúde – POLIFIBAN/CNPq. Ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC.

REFERÊNCIAS

- Abe, L. T., Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitislabrusca* L. e *Vitisvinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p.394-400, 2007.
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., Kroon, P. A. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.16, p.7298-7303, 2009.
- Choy, Y. Y., Jaggars, G. K., Oteiza, P. I., Waterhouse, A. I. Bioavailability of intact proanthocyanidins in the rat colon after ingestion of grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, n.1, p.121-127, 2013.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, v.18, n.14, p.1818-1892, 2013.
- Francis, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, v.45, p.208-213, 2000.
- Estruch, R. et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *The New England Journal of Medicine*, Massachusetts, v. 368, n. 14, p. 1279-1290, 2013
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.51, n.4, p.331-362, 2011.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., Hagerman, A. E. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.7, p.1785-1790, 2002.
- Lima, A, M.S; Sousa, F, A; Silva, J, A; Figueiredo, R, W; Lima, M,A,C; Rufino, M, S, M. Prospecting for macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in bagasse from wineries in the São Frasco River Valley. *International Journal of Development Research*. Vol. 10, Issue, 07, pp. 37578-37582, 2020.
- Mazza, G. (1995). *Anthocyanins in grapes and grape products*. *Food Science and Nutrition*, 35(4), 341-371.
- Mateos-Martin, M. L., Pérez-Jiménez, J., Fuguet, E., Torres, J. I. Non-extractable proanthocyanidins from grape are a source of bioavailable (epi)catechin and derived metabolites in rats. *British Journal of Nutrition*, v.108, n.2, p.290-297, 2012.
- O'byrne, D. J., Devaraj, S., Grundy, S. M., Jialal, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoid and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.76, n.6, p.1367-1374, 2002.
- Oliveira, D. S., Aquino, P. P., Ribeiro, S. M. R., Proença, R. P. C., Pinheiro-Sant'ana, H. M. Vitamina C, carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Cesa do Estado de Minas Gerais. *Acta Scientiarum: Health Sciences*, v.33, n.1, p.89-98, 2011.
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Sauracalixto, F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, v.26, n.2, p.118-129, 2013.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, v.74, p.315-323, 2015.
- Pérez-Jiménez, J., Torres, J. I. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.24, p.12713-12724, 2011.
- Saura-Calixto, F. Macromolecular Antioxidants: Importance in Health and Perspectives. *Arch Med Deporte*, v.34, n.4, p.188-189, 2017.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, v.101, n.2, p.492-501, 2007.
- Shahidi, F. *Natural Antioxidants Chemistry, health effects, and applications*. 414 p. Champaign: AOCS Press. 1997.
- Silva, J, A; Sousa, F,A; Lima, A, M, S; Figueiredo, R, W; Lima, M, A, C; Rufino, M, S, M. Macromolecular antioxidants usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study in the grapes industrial residues. *International Journal of Development Research* Vol. 10, Issue, 08, pp. 39527-39533, August, 2020.
- Sousa, F, A; Figueiredo, R, W; Fonseca, A, M; Amaral, J, F; Ribeiro, L, P, D; Rufino, M, F, M. Determination of both extractable and non-extractable polyphenols, and in vitro antioxidant activity in pulp and clarified assai juice. *International Journal of Development Research*. Vol. 10, Issue, 08, pp. 39707-39711, 2020.
- Souza, J. C. *Atividade antioxidante in vitro e in vivo de suco de uva e da norbixina*. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, v.111, n.4, p.816-823, 2008.
- Zurita, J., Díaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.63, n.8, p.936-939, 2012.