



NATÁLIA ALVES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS EM GERMOPLASMA DE MILHO E
APLICAÇÃO EM BIOPOLÍMEROS
ALIMENTÍCIOS**

**LAVRAS – MG
2016**

NATÁLIA ALVES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
GERMOPLASMA DE MILHO E APLICAÇÃO EM BIOPOLÍMEROS
ALIMENTÍCIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Joelma Pereira

Coorientadora

Dra. Maria Cristina Dias Paes

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Barbosa, Natália Alves.

Caracterização de compostos bioativos em germoplasma de milho e
aplicação em biopolímeros alimentícios / Natália Alves Barbosa. –
Lavras: UFLA, 2016.

160 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Joelma Pereira.

Bibliografia.

1. Milho colorido. 2. Extrato fenólico. 3. Biopolímeros. 4. Atividade
antioxidante. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

NATÁLIA ALVES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM
GERMOPLASMA DE MILHO E APLICAÇÃO EM BIOPOLÍMEROS
ALIMENTÍCIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de outubro de 2016.

Dra. Maria Cristina Dias Paes	EMBRAPA/CNPMS
Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA
Dra. Marali Vilela Dias	UFLA
Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho	UFLA

Dra. Joelma Pereira
Orientadora

**LAVRAS - MG
2016**

A Deus, por iluminar sempre meu caminho

OFEREÇO

À minha família, presente em todos os momentos da minha vida.

Meus pais, Milton e Márcia.

Meu esposo, Leandro.

Minha irmã, Danielle.

*Vocês são exemplo de família, amor e união!!!
São responsáveis por todas as minhas conquistas.*

Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir sonhar e realizar meus sonhos. Sou apaixonada por Ti, Jesus. Mais uma vez, sonhei, busquei e conquistei!!!

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Milho e Sorgo, pela oportunidade de realizar os experimentos em seus laboratórios e pelo custeio da pesquisa.

Ao Laboratório de Análises de Vitaminas da UFV e à responsável por ele, professora Helena Maria Pinheiro Sant'Ana, por permitir a realização das análises de tocoferóis.

À minha orientadora, professora Joelma Pereira, pela compreensão, paciência, correções e pela amizade. Obrigada por ser minha orientadora.

À minha coorientadora, Maria Cristina Dias Paes, pela paciência, por ser a maior incentivadora na superação de meus limites. Meu carinho e admiração sempre. Obrigada por participar da minha formação.

Aos membros da banca, pela atenção e disposição.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo, Fabiano Okumura, Alyne, Andreia, Bruna, Carlos César, Elaine, Jefferson, Letícia, Lydmara, Mônica, Nayara, Tatiane, Michel, Michelle Bastos e aos amigos do coral. Agradeço imensamente a todos pela amizade e convivência durante o trabalho experimental e, em especial, ao Carlos Henrique Pires, que muito contribuiu com suas orações. Às estagiárias do Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, Ediani, Michele Caroline, Paulinha e Rafaela Chaves, pelo carinho, companheirismo e auxílio no trabalho experimental. A todos os amigos do Laboratório de Grãos, Raízes e Tubérculos da UFLA, que sempre me

ajudaram quando precisei e pela harmoniosa convivência. Sinto-me engrandecida por ter feito parte dessa equipe. À doutoranda Pâmela, que me auxiliou nas análises de tocoferol.

Aos meus pais, Milton e Márcia, pelo exemplo de vida e de dignidade e por estarem sempre presentes. Ao meu esposo, Leandro, amigo e companheiro, pelo incentivo constante, amor, carinho e confiança. À minha irmã, Danielle, por estar sempre ao meu lado. Agradeço, carinhosamente, por tudo.

A todos que torceram por mim, acreditaram nesta vitória e que fazem parte deste momento de conquista, meus sinceros agradecimentos!!!

*Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos
erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias a baixam
para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

RESUMO GERAL

O milho tem ampla diversidade genética, dando origem a grande número de variedades e híbridos. Esta cultura apresenta várias colorações de grãos, entretanto, os milhos coloridos, como vermelho, roxo, azul e preto, são produzidos comercialmente apenas em pequenas quantidades, apesar de apresentarem substâncias com potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Nesta tese, as propostas foram caracterizar acessos pertencentes ao banco germoplasma de milho Tropical colorido da Embrapa Milho e Sorgo quanto à composição de substâncias de importância nutricional e industrial nos grãos, selecionar acesso de maior concentração de fitoquímicos e atividade antioxidante, além de obter extrato fenólico com elevada atividade antioxidante para a incorporação em biopolímero com ação antimicrobiana e aplicação na extensão da vida útil de morangos armazenados sob refrigeração, cobertos por esse biopolímero. Para tanto, a tese está dividida em cinco capítulos. Foi possível concluir que acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Milho Tropical colorido apresentam diferenças quanto à composição de fenólicos, antocianinas e à capacidade antioxidante dos grãos, e estas estão em maiores concentrações em grãos com coloração mais intensa (capítulo 2); dentre os acessos avaliados, o que mais se destaca quanto à composição de fitoquímicos e capacidade antioxidante é o TO 002 (capítulo 3); uso do solvente etanol 80% a 20 °C é a condição ideal para a extração de fenólicos de milho com a finalidade de aplicação alimentícia e biopolímeros comestíveis à base de amido, e zeína com adição de 100% de extrato fenólico do milho TO 002 apresenta atividade antimicrobiana para a bactéria *Staphylococcus aureus* (capítulo 4) e morangos armazenados sob refrigeração, revestidos com cobertura de amido ou zeína adicionados a 100% de extrato fenólico, podem ter vida útil maior que a dos morangos não revestidos (Capítulo 5).

Palavras-chave: Milho colorido. Extrato fenólico. Biopolímeros. Atividade antioxidante.

GENERAL ABSTRACT

Corn has wide genetic diversity, originating a large numbers of varieties and hybrids. This crop shows several colorations of grains, however, colored corns, such as red, purple, blue and black, are commercially produced only in small quantities, despite presenting substances with potential for the development of functional foods. In this thesis, the proposal was to characterize some tropical maize belonging to the Embrapa Milho e Sorgo Germplasm Bank in relation to the composition of substances of nutritional and industrial importance in the grains, to select access of higher concentration of phytochemicals and antioxidant activity, besides obtaining phenolic extract with high antioxidant activity for the incorporation in biopolymer with antimicrobial action and application in the extension of the useful life of strawberries stored under refrigeration, covered by this biopolymer. Therefore, the thesis is divided into five chapters. It was concluded that maizes from the active colored tropical corn germplasm bank shows difference in the composition of phenolic, anthocyanin and antioxidant capacity of the grain, and these are in higher concentrations in grains with more intense color (Chapter 2); among genotypes what stands out most about the composition of phytochemicals and antioxidant capacity is the TO 002 (Chapter 3); to obtain a phenolic extract is ideal to work with a temperature of 20 ° C and 80% ethanol solvent and edible biopolymers based on starch and zein with addition of 100% corn TO statement 002 has antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* bacteria (Chapter 4) and strawberries stored in coated cooling starch coverage or zein added to 100% of phenolic extract they may have longer life than non-coated strawberries (Chapter 5).

Keywords: Colored corn. Phenolic extract. Biopolymers. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Anatomia do grão de milho..... 21
Figura 2 - Principais compostos bioativos identificados em grãos de milho.. 24
Figura 3 - Esqueleto básico de flavonoides..... 27
Figura 4 - Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol 30
Figura 5 - Estrutura química do β -caroteno..... 33

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo. (Continuação) 54

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Acessos de milho colorido do BAG..... 81

CAPÍTULO 4

- Figura 1 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (A) e da atividade antioxidante (% de Inibição) (B) nos extratos em diferentes temperaturas.109
Figura 2 - A) Biopolímero de amido de milho com 0% de adição de extrato Fenólico; B) biopolímero de amido de milho com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímero de amido de milho com 100% de adição de extrato fenólico.....111
Figura 3 - A)Biopolímeros de zeína com 0% de adição de extrato fenólico; B) biopolímeros de zeína com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímeros de zeína com 100% de adição de extrato fenólico.111
Figura 4 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente do parâmetro de cor: variável L^* (A), variável a^* (B), variável b^* (C) e ΔE (D), para os biopolímeros de amido de milho e zeína, em diferentes concentrações de extrato.....113
Figura 5 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (A) e atividade antioxidante (% de inibição) (B) nos biopolímeros de amido e zeína, em diferentes concentrações de extrato.....115

Figura 6 -	A) Biopolímero de zeína com 0% de adição de extrato fenólico; B) biopolímero de zeína com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímero de zeína com 100% de adição de extrato fenólico; D) biopolímero de amido de milho com 0% de adição de extrato fenólico; E) biopolímero de amido de milho com 50% de adição de extrato fenólico; F) biopolímero de amido de milho com 100% de adição de extrato fenólico.....	116
------------	--	-----

CAPÍTULO 5

Figura 1 -	Fluxograma do preparo dos morangos.....	130
Figura 2 -	Solução de cobertura de amido de milho sem adição de extrato (A) e solução de cobertura de amido de milho com adição de extrato (B).	132
Figura 3 -	Solução da cobertura de zeína sem adição de extrato (A) e solução da cobertura de zeína com adição de extrato (B).	133
Figura 4 -	Morangos revestidos com CAEF (A), morangos revestidos com CZEF (B).	134
Figura 5 -	Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de perda de massa dos morangos sem cobertura e revestidos com CAEF e CZEF, durante período de armazenamento (dias) refrigerado.	142
Figura 6 -	Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de acidez titulável ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos morangos sem cobertura e revestidos com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.....	145
Figura 7 -	Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.	147
Figura 8 -	Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.	149
Figura 9 -	Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias da atividade antioxidante, expressa em % de inibição dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.	150
Figura 10 -	Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de antocianinas ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos	

morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Estruturas químicas indicando os grupos metilas no anel α , β , γ e δ	30
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Classificação do acesso de milho conforme coloração do pericarpo dos grãos.	52
Tabela 2 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho, apresentando médias da concentração de fenólicos totais distintas (base seca). (Continuação)	65
Tabela 3 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho apresentando médias da concentração de antocianinas (base seca).	69
Tabela 4 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho apresentando médias distintas da atividade antioxidante.	71
Tabela 5 - Correlação de Pearson para a atividade antioxidante e as variáveis fenólicas totais e antocianinas dos acessos de milho.	72

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição centesimal dos grãos de milho dos acessos pigmentados.	87
Tabela 2 - Valores médios ¹ de variáveis de cor dos grãos de acessos pigmentados.	88
Tabela 3 - Valores médios ¹ da concentração de fitoquímicos (base seca) presentes nos grãos de milho de acessos pigmentados.	88
Tabela 4 - Valores médios ¹ da concentração de carotenoides (base seca) em grãos de milho de acessos pigmentados.	89
Tabela 5 - Valores médios ¹ da concentração de tocóis em grãos de milho de acessos pigmentados.	90
Tabela 6 - Valores médios ¹ da atividade antioxidante (base seca) dos grãos de milho de acessos pigmentados.	91

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Tratamentos do estudo da concentração de fenólicos totais em diferentes solventes e temperaturas.	101
---	-----

Tabela 2 - Tratamentos do estudo da funcionalidade dos biopolímeros adicionados de extrato fenólico, quanto à ação antimicrobiana.	102
Tabela 3 - Médias da concentração de fenólicos totais dos extratos em diferentes solventes.....	110

CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Tratamentos do estudo do efeito de cobertura comestível adicionada de extrato de milho preto rico em compostos fenólicos na vida útil de morangos.	129
Tabela 2 - Composição físico-química dos morangos <i>in natura</i> utilizados para o experimento	140
Tabela 3 - Média de pH dos morangos submetidos a diferentes tratamentos.	144

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	
1	INTRODUÇÃO GERAL	18
2	REFERENCIAL TEORICO	21
2.1	Milho	21
2.2	Fitoquímicos ou compostos bioativos	23
	REFERÊNCIAS.....	35
	CAPÍTULO 2 Caracterização de germoplasma de milho tropical quanto a compostos bioativos.....	47
1	INTRODUÇÃO.....	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Delineamento experimental	51
2.2	Amostragens e análises	53
2.2.1	Umidade	60
2.2.2	Determinação de fenólicos totais	60
2.2.3	Determinação da capacidade antioxidante.....	61
2.2.4	Antocianinas.....	62
2.3	Análise estatística.....	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1	Fenotipagem de acessos do BAG Milho quanto à concentração de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante.....	64
3.2	Correlação entre atividade antioxidante e as variáveis fenólicos totais e antocianinas	72
4	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	CAPÍTULO 3 Composição centesimal e concentração de substâncias bioativas de acessos de milho de grãos pigmentados	78
1	INTRODUÇÃO.....	80
2	MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1	Delineamento experimental	81
2.2	Composição centesimal	82
2.2.1	Umidade	82
2.2.2	Extrato etéreo.....	82
2.2.3	Fibra bruta.....	82
2.2.4	Cinzas	82
2.2.5	Proteína	83
2.2.6	Fração glicídica	83
2.3	Cor.....	83
2.4	Determinação dos compostos bioativos	84

2.4.1	Fenólicos totais.....	84
2.4.2	Antocianinas.....	84
2.4.3	Perfil de tocoferol.....	84
2.4.4	Perfil de carotenoides.....	85
2.5	Determinação da capacidade antioxidante.....	86
2.6	Análise estatística.....	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93
	CAPÍTULO 4 Obtenção de extrato fenólico de acesso de milho de grãos pretos e sua funcionalidade antimicrobiana em biopolímeros.....	96
1	INTRODUÇÃO.....	98
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	101
2.1	Delineamento experimental.....	101
2.1.1	Estudo da concentração de fenólicos totais de extratos obtidos por meio de diferentes temperaturas e solventes.....	101
2.1.2	Estudo das soluções para a obtenção dos biopolímeros e funcionalidade quanto à ação antimicrobiana dos biopolímeros adicionados de extrato fenólico.....	102
2.2	Preparo da amostra e estudo dos diferentes métodos de extração de fenólicos totais.....	102
2.2.1	Determinação de fenólicos totais.....	103
2.2.2	Atividade antioxidante.....	103
2.3	Preparo dos biopolímeros.....	103
2.3.1	Biopolímero à base de amido de milho.....	103
2.3.2	Biopolímero a base de zeína.....	104
2.3.3	Caracterização dos biopolímeros.....	105
2.3.3.1	Determinação do teor de umidade.....	105
2.3.3.2	Espessura.....	106
2.3.3.3	Cor.....	106
2.3.3.4	Determinação de fenólicos totais.....	106
2.3.3.5	Atividade antioxidante.....	107
2.4	Atividade antimicrobiana.....	107
2.5	Análise estatística.....	108
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
3.1	Estudo dos extratos.....	109
3.2	Caracterização dos biopolímeros.....	110
3.3	Funcionalidade dos biopolímeros quanto ação antimicrobiana.....	115
4	CONCLUSÃO.....	119
	REFERÊNCIAS.....	120

	CAPÍTULO 5 Efeito de cobertura comestível adicionada de extrato de milho preto rico em compostos fenólicos na vida útil de morangos	125
1	INTRODUÇÃO.....	127
2	MATERIAL E MÉTODOS	129
2.1	Delineamento experimental	129
2.2	Matéria-prima.....	130
2.3	Preparo do extrato fenólico	131
2.4	Preparo das soluções de cobertura	132
2.5	Aplicação da cobertura.....	133
2.6	Preparo das amostras para análises químicas.....	134
2.7	Determinação da umidade	135
2.8	Perda de massa.....	135
2.9	Determinação da acidez titulável.....	135
2.10	Sólidos solúveis totais.....	136
2.11	pH.....	136
2.12	Preparo da amostra para as análises de fenólicos totais e atividade antioxidante.....	136
2.12.1	Determinação de fenólicos totais	136
2.12.2	Determinação da capacidade antioxidante.....	137
2.13	Antocianinas.....	138
2.14	Análise estatística	138
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
3.1	Caracterização da matéria-prima	140
3.2	Estudo da vida útil dos morangos com e sem revestimento	141
3.2.1	Perda de massa.....	141
3.2.2	pH e acidez titulável.....	143
3.2.3	Sólidos solúveis.....	146
3.2.4	Fenólicos totais	148
3.2.5	Atividade antioxidante.....	150
3.2.6	Antocianinas.....	151
4	CONCLUSÃO.....	154
	REFERÊNCIAS.....	155

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A inestimável riqueza genética do milho vem sendo conservada nos bancos ativos de germoplasma (BAG). Muito embora o banco ativo de germoplasma de milho (BAG Milho) e o programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo conservem grande diversidade de milho em termos de origem, morfologia e estrutura de grãos, a seleção de materiais para a geração de novas cultivares está focada, principalmente, nas características agronômicas. Poucas informações têm sido consideradas, no que tange aos componentes de importância biológica para a nutrição e às propriedades físico-químicas e físicas de grãos, atributos essenciais para a agregação de valor e a adequação de uso de matérias-primas.

Compostos fitoquímicos são definidos como compostos bioativos presentes, principalmente, em frutas, legumes, grãos e outros alimentos vegetais (LIU et al., 2009). São produtos do metabolismo secundário dos vegetais que, além de sua função primária de proteção, contribuem, ainda, para conferir qualidades sensoriais, como a cor e a adstringência (BORGUINI, 2006; OLIVEIRA; BASTOS, 2011). São classificados como fenólicos carotenoides, alcaloides, compostos nitrogenados e compostos organossulfurados, dos quais participam outros compostos (LIU, 2003). Cada um desses apresenta uma particularidade em relação à fonte, à estrutura e à ação no organismo (LIU, 2003, 2004).

No milho, os principais fitoquímicos encontrados são fenólicos, tocoferóis e carotenoides. A distribuição no grão é distinta, estando os carotenoides presentes em maiores quantidades no amiloplasto do endosperma do grão de milho (BERALDO et al., 2004); os tocoferóis são encontrados em

quantidades significativas no germe e, em menores quantidades, no endosperma (EL-MALLAH; MUMI; EL-SHAMI, 1999) e os compostos fenólicos estão fortemente ligados aos constituintes da parede celular (ADOM; SORRELLS; LIU, 2003).

O interesse pelo estudo dos compostos bioativos em fontes naturais tem crescido consideravelmente devido à habilidade antioxidante dessas substâncias em sequestrar radicais livres e prevenir, em nível celular, os danos relacionados ao desenvolvimento de doenças (DORMAN et al., 2003). Estudos epidemiológicos têm mostrado correlação entre o aumento do consumo de compostos bioativos com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (ARRANZ et al., 2008; COOK; SAMMAN, 1996; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SALGADO, 2009; WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007).

No setor alimentício, muitos pesquisadores têm investigado a ação desses compostos em biopolímeros e em coberturas alimentícias por apresentarem, dentre outras funções, atividade antioxidante e antimicrobiana (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013; CHENSON; STEWARD; WALLACE, 1982; ESPINA et al., 2011; MENEZES, 2005; MOHAMMADZADEH et al., 2007; STEAD, 1993). Os compostos ativos alvos destes estudos são, principalmente, os compostos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos p-cumárico, cafeico e gálico (DE LA PARRA; SERNA; HAI, 2007; LÓPEZ-MARTINEZ et al., 2009; MONTILLA et al., 2011). Em meio a tantos benefícios, a utilização desses compostos poderia também substituir os aditivos sintéticos utilizados em grande escala no setor alimentício e que causam danos à saúde (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009).

Nesta tese, os objetivos foram caracterizar o germoplasma de milho da Embrapa Milho e Sorgo quanto à composição de substâncias de importância

nutricional (capítulo 2), selecionar acesso de maior concentração de fitoquímicos e atividade antioxidante (capítulo 3), obter extrato fenólico com elevada atividade antioxidante para incorporação em biopolímero e avaliar sua ação antimicrobiana (capítulo 4) e aplicação na extensão da vida útil de morangos armazenados sob refrigeração, cobertos com esse biopolímero (capítulo 5).

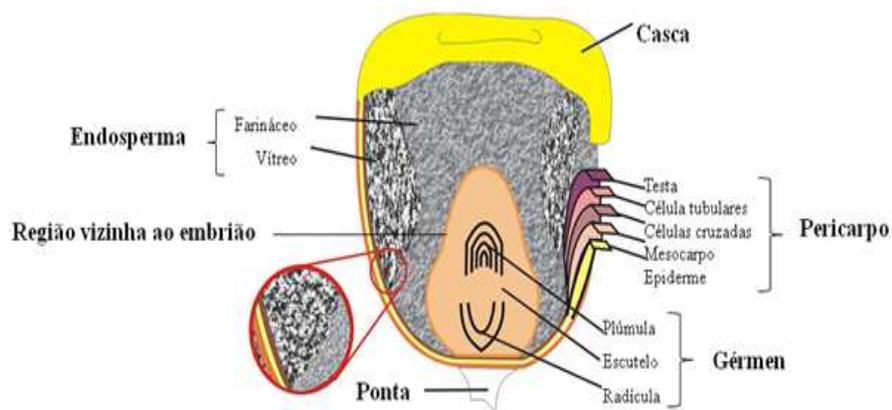
2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Milho

O milho é uma planta pertencente à família das Gramineae/Poaceae (MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2002). Consumido pelos povos americanos desde o ano 5.000 a.C., este cereal constituiu alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Hoje, é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só é menor que a do trigo e a do arroz (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABIMILHO, 2016).

O grão de milho é classificado, botanicamente, como uma cariopse, apresentando, basicamente, três partes anatômicas: o pericarpo, o endosperma e o gérmen, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Anatomia do grão de milho.



Fonte: Adaptado de Encyclopaedia Britannica (2006)

O pericarpo, a camada fina e resistente que constitui a parede externa da semente, é formado por várias camadas de fibra e representa 5% do peso do grão. O endosperma, a parte mais volumosa, representa mais de 80%, é envolvido pelo pericarpo e constituído de substância de reserva, basicamente o amido. A porção mais externa do endosperma e em contato com o pericarpo denomina-se camada de aleurona, rica em proteínas e enzimas que desempenham papel importante no processo de germinação. O gérmen está posicionado em uma depressão da superfície superior do endosperma, perto da base do grão. É rico em lipídeos e proteínas e pobre em amido (FORNASIERI FILHO, 1992; JOHNSTON; TAYLOR; HAMPL, 2000).

Grãos de milho de diferentes colorações estão presentes na natureza, todavia, grãos de coloração vermelha, roxo, azul e preto são produzidos apenas em pequenas quantidades, apesar de apresentarem grande valor para a preparação de alimentos funcionais ou para uso na ornamentação, devido à sua aparência colorida (ABDEL-AAL; YOUNG; RABALSKI, 2006). A pigmentação do milho destaca-se, principalmente, no pericarpo do grão (ABDEL-AAL; YOUNG; RABALSKI, 2006), podendo ser encontrada também na camada de aleurona, germe e endosperma (PEREIRA, 2006).

O milho de coloração roxa tem sido cultivado há séculos na Região Andina. No Peru, as pessoas consomem uma bebida típica chamada "chicha morada", feita de milho roxo, que é considerado, por folclore, um auxiliar na saúde (BRACK-EGG, 1999). No Chile, existem mais de 900 acessos de milho e a maior parte deles é totalmente pigmentada ou multicolorida (SALAZAR-SUAZO et al., 2006). No Japão, o milho roxo é utilizado como fonte de pigmentos adicionados a bebidas e geleias, entre outros alimentos (GABRIELSKA et al., 1999; TSUDA et al., 1996). No Brasil, o mais conhecido é o milho amarelo (AGROLINK, 2016), sendo consumido como milho verde, na

forma de espiga cozida, na preparação de pratos típicos, como pamonha, curau ou, ainda, na forma de canjica, fubá e creme de milho.

2.2 Fitoquímicos ou compostos bioativos

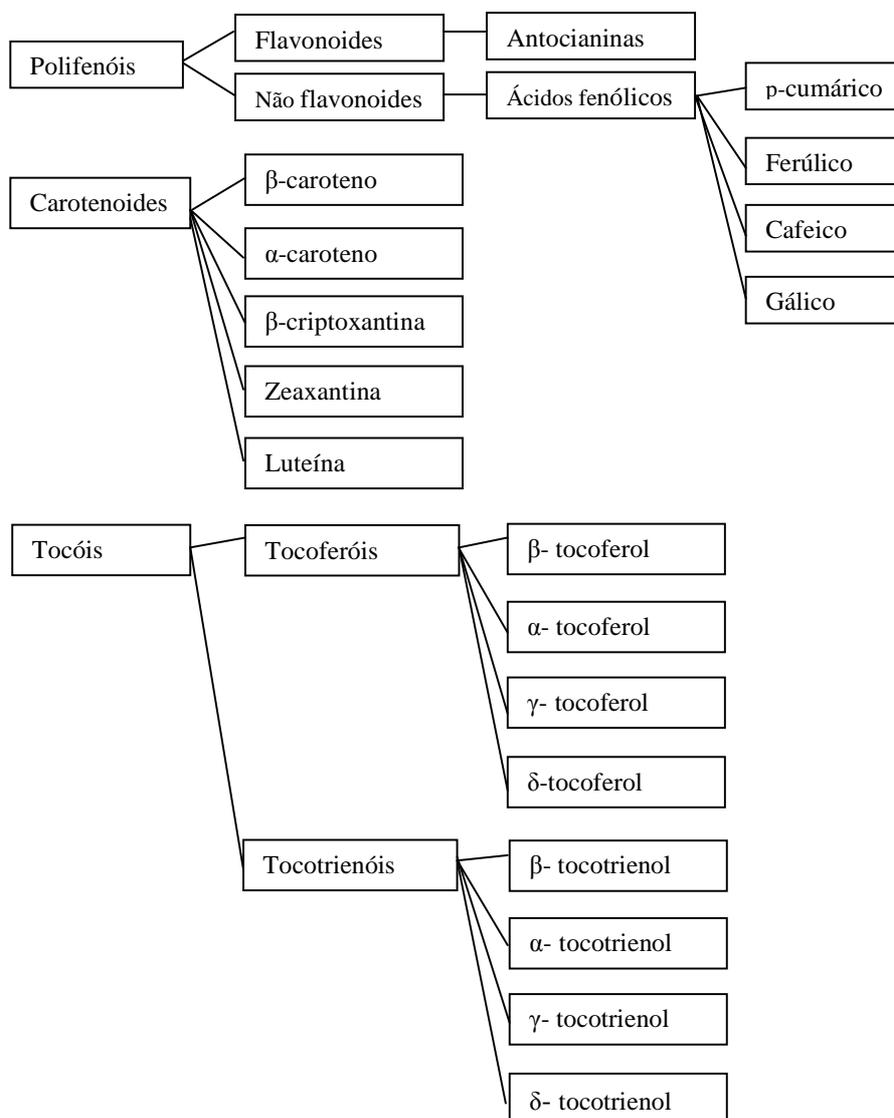
As substâncias ativas presentes nos alimentos, responsáveis por ações biológicas benéficas à saúde humana, são chamadas de fitoquímicos ou compostos bioativos. Exemplos desses compostos são os fenólicos, os tocoferóis e os carotenoides (LAJOLO, 2005).

Esses compostos são constituintes extras nutricionais que ocorrem, tipicamente, em alimentos de origem vegetal, com atividades biológicas ditas promotoras da saúde (KRIS-ETHERTON et al., 2002; PINTO, 2008; YOU et al., 2011).

Muita atenção tem sido dada aos compostos bioativos, especialmente para aqueles com alto teor de antioxidantes capazes de prevenir e/ou aliviar as dores de muitas doenças crônicas não transmissíveis resultantes da ação de radicais livres, como as cardiovasculares, além de câncer, doenças neurodegenerativas, inflamações e o envelhecimento (YOU et al., 2011).

Na Figura 2 apresenta-se uma relação das principais classes de compostos bioativos presentes nos grãos de milho (ANDREASEN et al., 2001; CLASSEN et al., 1990; HU; XU, 2011; PLATE; GALLAHER 2005; WHITE; WEBER, 2003).

Figura 2 - Principais compostos bioativos identificados em grãos de milho.



a) Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários e uma das principais classes de antioxidantes encontrados naturalmente em todas as plantas (YOU et al., 2011). Dentre os alimentos naturais que apresentam compostos fenólicos em sua composição química têm-se grãos de cereais e leguminosas, além das frutas e hortaliças (SGARBIERI, 1999).

O termo compostos fenólicos abrange grande variedade de compostos químicos cujo aspecto estrutural é a presença, nas suas moléculas, de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; SHAHIDI; NACZK, 1995).

Esses fitoquímicos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes dos alimentos, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Nas plantas, os compostos fenólicos são essenciais no crescimento e na reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação. Em alimentos, têm sido relacionados à cor, ao aroma e à estabilidade oxidativa (ÂNGELO; JORGE, 2007; BOBBIO; BOBBIO, 1989; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004; SOARES, 2002). Além disso, exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas, como antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora. Mas, o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante e antimicrobiana em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; MAJO et al., 2005; WORARATPHOKA; INTARAPICHET; INDRAPICHET, 2007).

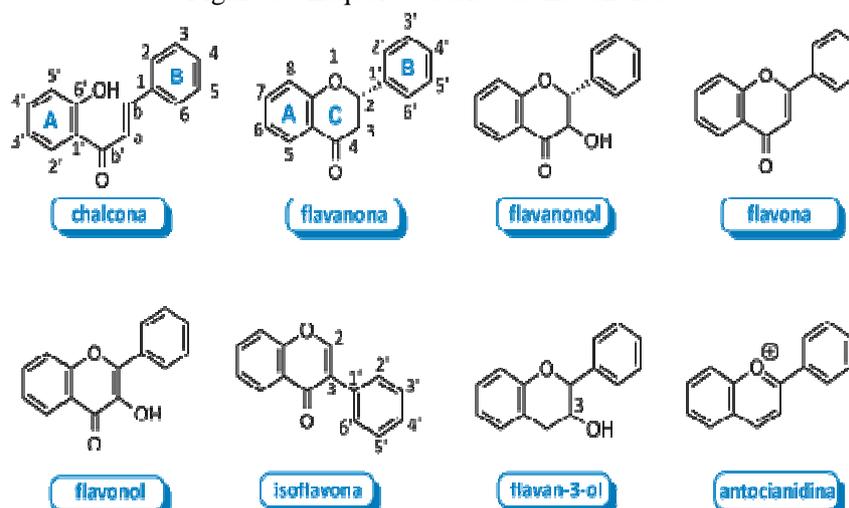
São classificados em dois grandes grupos, os flavonoides e os não flavonoides. Os flavonoides representam o maior grupo de polifenóis encontrado

em alimentos (SCALBERT; WILLIANSO, 2000), além de serem considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHID; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOOBRAATTEE et al., 2005). Os principais flavonoides incluem antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis (catequinas), flavanonas e as proantocianidinas e os não flavonoides estilbenos, ácidos fenólicos e álcoois fenólicos (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os flavonoides são responsáveis pela coloração das frutas e legumes, sendo as antocianinas, em particular, responsáveis pelas colorações rosa, escarlate, vermelho, lilás, azul e violeta de legumes e frutas (MAZZA; MINIATI, 1994). Outros flavonoides podem também contribuir para a coloração de produtos alimentícios. Plantas que contêm flavonoides, como flavonóis, flavonas, chalconas, auronas, flavanonas, isoflavonas e biflavonoides, apresentam coloração amarela ou marfim (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides devido à sua característica de esqueleto carbônico $C_6C_3C_6$. A estrutura química básica do grupo dos flavonoides e sua relação com as antocianinas são mostradas na Figura 3. Dentro de cada grupo, há muitos compostos diferentes e sua cor depende da presença e do número de substituintes ligados à molécula (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Figura 3 - Esqueleto básico de flavonoides.



Fonte: Coutinho, Muzitano e Costa (2009)

De acordo com Mazza e Brouillard (1987), a cor das antocianinas varia de acordo com as estruturas químicas e as condições físico-químicas do meio. A um determinado pH, as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3-5-diglucósido ou as antocianinas-5-glucósido. Da mesma forma, as antocianinas podem ser coradas ou não consoante o pH do meio, a sua concentração e a presença ou não de copigmentos.

Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998; SOARES, 2002). Podem ser divididos, ainda, em solúveis e insolúveis. Os solúveis encontram-se compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares (BECKMAN, 2000) e estão na forma livre ou conjugada, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular (para fortalecer a parede celular dos grãos), esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (FAULDS; WILLIAMSON, 1999). Os ácidos fenólicos livres apresentam a menor parte dos componentes fenólicos e são solúveis em

soluções aquosas-orgânicas, tais como metanol, etanol ou acetona (TIAN; NAKAMURA; KAYAHARA, 2004).

Quanto aos compostos fenólicos presentes no milho, estes incluem os ácidos gálico, vanílico, p-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico e p-cumárico (WHITE; WEBER, 2003). Entretanto, no milho amarelo, o principal composto fenólico encontrado é o ácido ferúlico, totalizando 85,1% do total de ácidos fenólicos, sendo o ácido transferúlico o mais abundante (CLASSEN et al., 1990), com concentrações de 259 mg kg⁻¹ na farinha de milho, correspondendo a 73,2% total e 3,1% do peso seco do farelo de milho (PLATE; GALLAHER, 2005).

Nos grãos de milho, os quais apresentam uma matriz amilo-proteica complexa, os compostos fenólicos se apresentam tanto na forma livre quanto na forma complexada, ligados a essa matriz ou componentes das camadas exteriores do grão, representando estes fenóis complexados, em média, até 85% do total de compostos fenólicos nos grãos (ADOM; LIU, 2002). Neste cereal, os compostos fenólicos encontram-se, geralmente, na forma esterificada a estanois e esteróis (SEITZ, 1989). Entretanto, encontram-se também nas formas livres e insolúveis, sendo a forma complexada predominante. Alguns fenólicos do milho são ligados covalentemente a aminas e outros a glicosídeos (SAULNIER et al., 2001).

As antocianinas também se destacam quanto à sua concentração em grãos de milho coloridos. Milhos azuis têm concentrações elevadas dos flavonoides antocianinas, principalmente cianidina e malvidina, enquanto os milhos de grãos vermelhos apresentam pelargonidina, cianidina, malvidina e outras antocianinas ainda não identificadas (SALINAS et al., 2013). Além do milho azul, milhos com pigmentação roxa e vermelha também são ricos em antocianinas (ADOM; LIU, 2002; FIMOGNARI et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2004; TSUDA et al., 2003; YANG; WEIWEI, 2010). Esses pigmentos estão

associados com a camada de aleurona do endosperma e a cor visível do grão. Geralmente, grãos de pequeno a médio porte produzem coloração azul mais intensa, uma vez que têm proporção mais elevada de camada de aleurona, menos diluída pelo endosperma amiláceo (BETRAN; BOCKHOLT; ROONEY, 2000).

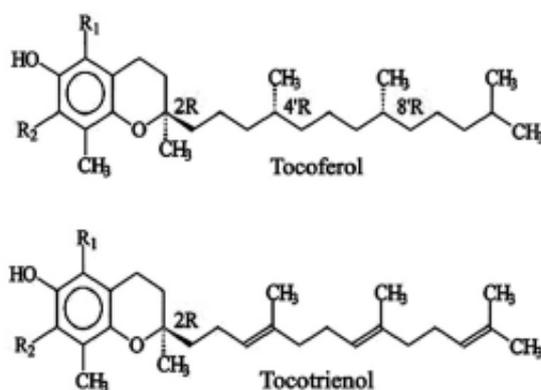
b) Tocoferóis e tocotrienóis

Os tocoferóis pertencem à classe dos antioxidantes lipossolúveis que, juntamente com os tocotrienóis, são genericamente chamados vitamina E ou tocóis (EL-MALLAH; MUMI; EL-SHAMI, 1999). No entanto, o termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION - AIN, 1979; CHUN et al., 2006).

Estas substâncias apresentam, como estrutura básica, um grupo 6-hidroxicromano e uma cadeia lateral fitol saturada constituída de unidades isoprenoides (LI et al., 2007). O grupo cromano pode ser metilado em diferentes posições, gerando produtos de diferentes atividades vitamínicas, consistindo de quatro isômeros de tocoferol e quatro isômeros de tocotrienóis (SIQUEIRA, 1997).

Na Figura 4 é apresentada a estrutura química do tocoferol e do tocotrienol.

Figura 4 - Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol.



Fonte: GUINAZ et al., 2009.

Existem quatro tipos de tocoferóis e tocotrienóis segundo a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ e δ (RAMALHO; JORGE, 2006), conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Estruturas químicas indicando os grupos metilas no anel α , β , γ e δ .

Tocopherol	Tocotrienol
α - tocoferol: R ₁ = R ₂ = R ₃ = CH ₃	α - tocotrienol: R ₁ = R ₂ = R ₃ = CH ₃
β - tocoferol: R ₁ = R ₃ = CH ₃ ; R ₂ = H	β - tocotrienol: R ₁ = R ₃ = CH ₃ ; R ₂ = H
γ - tocoferol: R ₁ = H; R ₂ = R ₃ = CH ₃	γ - tocotrienol: R ₁ = H; R ₂ = R ₃ = CH ₃
δ - tocoferol: R ₁ = R ₂ = H; R ₃ = CH ₃	δ - tocotrienol: R ₁ = R ₂ = H; R ₃ = CH ₃

Todas as quatro isoformas dos tocoferóis e tocotrienóis, α -, β -, γ - e δ , são encontradas no milho, sendo 95% do total de α -tocoferol e γ -tocoferol e a totalidade de δ -tocoferol concentrada no germe. Entretanto, γ -tocoferol é considerado o tocoferol de maior relevância no milho (EL-MALLAH; MUMI; EL-SHAMI, 1999), com concentração média de 45 mg kg⁻¹ (peso seco) (PANFILI; FRATIANNI; IRANO, 2003). Variações no conteúdo, na razão dessas isoformas e na distribuição nas partes anatômicas já foram reportadas

para linhagens de milho (WEBER, 1987), indicando possível seleção de acessos com perfil diferenciado para estes compostos.

Dentre os tocoferóis, o δ -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E (HEMEDA; KLEIN, 1990). A atividade antioxidante dos tocoferóis decresce do composto δ para o α -tocoferol e, assim, o δ -tocoferol é o mais efetivo antioxidante; o β e o γ -tocoferol têm atividade intermediária e o α -tocoferol apresenta a mais baixa atividade antioxidante (HEMEDA; KLEIN, 1990; MERKEN; BEECHER, 2000).

A importância dos tocoferóis para a saúde humana é relacionada à capacidade dos mesmos em sequestrar radicais livres na membrana celular, protegendo os ácidos graxos poli-insaturados da oxidação e da produção de radicais livres, assim, evitando alterações celulares, incluindo a integridade da membrana celular. Estas substâncias também exercem funções na imunidade e na reparação de danos causados por radicais livres ao DNA (ELMADFA; PARK, 1999; TRABER; PACKER, 1995).

Pode-se ressaltar a utilização do α -tocoferol na área de alimentos, com a função de conservante (CARVALHO, 2007); como fármacos, devido à sua função de captadores e liberadores de energia (PAIXÃO; STAMFORD, 2004); cosméticos, por meio de tratamento contra o envelhecimento cutâneo (ALMEIDA, 2008) e na inibição de doenças do coração (FREITAS, 2007).

Estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais e são amplamente aplicados como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (JORGE; GONÇALVES, 1998).

Pesquisas revelam que dietas à base de alimentos ricos em tocoferóis e tocotrienóis podem ajudar a combater o mal de Alzheimer (TAIPINA, 2009) e prevenir danos foto-oxidativos (ROPKE et al., 2003); podem, ainda, ser utilizados em veículos cosméticos associados com filtros solares (SASSON,

2006) e em condimentos com função antioxidante em produtos cárneos (MAURIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007), atuando, ainda, na função cognitiva (GUIMARÃES; VIANNA, 2009) e como avaliador de níveis séricos de animais (REIS; COSTA; PEIXOTO, 2007).

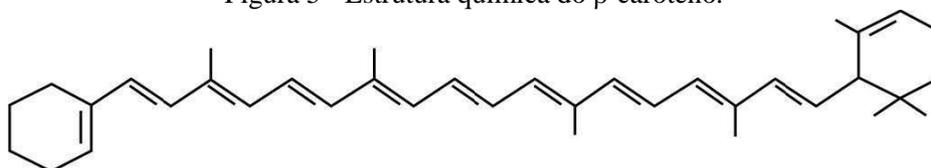
c) Carotenoides

O termo carotenoide caracteriza um grupo de pigmentos naturais de cor variável entre o amarelo e vermelho-escuro (AZEVEDO-MELEIRO, 2003). Nas plantas, os carotenoides participam do processo fotossintético absorvendo energia luminosa e transferindo-a para os centros de reação da clorofila além de protegerem o aparato celular fotossintético contra danos foto-oxidativos (BARTLEY; SCOINIK, 1995).

Já foram identificadas mais de 600 estruturas químicas dos carotenoides, das quais aproximadamente 50 têm atividade biológica e, deste total, cerca de 40 podem ser encontradas em alimentos (FRASER; BRAMLEY, 2004).

Esses compostos são classificados, de acordo com sua estrutura química, em carotenos (p.ex., β -caroteno e licopeno) e xantofilas (p.ex., luteína e zeaxantina), sendo o β -caroteno o mais estudado, dada a sua função precursora da vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

A estrutura básica dos carotenoides é um tetraterpeno com 40 átomos de carbono, formado por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES LÓPEZ, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura química do β -caroteno.

Fonte: Ambrósio, Campos e Faro (2006)

A propriedade dos carotenoides de absorver luz na região visível e, portanto, apresentar cor, deve-se ao sistema de duplas ligações conjugadas presente em suas estruturas, que também se relaciona às outras importantes funções/ações biológicas atribuídas aos carotenoides, como atividade pró-vitamínica A e antioxidante, importantes para a saúde humana. No entanto, a estrutura altamente insaturada torna-os bastante susceptíveis à degradação.

A principal e mais antiga função conhecida dos carotenoides é a atividade pró-vitamínica A, mas esta propriedade não é característica de todos os carotenoides, pois, para que o pigmento apresente esta função, a sua estrutura molecular deve ser composta, no mínimo, por uma cadeia poliênica de 11 carbonos contendo um anel β -ionona. Assim, dentre os mais de 600 carotenoides conhecidos, somente 50 deles são precursores da vitamina, como β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, a β -criptoxantina e α -criptoxantina. O β -caroteno é o mais importante precursor da vitamina A, pois tem, na sua estrutura molecular, dois anéis β -ionona que originarão duas moléculas desta vitamina, durante a etapa de conversão no organismo (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Os carotenoides estão presentes, principalmente, no milho amarelo e laranja (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2006), com destaque para as xantofilas (luteína, β -criptoxantina e zeaxantina), que perfazem cerca de 90% do total, além dos carotenos (β -caroteno e α -caroteno), encontrados em pequena concentração (JANICK-BUCKNER et al., 1999; KURILICH; JUVIK, 1999). Nos milhos normais, existem diferenças significativas na concentração de carotenoides totais (BERALDO et al., 2004; BLESSIN; BRECHER; DIMLER,

1963; QUACKENBUSH et al., 1963). Avaliando o teor e o perfil de 134 acessos do BAG Milho Tropical da Embrapa Milho e Sorgo, Cardoso et al. (2009) encontraram variação de 15 a 39,37 $\mu\text{g g}^{-1}$ de carotenoides totais.

Diferenças consideráveis em conteúdo de compostos bioativos e capacidade antioxidante entre um conjunto dos diferentes acessos de milho foram reportadas por Hu e Xu (2011) e Zilic et al. (2012). Para os materiais avaliados nesses estudos, a distribuição de carotenoides ou antocianinas diferiu significativamente entre as classes de cores. Em vários outros estudos tem sido relatada a atividade antioxidante e anticancerígena de polifenóis, como ácido ferúlico e p-cumárico, em grãos de milho branco (ANDREASEN et al., 2001; ANSELMINI et al., 2004; KROON; WILLIAMSON, 1999; RONDINI et al., 2002; TROMBINO et al., 2004).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL, E. S. M.; YOUNG, C. H.; RABALSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 13, p. 4696-4704, 2006.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 6182-6187, 2002.
- ADOM, K. K.; SORRELLS, M. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7825-7834, 2003.
- AGROLINK. **Milho no Brasil**. Disponível em:
<<http://www.agrolink.com.br/Agricultura.aspx>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- ALMEIDA, M. M. **Determinação e quantificação das vitaminas C e D associadas em produtos cosméticos**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Nomenclature policy: generic descriptors and trivial names for vitamins and related compounds. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 8, p. 12-19, 1979.
- ANDREASEN, M. F. et al. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 5679-5684, 2001.
- ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANSELMINI, C. et al. Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 6425-6432, 2004.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.

ARRANZ, S. et al. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**, London, v. 10, p. 985-990, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. **Produção de milho no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H. **Análise de carotenoides em alimentos brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas**. 2003. 246 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARTLEY, G. E.; SCOINIK, P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual, attraction, and human health. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1027-1038, 1995.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BERALDO, N. et al. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v. 5, n. 3, p. 393-398, 2004.

BETRAN, J.; BOCKHOLT, A. J.; ROONEY, L. W. Blue corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.). **Specialty corns**. Boca Raton: CRC, 2000. p. 293-301.

BLESSIN, C. W.; BRECHER, J. D.; DIMLER, R. J. Carotenoids of corn and sorghum: 5., distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 40, p. 582-586, 1963.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989. 223 p.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físicoquímicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. 178 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRACK-EGG, A. *Zea mays* L. In: _____. **Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú**. Cuzco: Imprenta del Centro Bartolomé de las Casas, 1999. p. 537-538.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARDOSO, W. S. et al. Variabilidade de acessos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, p. 164-173, 2009.

CARVALHO, S. M. **Efeito da adição de tocoferóis sobre a qualidade de óleo de soja embalado em PET**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CHENSON, A.; STEWARD, C.; WALLACE, R. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 597-603, 1982.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: Ed. UFLA, 2005. 785 p.

CHUN, J. et al. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 190-196, 2006.

CLASSEN, D. et al. Correlation of phenolic content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CYMMYT'S collections. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 301-315, 1990.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Woburn, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 3, p. 241-256, 2009.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 854, p. 435-442, 1998.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W. E.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants american society of plant physiologists**. Rockville: Maryland, 2000. p. 1250-1318.

DE LA PARRA, C.; SERNA, S. O.; HAI, R. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 10, p. 4177-4183, 2007.

DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N. Propriedades antioxidante de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, p. 33-40, 2004.

DELGADO VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

EL-MALLAH, M. H.; MUMI, T.; EL-SHAMI, S. New trends in determining the authenticity of corn oil. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 50, p. 7-15, 1999.

ELMADFA, I.; PARK, E. Impact of diets with corn oil or olive/sunflower oils on DNA damage in healthy young men. **European Journal of Nutrition**, London, v. 38, p. 286-292, 1999.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Ultimate reference suite**. São Paulo, 2006. 1 CD-ROM.

ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined process. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 6, p. 896-902, June 2011.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 393-395, 1999.

FIMOGNARI, C. et al. Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-*O*-glucopyranoside. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 67, p. 2047-2056, 2004.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: Ed. FUNEP, 1992. 273 p.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Bethesda, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 2007. 227 p. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GABRIELSKA, J. et al. Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effects. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Leipzig, v. 54, p. 319-324, 1999.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 78-85, 2009.

GUIMARÃES, M. R. M.; VIANNA, L. M. A. Vitamina E e função cognitiva: uma revisão de literatura. **Revista Neurociências**, São Paulo, v. 18, p. 249-255, 2009.

GUINAZ, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 2098-2103, 2009.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 184-185, 1990.

HU, Q. P.; XU, J. G. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 5, p. 2026-2033, Feb. 2011.

JANICK-BUCKNER, D. et al. Biochemical and ultra-structural analysis of the y10 mutant of maize. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 5, p. 507-513, June 1999.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

JOHNSTON, C. S.; TAYLOR, C. A.; HAMPL, J. S. More Americans are eating "5 a day" but intakes of dark green and cruciferous vegetables remain low. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 3063-3067, 2000.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 32, n. 40, p. 40-47, 1998.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 113, n. 9, p. 71-88, 2002.

KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 355-361, 1999.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1948-1955, 1999.

LAJOLO, F. M. Alimentos funcionais: uma visão geral. In: DE ANGELIS, R. C. (Ed.). **A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 175-181.

LI, S. et al. Retention of provitamin a carotenoids in high β -carotene maize (*Zea mays l.*) during traditional, African household processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p. 10744-10750, 2007.

LIU, R. H. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 78, p. 517S-520S, 2003. Supplement.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, p. 3479S-3485S, 2004. Supplement.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, p. 207S-219S, 2007. Supplement.

LIU, J. et al. Fresh apples suppress mammary carcinogenesis and proliferative activity and induce apoptosis in mammary tumors of the sprague-dawley rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 297-304, 2009.

LOPEZ-MARTINEZ, L. X. et al. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, p. 1187-1192, 2009.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC, 1990. 392 p.

MAGALHÃES, P. C.; OLIVEIRA, A. C. Caracterização morfológica de milho de diferentes ciclos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2002, Goiânia. **Anais...** Sete Lagoas: Ed. EMBRAPA, 2002. 1 CD-ROM.

MAJO, D. et al. Flavanones in Citrus fruit: Structure antioxidant activity relationships. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 1161-1166, 2005.

MATSUMOTO, M. et al. Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 2226-2229, 2004.

MAURIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiacea I.: aplicação em produtos alimentício. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 10, p. 96-103, 2007.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton: CRC, 1994. 343 p.

MAZZA, G. E.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, London, v. 25, p. 207-225, 1987.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 405-411, 2005.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 577-599, 2000.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, Londron, v. 103, p. 729-733, 2007.

MONTILLA, E. C. et al. Soluble and bound phenolic compounds in different bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 7068-7074, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G. et al. Seleção de acessos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 159-166, 2006.

PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos: uma abordagem analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 96-105, 2004.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 3940-3944, 2003.

PEREIRA, J. **Tecnologia e qualidade de cereais: arroz, trigo, milho e aveia.** Lavras: Ed. UFLA, 2006. 133 p. Apostila.

PINTO, M. S. **Compostos bioativos e cultivares brasileiras de morango (Fragaria x ananassa Duch):** caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico. 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PLATE, A. Y. A.; GALLAHER, D. D. The potential health benefits of corn components and products. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 50, p. 306-314, 2005.

QUACKENBUSH, F. W. et al. Carotenoid, oil, and tocopherol content of corn inbreds. **Cereal Chemistry**, London, v. 40, p. 250-259, 1963.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REIS, M. C.; COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C. Efeito da idade suplementação oral com o acetato de DL- α -tocopherol sobre os níveis séricos de vitamina E e sobre o proteinograma do acetato. **Revista Brasileira Saúde Produtos Naturais**, Salvador, v. 8, p. 152-161, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods.** Washington: USAID, 1999. Disponível em: <<http://www.mostproject.org/PDF/carrots2.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis.** Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

RONDINI, L. et al. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3037-3041, 2002.

ROPKE, C. D. et al. Validação de metodologias analíticas para determinação e quantificação de α -tocoferol e 4-neurodilcaterol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, p. 209-217, 2003.

SALAZAR-SUAZO, E. T. et al. **Estado de la conservación ex situ de los recursos fitogenéticos cultivados y silvestres em Chile**. Santiago: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, 2006. 178 p.

SALGADO, J. M. **Guia dos funcionais: dieta alimentar para manter a saúde e evitar doenças**. Rio de Janeiro: Ediouro, 2009. 192 p.

SALINAS, Y. et al. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. **Revista Fitotecnia**, Mexico, v. 36, p. 285-294, 2013.

SASSON, C. S. **Influencia dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol**. 2006. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SAULNIER, L. et al. Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. **Carbohydrates Biopolymers**, Amsterdam, v. 45, p. 269-275, 2001.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Nutrition Journal**, London, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SEITZ, L. M. Stanol and sterol esters of ferulic and p-coumaric acids in wheat, corn, rye and triticale. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, p. 662-667, 1989.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1999. 517 p.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Food Science and Nutrition**, London, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, R. E.; NACZK, M. **Food phenolics**. Lancaster: Technomic, 1995. 340 p.

SIQUEIRA, F. M. Nutrientes antioxidantes. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOOB RATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions: mutation research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 579, n. 1/2, p. 200-213, 2005.

STEAD, D. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 505-510, 1993.

TAIPINA, M. S. **Efeito da radiação gama sobre o conteúdo de Tocoferóis em produtos naturais e industrializados e avaliação sensorial**. 2009. 125 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4808-4813, 2004.

TRABER, M. G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 62, p. 1501S-1509S, 1995. Supplement.

TROMBINO, S. et al. Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with tocopherol, carotene, and ascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 2411-2420, 2004.

TSUDA, T. et al. Dietary cyanidin3-O-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 7, p. 2125-2130, 2003.

TSUDA, T. et al. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effects of anthocyanins pigments isolated from Phaseolus vulgaris L. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 52, p. 1033-1039, 1996.

WEBER, E. J. Lipids of the Kernel. In: WATSON, S. A.; RAMSTAD, P. E. (Ed.). **Corn chemistry and technology**. 2nd ed. Saint Paul: AACC, 1987. p. 311-316.

WORARATPHOKA, J.; INTARAPICHET, K.; INDRAPICHET, K. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 4, p. 1485-1490, 2007.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington: American Institute for Cancer Research, 2007. 987 p.

YANG, Z.; WEIWEI, Z. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, London, v. 11, n. 1, p. 169-176, Jan. 2010.

YOU, Q. et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 1, p. 201-208, 2011.

ZILIC, S. et al. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) Kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 5, p. 1224-1231, Jan. 2012.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL QUANTO A COMPOSTOS BIOATIVOS

RESUMO

O milho apresenta diversidade genética, dando origem a grande número de variedades, híbridos e acessos. Dentre eles estão materiais pigmentados, os quais passaram, recentemente, a ser de grande interesse devido ao conteúdo de compostos fenólicos e carotenoides, substâncias bioativas reconhecidas, especialmente de função antioxidante com efeitos benéficos para a saúde. O objetivo, nesta primeira parte do trabalho, foi caracterizar acessos tropicais de milho quanto ao perfil de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante. Foram avaliados 211 acessos de milho tropical de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As análises químicas foram realizadas em três repetições, sendo os resultados submetidos à análise de variância e, em seguida, agrupadas para comparação das médias, usando o teste de agrupamento Scott Knott, a 5% de probabilidade. Para a determinação da relação dos compostos fenólicos e antocianinas com a atividade antioxidante das amostras estudadas foi realizada a correlação de Pearson. Foi possível concluir que os acessos estudados apresentam diferenças na composição de fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante dos grãos. Os acessos de grãos mais pigmentados podem ser considerados boas fontes de compostos fenólicos e antocianinas, apesar das diferenças na concentração dessas substâncias entre eles. Os acessos coloridos TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661 devem ser considerados em avaliações visando aplicações de componentes de importância biológica para a nutrição e as propriedades físico-químicas e físicas, atributos essenciais para a agregação de valor de matérias-primas alimentares.

Palavras-chave: Acessos de milho. Fenólicos. Antocianinas. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Corn has wide genetic diversity, originating a large numbers of varieties and hybrids genotypes. Among them are pigmented materials, which have recently become of great interest due to the content of phenolic and carotenoids compounds, recognized bioactive substances, especially antioxidant function with beneficial effects on health. In the first part of the study, the objective was to characterize tropical maize genotypes as to the profile of phenolic compounds, anthocyanin and antioxidant activity. It was evaluated 211 tropical maize genotypes of colored grains from the Embrapa Milho and Sorgo Germplasm Bank (BAG). The experiment was designed in completely randomized design. Chemical analyzes were performed in triplicate, and the results were submitted to analysis of variance and then grouped for comparison of means using the Scott Knott grouping test at 5% probability. For the determination of the relation between anthocyanins and phenolic compounds with antioxidant activity in the studied samples, the Pearson correlation was performed. It was concluded that the accessions differ in the composition of total phenolics, anthocyanin and antioxidant capacity of the grains. The most pigmented grains accesses can be considered good sources of phenolic compounds and anthocyanins, despite the differences in concentration of these substances between them. The colorful genotypes TO 002, ES 006, RO 013 and BAG 0661 should be considered in evaluations aiming at applications of biological importance of components for nutrition and physical-chemical and physical properties, essential attributes for added value of food raw materials.

Keywords: Corn genotypes. Phenolics. Anthocyanins. Antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

O milho tem ampla diversidade genética, dando origem a grande número de variedades e híbridos (AOKI; KUZE; KATO, 2001; PASCUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002). Esta cultura apresenta várias colorações de grãos, entretanto, os milhos de grãos coloridos, como vermelho, roxo, azul e preto, são produzidos comercialmente apenas em pequenas quantidades no Brasil, apesar de apresentarem substâncias com potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais (ABDEL-AAL; YOUNG; RABALSKI, 2006).

Vários autores têm relatado a presença de compostos fenólicos e as diferenças da ação antioxidante em materiais de diferentes colorações. Ácido ferúlico presente em milho de coloração branca, amarela e laranja tem ação anti-inflamatória (OU et al., 2003), anticarcinogênica (ILMAIDA et al., 1990) e antidiabética (efeito similar ao da insulina) (NOMURA et al., 2003). Milhos com pigmentação vermelha, azul, roxa e preta, com presença de antocianinas, apresentam ação antimicrobiana, anticarcinogênica (HAGIWARA et al., 2001); antimutagênica e antioxidante (PEDRESCHI; ZEVALLOS, 2005), além de comprovada atividade na prevenção da obesidade e da hiperglicemia (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; TSUDA et al., 2003).

A caracterização do perfil fitoquímico do milho é importante se a associarmos também às características de resistência natural (BAKO et al., 2005), podendo ser utilizada como forma de minimizar o uso de defensivos e otimizar a produção de alimentos (PRATES et al., 2004). Resultado de estudo anterior permitiu identificar que linhagens e variedades de milho têm apresentado propriedades fitoquímicas que limitam os danos provocados por insetos (WARNOCK et al., 1991). Embora muitos estudos tenham sido conduzidos sobre as causas da resistência no milho, existem, ainda, muitos

aspectos a serem investigados, especialmente na identificação de substâncias envolvidas nos mecanismos fitoquímicos (BERGVINSON et al., 2007; WARNOCK et al., 1991) e sobre quais materiais apresentam maior concentração dessas substâncias, oferecendo subsídios para entomólogos, melhoristas e biotecnologistas na busca de novas fontes de resistência, bem como aos cientistas de alimentos e profissionais da área de saúde.

Apesar da grande variabilidade de substâncias ativas em grãos de milho, existem materiais ainda não fenotipados para esta característica, o que restringe seu uso para a geração de novas cultivares comerciais e produtos com melhor perfil nutricional em relação a compostos antioxidantes e antimicrobianos que poderiam ser utilizados como matérias-primas na produção de alimentos com característica funcional ou, ainda, como conservantes de outros alimentos. Sendo assim, o trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar acessos de grãos com distintas colorações, do banco germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo quanto ao perfil de fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante, identificando as fontes com melhor perfil de fitoquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 211 acessos de milho grãos coloridos do Banco Ativo do Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo, para a determinação de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante.

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As amostras foram analisadas em triplicata e as análises químicas, em três repetições.

Devido ao grande número de amostras avaliadas, os acessos foram classificados de acordo com a semelhança de cor e avaliados em três grupos: 1) acessos com grãos mais pigmentados (vermelhos, roxo e azul), 2) acessos com grãos amarelos e 3) acessos com grãos brancos. Esta classificação foi realizada visualmente.

A identificação segundo a classificação de cores está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do acesso de milho conforme coloração do pericarpo dos grãos.

Mais pigmentados
PR 031, MT 024, MT 059, MG 174, RR 028, BA 125, RO 013, BAG 0661, ES 006, TO 002, SC 016, RR 037, RJ 006 PALHA ROXA, SC 010, BA 083, CUBA 28, MG 040, GO 001, GUATEMALA 786, RR 022, RR 028, NODZOB RARE TOPRE
Amarelos
RO 015, RR 035, AC 045, RO 012, BA 226, RO 002, MT 012, MT 033, BA 007, PIPOCA RS 20, PR 015, RR 036, MG 152 PIPOCA MAGNO, RO 007, MS 046, RN 005, PR 037, MS 033, BA 077, BA 050, PR 045, MS 028, BA 027, SE 031, CE 030, MS 052, OAXACA 250, STIFF STAZCK SYNTETIC, SAN LUIS POTOSI 97, PR 013, AZTECA, MAYA XVIII, PA 067, PA 041, SE 013, MS 041, BA 080, PUERTO RICO, BA 178, WP 1 FLINT COMPOSTO, PIPOCA AMERICANO, BR 126 DENTADO COMPOSTO, BA 003, SINTETICO JPE ACS, RS 101, BULGARE 2, WP AMARELO DENT, RR 006, RR016, FRANCE 2, CMS 12 POOL22, PIRAPOCA AMARELO, WP 21 COMPOSTO CUBA, BA 224, AL 009, BA 020, BR 400 SUPER DOCE, RS 102, BA 101, PA 089, PA 032, RS 16, COLORADO PERGAMINO, RR 03, RR 201, RR 012, RR 090, CMS 03 AMARELO CRISTALINO, RR 052, VERA CRUZ 2015, SE 014, CATETO SETE LAGOAS, CENTRAL MEX J – VIII, BA 201, CAMELIA, CMS 05 SUWAN DMR, PR 034, MS 019, MG 010, BA 132, CMS 26 VII - D COMPOSTO, CMS 28 TUXPEN0 AMARELO, BA 117, PA 047, CMS 27 III DOCE DO HAWAI, CMS 04 AMARILLO DENTADO, CMS 39 COMPOSTO NACIONAL, PE 002, AC 014, AC 005, AC 036, PA 022, PA 003, MAYA OPACO 2, BR 106, BA 116, CE 039, RR 200, PE 001, PR 057, 31136 G MLYS COMP, BA 061, BA 042, RN 012, PB 020, REPUBLICA DOMINICANA 300, CMS 25 XI CATETO COLOMBIA, CENTRAL MEX, REPUBLICA DOMINICANA 274, CMS 15 POOLS 26, CMS 14 C POOL 25 CERRADO, WPV12 TUXP FLINT, CMS 11POOL 21, CMS 22 AMARILO DEL BAJIO, PE 029, BA 066, BA 064, RR 088, AM 006, BA 064, RR 088, AM 006, AM 003, AM 001, RR 001, RR 013, RS 165, SP 050, RS 162, CMS 36 SINTETICO CERRADO, RO 009, RS 094, SP 015, SP 145
Branco
PR 056, MT 035, PR 005, RS 229, AC 031, RS 230, MT 008, RR 047, RO 021, AL 020, RO 017, RR (DOCE FLOR DA SERRA), PA 090, RR 021, RR 043, RR 188, BA 100, RR 048, SC 008, RR 045, PR 030, MS 002, MS 61 (MT 032), 60002, RR 044, AC 006, PR 026, BR 402 DOCE CRISTAL, RO 004, Sp 620, PA 020, PR 020, MG 149 PIPOCA TIMOTEO, BA 197, AC 041, BA 017, ZAPALOTE CHICO, CMS 08 TUXPEN0 CREMA 1, AC 022, MT 038, WP 25 LA POSTA, DENTY FLI WTS N°393, VER CRUZ 149, NAYARIT 165, CMS 43 PONTUDO, TUXPEN0 CARIBE, EL SALVADOR GRUPO A 1, SP 087, COMPUESTO TUXPEN0 VERACRUZANO, TUXPEN0 1, MG 084, MG 089, PIRAPOCA BRANCO, MG 104, SAN LUIS POTOSI 127, BA 090, SC 005, KALAHARI BLITZ

2.2 Amostragens e análises

Na Figura 1 são apresentadas as imagens de grãos dos 211 acessos avaliados.

Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo. (Continua)



Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo. (Continua)



Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo.
(Continua)

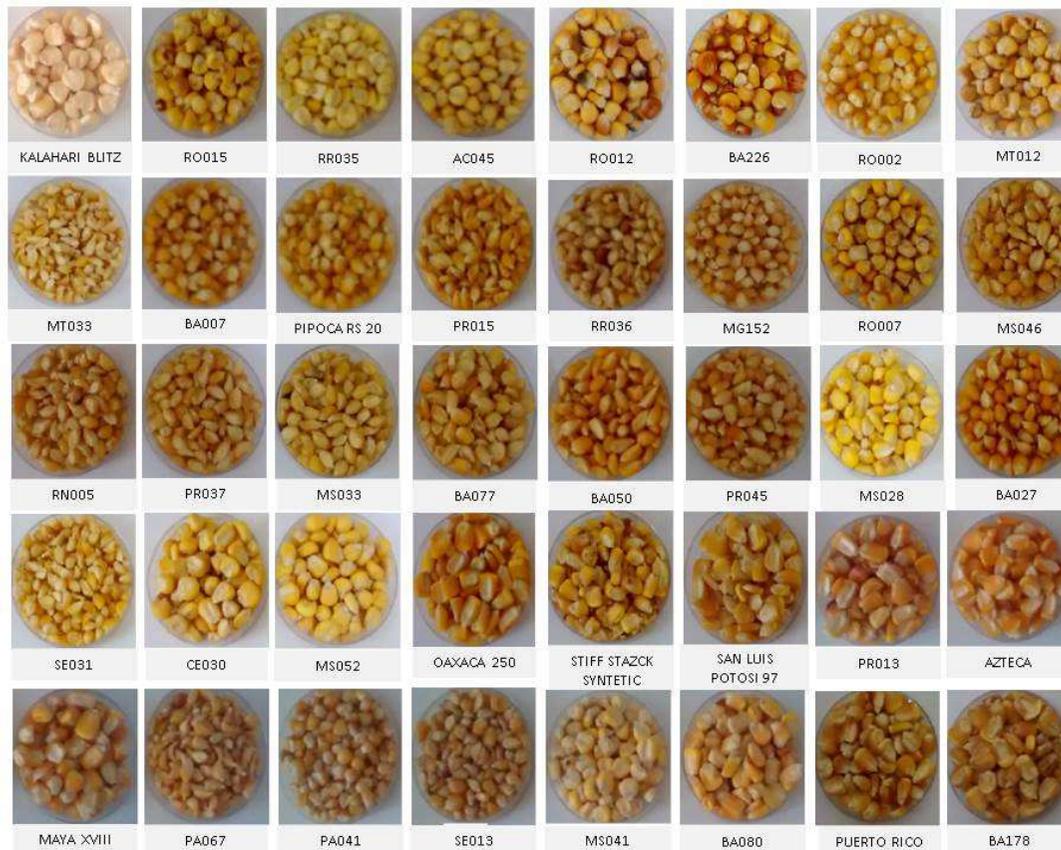


Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo.
(Continua)



Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo.
(Continua)



Figura 1 - Acessos de milho de grãos coloridos do Banco Ativo Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo.
(Conclusão)



Antes da moagem, os grãos foram mantidos, no Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, em temperatura ambiente de 21 ± 1 °C. No dia das análises, os grãos de milho foram moídos em moinho tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba, SP), utilizando peneira de 0,5 mm de abertura, sendo o material moído acondicionado em frascos de vidro, tampados, lacrados com parafilme e envoltos em papel alumínio.

Todas as análises foram realizadas imediatamente após a moagem das amostras em ausência de luz e em temperatura ambiente de 21 ± 1 °C.

2.2.1 Umidade

A umidade dos grãos foi determinada pelo método 920.151, descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012), utilizando estufa de secagem da marca American Lab, modelo AL 100/150.

A análise de umidade foi realizada para a correção dos resultados para base seca.

2.2.2 Determinação de fenólicos totais

O conteúdo total de polifenóis foi avaliado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo método adaptado de Singleton et al. (1999). Cada amostra (2 mg) foi macerada em 4 mL de metanol puro e filtrada em papel filtro Whatman n°1, este extrato foi pipetado para um tubo âmbar com tampa rosqueável 250 µL do extrato e 415 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), seguindo-se agitação do conteúdo em vórtex, durante 20 segundos. Após 10 minutos foram acrescentados 830 µL de solução 7,5% (p/v) de Na_2CO_3 (J.T Baker). As soluções foram mantidas à temperatura ambiente, envoltas em papel alumínio, durante 2 horas. Utilizaram-se como branco da reação somente

os solventes utilizados em cada etapa da extração. O conteúdo total de polifenóis foi determinado a 760 nm, utilizando-se um UV-Vis espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments). O conteúdo fenólico total de cada amostra foi determinado por meio de uma curva de calibração preparada com ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos como mg de ácido gálico por 100 g de amostra.

2.2.3 Determinação da capacidade antioxidante

A análise da atividade antioxidante dos grãos de milho foi realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). Cada amostra (2 mg) foi macerada com 4 mL de metanol puro e filtrada em papel filtro Whatman n°. 1. Foram coletados 500 µL do extrato em tubo limpo e acrescido de 500 µL de DPPH. As amostras ficaram sob agitação, por uma hora, em agitador tridimensional (3D marca Labnet, modelo GyroMini, 20 rpm inclinação 3D fixa em 20°), revestidas com papel alumínio. A leitura de absorbância foi feita após o período a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS.

Para o controle da reação foram utilizados DPPH e metanol. O espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments) foi zerado com metanol.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100$$

em que A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução determinada a 515 nm (ROESLER et al., 2007).

2.2.4 Antocianinas

A concentração de antocianinas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Francis (1992) e adaptada por Lopes et al. (2012). Cada amostra (1 g) foi extraída com 30 mL de solução etanol-HCl (1,5N), na proporção 85:15, em homogeneizador de tecidos (Ultra Stirrer 380-D), por dois minutos, na velocidade 5. Logo depois, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL (sem filtrar) e o volume ajustado com etanol-HCl (1,5N). Esse conteúdo foi homogeneizado e transferido a um frasco de vidro, envolto em papel alumínio, sendo mantido, por 16 horas, em geladeira (5 °C). Em seguida, o material foi filtrado em funil de vidro contendo papel Whatman nº1, sendo o filtrado recolhido em béquer de volume 50 mL envolto com papel alumínio. Em seguida, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments) em comprimento de onda de 535 nm. O branco foi composto apenas de solução etanol-HCl (1,5N). A concentração de antocianinas foi expressa em mg 100 g⁻¹.

Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, MG.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos, estatisticamente, à análise de variância e, em seguida, agrupados para comparação das médias, usando o teste de agrupamento Scott Knott, a 5% probabilidade. A análise de variância foi feita por grupo de acessos de milho, como classificados anteriormente. Para tanto, foi utilizado o programa Assistat, versão 7.5 beta (2008).

Para a determinação da relação dos compostos fenólicos e antocianinas com a atividade antioxidante das amostras estudadas, os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fenotipagem de acessos do BAG Milho quanto à concentração de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante

Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada para a concentração de fenólicos totais nos grupos dos acessos avaliados, indicando variação em relação à concentração desses compostos.

As médias da concentração de fenólicos totais ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ amostra seca) para os acessos de grãos mais pigmentados variaram entre 264,1 (grupo A) e 910,2 (grupo C). Já para as médias da concentração de fenólicos totais para os acessos amarelos a concentração de fenólicos variou entre 105,3 (grupo A) e 202,4 (grupo D). Nos acessos de grãos brancos, as médias dessas substâncias variaram entre 80,2 (grupo A) e 203,9 (grupo C).

Na Tabela 2 são apresentadas as médias do teor de fenólicos totais dos acessos estudados.

Tabela 2 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho, apresentando médias da concentração de fenólicos totais distintas (base seca). (Continua)

Grupos	Acessos de milho	Concentração de fenólicos totais (mg 100 g ⁻¹)
Mais pigmentados		
A	PR 031, MT 024, MT 059, MG 174, RR 028, BA 125, RR 037, RJ 006, SC 010, BA 083, CUBA 28, MG 040, GO 001, GUATEMALA 786, RR 022, RR 028	264,1 ^c
B	NODZOB RARE TOPRE, BAG 0661, SC 016, RO 013	743,2 ^b
C	ES 006, TO 002	910,2 ^a
Amarelos		
A	PIPOCA RS 20, PR 013, RR 034, CMS 26, RO 002, BA226, CE 030	105,3 ^d
B	RR016, COLORADO PERGAMINO, SAN LUIS POTOSI 97, RO 012, REPUBLICA DOMININCANA 247, PA 003, PA 022, CMS 21, RS 16, REPUBLICA DOMININCANA 300, WP AMARELO DENT, RO 009, CMS 03, CENTRAL MEX J, CENTRAL MEX, CMS POOL22, RR 013, CMS 04, PIRAPOCA AMARELO, PR 037, PE 029, PA 089, PE 002, MS 041, MAYA XVIII, CMS 36, PUERTO RICO, MS 028, PR 057, VERA CRUZ, BA 066, AL 009, BA 116, RS 102, BA 080, BA 020, SE 031, SP 050, SP 145, SE 014, BA 027, RS 101, BA 132, BR 126, RR 200, CAMELITA, WPV 12, BA 224, WP 1 FLINT, RR 201, RS 094	133,9 ^c
C	SP 015, PE 001, PIPOCA AMERICANO, STIFF STAZCK, WP 21, RR 03, RR 006, RR 001, RR 052, RR 088, RR 090, RS 165, PR 045, SINTETICO JPE, RN 012, RN 005, RS 162, PB 020, AC 005, CMS 05, AC 014, AC 036, BA 003, CMS 15, 31136, CMS 14 POLL, CMS 11 POOL, AZTECA, BULGARE 2, BA 077, BA 101, BA 064, BA 050, BA 061, BR 106, BR 400, BA 007, BA 042, BA 178, MT 012, MT 033, AM 003, MS 046, MS 052, PA 047, PA 067, AM 001, OAXACA 250, PA 032, MS 033, CMS 28, CMS 39, AM 006, CMS 22, CMS 25, MG 152, MS 019, MG 010, FRANCE 2, MAYA OPACO	158,3 ^b
D	SE 013, RO 007, PR 015, PA 041, RR 012, BA 117, AC 045, CE 039, RR 035, RO 015, CATETO SETE LAGOAS, BA 201, RR 036	202,4 ^a

Tabela 2 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho, apresentando médias da concentração de fenólicos totais distintas (base seca). (Conclusão)

Branco		
A	RO 021 RR 021, RR (DOCE FLOR DA SERRA), RR 043, RR 047, RR 056, RS 230, RS 229	80,2 ^c
B	MT 008, PA 090, RO 017, AC 031, AL 020, MT 035, PR 030, PR 005, SP 620, AC 006, BA 197 60002, RR 044, RO 004, BA 017, ZAPALOTE CHICO, SC 008, CMS 08 TUXPEN0, CMS 43, AC 041, KALAHARI BLITZ, BA 090, MG 084, AC 022, TUXPEN0 1, COMPUESTO TUXPEN0, EL SALVADOR, DENTY FLI, NAYARIT 165, PA 020, MT 038, VERA CRUZ, WP 25, SC 005, TUXPEN0 CARIBE, SP 087, PR 026, MG 149, SAN LUIS, MG 104, MG 089, PIRAPOCA BRANCO, RR 020, BA 100, MS 002	125,6 ^b
C	BR DOCE CRISTAL, RR 048, RR 188, MT 032	203,9 ^a

*Os acessos pertencentes a um mesmo grupo dentro de cada subtítulo acesso de milho não diferem entre si e as médias pertencentes a grupos distintos diferem entre si.**Foi aplicado o teste de agrupamento de média de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Montilla et al. (2011), estudando a composição de fenólicos totais em diferentes cultivares de milho roxo, encontraram variação de 311,0 a 817,6 mg 100 g⁻¹. De La Parra, Serna Saldivar e Liu (2007), Del Pozo-Insfran et al. (2006) e Mora-Rochin et al. (2010) relataram médias de 40,0 a 266,0 mg 100g⁻¹ de fenólicos totais em milho de diferentes colorações. Entretanto, Urias-Lugo et al. (2015) encontraram de 1.039,0 a 1.331,3 mg 100 g⁻¹, representando cinco vezes mais, comparados aos valores já relatados e superiores ao encontrado no presente trabalho.

As diferenças entre os resultados encontrados neste e nos trabalhos citados podem ser atribuídas a fatores como origem dos grãos, método de extração, composição química e genética dos grãos, bem como às condições ambientais e agronômicas nas quais os materiais foram cultivados (URIAS-LUGO et al., 2015).

Dentre todos os grupos previamente classificados, aqueles que compõem o grupo de acessos mais pigmentados apresentaram maiores médias quanto à concentração de fenólicos totais, com destaque para os grupos B e C. Isso indica que os acessos destes grupos devem ser considerados em avaliações para a obtenção de grupo de trabalho, visando aplicações e mais estudos quanto aos componentes de importância biológica para a nutrição e às propriedades físico-químicas e físicas, atributos essenciais para agregação de valor e adequação de uso de matérias-primas.

Para o estudo da caracterização quanto à concentração de antocianinas, diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada nos acessos classificados como mais pigmentados e amarelos. Nos acessos classificados como brancos não foi detectada presença de antocianinas, o que já era esperado, visto que antocianinas estão presentes em alimentos com coloração roxa, vermelha, amarela e verde.

As médias da concentração de antocianinas (mg 100g⁻¹) para os grãos mais pigmentados foram 19,13 (grupo A), 54,52 (grupo B) e 64,94 (grupo C). Já

as médias da concentração de antocianinas para os acessos de grãos amarelos variaram de 4,08 (grupo A) a 7,62 (grupo B).

Na Tabela 3 são apresentadas as médias da concentração de antocianinas dos acessos classificados como pigmentados e amarelos.

Tabela 3 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho apresentando médias da concentração de antocianinas (base seca).

Grupos	Acessos de milho	Concentração de antocianinas (mg 100g ⁻¹)
Mais pigmentados		
A	MT 024, MT 059, PR 031, BA 125, MG 174, GO 001, RR 022, GUATEMALA 786, BA 083, CUBA 28, MG 040, RJ 006, SC 010, RR 037, RR 028, SC 016	19,13 ^c
B	NODZOB RARE TOPRE, , BAG 0661	54,52 ^b
C	ES 006, RO 013, TO 002	64,94 ^a
Amarelos		
A	RS 102, PA 032, BA 003, BA 077, SE 031, WP 1 FLINT, BA 064, BA 101, RO 002, COLORADO PERGAMINO, RR 001, RR 013, RR 012	4,08 ^b
B	PIPOCA RS 20, PIRAPOCA AMARELO, PR 015, PB 020, PE 001, PE 002, PUERTO RICO, REPUBLICA DOMINICANA 300, RN 005, PR 037, PR 045, PR 057, OAXACA 250, PA 003, PA 022, MS 046, MS 052, MT 012, PA 047, PA 067, PA 089, WPV12 TUXP FLINT, PA 041, WP 21 COMPOSTO CUBA, VERA CRUZ 2015, RR 200, SE 013, RR016, RR 088, RR 090, SINTETICO JPE ACS RS 165, RS16, RS162, SAN LUIS POTOSI 97, RS 094, RS 101, RO 015, SP 145, RR 006, RO 007, RO 009, RO 012, RR 035, RR 036, RR 052, SP, 015, RR 03, BULGARE 2, CAMELIA, AM 006, BR 106, BR 126, BR 400, CE 030, CMS 03, AM 003, AM 001, CE 039, CENTRAL MEX, CENTRAL MEX J, BA 061, BA 066, BA 020, BA 027, BA 042, BA 050, BA 007, BA 201, AZTECA, BA 226, BA 116, BA 117, BA 178, CMS 39, FRANCE 2, MAYA OPACO 2, AC 005, CMS 28, CMS 36, MAYA XVIII, MS 019, MS 028, BA 132, MG 010, MG 152, 31136, AC 045, CMS 14 C POOL 25, AC 036, CMS 05, AL 009, CMS 12, AC 014, CMS 25, CMS 26, CMS 15, CMS 22, WP AMARELO DENT, SE 014, STIFF STAZCK SYNTETIC, PIPOCA AMERICANO, PE 029, PR 034, PR 013, MS 033, MS 041, CMS 27, MT 033, BA 224, CATETO SETE LAGOAS, RR 201, BA 080, CMS 04, CMS 11 POOL 21, RN 012, REPUBLICANA 274	7,62 ^a

*Os acessos pertencentes a um mesmo grupo não diferem entre si e as médias pertencentes a grupos distintos diferem entre si.**Foi aplicado o teste de agrupamento de média de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o estudo da caracterização dos acessos coloridos do BAG Milho quanto à atividade antioxidante, diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada para os acessos de grãos classificados como mais pigmentados e amarelos. Os materiais contendo grãos brancos não apresentaram diferença significativa quanto à atividade antioxidante, sendo essa de 9,01 (% de inibição do radical livre).

As médias da atividade antioxidante (% de inibição do radical livre) dos grãos pigmentados foram 33,67 (grupo A), 52,02 (grupo B) e 69,75 (grupo C). Já para os grãos amarelos, foram 22,59 (grupo A), 28,29 (grupo B) e 35,10 (grupo C).

Na Tabela 4 são apresentadas as médias da atividade antioxidante dos acessos estudados.

Tabela 4 - Identificação dos agrupamentos formados pelos acessos de milho apresentando médias distintas da atividade antioxidante.

Grupos	Acessos de milho	% de inibição do radical livre
Mais pigmentados		
A	PR 031, MT 024, MT 059, MG 174, RR 028, BA 125, RR 037, RJ 006, SC 010, BA 083, CUBA 28, MG 040, GO 001, GUATEMALA 786, RR 022, NODZOB RARE TOPRE, SC 016	33,67 ^c
B	RO 013, BAG 0661	52,02 ^b
C	ES 006, TO 002	69,75 ^a
Amarelos		
A	RO 015, BA 226, RO 002, RO 007, PR 037, BA 027, CE 030, STIFF STAZCK SYNTETIC, PA 067, MS 041, PIRAPOCA AMARELO, RR 090, RR 052, VERA CRUZ 2015, SE 014, CATETO SETE LAGOAS, CENTRAL MEX J, BA 201, CAMELIA, CMS 05, PR 034, MG 010, CMS 26, CMS 27, CMS 04, MAYA OPACO 2, BR 106, AC 036, PE 002 RR 088 CMS 36, RR 013, SP 050, AM 003, AM 001	22,59 ^c
B	RR 035, AC 045, RO 012, MT 012, MT 033, BA 007, PIPOCA RS 20, PR 015, RR 036, MG 152, MS 046, RN 005, MS 033, BA 077, BA 050, PR 045, MS 028, SE 031, MS 052, OAXACA 250, PR 013, AZTECA, MAYA XVIII, PA 041, SE 013, BA 080, PUERTO RICO, BA 178, WP 1 FLINT, PIPOCA AMERICANO, BR 126, BA 003, SINTETICO JPE ACS, RS 101, BULGARE 2, WP AMARELO DENT, RR 006, RR016, FRANCE 2, CMS 12 POOL22, WP 21 COMPOSTO CUBA, BA 224, AL 009, BA 020, BR 400, RS 102, BA 101, PA 032, RS 16, COLORADO PERGAMINO, RR 03, RR 201, RR 012, MS 019, BA 132, CMS 28, BA 117, PA 047, CMS 39, AC 014, AC 005, PA 022, PA 003, BA 116, TUXP, CMS 11, CMS 22, PE 029, BA 066, BA 064, AM 006, RR 001, RS 165, RS 162, , RO 009, RS 094, SP 015, SP 145	28,29 ^{±b}
C	42382, CE 039, RR 200, PE 001, PR 057, 31136, BA 061, BA 042, RN 012, PB 020, REPUBLICA DOMINICANA 300, CM 25, CENTRAL MEX, REPUBLICA DOMININCANA 274, CMS 15 POOLS, CMS 14 POOL, WPV12	35,10 ^a

*Os acessos pertencentes a um mesmo grupo dentro de cada subtítulo acesso de milho não diferem entre si e as médias pertencentes a grupos distintos diferem entre si.**Foi aplicado o teste de agrupamento de média de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.2 Correlação entre atividade antioxidante e as variáveis fenólicos totais e antocianinas

Os acessos mais pigmentados apresentaram forte correlação positiva entre atividade antioxidante e fenólicos totais, e moderada correlação positiva entre atividade antioxidante e antocianinas (Tabela 5). Já os acessos brancos apresentaram baixa correlação entre atividade antioxidante e fenólicos. Os acessos amarelos apresentaram forte correlação positiva para atividade antioxidante e fenólicos totais e correlação positiva moderada para atividade antioxidante e antocianinas.

Tabela 5 - Correlação de Pearson para a atividade antioxidante e as variáveis fenólicos totais e antocianinas dos acessos de milho.

Grupo de acessos de milho	Atividade antioxidante:fenólicos	Atividade antioxidante:antocianinas
Mais pigmentados	0,9052	0,6869
Branco	0,1385	
Amarelos	0,8298	0,5136

*Correlações significativas, a 5% de probabilidade.

Yang e Zhai (2010), ao avaliarem a atividade antioxidante e antocianinas de grãos de milho roxo, encontraram alta correlação entre essas variáveis (0,828).

A correlação entre atividade antioxidante e fenólicos totais nos grãos de milho foi maior do que a correlação entre atividade antioxidante e antocianinas, para todos os grupos de acessos, indicando que os compostos fenólicos presentes no milho induzem capacidade antioxidante maior que as antocianinas. Os compostos fenólicos dos alimentos estão entre os principais responsáveis pela atividade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Considerando o aspecto biológico, em estudos epidemiológicos tem sido demonstrada correlação entre o aumento do consumo de compostos fenólicos

com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco associado a doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (COOK; SAMMAN, 1996; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Portanto, os grãos de milho estudados, principalmente os mais pigmentados, seriam boa fonte alimentícia de compostos bioativos, se introduzidos na dieta.

4 CONCLUSÃO

Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Milho da Embrapa Milho e Sorgo diferem na composição de fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante dos grãos. Os materiais de grãos mais pigmentados podem ser considerados boas fontes de compostos fenólicos e antocianinas, apesar da existência de diferenças na concentração dessas substâncias entre eles.

Os acessos TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661 apresentam maior concentração de substâncias bioativas e, por essa razão, devem ser considerados em avaliações de aplicações dos seus componentes de importância biológica para a nutrição e propriedades físico-químicas e físicas, atributos essenciais para a agregação de valor de matérias-primas alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AAL, E. S. M.; YOUNG, C. H.; RABALSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 13, p. 4696-4704, 2006.
- AOKI, H.; KUZE, N.; KATO, Y. **Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.)**. 2001. Disponível em: <[http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/c669877336142b249256ba60018e581/\\$FILE/anthocyanin-FFIJ199.pdf](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/c669877336142b249256ba60018e581/$FILE/anthocyanin-FFIJ199.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012. 3000 p.
- BAKO, S. P. et al. Ethonomedical and phytochemical profile of some savanna plant species in Nigeria. **International Botany Journal**, Dubai, v. 2, p. 147-150, 2005.
- BERGVINSON, D. J. **Pryecto de investigation: tecnologias integrales para reducir las perdidas en post-cosecha de maiz em el Estado de Mexico**. 2007. Disponível em: <<http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/3741/90395.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and ref-fleshed sweet-potato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 3313-3319, 2003.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Woburn, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- DE LA PARRA, C.; SERNA SALDIVAR, S. O.; LIU, R. H. Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 10, p. 4177-4183, 2007.

DEL POZO-INSFRAN, D. et al. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays L.*) products. **Food Research International**, Barking, v. 39, p. 696-703, 2006.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic, 1992. p. 181-207.

HAGIWARA, A. et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 17-25, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutrition Biochemistry**, London, v. 13, n. 1, p. 572-584, 2002.

IMAIDA, K. et al. Effects of naturally occurring antioxidants on combined 1,2-dimethylhydrazine and 1-methyl-nitrosourea- initiated carcinogenesis in F344 male rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 55, p. 53-59, 1990.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

LOPES, M. M. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale L.*) durante o amadurecimento de clones de cajueiro anão-precoce. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 325-332, maio/jun. 2012.

MONTILLA, E. C. et al. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays L.*) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 13, p. 7068-7074, June 2011.

MORA-ROCHIN, S. et al. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. **Journal of Cereal Science**, London, v. 52, n. 3, p. 502-508, Nov. 2010.

NOMURA, E. et al. Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 11, p. 3807-3813, 2003.

- OU, L. et al. Oxidation of ferulic acid by momordica charantia peroxidase and related anti-inflammation activity changes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, p. 1511-1516, 2003.
- PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. LCMS Analysis of anthocyanins from purple corn cob. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1003-1006, 2002.
- PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays L.*). **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 956-963, 2005.
- PRATES, H. T. et al. **Prospecção química de acessos de milho com resistência à lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)**. 2004. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33232/1/Prospeccao-quimica.pdf>>. Acesso em: 30 fev. 2016.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./mar. 2007.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.
- TSUDA, T. et al. Dietary cyanidin3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 7, p. 2125-2130, 2003.
- URIAS-LUGO, D. A. et al. Total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity of native and elite blue maize hybrids (*Zea mays L.*). **CyTA - Journal of Food**, London, v. 13, n. 3, p. 336-339, Dec. 2015.
- WARNOCK, S. J. Natural habitat of *Lycopersicon* species. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 5, p. 466-471, May 1991.
- YANG, Z.; WEIWEI, Z. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays L.*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, London, v. 11, n. 1, p. 169-176, Jan. 2010.

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE ACESSOS DE MILHO DE GRÃOS PIGMENTADOS

RESUMO

Grãos de milho podem apresentar várias colorações, entretanto, milhos com pigmentação intensa têm recebido maior atenção devido à relação dessa característica com a presença de substâncias bioativas. Este estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar quatro acessos de milho de coloração intensa de grãos quanto à composição de nutrientes e substâncias bioativas, a fim de selecionar um acesso com destaque na composição destes fitoquímicos. Foram avaliados os acessos de milho de grãos coloridos TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661 do germoplasma de milho quanto à composição centesimal, fenólicos totais, antocianinas, atividade antioxidante, tocoferóis, carotenoides e cor dos grãos. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As análises foram realizadas em três repetições, sendo os resultados submetidos à análise de variância. Quando significativo, foi realizado teste de média Fischer (LSD), estabelecendo-se o nível de 5% de significância. Os grãos do acesso TO 002 apresentaram maior concentração de fenólicos totais ($959,6 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$) e antocianinas ($72,26 \text{ mg } 100\text{mg}^{-1}$), quando comparados aos demais acessos. O acesso ES 006 se destacou quanto à concentração de carotenoides totais ($3,24 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$), seguidos dos acessos RO 013 ($1,63 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) e BAG 0661 ($1,97 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$). Já o acesso TO 002 obteve a menor concentração de carotenoides totais ($0,32 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) nos seus grãos. As maiores concentrações de α -tocoferol ($563,49 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), δ -tocoferol ($98,35 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), α -tocotrienol ($2.582,73 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), β -tocotrienol ($7.529,90 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$), γ -tocotrienol ($238,51 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e δ -tocotrienol ($175,39 \text{ } \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) puderam ser notadas no acesso TO 002. Foi possível concluir que, dentre os acessos avaliados, o TO002 apresenta maior concentração de fitoquímicos e maior atividade antioxidante. Esse acesso deve ser considerado para futuros estudos, principalmente quanto ao extrato fenólico.

Palavras-chave: Carotenoides. Tocoferóis. Fenólicos. Antocianinas.

ABSTRACT

Maize grains may present several coloring, however, millet with intense pigmentation has received more attention due to the relation of this characteristic with the presence of bioactive substances. The objective of this study was to characterize four intensive coloring maize accessions on the composition of nutrients and bioactive substances in order to select an access with prominence in the composition of these phytochemicals. The maize accessions from coloring grains TO 002, ES 006, RO 003, RO 013 and BAG 0661 were evaluated for centesimal composition, total phenolics, anthocyanins, antioxidant activity, tocopherols, carotenoids and grain color. The experiment was planned in a completely randomized design. The analyzes were performed in triplicate, and the results were submitted to analysis of variance. When significant, a Fischer mean test (LSD) was performed, establishing the 5% level of significance. The TO 002 access grains had a higher concentration of total phenolics (959.6 mg 100mg⁻¹) and anthocyanins (72,26 mg 100mg⁻¹) when compared to the other accessions. The ES 006 access was highlighted for the total carotenoid concentration (3.24 µg g⁻¹), followed by the RO 013 (1.63 µg g⁻¹) and BAG 0661 (1.97 µg g⁻¹) approaches. The TO 002 access obtained the lowest concentration of total carotenoids (0.32 µg g⁻¹). In their grains. The highest concentrations of α-tocopherol (563.49 µg 100g⁻¹), δ-tocopherol (98.35 µg 100g⁻¹), α-tocotrienol (2582.73 µg 100g⁻¹), β-tocotrienol (7529,90 µg 100g⁻¹), γ-tocotrienol (238.51 µg 100g⁻¹) and δ-tocotrienol (175.39 µg 100g⁻¹) could be noted in the TO 002 access. It was possible to conclude that among the evaluated accessions, TO002 presents higher concentration of phytochemicals and higher antioxidant activity. This access should be considered for future studies, mainly regarding the phenolic extract.

Keywords: Carotenoids. Tocopherols. Phenolics. Anthocyanin.

1 INTRODUÇÃO

Grãos de milho podem apresentar várias colorações, entretanto, milhos com pigmentação intensa têm recebido maior atenção devido à relação dessa característica com a presença de substâncias bioativas, como carotenoides (AGUAYO-ROJAS et al., 2012; HU; XU, 2011) e compostos fenólicos (HU; XU, 2011; LICY et al., 2008; SANTIAGO et al., 2007; YANG; ZHAI, 2010; ZILIC et al., 2012).

Vários autores têm relatado que a maior concentração de compostos de pigmentação no milho está associada a uma maior capacidade antioxidante (HU; XU, 2011; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009; ZILIC et al., 2012).

Diferenças consideráveis em conteúdo de fitoquímicos e capacidade antioxidante foram reportadas por Hu e Xu (2011) e Zilic et al. (2012), em diferentes acessos de milho. Para os materiais avaliados nesses estudos, a distribuição de carotenoides ou antocianinas diferiu significativamente entre as classes de cores. Entretanto, materiais com diferentes colorações de grãos com diferentes origens, produzidos em distintas regiões do globo, necessitam ser avaliados, a fim de identificar acessos com maior destaque quanto à composição bioativa para uso local.

Assim, o presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar quatro acessos de milho de coloração intensa de grãos quanto à composição centesimal e composição de substâncias bioativas (carotenoides, tocoferóis, fenólicos totais, antocianinas, atividade antioxidante), a fim de selecionar um acesso com destaque para a composição destes fitoquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para as avaliações, os grãos de milho (Figura 1) foram moídos em moinho tipo ciclone MA 020 Marconi (Piracicaba, SP) acoplado de peneira de abertura 0,5mm, sendo o material acondicionado em frascos de vidro tampados, lacrados com parafilme e envoltos em papel alumínio.

Figura 1 - Acessos de milho colorido do BAG.



Todas as análises foram realizadas em ausência de luz e em temperatura de 21 ± 1 °C.

As análises químicas foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, MG, exceto perfil de tocoferóis, obtido no Laboratório de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As amostras foram analisadas em triplicata e as análises químicas, em três repetições.

2.2 Composição centesimal

2.2.1 Umidade

A umidade dos grãos foi determinada por método 920.151, descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012), utilizando temperatura de secagem de 105 °C, utilizando estufa de secagem da marca American Lab, modelo AL 100/150.

2.2.2 Extrato etéreo

O extrato etéreo foi determinado de acordo com o método Am 5-04 da Official Methods and Recommended Practices (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS, 2005), utilizando o extrator da marca Ankom, modelo XT10, Estados Unidos (USA).

2.2.3 Fibra bruta

Para fibra bruta, seguiu-se o método de acordo com a ANKON (2008), utilizando o analisador de fibra da marca Ankom, modelo A-2000, USA.

2.2.4 Cinzas

Os teores de cinzas foram determinados de acordo com o método 923.03 AOAC (2012), utilizando mufla da marca Quimis, modelo Q31M21.

2.2.5 Proteína

O método utilizado para a determinação do teor de nitrogênio total foi o método de Dumas e o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25 (AOAC, 1984). O equipamento utilizado para a realização das análises de proteína foi o analisador de nitrogênio, modelo FP-528, marca LECO (Leco Corporation St. Joseph, MI).

2.2.6 Fração glicídica

O método utilizado para a determinação da fração glicídica (extrato não nitrogenado) foi por diferença, como determina a AOAC (2000), segundo a Equação 1.

Fração glicídica = 100 - (umidade + extrato etéreo + proteína + fibra bruta + cinza) (Equação 1).

Todos os resultados da composição centesimal encontram-se na matéria seca.

2.3 Cor

Grãos inteiros das amostras de milho foram avaliados quanto ao aspecto de cor pelo sistema Hunter. As variáveis L*, a* e b* foram avaliadas utilizando-se o colorímetro Konica Minolta modelo CR 400 (Japão). Foram feitas cinco leituras das triplicatas de cada amostra.

2.4 Determinação dos compostos bioativos

2.4.1 Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi determinada de acordo com a metodologia de Singleton et al. (1999), descrita no capítulo 1 desta tese.

2.4.2 Antocianinas

A composição de antocianinas foi determinada de acordo com a metodologia de Francis (1992) e adaptada por Lopes et al. (2012), conforme descrito no capítulo 1 desta tese.

2.4.3 Perfil de tocoferol

Utilizou-se método de extração direta de acordo com Guinazi et al. (2009). Para tanto, pesaram-se em torno de 10 g da amostra e, em seguida, adicionaram-se 4 mL de água deionizada aquecida a 80 °C e cerca de 5 g de sulfato de sódio anidro. Acrescentaram-se 10 mL de isopropanol e 1 mL de hexano contendo 0,05% de BHT. Após a adição de 25 mL de mistura solvente (hexano:acetato de etila, 85:15, v/v), as amostras foram trituradas e filtradas a vácuo. Lavou-se o resíduo retido pela filtração com 15 mL de mistura solvente e, em seguida, transferiu-se para o tubo de trituração e a etapa de extração foi repetida, adicionando-se 5 mL de isopropanol e 30 mL de mistura solvente, com posterior homogeneização e filtragem a vácuo. O resíduo foi novamente lavado com 5 mL de mistura solvente e evaporado em rotavapor, utilizando temperatura de 70 °C. As amostras foram ressuspensas em mistura de solvente, sendo volume aferido para 25 mL, utilizando-se balões volumétricos. Após a completa

homogeneização, tomou-se uma alíquota de 5 mL, evaporando-a em nitrogênio gasoso, armazenando os extratos secos em vidros âmbar hermeticamente vedados em temperatura de -5 °C a 0 °C, até o momento da análise cromatográfica.

Após extração, as alíquotas das amostras secas em nitrogênio foram redissolvidas em 2 mL de hexano grau HPLC e filtradas através de unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm.

As análises dos tocoferóis e tocotrienóis foram conduzidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: cromatógrafo Shimadzu (modelo SCL 10AT VP) composto de bomba de alta pressão (modelo LC-10AT VP); coluna LiChrosorb Si60, 5 mm, 250 x 4 mm; detecção por fluorescência Phenomenex (modelo RF-10A XL) (290 nm de excitação e 330 nm de emissão); software "Multi System" (modelo Class VP 6.1) e fase móvel composta de hexano/isopropanol/ácido acético (99,33:0,6:0,07), com vazão de 1 mL min⁻¹.

2.4.4 Perfil de carotenoides

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik (1999), com modificações (BARBOSA et al., 2015).

Os carotenoides foram quantificados em técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Alliance Waters, modelo e 2695, equipado com coluna polimérica YMC C 30 (3 µm, 4,6 x 250 mm, Waters, Milford, MA, USA) e acoplado a detector de arranjo de di-iodo (modelo 2998 Waters). O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8 mL min⁻¹ em condições de gradiente 80:20 a 20:80 de metanol:éter metil *tert*-butil em 16 minutos, seguido por constante de 80:20 em 4 minutos, finalizando com 6

minutos de equilíbrio. A temperatura de forno utilizada foi de 30 °C, comprimento de onda 450 nm e volume de injeção de 40 µL. A temperatura do laboratório foi mantida a 20±1 °C, durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura (α -caroteno) e mamão formosa (β -criptoxantina), seguindo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Foram utilizados também os seguintes padrões: luteína (Lutein 40 mg, Vision Health), zeaxantina (Swanson, ZeaGold zeaxanthin 4 mg (from paprika) e β -caroteno (Beta Carotene (vitamina A) 25,000 IU Supplement, Swanson SW007). Os resultados da análise de carotenoides foram expressos em base seca.

A concentração de carotenoides totais (CT) foi obtida pela soma dos valores totais de todas as frações quantificadas.

Os limites de quantificação dos carotenoides foram luteína, 0,09 ng; zeaxantina, 0,16 ng; α -caroteno, 0,15 ng; β -caroteno, 0,14 ng e β -criptoxantina, 0,12 ng.

2.5 Determinação da capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia de Roesler et al. (2007), descrita no capítulo 1 desta tese.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativos, foi realizado teste de média LSD, estabelecendo-se o nível de 5% de significância.

Para análise dos dados, utilizou-se o programa Sisvar versão 5.3 (Build 77) (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada para composição centesimal (Tabela 1) entre os acessos de milho.

Tabela 1 - Composição centesimal dos grãos de milho dos acessos pigmentados.

	¹ Médias g 100 g ⁻¹ ± ² DP			
	TO 002	ES 006	RO 013	BAG 0661
Umidade	8,98±0,52 ^c	9,15±0,38 ^b	9,47±0,34 ^a	9,47±0,27 ^a
Cinzas*	1,42±0,48 ^c	1,41±0,48 ^c	1,56±0,27 ^a	1,47±0,26 ^b
Extrato etéreo*	3,67±0,31 ^a	3,17±0,50 ^c	3,16±0,29 ^c	3,27±0,36 ^b
Fibra bruta*	9,24±0,39 ^b	9,28±0,37 ^a	9,27±0,48 ^a	9,03±0,41 ^c
Proteína*	8,77±0,42 ^b	8,62±0,46 ^c	8,85±0,36 ^a	8,66±0,38 ^c
ENN	76,90±0,43 ^c	77,52±0,31 ^a	77,16±0,29 ^b	77,57±0,29 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$). ²DP: Desvio padrão.

*Base Seca

Os percentuais de cinzas, extrato etéreo, fibra, proteína e ENN para grãos de milho encontrados na literatura (GONÇALVES et al., 2003; NAVES et al., 2004, 2011), bem como os percentuais encontrados na tabela nutricional da Nutrition Data (NUTRITION DATA, 2016), corroboram todos os obtidos nos materiais estudados no presente trabalho.

Apesar de haver diferença significativa, os valores da composição centesimal estão próximos para os diferentes acessos. Os acessos que apresentaram maior porcentagem de umidade foram RO 013 e BAG 0661; quanto à cinza, o RO 013; extrato etéreo, o TO 002; fibra bruta, os acessos ES 006 e RO 013; proteína, o acesso RO 013 e ENN, os acessos ES 006 e BAG 0661.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados dos parâmetros de cor avaliados.

Tabela 2 - Valores médios¹ de variáveis de cor dos grãos de acessos pigmentados.

Acessos	Parâmetros de cor ¹ ± DP ²		
	L*	a*	b*
TO 002	33,12±0,93 ^c	0,39±1,73 ^d	0,08±1,17 ^c
ES 006	35,05±1,38 ^{bc}	0,82±1,04 ^c	0,04±1,39 ^c
RO 013	38,05±0,98 ^b	12,08±1,25 ^a	2,07±0,99 ^b
BAG 0661	47,82±0,91 ^a	2,26±1,16 ^b	12,01±1,10 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p>0,05$).

²DP: Desvio padrão.

Os acessos TO 002 e ES 006 apresentaram menores médias da variável L*, não tendo ES 006 diferido do RO 013, lembrando que estes são os acessos mais escuros. O acesso BAG 0661 apresentou maior valor de L*, quando comparado aos demais, sendo este o acesso com grãos mais claros (Figura 1).

Quanto à variável a*, a maior média foi apresentada para o acesso RO 013, sendo que este apresenta alguns grãos vermelhos. Já quanto à variável b*, o acesso com maior média foi o BAG 0661, o qual apresenta alguns grãos de coloração amarela.

Diferença significativa ($p<0,05$) foi observada para a concentração de fenólicos totais e antocianinas nos grãos dos acessos pigmentados (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios¹ da concentração de fitoquímicos (base seca) presentes nos grãos de milho de acessos pigmentados.

Acessos	Concentração de fitoquímicos (mg 100 mg ⁻¹) nos grãos ± DP	
	Fenólicos totais	Antocianinas
TO 002	959,6±0,61 ^a	72,26±0,40 ^a
ES 006	860,8±0,49 ^b	64,17±0,52 ^b
RO 013	756,3±0,31 ^c	58,40±0,38 ^{bc}
BAG 0661	690,0±0,38 ^d	50,84±0,43 ^c

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p>0,05$).

²DP: Desvio padrão.

Os grãos do acesso TO 002 apresentaram maior concentração de fenólicos totais e antocianinas, quando comparados aos demais acessos.

A concentração de fenólicos totais e antocianinas em grãos de milho de coloração vermelha, roxa e preta está correlacionada com a diferença total de cor, sendo grãos mais escuros aqueles com maior concentração de fenólicos (AGUAYO-ROJAS et al., 2012; HU; XU, 2011). Este dado concorda com os encontrados no presente trabalho, uma vez que os grãos de coloração mais intensa apresentaram maiores médias quanto à concentração de fenólicos totais e antocianinas.

Quanto aos carotenoides, diferença significativa ($p < 0,05$) entre os acessos pigmentados foi observada (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios¹ da concentração de carotenoides (base seca) em grãos de milho de acessos pigmentados.

Carotenoides	Concentração de carotenoides $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{DP}^2$			
	Acessos pigmentados			
	TO 002	ES 006	RO 013	BAG 0661
Luteína	*	0,96 \pm 1,05 ^a	0,31 \pm 1,08 ^c	1,16 \pm 1,10 ^b
Zeaxantina	*	0,87 \pm 1,03 ^{ab}	0,94 \pm 1,06 ^a	0,62 \pm 1,05 ^b
β -criptoxantina	0,13 \pm 1,04 ^d	0,62 \pm 1,10 ^a	0,19 \pm 0,90 ^c	0,31 \pm 1,03 ^b
β -caroteno	0,19 \pm 0,12 ^b	0,31 \pm 1,06 ^a	0,19 \pm 1,08 ^b	0,19 \pm 0,80 ^b
α -caroteno	*	*	*	*
Carotenoides totais	0,32 \pm 1,07 ^c	3,24 \pm 1,11 ^a	1,63 \pm 0,91 ^b	1,97 \pm 1,10 ^b

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

²DP: Desvio padrão.

* Abaixo do limite de quantificação

O acesso ES 006 se destacou quanto à concentração de carotenoides totais, seguidos dos acessos RO 013 e BAG 0661. Já o acesso TO 002 obteve a menor concentração de carotenoides totais nos seus grãos.

A concentração de carotenoides está também relacionada com a pigmentação da cor do grão de milho, uma vez que grãos com coloração amarela

intensa ou laranja apresentam maior concentração de carotenoides totais, quando comparados a grãos amarelo-claros e brancos (CARDOSO et al., 2009). Porém, quanto aos carotenoides totais, o acesso ES 006 (grãos roxos) apresentou maior concentração de carotenoides total, inclusive maior que o acesso BAG 0661 (alguns grãos amarelos). No entanto, com base no presente trabalho, os resultados de concentração de carotenoides para os acessos avaliados indicam que a resposta quanto ao perfil de carotenoides nos grãos deste cereal com base na coloração dos grãos é variável conforme o genótipo.

Cardoso et al. (2009), avaliando acessos do banco germoplasma de milho com grãos de coloração amarelo-alaranjada, encontraram variação de 9,46 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 42,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ de carotenoides totais. Já Kimura, Rodriguez-Amaya e Nestel (2007) encontraram concentrações de 11,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 9,17 $\mu\text{g g}^{-1}$, em cultivares de milho comercial Assum Preto e BR 473, respectivamente. Essas médias são superiores às encontradas no presente trabalho.

Para a composição de tocóis (tocoferóis e tocotrienóis), diferença significativa ($p < 0,05$) também foi observada entre os acessos de grãos de diferentes cores (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios¹ da concentração de tocóis em grãos de milho de acessos pigmentados.

Tocóis	Concentração de tocóis $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \pm \text{DP}^2$			
	Acessos pigmentados			
	TO 002	ES 006	RO 013	BAG 0661
α -tocoferol	563,49 \pm 1,55 ^a	499,74 \pm 1,68 ^b	304,22 \pm 9,70 ^d	423,49 \pm 2,87 ^c
β -tocoferol	30,24 \pm 0,37 ^{bc}	35,97 \pm 6,84 ^b	28,28 \pm 0,20 ^c	38,64 \pm 0,29 ^a
γ -tocoferol	444,48 \pm 1,78 ^c	396,57 \pm 9,74 ^d	1057,47 \pm 4,43 ^a	532,83 \pm 9,03 ^b
δ -tocoferol	98,35 \pm 1,50 ^a	*	25,21 \pm 1,56 ^b	25,40 \pm 0,78 ^b
α -tocotrienol	2582,73 \pm 8,13 ^a	343,82 \pm 3,93 ^d	454,56 \pm 10,36 ^c	696,43 \pm 2,31 ^b
β -tocotrienol	7529,90 \pm 10,97 ^a	7386,19 \pm 8,72 ^b	*	*
γ -tocotrienol	238,51 \pm 3,27 ^a	143,13 \pm 0,83 ^d	174,50 \pm 1,53 ^c	223,71 \pm 1,79 ^b
δ -tocotrienol	175,39 \pm 8,20 ^a	*	108,59 \pm 0,90 ^c	131,07 \pm 0,22 ^b

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

²DP: Desvio padrão.

* Abaixo do limite de quantificação

Os tocóis em destaque para os acessos avaliados foram β -tocotrienol, α -tocotrienol, α -tocoferol e γ -tocoferol.

As maiores concentrações de α -tocoferol, δ -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol e δ -tocotrienol puderam ser notadas no acesso TO 002.

O δ -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E. 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 tem atividade intermediária e o α -tocoferol apresenta a mais baixa atividade antioxidante (HEMEDA; KLEIN, 1990).

Para a variável atividade antioxidante, diferença significativa ($p < 0,05$) pode ser notada para os grãos dos acessos pigmentados (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios¹ da atividade antioxidante (base seca) dos grãos de milho de acessos pigmentados.

Acessos	% de inibição do radical livre \pm DP ²
TO 002	74,31 \pm 0,16 ^a
ES 006	65,19 \pm 0,09 ^b
RO 013	51,16 \pm 0,17 ^c
BAG 0661	52,88 \pm 0,14 ^d

¹Médias seguidas de mesma letra na não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

²DP: Desvio padrão.

Em ordem crescente, os acessos que mais se destacaram quanto à atividade antioxidante foram TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661.

Os valores de atividade antioxidante são classificados como alto (inibição > 70%), intermediário (40%-70% de inibição) e baixo (< 40% de inibição) (HASSIMOTO; GENOVESE; LAJOLO, 2005). Assim, de acordo com essa classificação, o acesso TO 002 tem alta atividade antioxidante e os acessos ES 006, RO 013 e BAG 0661, intermediária atividade antioxidante.

4 CONCLUSÃO

Acessos com grãos de milho de diferentes colorações diferem em composição centesimal.

O acesso de milho TO002 com grãos pretos é o acesso com maior concentração de fitoquímicos e maior atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

AGUAYO-ROJAS, J. et al. Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process of whole pigmented mexican maize. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 67, n. 2, p. 178-185, June 2012.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official method Am 5-04, rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 2005. 103 p.

ANKON. **Technology method 7: crude fiber analysis in feeds by filter bag technique**. Macedon, 2008. Disponível em: <http://.ankom.com/media/documents/CrudeFiber_1108_A200.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: AOAC International, 1984. 117 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012. 3000 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of Agricultural Chemists**. 17th ed. Washington, 2000. 1094 p.

BARBOSA, N. A. et al. Carotenoid retention in minimally processed biofortified green corn stored under retail marketing conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 4, p. 363-371, jul./ago. 2015.

CARDOSO, W. S. et al. Variabilidade de acessos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 2, p. 164-173, fev. 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic, 1992. p. 181-207.

GONÇALVES, R. A. I. et al. Yield and chemical composition of corn cultivate in dry-milling and grits production. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 635-642, maio/jun. 2003.

GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 184-185, 1990.

HU, Q. P.; XU, J. G. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 5, p. 2026-2033, Feb. 2012.

KIMURA, M. K. C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet potato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1734-1746, 2007.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1948-1955, 1999.

LICY, K. H. W. et al. Corn husk as a potential source of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 11413-11416, 2008.

LOPES, M. M. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) durante o amadurecimento de clones de cajueiro anão-precoce. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 325-332, maio/jun. 2012.

LOPEZ-MARTINEZ, L. X. et al. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, p. 1187-1192, 2009.

NAVES, M. M. V. et al. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade proteica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 34, p. 1-8, 2004.

NAVES, M. M. V. et al. Corn germ with pericarp in relation to whole corn: nutrient contents, food and protein efficiency, and protein digestibility-corrected amino acid score. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 264-269, jan./mar. 2011.

NUTRITION DATA. **Corn nutritional**. Disponível em: <<http://nutritiondata.self.com/facts/corn>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 53-60, 2007.

SANTIAGO, R. et al. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to Gibberella stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 5186-5193, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 29, p. 152-178, 1999.

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays L.*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v. 11, n. 1, p. 169-176, Jan. 2010.

ZILIĆ, S. et al. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays L.*) Kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 5, p. 1224-1231, Jan. 2012.

CAPÍTULO 4

OBTENÇÃO DE EXTRATO FENÓLICO DE ACESSO DE MILHO DE GRÃOS PRETOS E SUA FUNCIONALIDADE ANTIMICROBIANA EM BIOPOLÍMEROS

RESUMO

Os objetivos, neste capítulo, foram selecionar o melhor método de extração para compostos fenólicos do acesso de milho de grãos pretos TO 002, variando temperatura de extração e solvente, bem como testar a funcionalidade deste extrato como agente antimicrobiano em biopolímeros à base de amido de milho e zeína. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois fatores: temperatura (20 °C, 40 °C, 60 °C) e solvente (etanol 80%, etanol puro, metanol puro). Para o estudo das soluções de preparo dos biopolímeros e cobertura, o experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado em esquema fatorial constituído de dois fatores: tipo de biopolímero (amido e zeína) e concentrações de extrato fenólico (0%, 50% e 100%), totalizando seis tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizada análise de regressão para os fatores quantitativos e teste de média LSD para os fatores qualitativos, estabelecendo-se o nível de 5% de significância. O aumento da temperatura resultou em perda na concentração de fenólicos totais bem como na diminuição da atividade antioxidante, comprovando que o aumento da temperatura pode degradar os fenólicos e que estes estão associados à atividade antioxidante. A concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante nos biopolímeros de amido de milho e zeína aumentaram linearmente com o aumento da concentração de extrato fenólico, o que já era esperado, visto que a concentração no extrato também foi aumentada. Tanto os biopolímeros de amido quanto os biopolímeros de zeína com adição de 100% de extrato fenólico apresentaram halo de inibição, em média, de 25 mm de diâmetro. Foi possível concluir que menor temperatura (20 °C) e uso de etanol 80% são a condição ideal para otimizar a extração de compostos fenólicos do material avaliado. Biopolímeros de amido e zeína com adição de 100% de extrato fenólico resultam em atividade antimicrobiana para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Concentração de fenólicos totais. Extração de fenólicos. Biopolímero de amido. Biopolímero de zeína.

ABSTRACT

The objective of this chapter was to select the best extraction method for phenolic compounds from the access of TO 002 black grain corn, varying extraction temperature and solvent, as well as to test the functionality of this extract as an antimicrobial agent in food biopolymers. The experiment was designed in a completely randomized design, in a factorial scheme consisting of two factors: temperature (20 ° C, 40 ° C, 60 ° C) and solvent (ethanol 80%, pure ethanol, pure methanol). The experiment was designed in a completely randomized design in a factorial scheme consisting of two factors: biopolymer type (starch and zein) and phenolic extract concentrations (0%, 50% and 100%), Totaling six treatments. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA). When significant, regression analysis was performed for the quantitative factors and LSD mean test for the qualitative factors, establishing a level of 5% significance. The increase in temperature resulted in loss of total phenolic concentration as well as decrease in antioxidant activity, indicating that temperature increase may degrade phenolics, and that these are associated with antioxidant activity. The concentration of total phenolics and antioxidant activity in maize and zein starch biopolymers increased linearly with the increase in phenolic extract concentration, which was already expected, since the concentration in the extract was also increased. Both the starch biopolymers and zein biopolymers with 100% phenolic extract added had an inhibition halo averaging 25 mm in diameter. It was possible to conclude that lower temperature (20 ° C) and ethanol use 80% is the ideal condition to optimize the extraction of phenolic compounds from the evaluated material. Biopolymers of starch and zein with the addition of 100% phenolic extract results in antimicrobial activity for the bacterium *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Concentration of total phenolics. Extraction. Starch. Zein.

1 INTRODUÇÃO

Para a extração de um pigmento, muitas vezes é utilizado, como solvente, o metanol, por ser considerado o solvente mais eficiente para a extração de fenólicos (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006). Porém, para aplicação em alimento não é viável, uma vez que é tóxico para consumo e tem sido declarado, inclusive, prejudicial, por meio de sua exposição em longo prazo, podendo causar doenças como o mal de Parkinson (FINKELSTEIN; VARDI, 2002).

Segundo Cowan (1999), a eficiência da extração depende, principalmente, da escolha do solvente. A polaridade do composto alvo é o fator mais importante nessa decisão. Afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, segurança ambiental, toxicidade para humanos e viabilidade financeira também devem ser considerados na seleção do solvente para extração de pigmentos (OLIVEIRA, 2014). Extrações com diferentes solventes para atingir o máximo de rendimento de fenóis têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores (FINKELSTEIN; VARDI, 2002; GARZÓN, 2008; PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006). Além do metanol, a acetona, o etanol e a água são os solventes mais frequentemente utilizados para a extração, devido aos seus caracteres polares, que resultam em afinidade com compostos fenólicos em geral (GARZÓN, 2008; PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006).

O aumento da temperatura pode ser favorável para a extração de fenólicos. O calor pode tornar as paredes celulares permeáveis, aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminuindo a viscosidade dos solventes, facilitando, dessa forma, a extração. No entanto, temperaturas extremas podem degradar os compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2014). Para Khan et al. (2010), a temperatura em torno de 40 °C é ideal para a

extração de fenólicos em laranja. Já Aybastier, Sahin e Demir (2013) relatam que a temperatura em torno de 60 °C é ideal para a extração de fenólicos em folha de amora. Luzia e Jorge (2010) empregaram temperatura de 40 °C para a obtenção de extrato fenólico de limão. Entretanto, outros autores não utilizam aquecimento para a obtenção de extratos fenólicos em frutas tropicais, como acerola, caju e goiaba, bem como trigo, aveia e cevada (IRAKLI et al., 2012; VIEIRA et al., 2011).

Um dos maiores desafios da indústria de alimentos é o aumento da vida útil limitada de produtos alimentares, consequência das reações de oxidação e ação microbiológica (SOLIVA-FORTUNY; MARTIN-BELLOSO, 2003).

Um dos métodos estudados para reduzir a deterioração dos alimentos é a utilização de embalagens ativas, as quais exercem papel não só de revestir, mas também de preservar os mesmos. Dentre os materiais pesquisados para a confecção de biopolímeros, têm-se os polissacarídeos e as proteínas, sendo os primeiros os mais promissores, devido ao fato de serem abundantes, renováveis, e capazes de formar uma matriz contínua (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993). Biopolímeros obtidos a partir de polissacarídeos e proteínas são econômicos, devido ao baixo custo das mesmas e ao fato de serem biodegradáveis. Ainda apresentam outras vantagens, como poderem ser consumidos em conjunto com o produto, reterem compostos aromáticos, carrearem aditivos alimentícios ou componentes com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005).

Em embalagens ativas podem ser incorporados aditivos com função ativa, como, por exemplo, antioxidantes e agentes antimicrobianos (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; VERMEIREN et al., 1999).

Os compostos ativos podem ser de origem sintética ou natural. Todavia, diversas pesquisas têm sido conduzidas com compostos ativos naturais, como alternativa a aditivos sintéticos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; OUSSALAH et

al., 2004), uma vez que este último pode causar risco para a saúde (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009). Dentre os compostos ativos de fonte natural, podemos citar os compostos fenólicos, os quais são reportados por apresentar dentre outras funções, atividade antioxidante e antimicrobiana (ESPINA et al., 2011; MENEZES, 2005; MOHAMMADZADEH et al., 2007).

Alguns fatores podem afetar a efetividade da embalagem antimicrobiana, como as características do componente antimicrobiano (solubilidade e tamanho da molécula), o método de preparo do biopolímero (extrusão ou *casting*) e a interação entre o componente antimicrobiano e o polímero (SOARES et al., 2009).

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de selecionar o melhor método de extração de fenólicos do acesso TO 002, variando solvente e temperatura, e avaliar o efeito da adição do extrato rico em compostos bioativos, na atividade antimicrobiana em biopolímeros à base de amido e de zeína.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

2.1.1 Estudo da concentração de fenólicos totais de extratos obtidos por meio de diferentes temperaturas e solventes

O experimento foi planejado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois fatores, temperatura de extração (20 °C, 40 °C, 60 °C) e solvente (etanol 80%:água 20%, etanol puro, metanol puro), constituindo nove tratamentos (Tabela 1).

O experimento foi preparado em triplicata e as análises químicas, em três repetições.

Tabela 1 - Tratamentos do estudo da concentração de fenólicos totais em diferentes solventes e temperaturas.

Tratamento	Temperatura	Solvente
1	20 °C	Etanol 80%:água 20%
2	20 °C	Etanol puro
3	20 °C	Metanol puro
4	40 °C	Etanol 80%:água 20%
5	40 °C	Etanol puro
6	40 °C	Metanol puro
7	60 °C	Etanol 80%:água 20%
8	60 °C	Etanol puro
9	60 °C	Metanol puro

2.1.2 Estudo das soluções para a obtenção dos biopolímeros e funcionalidade quanto à ação antimicrobiana dos biopolímeros adicionados de extrato fenólico

O experimento foi planejado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois fatores: tipo de biopolímero (amido e zeína), concentrações de extrato fenólico (0%, 50% e 100%), totalizando seis tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos do estudo da funcionalidade dos biopolímeros adicionados de extrato fenólico, quanto à ação antimicrobiana.

Tratamento	Tipo de biopolímero	Concentração de extrato	Concentração de fenólicos (mg 100 g ⁻¹)
1	Amido	0%	0
2	Amido	50%	1783,2
3	Amido	100%	3767,1
4	Zeína	0%	0
5	Zeína	50%	1681,9
6	Zeína	100%	3756,0

2.2 Preparo da amostra e estudo dos diferentes métodos de extração de fenólicos totais

Os grãos de milho do acesso TO 002 foram moídos em moinho tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba, SP), sendo o material acondicionado em frasco de vidro, tampado, lacrado com parafilme e envolto em papel alumínio.

As amostras moídas foram maceradas em grau de porcelana e pistilo com o solvente em teste e o homogenato foi filtrado em filtro Whatman nº 1. O resíduo do filtro foi macerado por mais três vezes.

Para o experimento nas temperaturas de 40 °C e 60 °C, os extratos foram incubados em banho-maria, marca Precision Scientific (modelo 66722, EUA). A

temperatura do extrato foi monitorada com termômetro. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo marca Buchi (modelo R-144) acoplado com banho-maria (Waterbath B-480, Switzerland), em temperatura entre 25 °C e 30 °C até, aproximadamente, 10 mL. O extrato foi mantido em temperatura ambiente, durante 10 minutos, em frasco de vidro âmbar e, em seguida, armazenado em geladeira, na temperatura de 7 ± 1 °C até a condução das análises químicas.

O extrato obtido contendo melhor extração de fenólicos totais e maior atividade antioxidante foi utilizado para a preparação dos extratos a serem adicionados nas soluções de biopolímeros.

2.2.1 Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais nos extratos foi conduzida de acordo com a metodologia de Singleton et al. (1999), conforme descrito no capítulo 2 desta tese.

2.2.2 Atividade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia de Roesler et al. (2007) descrita no capítulo 2 desta tese.

2.3 Preparo dos biopolímeros

2.3.1 Biopolímero à base de amido de milho

Os biopolímeros de amido de milho foram preparados por meio da técnica de *casting*, utilizando-se 4 g de amido de milho comercial, 30% (p/p) de

glicerol (Sigma-Aldrich) em relação à massa do polímero e 100 mL de água deionizada. Estes valores foram determinados por meio de pré-testes.

Durante todo o processo a solução foi homogeneizada em constante agitação utilizando-se um agitador magnético modelo RH B1 (IKA, Staufen, Alemanha). A solução foi aquecida à temperatura de 85 °C até a completa gelatinização do amido. Em seguida, a opção de temperatura da chapa aquecedora foi desligada. Aguardou-se até a solução atingir 30 °C, adicionou-se o extrato fenólico e a solução ficou sob constante agitação, durante 5 minutos.

Com o auxílio de pipeta automática modelo P5000 (marca Gilson), verteram-se 10 mL da solução em placas de Petri de acrílico descartável com 8,7 cm de diâmetro. Para secagem da solução e formação do biopolímero, as placas foram mantidas em estufa marca Shel Lab (modelo 1350FX) com circulação forçada de ar a 35 ± 1 °C, por 24 horas.

Foram preparados biopolímeros com 0%, 50% e 100% de extrato fenólico em relação à massa do polímero, com base na metodologia de Borges (2013) e Botre et al. (2010).

2.3.2 Biopolímero a base de zeína

Assim como a solução do biopolímero à base de amido, o preparo da solução para o biopolímero à base de zeína foi preparada por meio da técnica de *casting*. Durante todo o processo, a solução foi homogeneizada em constante agitação, utilizando-se um agitador magnético modelo RH B1 (IKA, Staufen, Alemanha).

Para a elaboração da solução foram utilizados 0,2% de zeína comercial (m/v) (Sigma-Aldrich), em solução de etanol 70% (v/v). Esta solução foi aquecida até que atingisse a temperatura de 62 °C e, após isso, marcaram-se 4 minutos e foram acrescentados 15% de plastificante glicerol (Sigma-Aldrich) e 25%

de emulsificante emustab (Selecta). Contaram-se, novamente, 4 minutos e desligou-se a chapa aquecedora. Logo depois, o extrato fenólico foi adicionado. A solução permaneceu sob agitação durante 5 minutos. Esta metodologia foi determinada por meio de pré-teste e baseada na metodologia de Sant'Ana (2012).

Logo em seguida, verteram-se, com auxílio de pipeta automática modelo P 5000 (marca Gilson), 3 mL da solução em placas de Petri descartáveis de poliestireno com 8,7 cm de diâmetro, as quais foram colocadas em estufa marca Shel Lab (modelo 1350FX) com circulação forçada de ar (35 ± 1 °C), por 24 horas.

Assim como os biopolímeros de amido, foram preparados biopolímeros com 0%, 50% e 100% de extrato fenólico em relação à massa do polímero, com base na metodologia de Borges (2013) e Botre et al. (2010).

2.3.3 Caracterização dos biopolímeros

Foram realizadas análises de umidade, espessura, cor, fenólicos totais e atividade antioxidante. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

2.3.3.1 Determinação do teor de umidade

A umidade dos biopolímeros foi determinada conforme metodologia nº 925.09 da Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2000). Amostras dos biopolímeros foram pesadas em cápsula e submetidas à secagem (105 °C) por 24 horas.

2.3.3.2 Espessura

A espessura dos biopolímeros foi medida utilizando-se um micrômetro digital modelo MDC-25M (Mitutoyo, MFG, Japão) por meio da média de 10 medições em posições aleatórias de cada amostra do biopolímero, conforme metodologia de Fakhoury et al. (2012). Os resultados foram obtidos em μm .

2.3.3.3 Cor

Os biopolímeros foram avaliados quanto ao aspecto de cor, determinando-se as variáveis L^* , a^* e b^* , utilizando-se colorímetro Konica Minolta modelo CR 400 (Japão). Foram conduzidas 10 medições em posições aleatórias de cada amostra de biopolímero. O padrão branco foi utilizado.

Ainda foi calculado ΔE , de acordo com a equação 1.

$$\Delta E^* = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (\text{equação 1})$$

Para a avaliação da cor dos biopolímeros foi realizada leitura direta de refletância das coordenadas L^* , a^* , b^* e ΔE , sendo L^* relativo ao branco e ao negro (claridade); a^* , ao vermelho e ao verde, e b^* , ao amarelo e ao azul.

2.3.3.4 Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais nos extratos foi conduzida de acordo com a metodologia de Singleton et al. (1999), conforme descrito no capítulo 2 desta tese. As análises foram realizadas em três repetições.

2.3.3.5 Atividade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia de Roesler et al. (2007), descrita no capítulo 2 desta tese.

2.4 Atividade antimicrobiana

Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos biopolímeros contra *Staphylococcus aureus*, utilizando-se o método de disco de difusão descrito na Norma M7-A6 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003), com algumas modificações, conforme metodologia descrita por Borges (2013). A bactéria foi ativada em caldo *brain hearth infusion* (BHI), por 24 horas, a 37 °C. Após a incubação, a solução foi padronizada em espectrofotômetro utilizando-se a solução de 0,5 de McFarland a 625nm, para a obtenção de uma solução com concentração de, aproximadamente, 10⁸ células / mL e, posteriormente, esta solução foi, então, diluída para 10⁷ células / mL. Alíquotas de 0,1 mL desta última solução foram espalhadas com alça de Drigalski em uma placa contendo ágar nutriente. Amostras dos biopolímeros (2 cm de diâmetro) foram colocadas sobre a superfície da placa inoculada. Placas com biopolímero sem adição de extrato fenólico foram utilizadas como controle negativo. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da medição do halo de inibição formado (cm) após 24 horas de incubação a 37 °C, considerando o diâmetro do biopolímero.

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi escolhida para teste, por ser esta uma das mais encontradas em alimentos (HENNEKINNE et al., 2012).

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizada análise de regressão para os fatores quantitativos e teste de média LSD para os fatores qualitativos, estabelecendo-se o nível de 5% de significância.

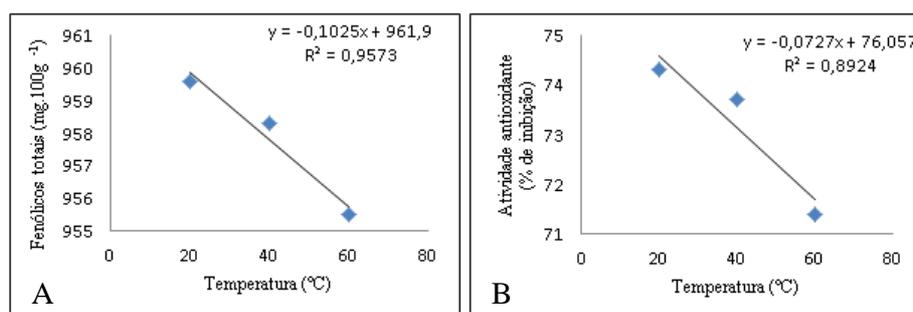
Para análise dos dados, utilizou-se o programa Sisvar versão 5.3 (Build 77) (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo dos extratos

Para o estudo da concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante nos extratos, houve significância para o efeito dos fatores separadamente (Figura 1).

Figura 1 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (A) e da atividade antioxidante (% de Inibição) (B) nos extratos em diferentes temperaturas.



O aumento da temperatura resultou em perda na concentração de fenólicos totais, bem como diminuição da atividade antioxidante, indicando que o aumento da temperatura pode degradar os fenólicos, e que estes estão associados à atividade antioxidante.

Quanto ao solvente utilizado, a maior concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante foram notadas para a extração realizada com metanol puro e etanol 80%, não havendo diferença entre este último e o etanol puro (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias da concentração de fenólicos totais dos extratos em diferentes solventes.

Solventes	Fenólicos totais (mg 100 mg ⁻¹)	Atividade antioxidante (% de inibição)
Etanol 80%	958,6±1,11 ^{ab}	73,17±1,02 ^{ab}
Etanol	957,1±1,17 ^b	72,99±1,10 ^b
Metanol	959,8±0,61 ^a	74,31±0,16 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade (p>0,05).

²DP: Desvio padrão

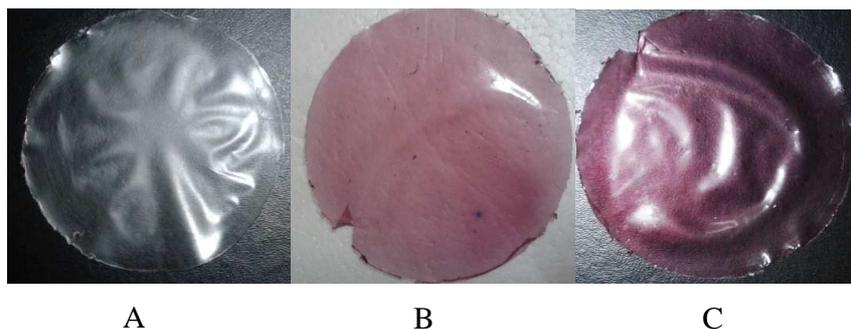
Apesar de se tratar de solventes com diferentes polaridades, não foi observada diferença na concentração de fenólicos totais e da atividade antioxidante entre os solventes etanol 80% e metanol puro. Possivelmente, isso ocorreu devido à presença de fenólicos solúveis em meio aos solventes utilizados. O importante agora seria avaliar o perfil de cada fenólico para melhor explicação dessa solubilidade em diferentes solventes.

Diversos autores concluíram que não é uma tarefa fácil encontrar um método único que seja adequado para a análise de um grupo diverso de fenólicos devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração (ANTOLOVICH et al., 2000).

3.2 Caracterização dos biopolímeros

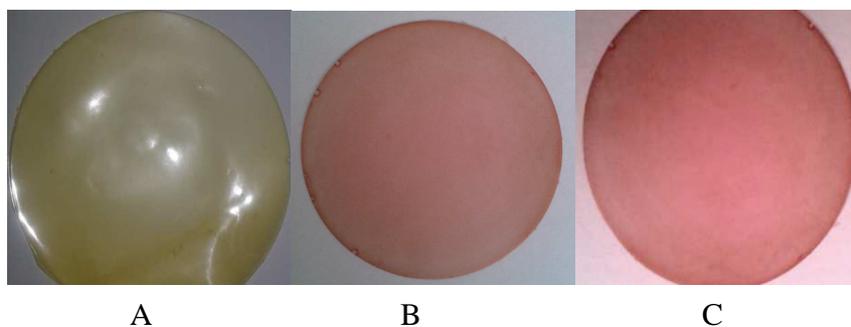
Na Figura 2 são apresentadas imagens dos biopolímeros de amido com diferentes concentrações de extrato fenólico.

Figura 2 - A) Biopolímero de amido de milho com 0% de adição de extrato Fenólico; B) biopolímero de amido de milho com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímero de amido de milho com 100% de adição de extrato fenólico.



Na Figura 3 encontram-se biopolímeros de zeína com diferentes concentrações de extrato fenólico do milho TO 0002.

Figura 3 - A) Biopolímeros de zeína com 0% de adição de extrato fenólico; B) biopolímeros de zeína com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímeros de zeína com 100% de adição de extrato fenólico.



Para a variável umidade não foi observada significância, porém, houve significância para o fator individual tipo de biopolímero.

Biopolímeros de amido independente da concentração de extrato fenólico apresentaram maior média de umidade ($9,95 \pm 0,12$) que o biopolímero de zeína ($8,63 \pm 0,14$).

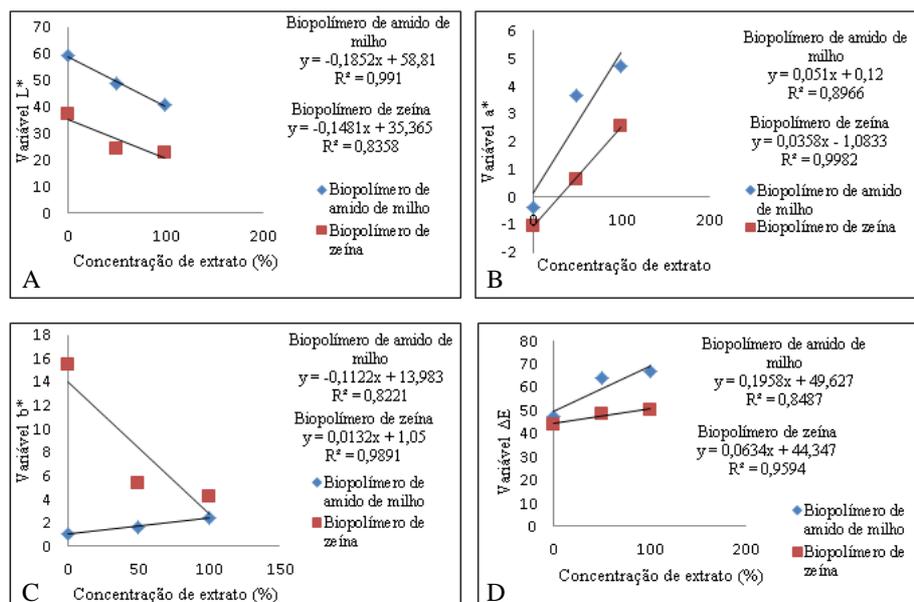
A espessura dos biopolímeros é um parâmetro de suma importância na avaliação das propriedades de aplicação dos mesmos. Ela é definida como a distância perpendicular entre duas superfícies principais do material (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008). O controle da espessura dos biopolímeros é difícil, principalmente no processo de produção do tipo *casting*. Essa dificuldade deve-se ao fato de o controle da espessura depender diretamente da viscosidade da solução do biopolímero (SOBRAL, 2000).

Quanto à variável espessura dos biopolímeros, efeito significativo foi verificado para o fator tipo de biopolímero. Biopolímero de zeína independente da concentração de extrato fenólico apresentou maior espessura ($76,0 \pm 7,29 \mu\text{m}$) que o biopolímero de amido ($58,0 \pm 3,41 \mu\text{m}$). Isto pode ter acontecido pelo fato de a viscosidade da solução do biopolímero de zeína ser mais viscosa em relação à solução do biopolímero de amido.

Para cor, significância ($p < 0,05$) foi observada entre a interação concentração de extrato fenólico x tipo de biopolímero, para as variáveis de cor L^* , a^* , b^* e cálculo ΔE . Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão do fator concentração de extrato fenólico dentro de tipo de biopolímero.

Na Figura 4 são apresentados os modelos lineares da variável de cor L^* , a^* , b^* e ΔE , para os biopolímeros de amido de milho e zeína acrescidos de extrato fenólico, em diferentes concentrações.

Figura 4 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente do parâmetro de cor: variável L* (A), variável a* (B), variável b* (C) e ΔE (D), para os biopolímeros de amido de milho e zeína, em diferentes concentrações de extrato.



Para a variável de cor L*, em ambos os biopolímeros, à medida que a concentração de extrato aumenta, a claridade diminui, visto que os biopolímeros mais escuros contêm as maiores concentrações de extrato fenólico, tornando-se mais opacos quando secos.

Com relação à variável a*, em ambos os biopolímeros, percebe-se que esta aumenta, ou seja, passa de valores negativos a valores positivos à medida que a concentração de extrato aumenta. Vale ressaltar que a coloração do extrato aplicado está associada à presença de fenólicos e antocianinas, os quais são responsáveis pela aparência colorida dos biopolímeros. Portanto, quanto maior a concentração dos extratos, maior a tendência para valores positivos do parâmetro a*, o que equivale à cor vermelha.

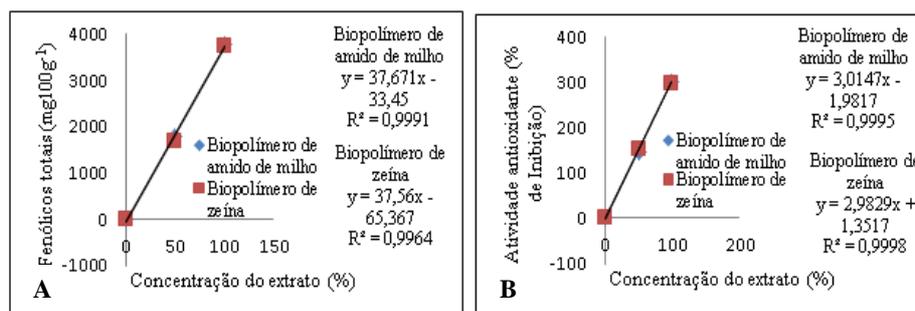
No biopolímero de amido, o aumento da concentração de extrato resulta em aumento de valor da variável b^* , porém, o valor é bem baixo, com a amostra ainda na região do cinza. Já para o biopolímero de zeína, o aumento da concentração de extrato induz a diminuição desta variável, ficando na mesma região de cor b^* que o biopolímero de amido. Vale ressaltar que a zeína apresenta coloração amarela, repassando esta coloração aos biopolímeros. Portanto, os biopolímeros de zeína sem adição de extrato apresentam coloração tendendo ao amarelo, apresentando maior média em relação aos biopolímeros de zeína com adição de extrato.

A diferença total de cor dos biopolímeros de amido e zeína, dada por ΔE , permitiu observar que o aumento da concentração do extrato altera a cor do material de forma semelhante. Percebe-se, ainda, que a variação na cor do biopolímero de amido é bem mais intensa, quando comparada à do biopolímero de zeína. Talvez isto tenha acontecido pelo fato de o biopolímero de amido ser mais claro e, ao adicionar o extrato roxo, a alteração foi mais notória.

Quanto aos atributos fenólicos totais e atividade antioxidante, significância ($p < 0,05$) foi verificada para a interação dos fatores. Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão para o fator concentração de extrato dentro de tipo de biopolímeros.

Na Figura 5 é apresentado o modelo linear da concentração de fenólicos totais dos biopolímeros de amido e zeína acrescidos de extrato fenólico em diferentes concentrações.

Figura 5 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (A) e atividade antioxidante (% de inibição) (B) nos biopolímeros de amido e zeína, em diferentes concentrações de extrato.



A concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante nos biopolímeros de amido de milho e zeína aumentou linearmente com o aumento da concentração de extrato fenólico, o que já era esperado, visto que a concentração no extrato também foi aumentada. Isso é um fato bastante positivo, uma vez que os biopolímeros com maior concentração de extrato fenólico poderão ser utilizados para futura aplicação em alimento que tem alta taxa de oxidação.

Borges (2013) e Juliano, Pala e Cossu (2007), avaliando a incorporação de extrato etanólico de própolis em biopolímeros à base de diferentes macromoléculas (alginato, agar e quitosana) e gelatina, encontraram compostos fenólicos nos biopolímeros aditivados, indicando que o processo de produção do biopolímero não degradou estes compostos.

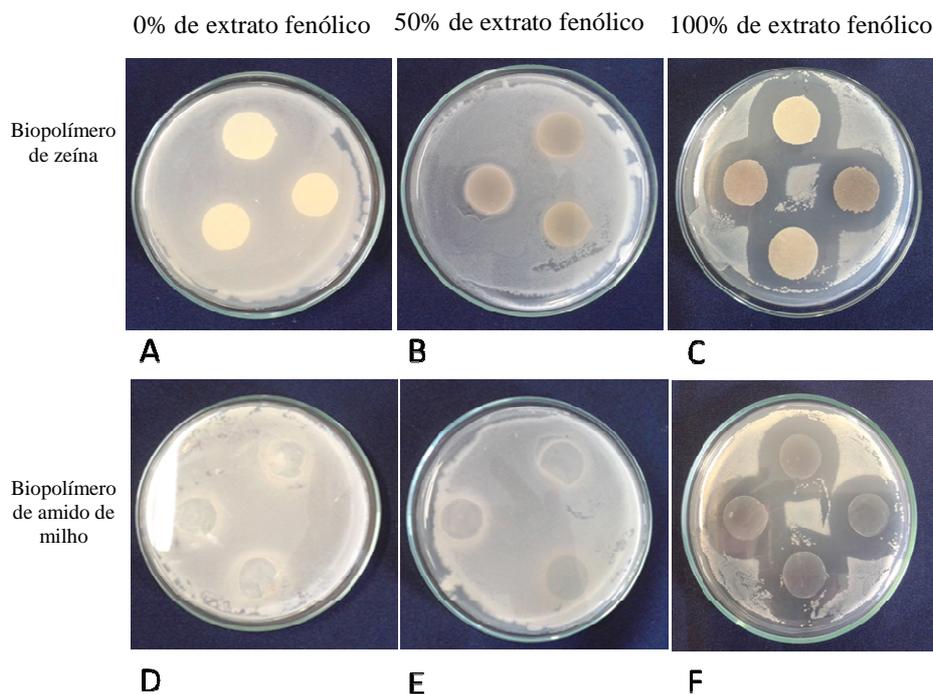
3.3 Funcionalidade dos biopolímeros quanto ação antimicrobiana

Os biopolímeros controle de amido e zeína, e os mesmos, com adição de 50% de extrato fenólico, não apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias *S. aureus*. Diferentemente, a adição de 100% de extrato à solução do

biopolímero resultou em eficiência antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 6 são apresentadas imagens das placas da avaliação da atividade antimicrobiana dos biopolímeros de amido e zeína incorporados com diferentes concentrações de extrato fenólico, atestada com a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Figura 6 - A) Biopolímero de zeína com 0% de adição de extrato fenólico; B) biopolímero de zeína com 50% de adição de extrato fenólico; C) biopolímero de zeína com 100% de adição de extrato fenólico; D) biopolímero de amido de milho com 0% de adição de extrato fenólico; E) biopolímero de amido de milho com 50% de adição de extrato fenólico; F) biopolímero de amido de milho com 100% de adição de extrato fenólico



Tanto os biopolímeros de amido quanto os biopolímeros de zeína com adição de 100% de extrato fenólico apresentaram halo de inibição, em média, de 25 mm de diâmetro.

Arbos, Stevani e Castanha (2013), estudando a ação microbiológica de compostos fenólicos (3.123,0 a 6.644,0 mg 100g⁻¹) de frutos de manga, encontraram halo de inibição de 19,0 mm de diâmetro frente a bactéria *Staphylococcus aureus*. Sabe-se que os compostos fenólicos podem apresentar atividade antimicrobiana quando estáveis e em concentrações suficientes (MENEZES, 2005; MOHAMMADZADEH et al., 2007). Dessa forma, nota-se que os compostos fenólicos presentes no extrato do milho preto TO 002 permaneceram em concentrações suficientes após o processamento do biopolímero com 100% de extrato, uma vez que este apresentou atividade antimicrobiana. Entretanto, nos biopolímeros com adição de 50% do extrato fenólico, a concentração de compostos fenólicos não foi suficiente para a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Stead (1993) avaliou o efeito de soluções etanólicas dos ácidos fenólicos, cafeico, p-cumárico e ferúlico no crescimento de espécies de *Lactobacillus* e observou que esses compostos, quando em baixas concentrações, estimulam o crescimento e, em altas concentrações, inibem.

Vários são os trabalhos que relatam a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos. Chenson, Steward e Wallace (1982) demonstraram que os ácidos p-cumárico e ferúlico inibiam totalmente o crescimento de bactérias do rúmex. Baranowski e Nagel (1982) encontraram pequena atividade antimicrobiana dos ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico contra *Pseudomonas fluorescens*. Herald e Davidson (1983) também observaram atividade antimicrobiana dos mesmos ácidos ferúlico e p-cumárico contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, outros autores apresentaram resultados divergentes, mostrando ausência ou uma discreta

atividade antibacteriana dos ácidos fenólicos (BARANOWSKI; NAGEL, 1982; LEIFERTOVA et al., 1975).

Vaquero, Alberto e Nadra (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos presentes em vinhos sobre bactérias patogênicas e investigaram, entre outros, os ácidos cafeico e protocateico, com maiores atividades para o ácido cafeico contra *Escherichia coli*.

A divergência entre os resultados dos trabalhos citados pode estar relacionada, dentre outros, a diferenças na metodologia experimental, à composição do meio, aos microrganismos empregados, às concentrações investigadas e à baixa solubilidade de muitos compostos fenólicos (DAVIDSON, 1993; WEN et al., 2003).

4 CONCLUSÃO

- a) Temperatura de 20 °C e etanol 80%:água 20% são condições ideais para a obtenção de extrato de milho de grãos pretos com maior concentração de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante.
- b) Aumento de temperatura de extração causa redução na concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos.
- c) Maior concentração de extrato fenólico nas soluções dos biopolímeros de amido e zeína resulta em maior concentração de fenólicos totais e maior atividade antioxidante.
- d) Adição de extrato etanólico do milho de grãos pretos TO 002, na concentração de 100%, a soluções de biopolímeros à base de amido e zeína resulta em atividade antimicrobiana nos mesmos para a bactéria *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Critical Review Analyst**, Melbourne, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casa e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. Gaithersburg, 2000. v. 1, 136 p.
- AYBASTIER, O.; SAHIN, S.; DEMIR, C. Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of quercetin and isolation of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. by column chromatography. **Separation Science and Technology**, New York, v. 48, n. 11, p. 1665-1674, Feb. 2013.
- BARANOWSKI, J. D.; NAGEL, C. W. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hydroxycinnamic acids and their alkyl esters. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, p. 1587-1589, 1982.
- BORGES, J. G. **Desenvolvimento de biopolímeros de desintegração oral para liberação de compostos bioativos**. 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de São Paulo, São Paulo, 2013.
- BOTRE, D. A. et al. Avaliação de biopolímero incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 3, p. 283-291, maio/jun. 2010.
- CHENSON, A.; STEWARD, C.; WALLACE, R. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 597-603, 1982.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

- DAVIDSON, P. M. Parabens and phenolic compounds. In: _____. **Antimicrobials in foods**. 3rd ed. New York: CRC, 1993. p. 1-9.
- ESPINA, L. et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined process. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 6, p. 896-902, June 2011.
- FAKHOURY, F. M. et al. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin e influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 49, n. 1, p. 149-154, 2012.
- FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 6 jan. 2016.
- FINKELSTEIN, Y.; VARDI, J. Progressive Parkinsonism in a young experimental physicist following long-term exposure to methanol. **Neurotoxicology Journal**, Little Rock, v. 23, p. 521-525, 2002.
- GARZÓN, G. Las antocianinas como colorants naturais y compuestos bioativos: revisión. **Acta Biológica Colombiana**, Bogotá, v. 13, n. 3, p. 27-36, 2008.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish geletin and chitosan incorporated with clove essential oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Oxford, v. 18, p. 46-52, 2009.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatine chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, New York, v. 27, n. 7, p. 889-896, Oct. 2010.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.
- HENNEKINNE, J. A. et al. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Microbiology Review**, Haren, v. 36, n. 1, p. 815-836, 2012.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de biopolímeros biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia do Alimento**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HERALD, P. J.; DAVIDSON, P. M. Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 1378-1379, 1983.

IRAKLI, M. N. et al. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acid in cereals after solid-phase extraction. **Food Chemistry**, London, v. 134, n. 3, p. 1624-1632, Oct. 2012.

JULIANO, C.; PALA, C. L.; COSSU, M. Preparation and characterisation of biopolymeric films containing própolis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 17, n. 3, p. 177-180, 2007.

KHAN, M. K. et al. Ultrasound-assisted extraction of Polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 851-858, 2010.

LEIFERTOVA, I. et al. Antifungal and antibacterial effects of phenolic substances. **Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultas Rerun**, Olomouc, v. 74, p. 83-89, 1975.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Potencial antioxidante de extratos de semente de limão (*Citrus limon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 489-493, abr./jun. 2010.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 405-411, 2005.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, Londron, v. 103, p. 729-733, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 8th ed. Wayne, 2003. 116 p. (NCCLS document M2-A8).

OLIVEIRA, D. S. **Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos**. 2014. 150 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 5598-5605, 2004.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal Agricultural Chemistry**, Bethesda, v. 54, n. 13, p. 4557-4567, 2006.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 38, p. 859-865, 2005.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./mar. 2007.

SANT'ANA, R. C. O. **Isolamento e identificação do perfil de zeínas do germoplasma tropical de milho para produção de cobertura comestível e biobiopolímero**. 2012. 121 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 770-775, Nov. 2010.

SOARES, N. de F. F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 4, p. 370-378, 2009.

SOBRAL, P. J. A. Influencia da espessura de biopolímeros feitos a base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, jun. 2000.

SOLIVA-FORTUNY, R. C.; MARTIN-BELLOSO, O. New advances in extending the shelflife of fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 14, n. 9, p. 341-353, Sept. 2003.

STEAD, D. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 505-510, 1993.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. C.; NADRA, M. C. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 93-101, 2007.

VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 77-86, 1999.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

WEN, A. et al. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, New York, v. 20, p. 305-311, 2003.

CAPÍTULO 5

EFEITO DE COBERTURA COMÉSTIVEL ADICIONADA DE EXTRATO DE MILHO PRETO RICO EM COMPOSTOS FENÓLICOS NA VIDA ÚTIL DE MORANGOS

RESUMO

A incorporação de antioxidantes nos biopolímeros e recobrimentos (coberturas) comestíveis auxilia na extensão da vida útil dos alimentos retardando o processo de deteriorização desses produtos. Sabe-se que o morango é um fruto atrativo, porém, muito perecível, com perdas sensoriais e econômicas. Assim, o objetivo, neste capítulo, foi avaliar a influência da cobertura à base de biopolímeros com adição de extrato fenólico de milho de grãos pretos nas características físicas e químicas de morangos durante armazenamento refrigerado. Foram utilizados morangos *Fragaria anannasa* cv. Oso Grande. O experimento foi planejado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois fatores: tratamento (sem cobertura, CAEF - cobertura de amido de milho com adição de extrato fenólico e CZEF - cobertura de zeína com adição de extrato fenólico) e período de armazenamento (1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias). Para análise do efeito da cobertura com extrato fenólico no morango, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O revestimento de morangos com coberturas de amido e zeína com adição de extrato fenólico de milho preto TO 002 aumenta a concentração de compostos bioativos nos mesmos. Apesar de ocorrerem perda de massa, diminuição do teor de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento, elas ocorrem em menor escala nos morangos revestidos, quando comparados aos morangos sem revestimento, o que aumenta a vida útil dos morangos refrigerados.

Palavras-chave: Antioxidantes. Compostos bioativos. Armazenamento de morangos. Embalagem ativa.

ABSTRACT

The incorporation of antioxidants in biopolymers and coatings (covers) edible assists in extension of the shelf life of foods by slowing the process of deterioration of these products. We are known that the strawberry is an attractive fruit, but very perishable with sensory and economic losses. The objective of this chapter was to evaluate the influence of coverage biopolymers base with the addition of phenolic extract of black grains of corn in the physical and chemical characteristics of strawberries during refrigerated storage. *Fragaria anannasa* cv. Oso Grande strawberries were used. The experiment was designed in completely randomized design in a factorial scheme consisting of two factors: treatment (without cover, CAEF - corn starch coverage with addition of phenolic extract) and CZEF (zein coverage with addition of phenolic extract) and storage time (1, 2, 3, 4, 5 and 6 days). For analysis of the effect of the cover with phenolic extract in the strawberry, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA). When significant, regression analysis was performed for quantitative factors and average LSD test for qualitative factors, establishing the 5% level of significance. The strawberries coating with starch and zein covers with addition of phenolic extract of black corn TO 002 increases the concentration of bioactive compounds the same. Despite occur weight loss, decreased total phenolic content, anthocyanins and antioxidant activity during the storage period, these occur on a smaller scale in the coated strawberries compared to strawberries without coating, which could increase the shelf life of chilled strawberries.

Keywords: Antioxidants. Bioactive compounds. Storage.

1 INTRODUÇÃO

O morango é um fruto atrativo devido às suas características peculiares de coloração vermelho-brilhante, odor, textura macia e sabor levemente acidificado (FLORES-CANTILLANO, 2003). É uma boa fonte de vitamina C e outros antioxidantes, como, por exemplo, flavonoides, entre outros fenólicos (ROBARDS et al., 1999), porém, apresenta elevada perecibilidade pós-colheita devido, principalmente, à sua intensa atividade metabólica (MALGARIM; CANTILLANO; COUTINHO, 2006), à elevada quantidade de água (GEBHARDT; THOMAS, 2002) e à grande suscetibilidade ao ataque de agentes patogênicos causadores de podridões (MALGARIM; CANTILLANO; COUTINHO, 2006). A alta perecibilidade resulta em perdas qualitativas e econômicas consideráveis (FLORES-CANTILLANO, 2003).

A tecnologia do processamento mínimo surgiu como um fator determinante para prolongar a vida útil ao submeter a fruta a processos de seleção de matéria-prima, lavagem, sanitização, embalagem e refrigeração (SILVA et al., 2006). A utilização de baixas temperaturas (0 °C a 4 °C) pode estender a vida útil do morango, usualmente, por até 5 dias (HAN et al., 2004). Entretanto, para o armazenamento prolongado, somente a redução da temperatura não é suficiente para manter as características físicas, químicas e microbiológicas dos frutos, sendo necessária a utilização de outras técnicas (MALGARIM; CANTILLANO; COUTINHO, 2006).

Uma das alternativas empregadas é a utilização de revestimentos comestíveis (coberturas e biopolímeros) (AZEREDO, 2003; KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). A diferença entre cobertura e biopolímero é que a primeira é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto o segundo é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (GONTARD; GUILBERT, 1995;

KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). Eles podem transportar ingredientes alimentícios, como antioxidantes, antimicrobianos e flavorizantes, a fim de melhorar a preservação de frutas e hortaliças, mantendo a aparência fresca, a firmeza e o brilho, aumentando o seu valor comercial (PALMU, 2003; SOTERO, 2000). A base desses biopolímeros comestíveis, geralmente, é formada por polissacarídeos e proteínas, pois suas cadeias são longas e capazes de produzir matrizes contínuas que dão estrutura ao revestimento (MARTINS, 2003; PÉROVAL et al., 2002).

Em inúmeras pesquisas em todo o mundo tem sido mostrado o potencial do uso dos revestimentos, como biopolímeros e coberturas, incorporados com agentes ativos na manutenção e no prolongamento da vida útil de alimentos, sendo eles de origem vegetal ou animal (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009; GRANDA-RESTREPO et al., 2009; SOARES et al., 2009). Porém, as melhores fontes para a obtenção desses compostos ativos são as plantas (ARUTSELVI et al., 2012), devido à elevada concentração de compostos fenólicos presentes em seus extratos e/ou óleos que favorecem as propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas (KANATT et al., 2012).

Apesar de o morango ser rico em compostos bioativos, a adição da cobertura com adição de extrato fenólico em biopolímeros e /ou coberturas poderia impedir ou retardar algumas ações negativas ao longo do armazenamento refrigerado de morangos. Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de coberturas de amido de milho e zeína adicionadas de extrato fenólico de milho de grãos pretos nas características físicas e químicas de morangos durante armazenamento refrigerado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de dois fatores: tratamento (sem cobertura, CAEF - cobertura de amido com extrato fenólico e CZEF - cobertura de zeína com extrato fenólico) e período de armazenamento (1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias), sendo 18 combinações (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos do estudo do efeito de cobertura comestível adicionada de extrato de milho preto rico em compostos fenólicos na vida útil de morangos.

Combinação	Morangos	Período de armazenamento (dia)
1	Sem cobertura	1
2	Sem cobertura	2
3	Sem cobertura	3
4	Sem cobertura	4
5	Sem cobertura	5
6	Sem cobertura	6
7	CAEF	1
8	CAEF	2
9	CAEF	3
10	CAEF	4
11	CAEF	5
12	CAEF	6
13	CZEF	1
14	CZEF	2
15	CZEF	3
16	CZEF	4
17	CZEF	5
18	CZEF	6

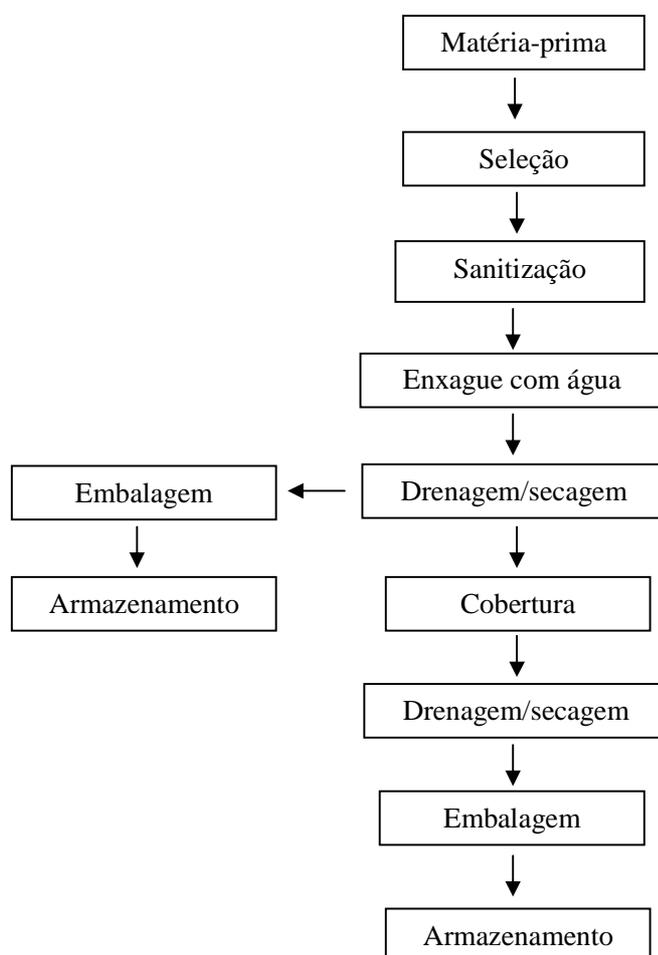
No dia 0 foram realizadas análises físico-químicas dos morangos “in natura”, para a caracterização dos mesmos.

2.2 Matéria-prima

Foram utilizados morangos (*Fragaria ananassa* cv. Oso Grande), adquiridos do Supermercado Castanheira & Cia (Supermercado Santo Antônio), em Sete Lagoas, MG. As frutas foram adquiridas no mesmo dia em que chegaram do Centro de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA-MG).

O fluxograma do preparo dos morangos encontra-se na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do preparo dos morangos.



Frutas de tamanho uniforme de coloração vermelha, firmes e livres de danos mecânicos e infecção por fungos foram selecionadas para o experimento. Elas foram imersas em solução sanificante de hipoclorito de sódio 150 ppm, por 3 minutos, enxaguadas com água deionizada corrente, drenadas e secas com papel toalha.

As amostras controle, ou seja, sem aplicação de cobertura, após passarem por todas as etapas de higienização, foram embaladas em bandeja de poliestireno recoberta com filme comercial (PVC 18 mm) e armazenadas, a 4 ± 1 °C e umidade relativa (UR) de 60% em geladeira (Eletrolux Frost Free Duplex DF42). As condições de temperatura e umidade foram monitoradas com termômetro e termo-higrômetro, além de um termômetro infravermelho a laser modelo GM300 da marca Benetech.

Para cada tratamento e para o controle foram preparadas três bandejas (triplicata) com, aproximadamente, 110 g de morangos (5 a 6 morangos).

Para os tratamentos com cobertura, após a secagem, as amostras foram imersas nas suas respectivas coberturas, sendo elas amido de milho com adição de extrato fenólico (CAEF) e zeína com adição de extrato fenólico (CZEF) na concentração de 100% de extrato, correspondendo a $3.838,4$ ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) de fenólicos totais.

Os detalhes da aplicação da cobertura nos morangos serão descritos nos itens a seguir.

2.3 Preparo do extrato fenólico

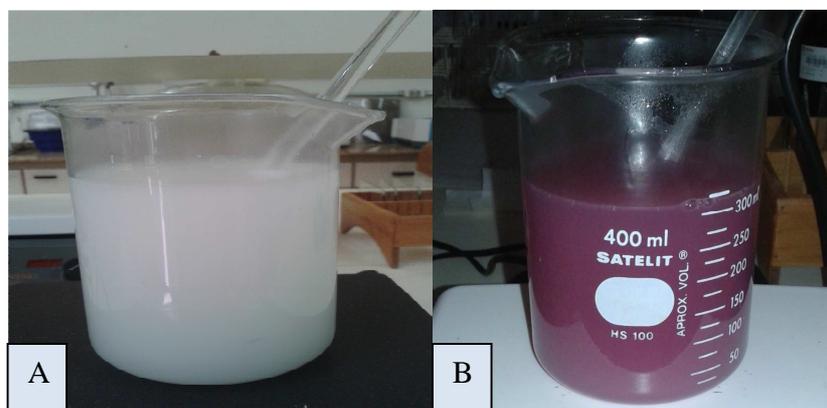
O extrato fenólico foi preparado como descrito no capítulo 4, sendo obtido de grãos moídos de milho preto TO 002.

2.4 Preparo das soluções de cobertura

A solução de cobertura à base de amido de milho foi preparada por meio da técnica de *casting*, conforme descrito no capítulo 4.

Na Figura 2 mostram-se as soluções para preparo da cobertura de amido de milho com e sem adição de extrato.

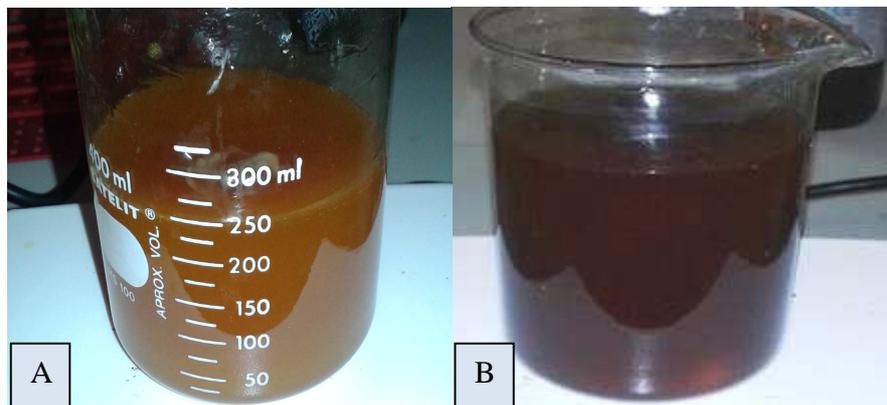
Figura 2 - Solução de cobertura de amido de milho sem adição de extrato (A) e solução de cobertura de amido de milho com adição de extrato (B).



A solução de cobertura de zeína também foi preparada por meio da técnica de *casting*, conforme descrito no capítulo 4 desta tese.

Na Figura 3 mostram-se as soluções da cobertura de zeína com e sem adição de extrato.

Figura 3 - Solução da cobertura de zeína sem adição de extrato (A) e solução da cobertura de zeína com adição de extrato (B).



2.5 Aplicação da cobertura

A solução foi deixada sob a bancada do laboratório até que a temperatura da cobertura se igualasse a 21 ± 1 °C (CHIUMARELLI, 2008; FONTES, 2005; HENRIQUE; CEREDA, 1999).

Os morangos foram imersos, por 3 minutos, nas respectivas coberturas e, em seguida, recolhidos com o auxílio de espumadeira inox.

Na Figura 4 observam-se imagens dos morangos revestidos com CAEF e CZEF.

Figura 4 - Morangos revestidos com CAEF (A), morangos revestidos com CZEF (B).

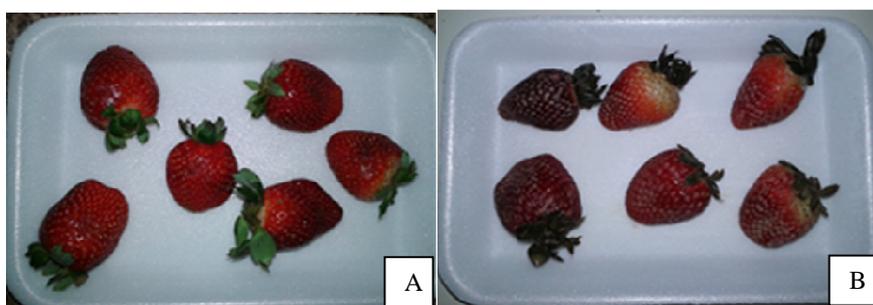


Foto do 2º dia de armazenamento

As bandejas foram dispostas aleatoriamente na geladeira. E, para melhor simulação de condições de comercialização a varejo, os morangos ficaram expostos em presença de luz até o final do período de armazenamento, para o que foi utilizada uma luminária fluorescente modelo Sobrepor 100W E27.

2.6 Preparo das amostras para análises químicas

Os morangos foram triturados em moinho de bancada modelo 1119 (Toastmaster grinder), por 15 segundos.

Foram realizadas análises de umidade, perda de massa, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis (SS) °Brix, fenólicos totais, atividade antioxidante e antocianinas. As três últimas análises foram realizadas na ausência de luz.

As análises foram realizadas em três repetições, a cada 24 horas, durante 6 dias de armazenamento.

2.7 Determinação da umidade

A umidade dos morangos foi determinada de acordo com o método 920.151 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012). Foi utilizada uma estufa a vácuo, da marca Shel Lab 1350FX (USA), à temperatura de 70 °C, para secagem de, aproximadamente, 2 g de amostra até peso constante (aproximadamente 72 horas). Os resultados foram expressos em g 100 g⁻¹ de umidade.

2.8 Perda de massa

As perdas de massa nos morangos foram determinadas, em gramas, com auxílio de balança Precision, PR 5000 (Alemanha). Foi utilizada a média de três bandejas por tratamento. Os frutos foram pesados no início do experimento (0h – massa inicial) e durante o armazenamento, a cada 24 horas até 144 horas. Os dados foram expressos em porcentagem, considerando a diferença entre a massa inicial e a massa obtida a cada intervalo de tempo. A porcentagem da perda de massa foi calculada de acordo com a equação 1.

$$\text{Perda de massa (g.100g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad \text{equação 1.}$$

2.9 Determinação da acidez titulável

A acidez titulável foi determinada pelo método oficial n° 942.15 da AOAC (2005), determinada por titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 M. Aproximadamente 1 g da amostra foi pesado e acrescentados 50 mL de água destilada. Fenolftaleína 1% foi utilizada como indicador (3 gotas). A titulação

ocorreu até a mudança de cor para levemente róseo. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido cítrico por 100 g de polpa de morango.

2.10 Sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais foram determinados pelo índice de refração em refratômetro digital de bancada Pocket Refractometer PAL-1 ATAGO (China) calibrado com água deionizada. Os resultados foram expressos em graus Brix.

2.11 pH

Mediu-se o pH com potenciômetro digital de bancada Denver Instrument, UltraBASIC (USA), padronizado com soluções padrão de pH 4 e pH 7, diretamente em 10 mL de polpa de morango.

2.12 Preparo da amostra para as análises de fenólicos totais e atividade antioxidante

A amostra foi macerada com metanol (grau PA Vetec) na proporção 1:10 (m/v). O extrato obtido foi filtrado utilizando-se papel filtro Whatman n° 6. O resíduo foi extraído por mais duas vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador RE 120 – Buchi (Alemanha), em temperatura de banho de 40 °C. O extrato ficou armazenado na geladeira até a realização da análise.

2.12.1 Determinação de fenólicos totais

O conteúdo total de polifenóis foi avaliado usando o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo método adaptado de Singleton et al. (1999). Pipetaram-se

330 μL do extrato e adicionaram-se 550 μL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Aguardou-se por 10 minutos e acrescentaram-se 1.000 μL de solução 7,5% (p/v) de Na_2CO_3 (J.T Baker). As soluções ficaram mantidas à temperatura ambiente (22 $^\circ\text{C}$), envoltas em papel alumínio, durante 2 horas. Utilizou-se como branco da reação uma extração com solvente em vez de amostra. O conteúdo total de polifenóis foi determinado a 760 nm, usando um UV-Vis espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments). O conteúdo fenólico total de cada amostra foi determinado por meio de uma curva de calibração preparada com ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos como mg de ácido gálico por 100 g de amostra.

2.12.2 Determinação da capacidade antioxidante

A análise da atividade antioxidante dos morangos foi realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). Foram coletados 500 μL do extrato e adicionaram-se 500 μL de DPPH. As amostras ficaram sob agitação, por 1 hora, em agitador tridimensional (3D marca Labnet, modelo GyroMini, 20 rpm inclinação 3D fixa em 20 $^\circ$) e revestidas em papel alumínio. Logo depois, realizou-se a leitura, em 515 nm, em espectrofotômetro.

Fez-se um controle somente com DPPH e metanol e zerou-se com metanol o espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments).

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a equação 2.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Ext}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100 \quad \text{equação 2.}$$

em que A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorvância da amostra em solução determinada a 515 nm (ROESLER et al., 2007).

2.13 Antocianinas

O teor de antocianinas foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Francis (1992) e adaptada por Lopes et al. (2012). Um grama de polpa foi extraído com 30 mL de solução etanol-HCl (1,5N), na proporção (85:15). A amostra foi homogeneizada em homogeneizador de tecidos (Ultra Stirrer 380-D), por 2 minutos, na velocidade “5”. Logo depois, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 mL (sem filtrar) e aferiu-se o volume com etanol-HCL (1,5N). Em seguida, transferiu-se para um frasco de vidro, envolto em papel alumínio, e deixou-se descansando, por 16 horas, na geladeira. Filtrou-se o material com auxílio de papel Whatman nº1, para um béquer de 50 mL, sempre envolto em papel alumínio. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro modelo T80 (PG Instruments) em comprimento de onda de 535 nm. O branco foi composto apenas de solução etanol-HCL (1,5N). A concentração de antocianinas foi expressa em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, MG.

2.14 Análise estatística

Para análise do efeito da cobertura com extrato fenólico no morango, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizada uma análise de regressão para os fatores quantitativos e teste de média LSD para os fatores qualitativos, estabelecendo-se o nível de 5% de significância.

Para análise dos dados, utilizou-se o programa Sisvar versão 5.3 (Build 77) (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da matéria-prima

A composição físico-química dos morangos (*Fragaria ananassa* cv. Oso Grande) encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição físico-química dos morangos *in natura* utilizados para o experimento

Determinações	Médias
Umidade (mg 100g ⁻¹)	90,27±0,62
Ph	3,26±0,19
Acidez titulável (% de ácido cítrico/100 g)	0,85±0,27
Sólidos solúveis (°Brix)	7,90±0,16
Fenólicos totais (mg 100 g ⁻¹ amostra)	208,83±0,64
Atividade antioxidante (% de inibição)	36,81±0,31
Antocianinas (mg 100 g ⁻¹)	16,0±0,26

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TABELA..., 2011), a umidade de morangos *Fragaria ananassa* cv. Oso Grande é de 91,5%. Já na Tabela de Composição Química (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2006), o teor de umidade em morangos é de 90,94%. Pequenas variações são observadas entre o valor encontrado no presente trabalho e as tabelas citadas, o que, provavelmente, é resultante das diferenças de cultivares, do estágio de maturação, do clima e do local de plantio do morango.

O pH obtido para as amostras de morango da cultivar Oso Grande se assemelha ao reportado por Garcia (2006) 3,70 e por Cantillano et al. (2008), 3,45, que trabalharam com morangos das cultivares Caminho Real, Ventana e Aromas. Segundo a tabela SAFE, os valores de pHs de morangos em geral estão entre 3,0 e 3,90 (US FDA/CFSSAN, 2008).

O valor 0,80 de acidez titulável encontrado por Garcia (2006) concorda com a acidez encontrada para os morangos estudados neste trabalho; já o teor de sólidos solúveis apresentou-se um pouco menor que o encontrado pelo mesmo autor, 9,33 °Brix.

Os valores de fenólicos totais, atividade antioxidante e antocianinas estão dentro dos valores encontrados em outros trabalhos (PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2008; ZHENG et al., 2007) realizados com morangos das variedades Fragaria e Ananassa Duch. Na literatura, os valores de fenólicos totais para morango, em geral, variam de 200 a 300 mg 100 g⁻¹ e antocianinas, 12 a 32 mg 100g⁻¹ (PANTELIDS et al., 2007; PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2008; ROBERT; GORDON, 2003; SOUZA, 2013; WANG; LIN, 2000).

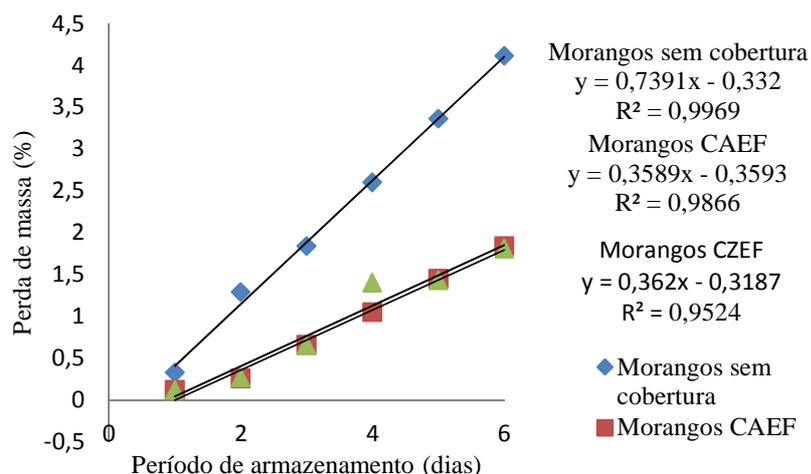
3.2 Estudo da vida útil dos morangos com e sem revestimento

3.2.1 Perda de massa

Para a variável perda de massa, significância foi notada entre a interação tratamento x período de armazenamento. Após o desdobramento foi aplicada análise de regressão do período de armazenamento dentro do fator tratamento.

Na Figura 5 é apresentada a variação da perda de massa durante o período de armazenamento de morangos sem cobertura e revestidos com CAEF e CZEF.

Figura 5 - Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de perda de massa dos morangos sem cobertura e revestidos com CAEF e CZEF, durante período de armazenamento (dias) refrigerado.



A perda de massa aumentou significativamente nos morangos com e sem cobertura, durante os seis dias de armazenamento. Entretanto, em todos os dias de armazenamento, a perda de massa pela amostra controle (sem cobertura) foi significativamente superior às demais.

Os índices percentuais de perda de massa, obtidos em função do período de armazenamento, não foram significativamente diferentes para os morangos com CAEF e CZEF, mas estes foram significativamente diferentes para os morangos sem cobertura ($p < 0,05$), em regressão do tipo linear.

A utilização de coberturas na superfície de frutos no intuito de aumentar a espessura da película natural pode contribuir como barreira à perda de água (OLIVEIRA; CEREDA, 2003).

A percentagem máxima de perda de água aceitável para a comercialização do morango é de 6% de seu peso na colheita. Acima deste

patamar, o morango torna-se inaceitável para a comercialização (GARCIA; MEDINA; OLÍAS, 1998; RONQUE, 1998). Sendo assim, verificou-se, neste experimento, que os frutos com e sem cobertura encontraram-se comercialmente aceitáveis até seis dias de armazenamento refrigerado.

Todavia, os morangos com cobertura apresentaram menor perda de água que os sem cobertura, indicando que a cobertura foi eficiente em reduzir, ao longo do tempo, a perda de massa dos morangos. Isso pode ser explicado pelo favorecimento da dificuldade de migração da água para o ambiente, causado pela película formada ao redor do fruto (GARCIA, 2006).

A perda de água é um acelerador da senescência das frutas, acarretando maior rapidez na taxa de desintegração da membrana e perda do conteúdo celular e, conseqüentemente, o murchamento e a perda de suculência (GARCIA; MEDINA; OLÍAS, 1998). Vale ressaltar que, após a colheita, os morangos apresentam alta atividade fisiológica, acarretando rápida desidratação (GARCIA; MEDINA; OLÍAS, 1998; TALBOT; CHAU, 1991).

Ribeiro et al. (2007) observaram perda de, aproximadamente, 3% em morangos com o revestimento de quitosana ou carragena, armazenados entre 0 e 5 °C, durante 6 dias. Já Hernández-Muñoz et al. (2008) observaram entre 14,2% e 19,6% de perda de massa em morangos com revestimento de quitosana armazenados a 10 °C, por 7 dias, enquanto os morangos sem cobertura tiveram 28,7% de perda de massa. Vale ressaltar que, neste último caso, a temperatura pode ter influenciado, uma vez que, segundo os autores, a perda de massa está diretamente relacionada com a temperatura de armazenamento.

3.2.2 pH e acidez titulável

Tanto as medidas de pH como as de acidez titulável estão relacionadas a determinações de ácidos presentes no alimento. A diferença entre elas é que a

medida de pH expressa o ácido dissociado, que tem a capacidade tamponante, enquanto a acidez titulável expressa a quantidade total de ácidos presentes como ácidos orgânicos livres, na forma de sais e compostos fenólicos (GARCIA, 2006).

Não houve significância para a interação período de armazenamento x tratamento, para o pH dos morangos. Logo, não houve alteração de pH entre o início e o final de armazenamento, para todos os tratamentos. Porém, o fator tratamento foi significativo, portanto, a cobertura influenciou o pH dos frutos.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias gerais de pH dos morangos em diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Média de pH dos morangos submetidos a diferentes tratamentos.

Tratamento	Média de pH \pm DP
Sem cobertura	3,24 \pm 0,23 ^c
Cobertura de amido de milho com extrato fenólico (CAEF)	3,51 \pm 0,47 ^b
Cobertura de zeína com extrato fenólico (CZEF)	3,62 \pm 0,51 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de LSD, a 5% de probabilidade (p<0,05)

DP: Desvio padrão

Os morangos que receberam coberturas apresentaram pH maior que o do controle (sem cobertura), o que pode ser explicado pela interferência do pH das coberturas, as quais apresentaram-se superiores ao da fruta. O pH da CAEF no momento da aplicação foi de 5,2 e o pH da CZEF, 6,3.

Percebe-se, ainda, que o pH dos morangos com revestimento de CZEF apresentou maior média, quando comparado ao pH dos morangos com CAEF, o que já era esperado, uma vez que o pH da CAEF apresentou-se maior que o da CZEF. Vale ressaltar que todos os pH apresentam-se ácidos, abaixo de 4.

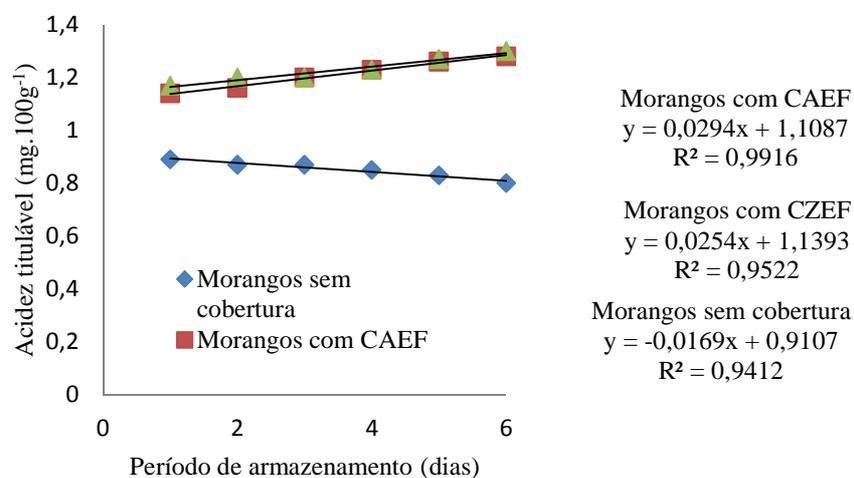
Nota-se que, apesar de os morangos com revestimento apresentarem médias de pH superiores aos do morango sem cobertura, a diferença não foi tão

grande e isso pode ser um atributo interessante, uma vez que a presença de cobertura não influenciaria tanto o sabor levemente ácido do morango. Lembrando que esta é uma característica sensorial desejada do morango (FLORES-CANTILLANO, 2003; SILVA et al., 2006).

Para a acidez titulável houve significância para os fatores tratamento x período de armazenamento. Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão para o fator período de armazenamento dentro dos tratamentos.

Na Figura 6 é apresentado o modelo linear da acidez titulável durante o período de armazenamento de morangos cobertos com CAEF, CZEF e sem cobertura.

Figura 6 - Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de acidez titulável ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos morangos sem cobertura e revestidos com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.



As amostras de morango sem cobertura apresentaram menor acidez titulável que as cobertas. Isso pode ser explicado pelo fato de as coberturas

apresentarem ácidos orgânicos (ácidos fenólicos), o que, possivelmente, influenciou aumentando a acidez titulável dos morangos com cobertura.

Percebe-se, ainda, que os morangos sem cobertura não só apresentaram acidez titulável menor, bem como ela foi diminuindo ao longo do armazenamento, enquanto a acidez titulável nas amostras cobertas foi aumentando linearmente. Compreende-se, portanto, que a presença da cobertura com extrato fenólico mostrou-se eficiente quanto à conservação dos ácidos presentes na fruta, bem como os ácidos fenólicos da cobertura podem ter migrado para a fruta lentamente, de tal forma que os ácidos orgânicos aumentaram ao longo do período de armazenamento, consequentemente causando aumento na acidez titulável.

Segundo Coma (2008), a migração do composto ativo presente no biopolímero ou cobertura acontece lentamente.

Os ácidos orgânicos são importantes componentes do sabor e do aroma das frutas, tendo influência direta sobre eles. Segundo Cordenunsi, Nascimento e Lajolo (2003), depois dos açúcares solúveis, os ácidos orgânicos não voláteis são os componentes mais importantes responsáveis pelo sabor dos morangos.

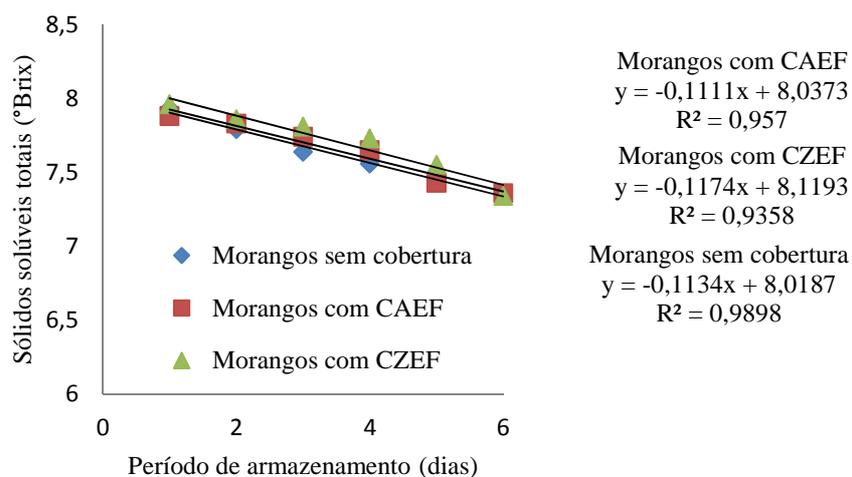
3.2.3 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis estão relacionados com o sabor “doce” do morango, pois os açúcares são os componentes mais abundantes encontrados nessa fração. Em morangos, esse teor pode variar entre 5% e 12% (KADER, 1991; PERKINS-VEAZIE, 1995), conforme a cultivar e os fatores pré-colheita a que ela foi sujeita. Mas, para que um fruto seja sensorialmente aceitável, ele deve apresentar teor mínimo de 7% (MITCHAM; CRISOSTO; KADER, 2013) para a obtenção de sabor aceitável pelo mercado consumidor, que requer frutos doces (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Para os sólidos solúveis, foi detectada significância ($p < 0,05$) da interação dos fatores tratamento e período de armazenamento. Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão para o fator período de armazenamento dentro dos tratamentos.

Na Figura 7 são apresentados os modelos lineares da variação dos sólidos solúveis ao longo do período de armazenamento dos morangos cobertos com CAEF, CZEF e sem cobertura.

Figura 7 - Representação gráfica da equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.



Os morangos com e sem cobertura apresentaram redução de SS ao longo do armazenamento.

A redução nos teores de SS, ao longo do armazenamento, é uma característica de frutos não climatéricos, como o morango. Isso acontece por que, ao serem colhidos, estes frutos apresentam pouca ou nenhuma reserva

energética (amido), sendo necessária a utilização dos açúcares presentes na fruta como fonte energética para a respiração, reduzindo, assim, o teor de SS (GARCIA, 2006).

Frutos não climatéricos (CORDENUNSI; NASCIMENTO; LAJOLO, 2003), apesar de desenvolverem a cor vermelha brilhante, em alguns casos, podem melhorar a textura e o aroma, mas não desenvolvem, após a colheita, o sabor adocicado (GARCIA, 2006).

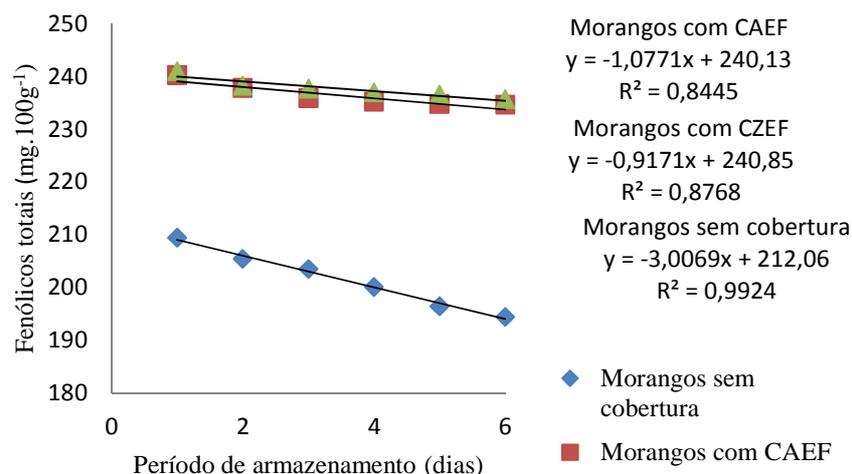
Hernández-Muñoz et al. (2008) e Tanada-Palmu e Grosso (2005) observaram aumento no teor de SS de morangos que receberam coberturas à base de glúten e quitosana, respectivamente. Segundo os autores, este aumento pode ser explicado pela significativa perda de água dos morangos, acarretando concentração dos SS. Todavia, apesar de ter sido observada, no presente trabalho, perda de água durante o período de armazenamento, não foi verificado aumento no teor de SS. A perda de água verificada por estes autores foi, em média, de 16%, enquanto, no presente trabalho, foi de 2%.

3.2.4 Fenólicos totais

Significância ($p < 0,05$) foi observada no teor de fenólicos totais para a interação período de armazenamento x tratamento.

Os resultados obtidos na análise de fenólicos totais estão apresentados na Figura 8. A concentração de fenólicos totais inicial dos frutos com cobertura foi superior à dos com cobertura.

Figura 8 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de fenólicos totais ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.



Para os morangos sem cobertura houve brusca perda de fenólicos totais ao longo do período de armazenamento. Entretanto, os morangos com revestimento também apresentaram redução do teor de compostos fenólicos ao longo do período de armazenamento, porém, esta redução foi menos acentuada quando comparada à dos morangos com revestimento.

A película pode controlar os fatores como umidade, oxigênio e luz, servindo como barreira aos micro-organismos presentes na atmosfera, impedindo o seu desenvolvimento no produto, garantindo, assim, a qualidade e a segurança do produto, além de prolongar a sua vida útil e minimizar as perdas por deterioração (CABRAL et al., 2004). Neste caso, a película protegeu contra degradação por esta ser barreira ao oxigênio, água e luz, sendo estes os principais fatores da degradação dos compostos bioativos.

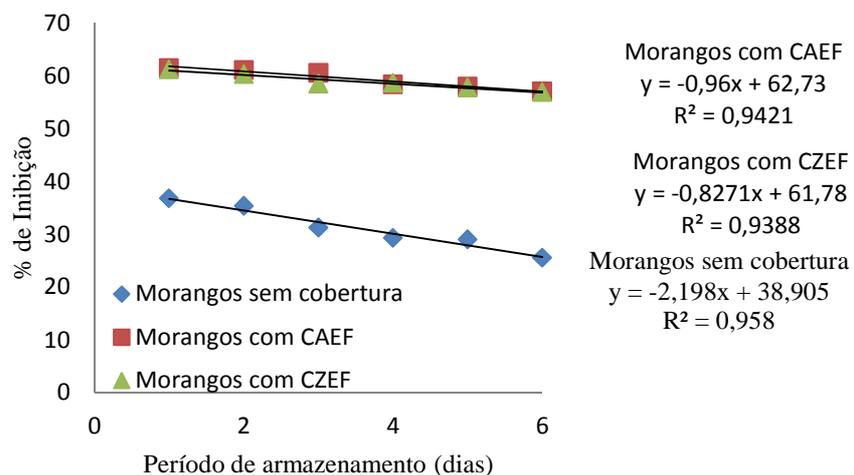
As concentrações de compostos fenólicos presentes na cobertura, possivelmente, foram degradando-se ao longo do período de armazenamento, mas estes ainda apresentaram concentração suficiente para fazer efeito nos morangos revestidos.

3.2.5 Atividade antioxidante

Para a atividade antioxidante foi observada significância entre a interação período de armazenamento e tratamento. Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão do fator período de armazenamento dentro dos tratamentos.

Os resultados obtidos na análise de regressão para a variável atividade antioxidante estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias da atividade antioxidante, expressa em % de inibição dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.



De acordo com Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005), os valores de atividade antioxidante são classificados como alto (inibição > 70%), intermediário (40-70% de inibição) e baixo (<40% de inibição). De acordo com esta classificação, os morangos que receberam coberturas contendo extrato fenólico de milho preto TO 002, além de apresentarem maior inibição, ainda conservaram-se como boas fontes de antioxidantes até o final do período de armazenamento estudado. Assim, à semelhança do teor de compostos fenólicos, a percentagem de inibição da capacidade antioxidante, apesar da diminuição ao longo do período de armazenamento, não foi tão acentuada para os morangos revestidos. Nos morangos não revestidos, percebeu-se, bruscamente, a perda da atividade antioxidante. Porém, ressaltamos o que foi relatado anteriormente, que a película protegeu a degradação dos compostos bioativos por esta ser barreira ao oxigênio, água e luz (CABRAL et al., 2004). Consequentemente, os morangos revestidos apresentaram menor perda da atividade antioxidante, quando comparados aos não revestidos.

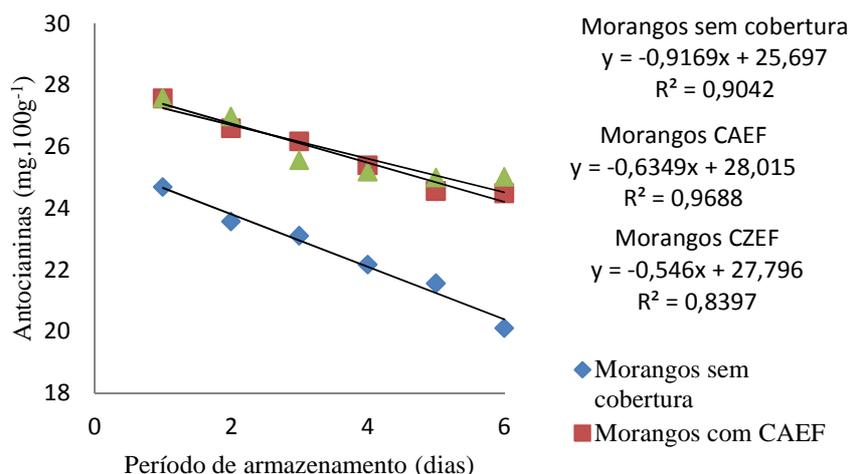
A característica antioxidante dos compostos fenólicos os torna susceptíveis à degradação por oxidação, que pode ser influenciada pela presença de oxigênio, luz, calor e íons metálicos (BRITTON, 1992; DAVEY, 2000).

3.2.6 Antocianinas

Quanto à variável antocianina, foi observada significância para a interação período de armazenamento x tratamento.

Os resultados obtidos na análise de antocianinas estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Representação gráfica, equação de regressão e coeficiente de determinação das médias de antocianinas ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) dos morangos sem cobertura, com CAEF e CZEF, em função do período de armazenamento (dias) refrigerado.



Diminuição na concentração de antocianinas foi registrada ao longo do período de armazenamento para os morangos com e sem presença de cobertura. Para todos os tratamentos foi verificada perda na concentração de antocianinas. Para os morangos revestidos com CAEF e CZEF houve variação de 27,56 a 24,49 e 27,58 a 25,02 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente.

Os morangos revestidos com CAEF e CZEF apresentaram maior concentração de antocianinas. Seguramente, isso ocorreu pelo fato de que, na extração de fenólicos do milho preto TO 002, utilizado para a preparação do extrato para aplicação na cobertura, antocianinas também foram extraídas.

As antocianinas são substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides. Além de estarem relacionadas com os atributos sensoriais das frutas, apresentam potencial atividade antioxidante. As antocianinas são de grande importância na avaliação da maturidade dos morangos, já que são responsáveis pela cor

vermelha do morango. A cor superficial do morango é, normalmente, o parâmetro utilizado como índice de maturidade na colheita (CORDENUNSI et al., 2002) e também aceitabilidade pelo consumidor.

4 CONCLUSÃO

O revestimento de morangos com coberturas de amido e zeína com adição de extrato fenólico de milho preto TO 002 aumenta a concentração de compostos bioativos nos mesmos.

A diminuição na concentração de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento ocorre em menor escala nos morangos revestidos com presença de compostos fenólicos dos extratos, quando comparados aos morangos sem revestimento, o que aumenta a vida útil dos morangos armazenados sob refrigeração.

REFERÊNCIAS

- ARUTSELVI, R. et al. Phytochemical screening and comparative study of anti-microbial activity of leaves and rhizomes of turmeric varieties. **Asin Journal of Plant Science and Research**, Coden, v. 2, n. 2, p. 212-219, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 18th ed. Gaithersburg, 2005. 1200 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012. 3000 p.
- AZEREDO, H. M. C. Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 21, p. 267-278, 2003.
- BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G. F. (Ed.). **Natural foods colorants**. New York: Blackie, 1992. p. 141-182.
- CANTILLANO, R. F. F. et al. Qualidade físico-química e sensorial de cultivares de morango durante o armazenamento refrigerado. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 76, p. 30, 2008.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2005. 783 p.
- CHIUMARELLI, M. **Avaliação da vida útil de manga (*Mangifera indica* cv 'Tommy Atkins') minimamente processada pré-tratada com ácido cítrico e coberturas comestíveis**. 2008. 122 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 90-103, 2008.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 83, p. 163-173, 2002.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. **Food Chemistry**, London, v. 83, p. 163-173, 2003.

DAVEY, M. W. Plant L-ascorbic acid: chemistry function metabolism bioavailability and effects of processing. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.

FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: Ed. UFLA, 2000. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

FLORES-CANTILLANO, R. F. (Ed.). **Morango: pós-colheita**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado; Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 28 p. (Frutas do Brasil, 42).

FONTES, L. C. B. **Uso de solução conservadora e de películas comestíveis em maçãs da cultivar Royal Gala minimamente processadas: efeito na fisiologia e na conservação**. 2005. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic, 1992. p. 181-207.

GARCÍA, J. M.; MEDINA, R. J.; OLÍAS, J. M. Quality of strawberries automatically packed in different plastic films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 6, p. 1037-1041, 1998.

GARCIA, L. C. **Aplicação de coberturas comestíveis em morangos minimamente processados**. 2006. 143 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

GEBHARDT, S. E.; THOMAS, R. G. **Nutritive value of foods**. Beltsville: USDA, 2002. 95 p.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Incorporation of antioxidante borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 92, p. 78-85, 2009.

- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, n. 1/2, p. 10-17, 1995.
- GRANDA-RESTREPO, D. M. et al. Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. **Food Research International**, Barking, v. 42, p. 1396-1402, 2009.
- HAN, C. et al. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria* \times *ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 67-78, 2004.
- HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 2928-2935, 2005.
- HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P. Utilização de biopolímeros na conservação pós colheita de morangos (*Fragaria ananassa* Duch) cv IAC Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 231-233, 1999.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. et al. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 2, p. 428-435, 2008.
- KADER, A. Quality and its maintenance in relation to postharvest physiology of strawberry. In: LUBY, A. (Ed.). **The strawberry into the 21st century**. Portland: Timber, 1991. p. 145-152.
- KANATT, S. R. et al. Active chitosan polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Hydrocolloids**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 290-297, Dec. 2012.
- KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable biopolymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.
- LOPES, M. M. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) durante o amadurecimento de clones de cajueiro anão-precoce. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 325-332, maio/jun. 2012.

MALGARIM, M. B.; CANTILLANO, R. F. F.; COUTINHO, E. F. Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 185-189, 2006.

MARTINS, J. Amigo da prensa. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 196, p. 42-43, ago. 2003.

MITCHAM, E. J.; CRISOSTO, C. H.; KADER, A. A. **Strawberry: recommendations for maintaining postharvest quality**. Davis: University of California, 2013. Disponível em: <<http://rics.ucdavis.edu/postharvest2/produce/ProduceFacts/Fruit/strawberry.shtml>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P. Pós-colheita de pêssegos (*Prunus pérsica* L. Bastsch) revestidos com biopolímeros a base de amido como alternativa à cera comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 28-33, 2003.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biopolímeros comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PANTELIDIS, G. E. et al. Antioxidant, capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, London, v. 102, p. 777-783, 2007.

PERKINS-VEAZIE, P. Growth and ripening of strawberry fruit. **Horticultural Reviews**, New York, v. 17, p. 267-297, 1995.

PÉROVAL, C. et al. Edible arabinoxylan-based films: 1., effects of lipid type on water vapor permeability, film structure and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3977-3983, 2002.

PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberry (*fragaria x ananassa* Duch). **Food Chemistry**, Oxford, v. 107, p. 1629-1635, 2008.

RIBEIRO, C. et al. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2007.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

ROBERTS, W.; GORDON, M. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1486-1493, 2003.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./mar. 2007.

RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba: EMATERPR, 1998. 206 p.

SILVA, E. O. et al. Segurança microbiológica em frutas e hortaliças minimamente processadas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 4.; SIMPÓSIO ÍBERO-AMERICANO DE VEGETAIS FRESCOS CORTADOS, 1., 2006, São Pedro. **Anais...** Piracicaba: USP/ESALQ; CYTED, 2006. 1 CD-ROM.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, N. de F. F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 4, p. 370-378, 2009.

SOTERO, A. P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **Jornal de Plásticos**, Campinas, v. 23, p. 13-16, ago. 2000.

SOUZA, V. R. **Compostos bioativos e o processamento de pequenas frutas vermelhas cultivadas em clima subtropical**. 2013. 196 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TABELA brasileira de composição de alimentos. 4. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2011. Disponível em:
<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>
. Acesso em: 4 mar. 2016.

TALBOT, M. T.; CHAU, K. U. **Precooling strawberries**. Tallahassee: Florida Cooperative Extension Service-IFAS; University of Florida, 1991. 83 p. (Circular, 942).

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*fragaria ananassa*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 199-208, 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Tabela de composição química de alimentos**. 2006. Disponível em:
<<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=2245>>. Acesso em: 4 mar. 2016.

US FDA/CFSSAN. **Approximate pH of foods and food products**. 2008. Disponível em:
<<http://www.foodscience.caes.uga.edu/extension/documents/fdaapproximatephofoodslacf-phs.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2016.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 140-146, 2000.

ZHENGGA, Y. et al. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. **Swiss Society of Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 40, p. 49-57, 2007.