

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E
ESPECTROMÉTRICAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
GRÃOS DE CEVADA POR UHPLC-MS/MS**

Bruno Molero da Silva

Centro Universitário Padre Anchieta

bruno.silva@anchieta.br

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Instituto de Química, Unicamp.

carlab@iqm.unicamp.br

RESUMO

Estudos revelam que a cevada (*Hordeum vulgare L.*) contém compostos fenólicos, indicando que ela pode servir como uma excelente fonte de antioxidantes naturais para a prevenção de doenças. Este trabalho teve como objetivo a análise de compostos fenólicos em grãos de cevada brasileira. Os grãos foram extraídos e analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). O desenvolvimento do método por UHPLC-MS/MS, com fase móvel binária contendo água/acetonitrila acidificada, foi eficaz para monitorar 11 analitos simultaneamente num tempo de 7 minutos de análise. Foi escolhido o modo negativo de ionização, devido à realização de testes que apresentaram resultados satisfatórios na sensibilidade dos analitos quando comparados ao modo de ionização positivo.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, Cevada, UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Studies show that barley (*Hordeum vulgare L.*) contains phenolic compounds, indicating that it can serve as an excellent source of natural antioxidants for disease prevention. Thus, the study aimed to the analysis of phenolic compounds in Brazilian barley grains. The grains were extracted and analyzed by UHPLC-MS/MS. The development of the UHPLC-MS /MS method with binary mobile phase containing water / acetonitrile acidified was effective to monitor 11 analytes simultaneously in a time of 7 minutes analysis. The negative ionization mode was chosen because of testing which showed satisfactory results in the sensitivity of the analyte as compared to the positive ionization mode.

Keywords: Phenolic compounds, Barley, UHPLC-MS/MS.

INTRODUÇÃO

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nos alimentos, como a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (CZUCHAJOWSKA et al., 1998; MOREIRA et al., 2013). Estudos realizados correlacionam esses compostos a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticarcinogênicas (ABE, 2007).

Dentre as classes de alimentos, encontram-se os grãos de cereais, que contribuem significativamente na dieta humana com quantidades de proteínas, minerais e vitaminas essenciais para uma boa alimentação. Estudos recentes comprovam que eles contêm uma larga variedade de substâncias biologicamente ativas, incluindo os compostos antioxidantes (FERRERES et al., 2009). Os antioxidantes são compostos conhecidos por reagirem com radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio, de forma a inativá-los, prevenindo os danos oxidativos e, conseqüentemente, o desgaste celular (MOON; SHIBAMOTO, 2009)

Esses benefícios são confirmados em alimentos como a cevada (*Hordeum vulgare* L.), cereal de origem milenar, cuja composição possui proteínas, nutrientes e fibras, sendo considerado o quinto cereal mais consumido no mundo, com uma produção acima de 130 milhões de toneladas anuais (HAO; BETA, 2012). Cerca de 2% do total da cevada produzida têm sido usados para alimentação humana, sendo o restante direcionado para alimentação animal e para a indústria de cerveja (BAIK; ULLRICH, 2008). Nos últimos anos, tem havido um grande interesse em sua utilização na alimentação humana na forma de cereal, devido ao seu alto valor nutricional e também ao seu baixo custo. Alguns estudos indicam que a cevada contém compostos fenólicos, indicando que ela pode servir como uma excelente fonte de antioxidantes naturais para a prevenção de doenças (LIU; YAO, 2007). O esqueleto de base a partir do qual os compostos fenólicos podem ser derivados são vistos na Figura 1.

Vários métodos de preparação de amostra têm sido desenvolvidos para determinar compostos fenólicos em uma grande variedade de tipos de amostras, como cereais, plantas medicinais e bebidas. Esses métodos de preparação variam desde a simples filtração até procedimentos mais elaborados, que incluem hidrólise e extração/limpeza antes das análises (MOREIRA et al., 2013; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

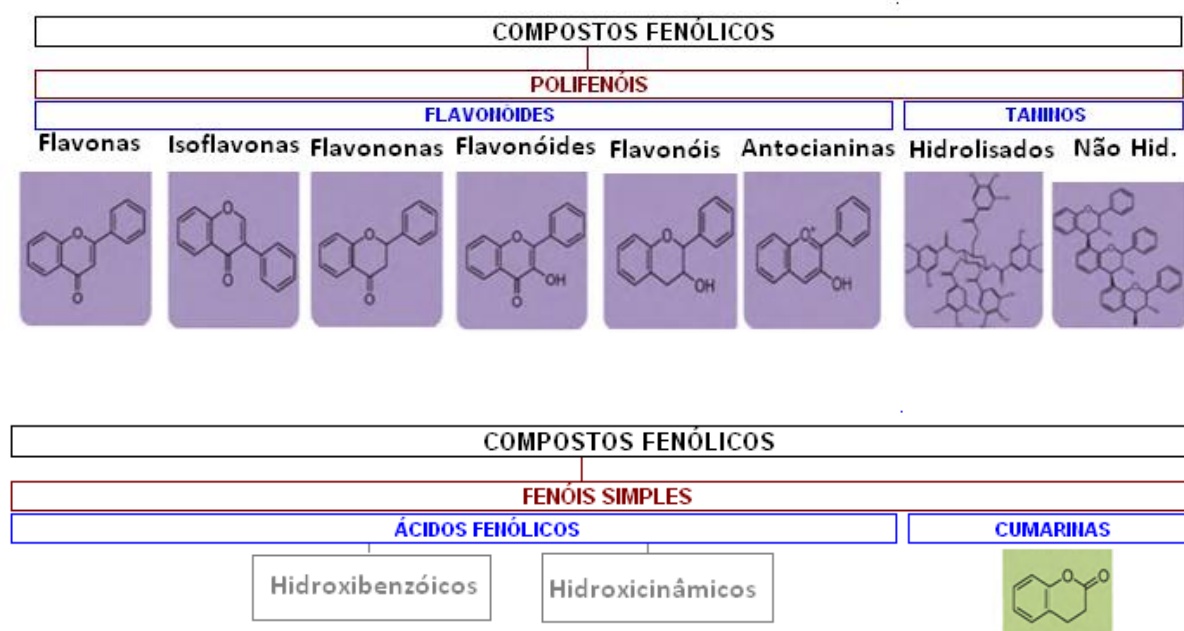


Figura 1. Esqueleto de base a partir do qual os compostos fenólicos de origem vegetal são derivados. Adaptado de (STALIKAS, 2007; HURTADO-FERNANDEZ; et al., 2010).

As técnicas analíticas instrumentais usadas para determinação de compostos fenólicos incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (FERRERES et al., 2009; ZHAO et al., 2006; MAILLARD; BERSET, 1995), a eletroforese capilar (CE) (BONOLI; MARCONI; CABONI, 2004; VERARDO et al., 2011) e, mais recentemente, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (GRUZ; NOVÁK; STRNAD, 2008).

O uso da análise instrumental é indispensável para a análise qualitativa e quantitativa, desde a avaliação de analitos em amostras simples, como água, até matrizes mais complexas, como bebidas e alimentos que incluem os cereais como a cevada.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) é uma das técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. É uma técnica físico-química de separação, que tem sido amplamente aplicada para fins qualitativos e quantitativos, na qual os componentes de uma mistura são separados, através de suas distribuições em duas fases: uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel líquida (FM), que flui por meio da fase FE, com o auxílio de bombas de alta pressão (ANDRÉ, 2014). A UHPLC utiliza os mesmos princípios da técnica de HPLC, que tem sido a técnica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios, com

uma elevada gama de aplicação, porém com a vantagem de trabalhar com fases estacionárias menores que 2 μm , ao contrário da HPLC, que utiliza fases estacionárias com tamanhos de partícula na faixa de 3 a 10 μm (MALDANER.; JARDIM, 2009). Com o auxílio dessas partículas, juntamente com as altas velocidades lineares da FM, aumentam-se a resolução e a detectabilidade, além de diminuir o tempo das análises; uma vez que o tempo de análise de compostos fenólicos por HPLC é próximo de 40 minutos (STALIKAS, 2007).

As colunas empregadas em UHPLC são de tamanhos reduzidos (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), fazendo que maiores velocidades lineares de fase móvel possam ser alcançadas. Para tanto, é necessário o uso de equipamentos mais adequados, capazes de operar a pressões mais elevadas por UHPLC que opera na faixa (6000-15000 psi) do que por HPLC que opera na faixa (1400-3000 psi) (MALDANER; JARDIM, 2009; MALDANER; JARDIM, 2012).

Com base em trabalhos recentes, vale ressaltar que as análises, utilizando-se a UHPLC, são mais rápidas, e o consumo de solventes é menor; as eficiências e resolução são maiores que na maioria das vezes, há aumento de detectabilidade, devido à formação de picos mais altos e estreitos, e redução do efeito matriz, se comparadas às análises feitas por HPLC (NAUSHAD; KHAN; ALOTHMAN, 2014; STEENE; LAMBERT, 2008).

De modo geral, a UHPLC já está bem estabelecida, tanto em termos de fase estacionária, como de instrumentação. É uma técnica que apresenta facilidade na transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, uma grande variedade de colunas, equipamentos e detectores disponíveis comercialmente, e isso indica que, num futuro próximo, essa técnica consiga superar a HPLC nas análises de rotina, além de usar menores volumes de solventes orgânicos, gerando menor quantidade de resíduos, de acordo com os princípios da Química Verde (MALDANER; JARDIM, 2012; NUNEZ et al., 2012).

Por outro lado, a técnica de UHPLC requer cuidados especiais com a limpeza cromatográfica e com os problemas decorrentes de pressões elevadas. No entanto, essas limitações não têm reduzido a aplicação e o uso difundido da técnica.

A técnica de UHPLC permite o acoplamento com a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). A espectrometria de massas pode ser compreendida

como uma técnica analítica, que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes substâncias em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação por meio de um campo elétrico ou magnético. Essa movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, representada por m/z (razão massa/carga). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula, é possível deduzir sua composição química elementar e, com isso, determinar sua estrutura (VAN BRAMER, 1998).

Dentre os principais componentes, o espectrômetro de massas é constituído por um sistema de introdução de amostras, uma fonte de ionização, na qual são produzidos íons na fase gasosa, um analisador de massas, que identifica as substâncias químicas de acordo com suas relações massa/carga (m/z), e um detector, que geralmente é constituído por um multiplicador de elétrons (KONATO, 2014).

O desenvolvimento dos espectrômetros de massas de múltiplos estágios – como os triplo e pentaquadrupolos, armadilha de íons (*ion traps*), setores elétricos e magnéticos, e equipamentos híbridos (Q-tof, Q-trap) – permitiu o acesso a técnicas de espectrometria de massas em sequencial (MS/MS ou MS^n) e, com isso, ocorreu um aumento significativo das potencialidades analíticas da técnica. A Figura 2 representa o esquema dos componentes de um espectrômetro de massas.

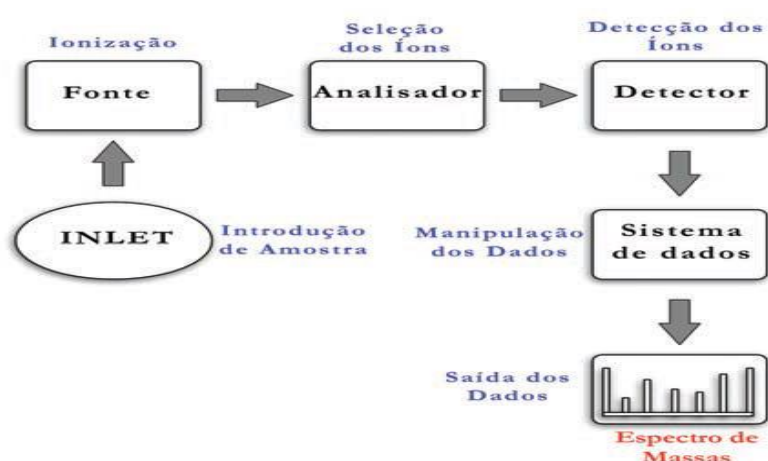


Figura 2. Esquema dos componentes de um espectrômetro de massas (LANÇAS, 2009).

O analisador de massas é responsável pela seleção e/ou separação de acordo com a relação entre m/z dos íons.

O analisador triplo quadrupolo empregado em MS/MS é constituído por 3 quadruplos em série, sendo dois quadrupolos de transmissão (utilizados para separar íons de mesma relação m/z) interligados por um quadrupolo que atua como cela de colisão, no qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC), e que é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método por UHPLC/MS-MS a partir da otimização das condições cromatográficas para análise de compostos fenólicos nos extratos de cevada, já que não há estudos relatados na literatura com a utilização dessa técnica analítica para avaliar extratos de cevada.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e Reagentes

Os padrões catequina, epicatequina, rutina, miricetina, ácido sinápico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p- cumárico, ácido clorogênico e ácido protocatecóiico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Todos os padrões de grau analítico ($\geq 98\%$) foram usados sem purificação adicional.

A água ultrapurificada foi obtida a partir de um sistema Milli-Q UV Synergy, da Millipore (Molsheim, France). Também foi utilizado papel de filtro qualitativo tipo Whatman, com espessura de 55 mm, e filtro Millex de 0,22 μm de porosidade, da Millipore.

Foram empregados etanol e DMSO (Dimetilsulfóxido) grau HPLC, da Panreac (Barcelona, Espanha), hidróxido de amônio e ácido clorídrico, da Synt (São Paulo, Brasil); ácido acético glacial e ácido fórmico, todos da Synth (São Paulo, Brasil); hexano grau HPLC e acetonitrila grau HPLC, da Tedia (Fairfield, USA), etanol grau HPLC, da Panreac (Barcelona, Espanha), e metanol grau HPLC, da Merck (Madri, Espanha). O óleo de silicone usado para o controle da temperatura na extração em sistema de refluxo foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil).

As soluções estoque dos padrões (1000 mg L^{-1}) foram preparadas dissolvendo-se quantidade apropriada das substâncias em metanol, e armazenadas em frascos fechados

a 10°C em geladeira. As soluções de trabalho dos compostos fenólicos foram preparadas pela diluição, em metanol, das soluções estoque em 0,3 µg mL⁻¹, 0,5 µg mL⁻¹, 1 µg mL⁻¹, 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ and 10 µg mL⁻¹.

Amostras de cevada

Os grãos de cevada foram fornecidos pelo Centro de Pesquisa da Embrapa/Trigo de Passo Fundo, e cultivados no município de Ibiaçá/ Rio Grande do Sul, sendo que foram utilizadas as cultivares BRS Lagoa, do ano de 2010. Os grãos foram previamente secos em estufa a 55°C e moídos em micromoinho, a fim de se obter tamanho de partículas <1 mm de diâmetro.

Foram utilizados diferentes lotes de amostragens que foram usadas nas extrações.

Método de extração hidroetanólica sob refluxo (R)

Foram adicionados 3 g de grãos moídos de cevada a 15 mL de hexano para cada extrato, sob agitação, por 60 min, para remoção de gordura em béquer de 250 mL. As soluções contendo hexano e gordura foram descartadas com o uso da pipeta de Pauster. Para o método R, adicionou-se, à porção restante, 45 mL de solução hidroetanólica (80% v/v), deixando em sistema de refluxo por 90 min a 80 °C, seguido de filtração em papel de filtro qualitativo. Em seguida, os sobrenadantes foram evaporados em rotaevaporador até a secagem e ressuspensos em 2 mL de solução hidroetanólica 80% (v/v). Essas soluções finais foram filtradas em membrana de 0,22 µm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na UHPLC/MS-MS, graças à seletividade do sistema de detecção, utilizado no modo de aquisição SRM (Selected Reaction Monitoring), foi possível identificar os compostos fenólicos sem que estes estivessem totalmente separados cromatograficamente, isto é, sem que apresentassem tempos de retenção distintos.

A otimização da análise dos seguintes compostos fenólicos também pôde ser avaliada utilizando a técnica de UHPLC/MS-MS para os padrões de compostos fenólicos vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos fenólicos analisados com ionização no modo positivo e negativo.

Substância	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)
Ácido cafeico	181	179
Ácido clorogênico	355	353
Ácido ferúlico	195	193
Ácido p-cumárico	165	163
Ácido protocatecóico	183	181
Ácido sinápico	225	223
Ácido vanílico	169	167
Catequina	291	289
Epicatequina	291	289
Miricetina	319	317
Rutina	611	609

Inicialmente, foram otimizados os parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas, a fim de se conseguir o melhor sinal (maior intensidade) do íon molecular e de dois íons produtos mais abundantes de cada composto fenólico, através da infusão deles em solução, diretamente no espectrômetro de massas, promovendo a fragmentação dos íons moleculares dos analitos através do detector do tipo triplo quadrupolo. Dessa forma, foram obtidas as transições de quantificação e confirmação, recomendadas na análise de compostos fenólicos, dentre outros analitos, para a determinação analítica segura e posterior quantificação destes.

A infusão consistiu no bombeamento de soluções de compostos fenólicos a 5 mg L⁻¹ em metanol na vazão de 50 µL min⁻¹ combinada com os solventes auxiliares acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v): água com ácido fórmico 0,1% (v/v) (50:50) na vazão de 0,1 mL min⁻¹. As condições otimizadas da fonte do MS/MS podem ser verificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Melhores condições de operação do espectrômetro de massas MS/MS.

Parâmetros	Condição
Modo de ionização	negativo
Capilar (kV)	4,5
Temperatura Fonte (°C)	120
Temperatura Dessolvatação (°C)	400
Vazão Gas Cone (L h ⁻¹)	900
Vazão Gas Dessolvatação(L h ⁻¹)	30
Multiplier	650
Pressão na cela de Colisão (mbar)	2,43 × 10 ⁻³

Foi escolhido trabalhar no modo negativo de ionização, devido à realização de testes no modo positivo, os quais apresentaram resultados insatisfatórios quando comparados ao modo negativo.

Os testes no modo positivo, assim como foi feito no modo negativo, consistiram em aplicar diferentes voltagens do cone, com o objetivo de obter o espectro com melhor ionização e maior intensidade dos analitos. Foi realizada uma varredura da voltagem do cone de 10 V a 60 V. Com a utilização da espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)-MS/MS), apenas 4 analitos foram capazes de sofrer ionização, obtendo as melhores intensidades de sinal com as respectivas voltagens: ácido protocatecólico -10 V, catequina ou epicatequina – 60 V, miricetina e rutina – 60 V conforme mostra a Figura 3.

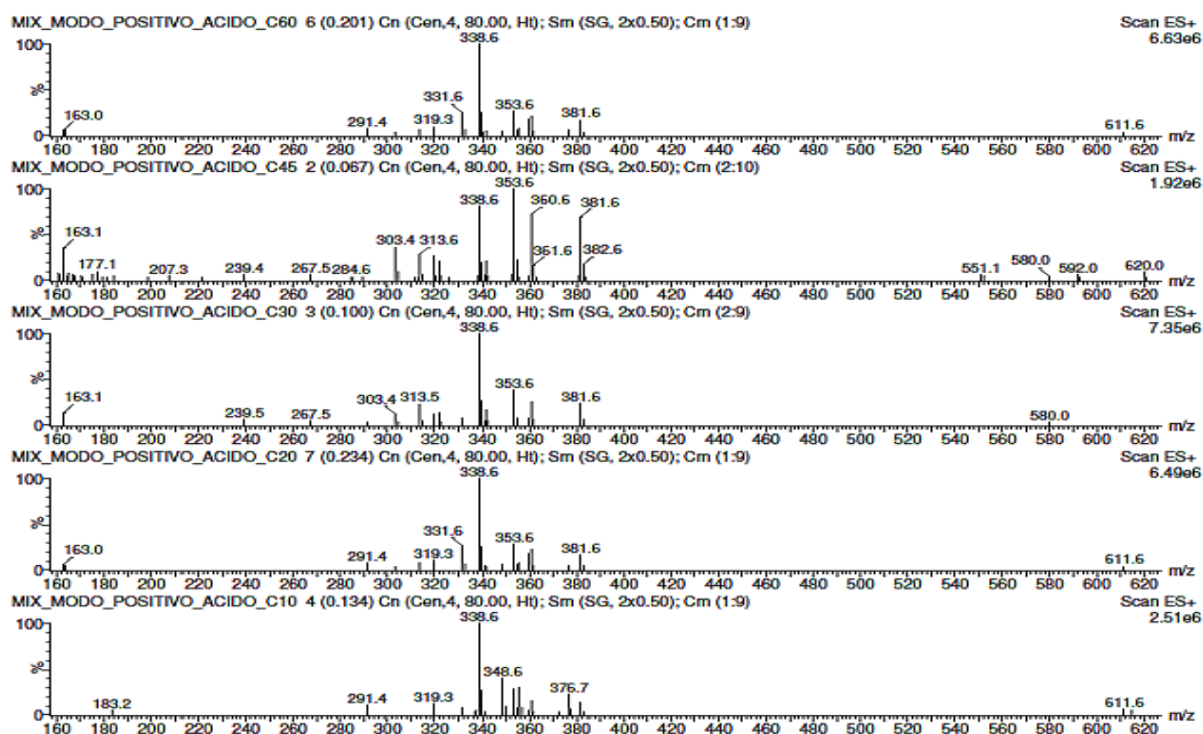


Figura 3. ESI no modo positivo da mistura, contendo 11 padrões de compostos fenólicos, com voltagens do cone avaliadas em 10, 20, 30, 45 e 60 V.

Já a Figura 4 representa a ESI(-)-MS/MS no modo negativo da mistura de compostos fenólicos, com voltagem do cone avaliada em 30 V.

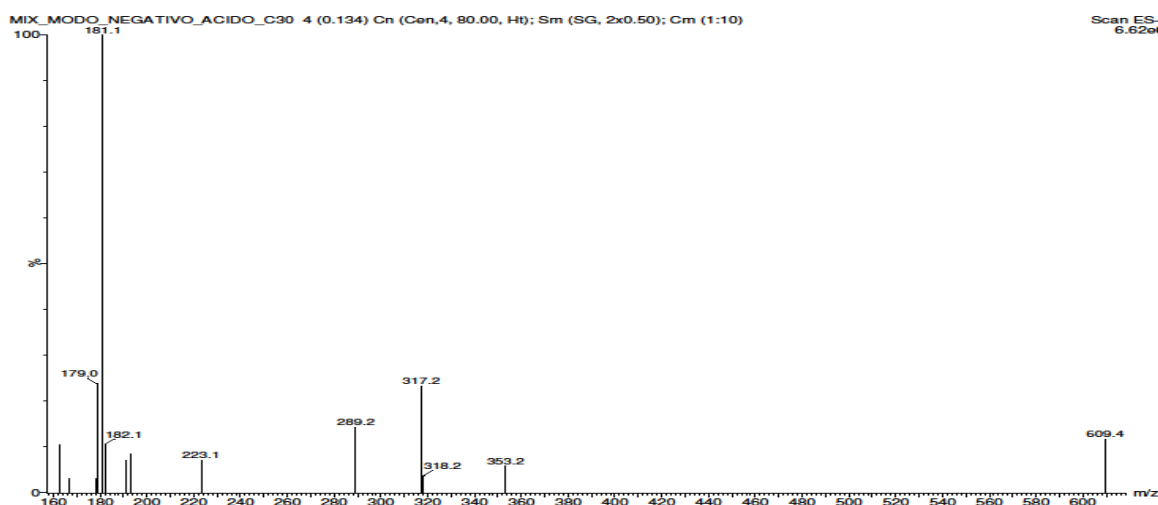


Figura 4. ESI no modo negativo da mistura, contendo 11 padrões de compostos fenólicos, com voltagem do cone avaliada em 30 V.

Como os compostos fenólicos apresentam os grupos ácidos carboxílicos em sua estrutura química, estes podem se dissociar de acordo com a variação na faixa de pH. Devido a esse comportamento, os compostos fenólicos são comumente encontrados na forma desprotonada, favorecendo a análise por UHPLC-MS/MS com ionização no modo negativo.

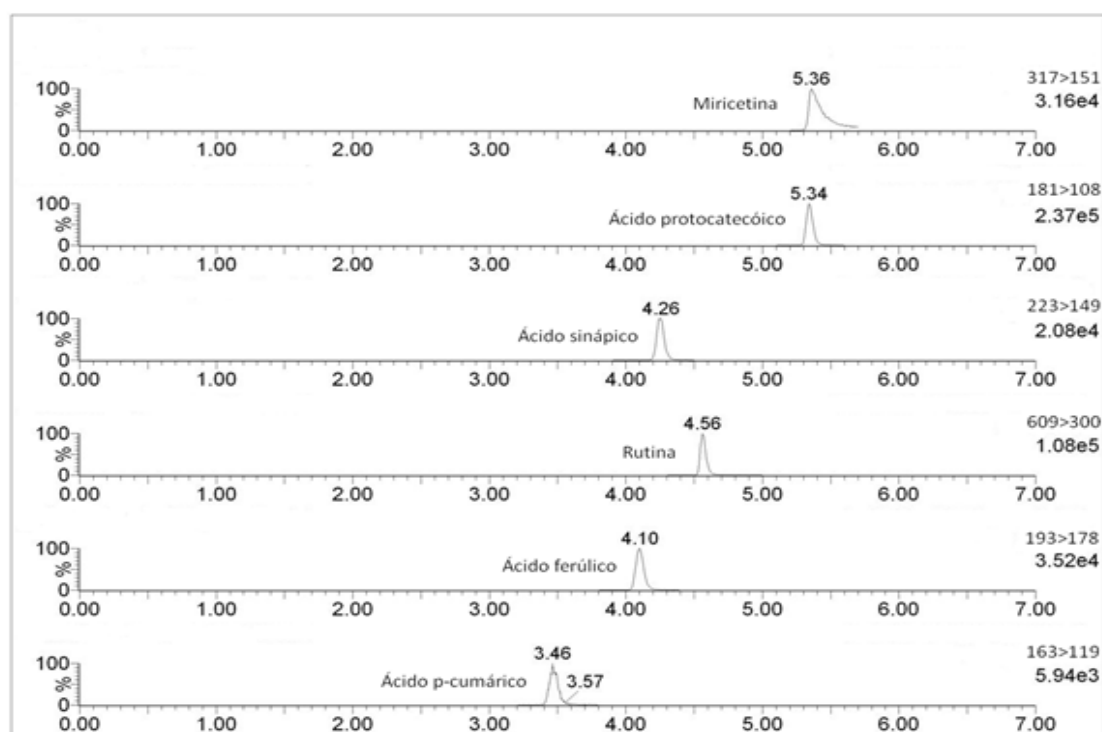
Dessa forma, fica evidente a escolha pelo modo negativo de análise, desde que o modo negativo de análise foi favorável para os 11 analitos investigados, enquanto que, no modo positivo, apenas 4 analitos foram capazes de sofrer ionização.

Foi também realizado teste utilizando, como solventes auxiliares, acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v): água com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) (50:50) na vazão de 0,1 mL min⁻¹, em que foi observada uma pronunciada diminuição da intensidade do sinal dos analitos, mostrando a inviabilidade do uso desse tipo de fase móvel comparada à anterior.

A próxima etapa, após o estabelecimento das condições espectrométricas, foi o desenvolvimento da separação cromatográfica. No UHPLC, foram testados os tipos de eluição, isocrático e gradiente, diferentes tipos de solventes e proporções de fase móvel, como solventes orgânicos (metanol e acetonitrila, tanto acidificados como não acidificados) e solventes aquosos (ácido fórmico 0,1% (v/v) e tampão formiato de amônio ou NH₄OH em 0,025%).

Foi avaliada a intensidade dos picos cromatográficos em termos de área e, também, os tempos de retenção dos compostos fenólicos. Para a maioria dos compostos fenólicos, a melhor condição cromatográfica foi obtida com a mistura binária de acetonitrila acidificada: água com ácido fórmico 0,1 % e por eluição gradiente.

Os testes de diferentes condições cromatográficas, utilizando diferentes combinações de fase móvel realizadas com o objetivo de selecionar a melhor condição de análise, estão apresentados na Figura 5, que apresentam os cromatogramas obtidos com a ionização no modo negativo com uso de solventes auxiliares acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v): água com ácido fórmico 0,1% (v/v); (50:50).



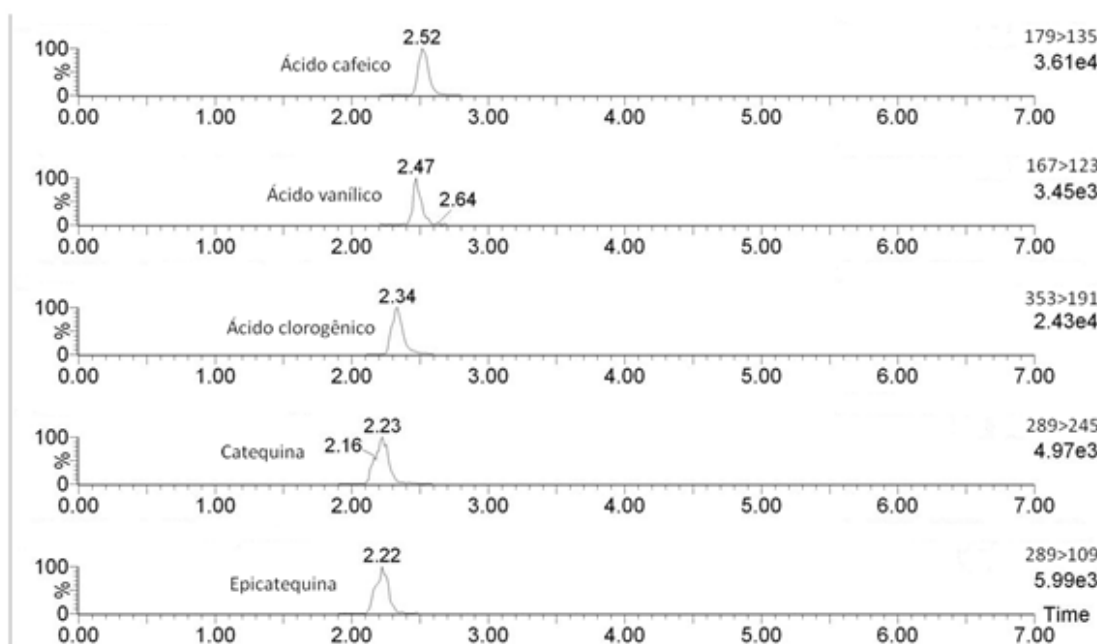


Figura 5. Cromatograma da mistura, contendo 11 padrões com ESI no modo negativo.

Pela observação da maioria dos compostos nos testes realizados, e considerando a solubilidade destes descritos na literatura, os gradientes que apresentaram melhor linha de base das bandas cromatográficas e eficiência foram aqueles em que se utilizou, como fase móvel A, água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, combinada com fase móvel B, acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico.

Dos gradientes testados, o que se mostrou mais promissor foi o gradiente de eluição composto por 3% B por 1 min; 3% a 15% B em 4 min; 15% a 40% em 3 min; 40% a 3% em 1 min (ANDRE, 2014).

O comportamento nos perfis dos cromatogramas pode ser visto para o extrato R otimizado com ESI no modo negativo com adição de ácido e base.

Na Figura 6, os cromatogramas também foram alcançados com o uso da fase móvel contendo acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v): água com ácido fórmico 0,1% (v/v) (50:50), no modo de ionização negativo.

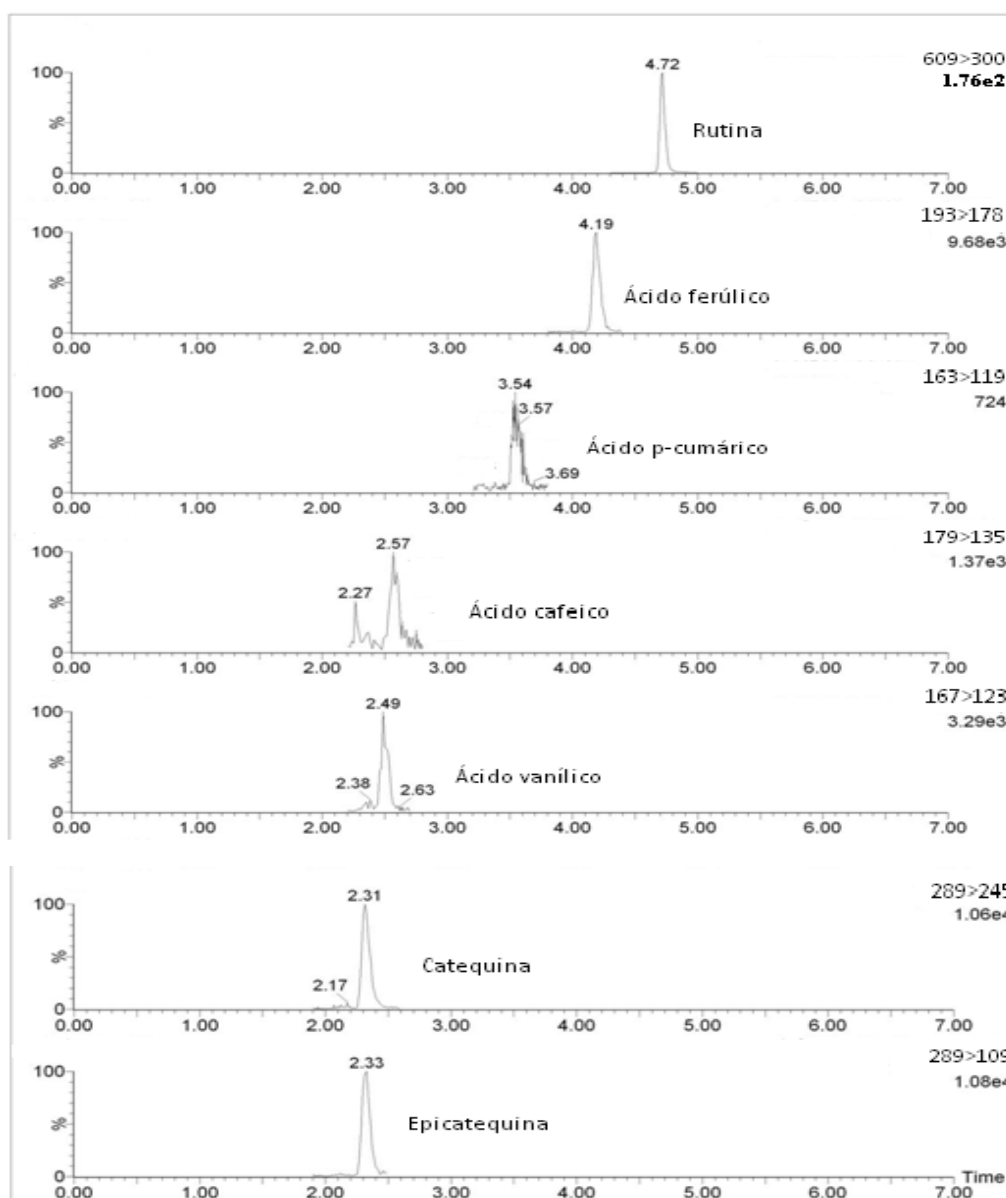


Figura 6. Cromatogramas do extrato R otimizado com ESI no modo negativo.

Já na Figura 7, foram utilizados solventes aquosos (ácido fórmico 0,1% (v/v) e tampão formiato de amônio ou NH_4OH em 0,025%) como fase móvel para o extrato R otimizado.

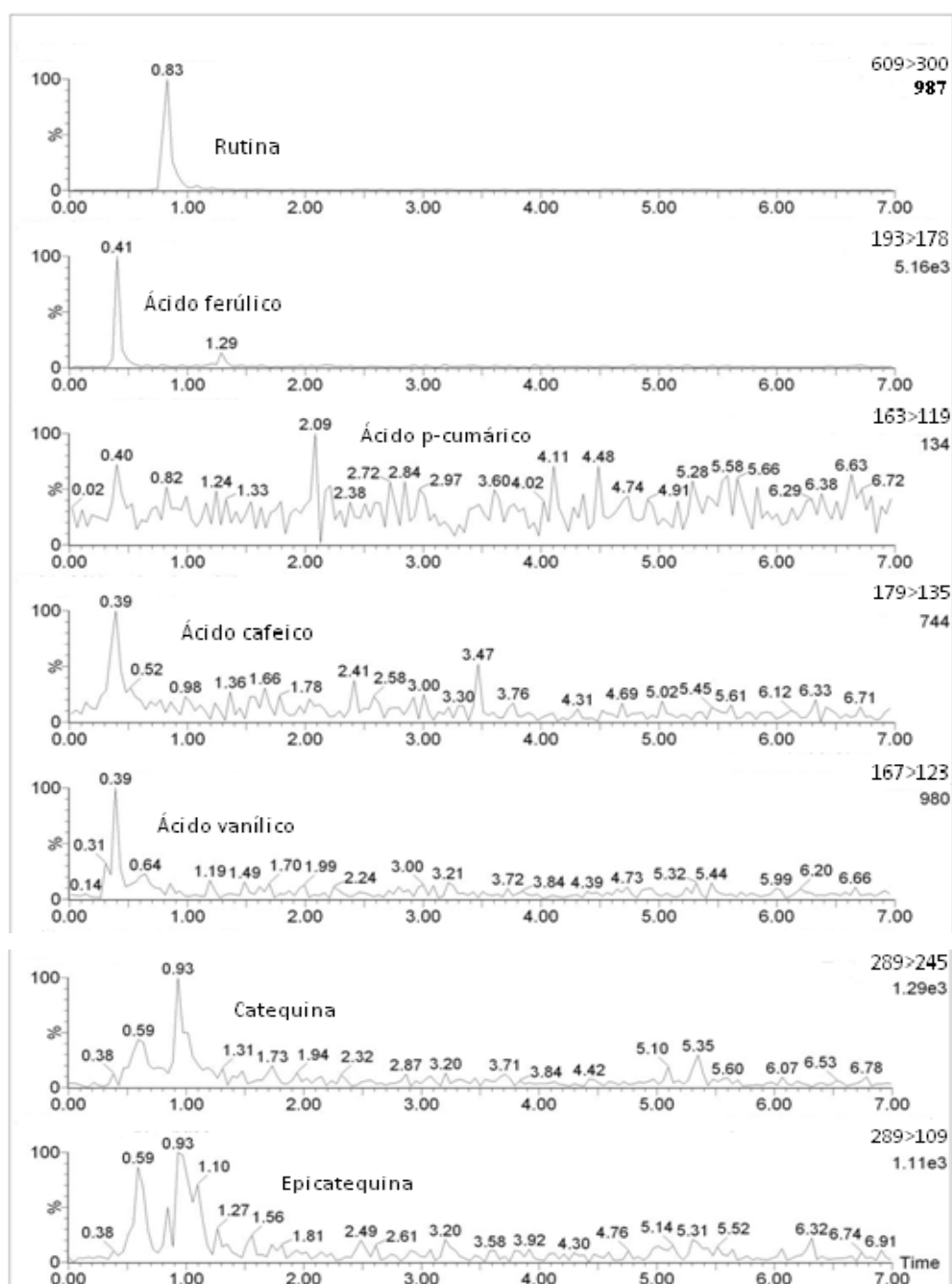


Figura 7. Cromatograma do extrato R otimizado com ESI no modo negativo com adição de NH_4OH 0,025%.

Com base na avaliação e comparação dos cromatogramas na matriz das Figuras 6 e 7, conclui-se que a adição de NH_4OH 0,025% na fase móvel diminui a intensidade e sensibilidade dos analitos, além de prejudicar a linha de base destes e causar coeluição de picos.

CONCLUSÃO

A técnica de UHPLC permite o acoplamento com a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS), e mostrou-se uma boa escolha na análise de compostos fenólicos em cevada.

Com a realização de testes de ESI no modo positivo, apenas 4 analitos foram capazes de sofrer ionização. Portanto, ficou evidente a escolha pelo modo negativo de ionização, sendo que este foi favorável para os 11 analitos investigados.

Na avaliação dos extratos de cevada para análise de compostos fenólicos, utilizou-se, como fase móvel, água acidificada combinada com acetonitrila acidificada, devido à maior sensibilidade dos analitos quando comparados com adição de base.

O desenvolvimento do método por UHPLC-MS/MS foi eficaz para monitorar 11 analitos simultaneamente num tempo de 7 min de análise e 10 min entre as replicatas das injeções. Destaca-se que o tempo de análise é muito baixo comparado com outros métodos de análise de compostos fenólicos em cevada citados na literatura por HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis Labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

ACOSTA-ESTRADA, B.A., GUTIERREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, n. 1, p. 46-55, 2014.

ANDRÉ, M. F., **Determinação de compostos fenólicos em extrato de carqueja empregando técnicas cromatográficas e eletroforéticas.** Tese de Doutorado. Instituto de Química. Unicamp, 2014.

BAIK, B. K.; ULLRICH, S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 2, p. 233-242, 2008.

BONOLI, M.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare L.*) flours. **Journal of Chromatography A**, v.1057, n.1-2, p. 1-12, 2004.

CZUCHAJOWSKA, Z.; KLAMCZYNSKI, A.; PASZCZYNSKA, B.; BAIK, B. K. *Structure and Functionality of Barley Starches. Cereal Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 747-754, 1998.

FERRERES, F.; KRŠKOVÁ, Z.; GONÇALVES, R.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; DUSEK, J. *Free water-soluble phenolics profiling in barley (Hordeum vulgare L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 6, p. 2405-2409, 2009.

GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. *Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. Food Chemistry*, v. 111, n. 3, p.789–794, 2008.

HAO, M.; BETA, T. *Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, n. 10, p. 2062-2068, 2012.

HURTADO-FERNANDEZ, E.; GÓMEZ-ROMERO, M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. *Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, n. 5, p. 1130-1160, 2010.

KONATO, F. R. B., *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de alface, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Unicamp, 2014.

LANÇAS, F.M., *A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?* **Scientia Chromatographica**, v.1, n. 2: p. 35-61, 2009.

LIU, Q.; YAO, H. *Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 732-737, 2007.

MAILLARD, M.-N. and C. BERSET, *Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 7, p. 1789-1793, 1995.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quimica Nova*, v. 32, n.1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC *Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes*. *Scientia Chromatographica*, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. *Antioxidant assays for plant and food components*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOREIRA, M. M., MORAIS, S., CARVALHO, D. O., BARROS, A. A., DELERUE-MATOS, C., GUIDO, L. F. *Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds*. *Food Research International*, v. 54, n. 1, p. 382-388, 2013.

NAUSHAD, M.; KHAN, M.; ALOTHMAN, Z. *Alothman, History and Introduction of UPLC/MS*. p. 1-16, 2014.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H; MARTINS, C. P, LUCCI, P. *New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis*. *Journal of Chromatography A*, v. 1228, p. 298-323, 2012.

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

VAN STEENE, J.C.; LAMBERT, W.E. *Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters*. *Journal of the American Society for Mass Spectrom*, v. 19, n. 5, p. 713-718, 2008.

VAN BRAMER, S. E. *An introduction to mass spectrometry*. 1998, Widener: Chester PA.

VERARDO, V.; GOMEZ-CARAVACA, A. M.; MARCONI, E.; FIORENZA CABONI, M. *Air classification of barley flours to produce phenolic enriched ingredients: Comparative study among MEKC-UV, RP-HPLC-DAD-MS and spectrophotometric determinations*. *LWT. Food Science and Technology*, v. 44, n.7, p. 1555-1561, 2011.



ZHAO, H.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.; LIN, Y.; FAN, W.; GU, G. *Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare L.*)*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277-7286, 2006.