Innovation dialogues to accelerate industry application
SEPTEMBER 19th TO 21th, 2018
ARACAJU, SERGIPE, BRAZIL
9th ISTI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TECHNOLOGICAL INNOVATION

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM RESÍDOS DE TAMARINDO (*Tamarindus indica*)

Tacila Rayane Jericó Santos – tacilarayane@hotmail.com
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Renorbio-SE - Departamento de Tecnologia de Alimentos- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia – Universidade Federal de Sergipe
Paula Ribeiro Buarque Feitosa – paularbuarque@yahoo.com.br
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Renorbio-SE - Departamento de Tecnologia de Alimentos- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia – Universidade Federal de Sergipe
Helisvanhah Gretta Antunes Rodrigues – mailis.garbo@gmail.com
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Departamento de Tecnologia de Alimentos- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia – Universidade Federal de Sergipe
Luciana Cristina Lins de Aquino Santana – aquinoluciana@hotmail.com
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Renorbio-SE - Departamento de Tecnologia de Alimentos- Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia – Universidade Federal de Sergipe

Resumo— Os resíduos de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) geralmente não são aproveitados comercialmente, ocorrendo seu descarte. Dessa maneira, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos e flavonoides totais dos resíduos de tamarindo. Os maiores teores de compostos fenólicos totais foram obtidos em extratos da casca de tamarindo em etanol a 50% e 60% e acetona a 50% e 80% (valores entres 380,65 e 389,22 mg GAE /100g de resíduo), extratos das sementes em acetona a 80%, etanol a 80% e metanol a 40% e 60% (393,51 e 403,19 mg GAE / 100g de resíduo) extratos da junção cascas e sementes em metanol a 70% e 80% (434,46 e 434,54 mg GAE/100g de resíduo). Já os maiores teores de flavonoides totais foram obtidos com extratos das cascas em acetona a 70% (392,87 mg quercetina / 100g de resíduo), extratos das sementes em metanol a 80% (668,95 mg quercetina/100g de resíduo) e extratos da junção cascas e sementes em acetona a 80% (666,26 mg quercetina/100g de resíduo). Os extratos de resíduos de tamarindo demonstraram ser uma fonte promissora natural de compostos bioativos e oferecem oportunidades para a valorização econômica destes subprodutos.

Palavras-chave – fruta exótica, compostos fenólicos, flavonoides totais, resíduo de fruta.

***Abstract*—** Tamarind residues (*Tamarindus indica* L.) are generally discarded due to non-commercial use. Thus, this study aimed to evaluate the effect of different solvents on the extraction of total phenolic and total flavonoids compounds from tamarind residues. The higher total phenolic contents were obtained in extracts of tamarind husks in 50% and 60% ethanol and 50% and 80% acetone (values between 380.65 and 389.22 mg GAE / 100g of residue), seeds extracts in 80% acetone, 80% ethanol and 40% and 60% methanol

(393.51 and 403.19 mg GAE /100g of residue) and mixture of husks and seeds extracts in 70% and 80% methanol (434.46 and 434.54 mg GAE /100g of residue). The higher total flavonoids contents were obtained with 70% acetone peels extracts (392.87 mg of quercetin /100 g of residue), 80% methanol seed extracts (668.95 mg of quercetin / 100g of residue) and mixture husks and seeds extracts in 80% acetone (666.26 mg quercetin/100g of residue). Tamarind residue extracts showed to be a promising natural source of bioactive compounds and offer opportunities for economic valorization of these by-products.

***Keywords*— E**xotic fruit, phenolic compounds, total flavonoids, fruit residue.

1 INTRODUÇÃO

O *Tamarindus indica*, comumente conhecido como tamarindo, é uma fruta exótica usualmente encontrada em países tropicais embora tenha se originado na África. É uma árvore da família Fabaceae, sua polpa é usada na culinária devido ao seu sabor amargo e particularmente para dar sabor a alguns pratos salgados (MARTINELLO et al., 2006). Os resíduos das frutas, material orgânico sem utilização comercial muitas vezes transformam-se em uma fonte de poluição ambiental (AJILA et al., 2007). Vários estudos têm revelado que as cascas e as sementes de frutas exibem um teor relevante de fitoquímicos bioativos, como, flavonoides, antocianinas, carotenoides, compostos fenólicos (JARDINI e MACINNI-FILHO, 2007; MELO e ANDRADE, 2010; ALMEIDA et al., 2016), os quais são amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, como antioxidantes e antimicrobianos, representando, portanto, potenciais fontes naturais dessas substâncias (JORGE & MALACRIDA, 2008). Portanto, o conhecimento do conteúdo de compostos bioativos de resíduos de tamarindo visa agregar valor comercial e industrial a estas frutas, contribuir para o reaproveitamento e propor alternativas para ciência dos alimentos.

A extração é o principal passo para a recuperação e isolamento de fitoquímicos bioativos de materiais vegetais, antes da análise. É influenciado pela sua natureza química, o método de extração empregado, tamanho da partícula da amostra, bem como a presença de substâncias interferentes. As extrações líquido-líquido e sólido-líquido são os procedimentos mais comumente usados antes da análise de polifenóis e fenólicos simples em plantas naturais. Os solventes desempenham um papel fundamental no aumento da solubilidade dos fenóis, uma vez que os extratos fenólicos brutos contêm misturas complexas de algumas classes de fenóis, que são seletivamente solúveis nos diferentes solventes (NACZK e SHAHIDI, 2006; STALIKAS, 2007).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos e flavonoides totais dos resíduos de tamarindo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

As frutas e seus respectivos resíduos por serem fontes naturais de antioxidantes, vários estudos consideram como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. Estudos demonstraram que as plantas apresentam compostos com propriedades antioxidantes, incluindo, as vitaminas A, E e C e compostos fenólicos, tais como, flavonoides, taninos e ligninas (RAMALHO e JORGE, 2006; BOOTS et al., 2008). Tipicamente, compostos bioativos de plantas são produzidos como metabólitos secundários. Os compostos bioativos podem ser identificados e caracterizados a partir de partes de plantas, como folhas, caule, flores e frutos (AZMIR et al., 2013).

Os resíduos de frutas (cascas e sementes), podem conter um número maior de compostos bioativos do que as suas respectivas partes comestíveis (SOARES et al., 2008; ALVES et al., 2013; GOLDMEYER et al., 2014). Os compostos bioativos existem em grande número e podem ser divididos em várias classes, por exemplo, polifenóis, ácidos benzoicos, os ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas). Eles contribuem substancialmente para o efeito antioxidante de muitas espécies de frutos pequenos (DENARDIN et al., 2015).

O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) é uma fruta tropical exótica com utilização principalmente para o consumo *in natura* ou produção de polpa de fruta, cujo processo resulta em grande quantidade de resíduos que geralmente não são aproveitados comercialmente, ocorrendo seu descarte (AKAJIAKU et al., 2014). Tornando assim, a extração dos compostos presentes nos resíduos de tamarindo de grande valia para novos estudos sobre a

viabilidade econômica deste resíduo. Sudjaroen et al. (2005) verificaram a presença de antioxidantes fenólicos nas sementes de tamarindo tais como, 2-hidroxi-3, 4'-di-hidroxiacetofenona, 3,4-di-hidroxibenzoato de metila, 3,4 - acetato de di-hidroxifenilo e epicatequina. Luiza e Jorge (2011), encontraram como componente principal das sementes, ácido linoleico além de palmítico, esteárico e oleico. Já El-Siddig et al. (2006) verificaram que a casca de tamarindo pode conter até 70% de taninos.

Os estudos qualitativos e quantitativos de compostos bioativos de materiais vegetais dependem principalmente da seleção de método de extração (SASIDHARAN et al., 2011). Os fatores mais comuns que afetam os processos de extração são propriedades da matriz da parte da planta, solvente, temperatura, pressão e tempo (HERNÁNDEZ et al., 2009). Os compostos bioativos de materiais vegetais podem ser extraídos várias técnicas clássicas de extração. A maioria dessas técnicas baseia-se no poder de extração de diferentes solventes em uso e a aplicação de calor e /ou mistura.

O rendimento de extração e atividade antioxidante tem grande influência do método de extração, mas também sobre o solvente usado para a extração. A presença de vários compostos antioxidantes com diferentes produtos químicos características e polaridades podem ou não ser solúveis em um solvente particular (TURKMEN et al., 2006). Os solventes polares são frequentemente usados para recuperar polifenóis de matrizes de plantas. O mais adequado solvente são misturas aquosas contendo etanol, metanol, acetona e acetato de etila (DAI e MUMPER, 2010). Dessa maneira, torna-se importante o comparativo de extração e quantificação de fenólicos totais, flavonoides totais, a fim de estabelecer condições de extração que possam aumentar a disponibilidade destes compostos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os tamarindos foram obtidos no Mercado Municipal de Abaré-BA. Inicialmente, os frutos (Figura 1) foram selecionados de acordo com o grau de maturidade. Em seguida, as cascas e as sementes foram separadas da polpa, pesadas e submetidas à secagem a 50ºC em estufa por 24 h. Após esse período, as cascas e as sementes foram trituradas no liquidificador para obtenção de um pó, as quais foram acondicionadas em um frasco de polietileno separadamente e mantido sob temperatura ambiente até o desenvolvimento das análises.

Figura 1. Sementes de tamarindo

Fonte. (Este trabalho).

Figura 2. Cascas de tamarindo

Fonte. (Este trabalho).

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Diferentes extratos das cascas, sementes e junção cascas e sementes foram obtidos com água destilada e com os solventes acetona, metanol e etanol nas concentrações de 40%, 50%, 60%, 70% e 80% de acordo com a metodologia descrita por Sujata et al. (2011) com algumas modificações. Frascos Erlenmeyers contendo os extratos foram agitados em shaker orbital a 200 rpm, temperatura de 30 ºC durante 1 h. Posteriormente, as amostras foram filtradas em papel filtro e o sobrenadante obtido foi analisado quanto o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.

3.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia do método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (WATERHOUSE, 2002). Alíquotas de 1 mL dos extratos foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais adicionou-se 1 mL de solução de etanol 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau 1N. A mistura foi homogeneizada e adicionou 1 mL de solução de carbonato de sódio a 5% (p/v), seguindo-se nova homogeneização. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara escura por 60 min e em seguida homogeneizados. As amostras tiveram suas absorbâncias medidas no comprimento de onda de 725 nm. Para a quantificação destes extratos, realizou-se uma curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0-500 mg/L), a fim de converter as absorbâncias e expressar os resultados em termos de miligramas de ácido gálico equivalente (GAE eq) por 100g de peso da amostra (mg GAEeq /100 g de resíduo).

A quantificação dos compostos flavonoides totais foi realizada utilizando o método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Dewanto et al. (2002), com algumas modificações. Alíquotas de extrato (2 mL) foram colocadas em tubos de ensaio e cloreto de alumínio 2% (p/v) (2 mL) foi adicionado, em seguida homogeneizou-se e deixou-se em repouso no escuro por 30 min. As absorbâncias das amostras foram lidas à 415 nm. A concentração total de flavonoides totais foi determinada através de uma curva de calibração construída a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0-100 mg/L). Os resultados foram convertidos e expressos em (mg quercetina/100 g de resíduo).

3.3 ESTATÍSTICA

Os resultados de todos os experimentos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) e o teste de Tukey para comparação das médias com o auxílio do software Sisvar 5.6 (Ferreira, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos resíduos de tamarindo extraídos com os diferentes solventes (água destilada, acetona, etanol e metanol) estão demonstrados nas Figuras 3 a 8, respectivamente.

Figura 3. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos das cascas de tamarindo.

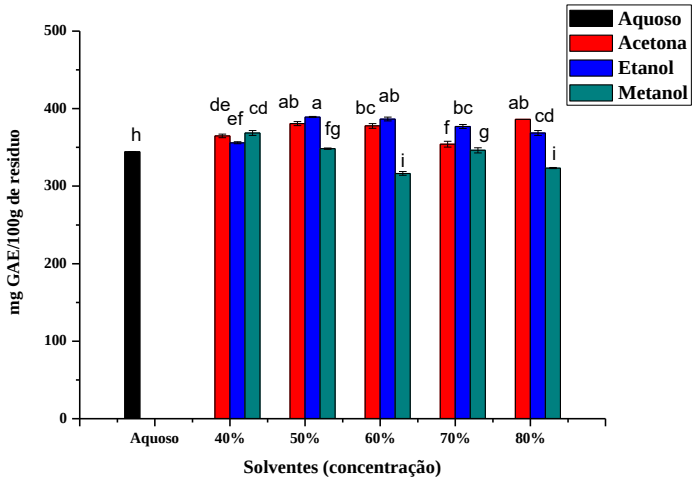


Figura 4. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos das sementes de tamarindo.

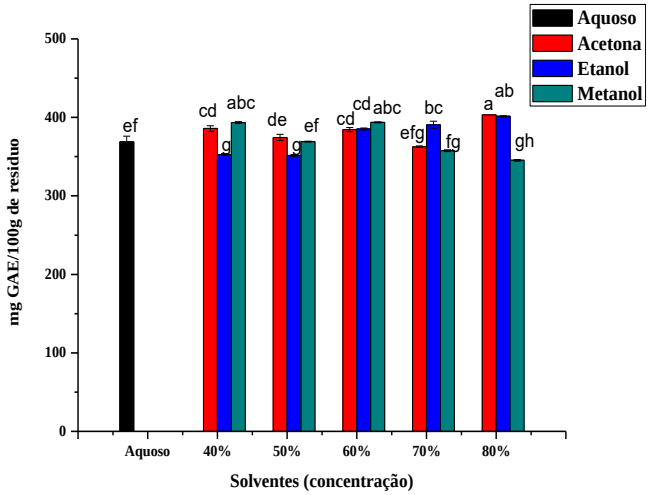


Figura 5. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos da junção cascas e sementes de tamarindo.

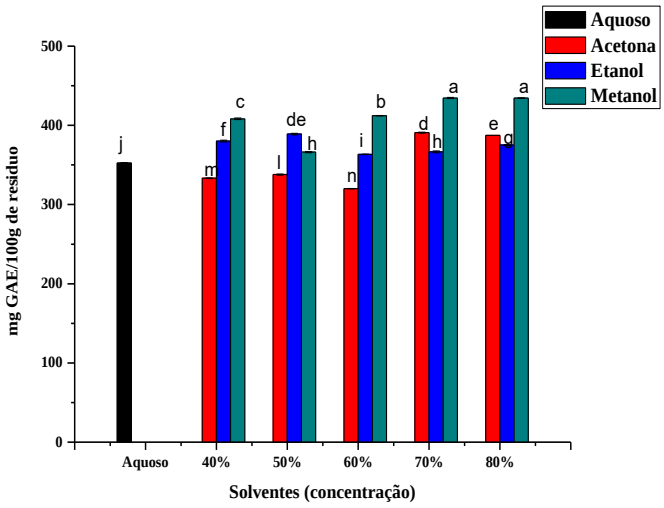


Figura 6. Teor de flavonoides totais dos extratos das cascas de tamarindo.

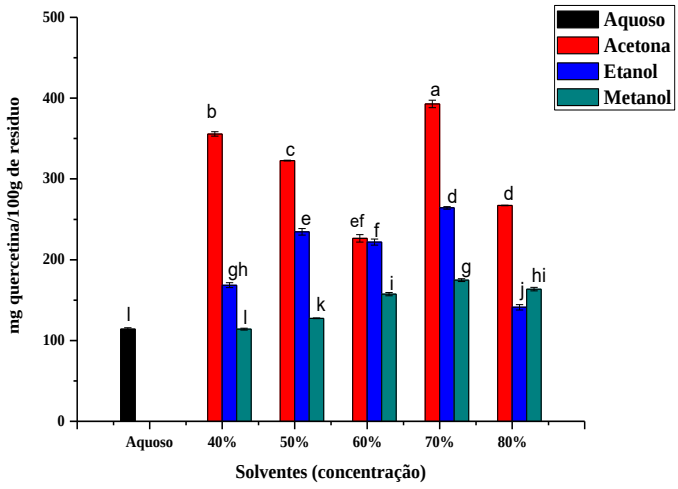


Figura 7. Teor de flavonoides totais dos extratos das sementes de tamarindo.

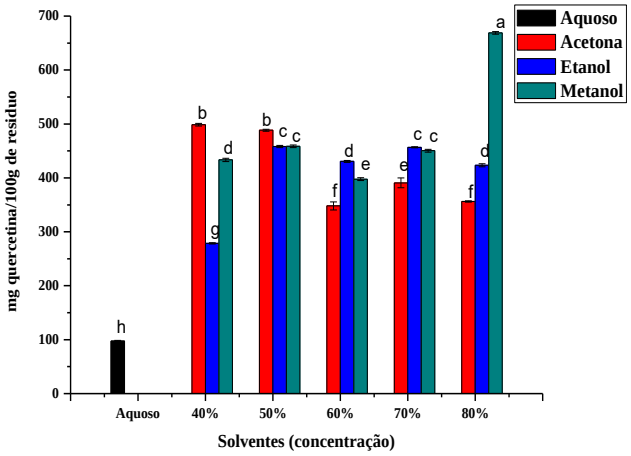
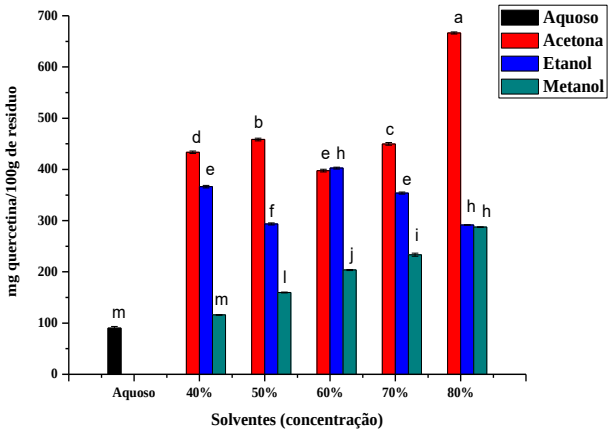


Figura 8. Teor de flavonoides totais dos extratos da junção cascas e sementes de tamarindo



Na Figura 3 observou-se que o extrato proveniente da casca de tamarindo em etanol a 50% e 60% e em acetona a 50% e 80% não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$) no teor de compostos fenólicos, sendo obtido os maiores valores entre 380,65 e 389,22 mg GAE / 100g de resíduo. Na Figura 4, os extratos obtidos com as sementes de tamarindo em acetona a 80%, etanol a 80% e metanol a 40% e 60% demonstraram os maiores teores de fenólicos (entre 393,51 e 403,19 mg GAE / 100g de resíduo), não diferindo estatisticamente entre si ($p<0,05$). Já nos extratos de cascas e sementes de tamarindo (Figura 5), os maiores teores de fenólicos totais foram obtidos com metanol a 70% e metanol a 80% (valores entre 434,46 e 434,54 mg GAE/100g de resíduo), os quais não apresentaram diferença significativa entre si.

Em relação ao teor de flavonoides totais (Figura 6), dos extratos com cascas de tamarindo, o maior teor foi obtido com acetona a 70% (392,87 mg quercetina /100g de resíduo), diferindo estatisticamente dos outros extratos ($p>0,05$). Dos extratos das sementes (Figura 7), o maior teor de flavonoides totais foi obtido com metanol a 80% (668,95 mg quercetina / 100g de resíduo), apresentando diferença significativa dos demais extratos ($p>0,05$). Já com a junção de sementes e cascas de tamarindo, o maior conteúdo de flavonoides totais foi obtido com acetona a 80% (666,26 mg quercetina/100g de resíduo), diferenciando estatiscamente dos demais extratos ($p>0,05$).

Na presente investigação, o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais variou de acordo com o tipo de solvente, concentração e resíduo de tamarindo. Khairunnuur et al. (2009) obtiveram menor teor de compostos fenólicos nas sementes de tamarindo (18,91 mg GAE/100g extrato) utilizando água destilada para a extração. A capacidade de extração dos solventes depende principalmente da solubilidade do composto no solvente, da massa cinética de transferência do produto e da resistência do soluto/matriz interação com as correspondentes limitações de calor e taxa de difusão em massa (DHANANI et al., 2017). Apesar de terem sido obtidos significativos teores de compostos fenólicos nos resíduos de tamarindo em água destilada, este solvente não é considerado bom extrator, pois origina extratos com alta impureza, já que extraem também compostos como ácidos orgânicos, açúcares, proteínas solúveis, que podem interferir na quantificação dos compostos fenólicos (VIZZOTO, 2009).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisados os teores de compostos bioativos (fenólicos totais e flavonoides totais) dos resíduos de tamarindo. Para a extração de fenólicos totais de cascas; sementes e junção de cascas e sementes os solventes mais adequados foram etanol a 50%, acetona a 80% e metanol a 70%, respectivamente. Já para a extração de flavonoides totais das cascas, sementes e junção de cascas e sementes foram mais adequados acetona a 70%, metanol a 80% e acetona a 80%, respectivamente. Os resultados demonstraram que estes extratos poderiam ser uma alternativa interessante para futura aplicação como antioxidantes naturais.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Sergipe e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado ao primeiro autor do trabalho.

REFERÊNCIAS

AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemical**, v. 102, p. 1006-1011, 2007.

AKAJIAKU, L. O.; NWOSU, J. N.; ONUEGBU, N. C.; NJOKU, N. E.; EGBENEKE, C. O. Proximate, mineral and anti-nutrient composition of processed (Soaked and Roasted) tamarind (*Tamarindus indica*) seed nut. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 2, p. 136–145, 2014.

ALMEIDA, M. L. B.; FREITAS, W. E. S.; MORAIS, P. L. D.; SARMENTO, J. D. A.; ALVES, R. E. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1078-1082, 2016.

ALVES, A. M.; ALVES, M. S. O.; FERNANDES, T. O.; NAVES, R. V.; NAVES, M. M. V. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabiroba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, 2013.

AZMIR, J.;ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering,** v. 117, 2013.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. **Health effects of quercetin**: From antioxidant to nutraceutical. European Journal of Pharmacology, v. 585, p. 325-337, 2008.

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

DHANANI, T.; SHAH, S.; GAJBHIYE, N. A.; KUMAR, S. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1193-1199, 2017.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; ROCHA, R. F.; VIZZOTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. F. C.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 387-398, 2015.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K. K.; LIU, RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 50, n. 10, p. 3010-3014, 2002.

EL-SIDDIG, K.; GUNASENA, H. P. M.; PRASA, B. A.; PUSHPAKUMARA, D. K. N. G.; RAMANA, K. V. R.; VIJAYANAND. P.; WILLIAMS, J. T. **Tamarind** – Tamarindus indica L. Fruits for the future 1. Southampton Centre for Underutilized Crops, Southampton, UK, p. 188, 2006.

FERREIRA, D F. **Sisvar:** a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência Agrotécnica,** v.38, n.2, 2014.

GOLDMEYER, B.; PENNA, N. G.; MELO, A.; ROSA, C. S. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, 2014.

HERNANDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZALEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 734–741, 2009.

JARDINI, F. A.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Antioxidant activity, fatty acid profile and tocopherols of *Tamarindus indica* L. seeds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 497-501, 2011.

MARTINELLO, F.; SOARES, S. M.; FRANCO, J. J.; SANTOS, A. C.; SUGOHARA, A.; GARCIA, S. G. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 810-818, 2006.

MELO, E. A.; ANDRADE, R. A. M. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos de umbuzeiro. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 453-457, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **J Pharm Biomed Anal,** v. 41, p. 1523-1542, 2006.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Foto antioxidantes. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, Y. L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

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

SUDJAROEN, Y.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. Food and Chemical Toxicology, v. 43, p. 1673–1682, 2005.

SUJATA VALVI, R.; RATHOD, V. S.; YESANE, D. P. Screening of three wild edible fruits for their antioxidant potential. **Current Botany,** v. 2, n. 1, p. 48-52, 2011.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteau methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M.C. Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). **Embrapa Clima Temperado**, 2009.

WATERHOUSE, A. L. **Polyphenolics:** determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, editor. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley; 2002.