

Antonio Humberto Boeing

**PERFIL POLIFENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
FARINHAS E POLENTAS DE VARIEDADES LOCAIS DE
MILHO CONSERVADAS *ON FARM* NO OESTE DE SANTA
CATARINA: POTENCIAL COMO NUTRACÊUTICO E
ALIMENTO FUNCIONAL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Agroecossistemas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Agroecossistemas
Orientador: Prof. Dr.^a Shirley Kuhnen

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boeing, Antonio Humberto
Perfil polifenólico e atividade antioxidante de farinhas e polentas de variedades locais de milho conservadas *on farm* no Oeste de Santa Catarina: potencial como nutracêutico e alimento funcional / Antonio Humberto Boeing; orientadora, Shirley Kuhnen - Florianópolis, SC, 2014.
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Inclui referências

1. Agroecossistemas. 2. Ácido ferúlico . 3. Fenólicos ligados. 4. Cereais integrais. 5. Segurança alimentar. I. Kuhnen, Shirley. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. III. Título.

Antonio Humberto Boeing

**PERFIL POLIFENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
FARINHAS E POLENTAS DE VARIEDADES LOCAIS DE
MILHO CONSERVADAS *ON FARM* NO OESTE DE SANTA
CATARINA: POTENCIAL COMO NUTRACÊUTICO E
ALIMENTO FUNCIONAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Agroecossistemas”, e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Florianópolis, 26 de outubro de 2014.

Prof. Ademir Antônio Cazella, Dr.
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas

Banca Examinadora:

Prof.^a Maria José Hötzel, Dr.^a
Presidente

Prof.^a Priscilla Maria Menel Lemos, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Juliana Bernardi Ogliari, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cibele Longo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus, pela vida.

À minha mãe Dulce, meu pai Serafim, meu padrasto Isírio e meus irmãos Alan, Fábio, Fabiana, Eduarda e Tiago, pelo apoio recebido.

Aos meus avós maternos Antônio e Carolina (*in memorian*), pelos ensinamentos e carinho. Além do agradecimento, tenho respeito, grande admiração e uma dívida imensurável com essas pessoas que contribuíram para eu me tornar uma pessoa melhor.

Aos meus avós paternos Huberto e Elisabeth (*in memorian*) e meus entes queridos que partiram durante este período de elaboração do trabalho, meus tios Roquelane e Lourivaldo Boeing e meu primo Gilmar (*in memorian*).

Aos meus tios Lourivaldo Heidemann, Marluci e Carmen pelo apoio recebido. Aos meus primos Gilmara e Ataíde, pelo carinho e amizade.

Aos demais familiares, tios, primos, sobrinhos e amigos, pelo apoio, carinho e amizade.

À minha noiva Simone Moreira, pelo amor, amizade, muita compreensão e pelos momentos felizes que passamos juntos. Agradeço também pelo apoio psicológico nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Professora Dra. Shirley Kuhnen, pela confiança, compreensão, amizade e ensinamentos proporcionados durante o curso de mestrado.

Aos professores Ademir, Luiz, Jucinei, Ylias, Renato e demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (PGA), pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório Integrado de Bioquímica e Morfofisiologia Animal (LABIMA), doutoranda Amanda, mestrandas Daline e Samira, aos demais alunos Jaqueline, Lauana, Bruno, Priscila, Jhônatan, Thiago, Bruna, Amábile e ao técnico de laboratório Lauro, pela ajuda na realização das análises laboratoriais, desenvolvimento do trabalho e pelo apoio e amizade.

Ao Professor PhD. Marcelo Maraschin, pelo apoio e auxílio na realização das análises laboratoriais no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV).

Ao Professor Dr. Rubens O. Nodari e a Dra. Sarah Z. Agapito Tenfen, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV).

Ao técnico de laboratório Jacó e ao aluno de mestrado Miguel, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ).

À Professora Dra. Juliana Bernardi Ogliari, pelo apoio e participação no projeto.

À Rudinei Stibuski, Adriano Canci, Rafael Vidal e demais alunos do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABIO), pela aquisição das sementes de milho.

À Dra. Cibele Longo, pela contribuição nas análises estatísticas.

À Prefeitura Municipal de São Bonifácio, em nome do Prefeito Laurino Peters, pelo apoio recebido durante a realização do mestrado.

Ao CNPq e FUMDES, pelo financiamento do projeto de pesquisa e concessão de bolsa de mestrado.

Aos colegas do curso de mestrado, pela amizade, companheirismo e construção do conhecimento.

À Marlene, secretária do PGA, pelo auxílio e amizade.

Ao PGA, por oferecer condições necessárias para o desenvolvimento do mestrado.

O acesso ao alimento nutricionalmente adequado e seguro é um direito de todo indivíduo.

(FAO/WHO, 1992)

É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal forma que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.

(Paulo Freire, 1996)

RESUMO

Introdução: Uma dieta saudável está baseada no consumo adequado de frutas, verduras e cereais integrais. Entre os cereais, o milho destaca-se por ser considerado uma boa fonte de ácido ferúlico. É amplamente utilizado para diversas preparações culinárias, a exemplo da polenta, que tem sido pouco estudada. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o perfil fenólico e a atividade antioxidante nas farinhas de variedades locais de milho, devido ao seu potencial de diversidade química, e avaliar os possíveis efeitos da preparação da polenta sobre o conteúdo daqueles compostos. **Métodos:** Grãos de 5 variedades locais foram resgatadas nos Municípios de Anchieta e Guaraciaba (Oeste de Santa Catarina) e uma variedade comercial foi utilizada para efeitos de comparação. As amostras foram moídas (60 mesh) e os compostos fenólicos livres (FL), esterificados (FE), glicosilados (FG), ligados liberados por hidrólise enzimática (HE) ou térmica (HT) foram extraídos. As farinhas das variedades Vermelho (76C), Mato Grosso Palha Branca (2109) e o milho comercial (P32R22) foram utilizadas para preparar as polentas. O teor de fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos ensaios “*Ferric Reducing Antioxidant Power*” (FRAP) e DPPH (2,2-difenil 1 picril hidrazil). A identificação dos compostos de interesse foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Resultados:** O conteúdo de fenólicos totais nas farinhas variou de 794,35 à 1.350,52 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG. Kg⁻¹), estando a maior parte deles ligados (76,92%). Entre as variedades, 76C e 2109 apresentaram maiores conteúdos de fenólicos. A análise das polentas evidenciou a liberação dos compostos fenólicos, com aumento médio de 129%. O maior conteúdo de fenólicos foi encontrado na polenta da variedade 76C. Com a preparação da polenta ocorreu um aumento da atividade antioxidante evidenciado por ambos os métodos (FRAP e DPPH). A maior atividade antioxidante total foi encontrada na farinha da variedade 76C, bem como na sua polenta. Os teores de fenólicos totais mostraram forte correlação positiva com a atividade antioxidante total, pelos métodos de FRAP ($r^2 = 0,903$, $P < 0,01$) e DPPH ($r^2 = 0,794$, $P < 0,05$). Entre os extratos, FL, FE e HT apresentaram correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante. Já FG mostrou correlação positiva somente para as polentas. A CLAE revelou o ácido ferúlico e seu derivado como compostos majoritários dos extratos HT e FL, respectivamente. A identificação dos fenólicos nos outros extratos não foi possível pela

ausência de padrões comerciais. No entanto, neste caso, foi observado composição química distinta entre as variedades. Similarmente, a análise dos perfis UV-vis via PCA revelou diferenças entre os extratos contendo os fenólicos solúveis e ligados e os ligados entre si. **Conclusão:** A variedade 76C apresentou maior potencial à produção de uma farinha e polenta diferenciada, pelo maior conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante. Ficou evidenciado também que o processo utilizado para preparar a polenta acarretou no aumento do teor de fenólicos e da atividade antioxidante total. Portanto, os resultados encontrados são importantes no âmbito da segurança alimentar, mostrando as farinhas de milho como nutracêuticos (fonte de fenólicos solúveis) e a polenta como alimento funcional, principalmente pelo conteúdo de ácido ferúlico, os quais tem sido associados à prevenção do câncer de cólon.

Palavras-chave: ácido ferúlico, fenólicos ligados, cereais integrais, segurança alimentar.

ABSTRACT

Introduction: A healthy diet is based on the adequate consumption of fruits, vegetables, and whole grains. Among the grains, corn stands out as a good source of ferulic acid. Corn is used for various culinary dishes, including polenta, which has been poorly studied. As such, the objective of the current study was to investigate the phenolic profile and antioxidant properties of flours produced from landraces of corn, based on their chemical properties, and evaluate the possible effects of polenta preparation on chemical composition. **Methods:** Grains of five landraces were collected from the Municipalities of Anchieta and Guaraciaba (Western Santa Catarina State, Brazil) and one commercial variety was used for comparison. Samples were ground (60-mesh) and the following phenolic compounds were extracted: free (FL), esterified (FE), glycosylated (FG), and bonds released using enzymatic hydrolysis (HE) or thermal hydrolysis (HT). Flours from the varieties Red (76C), Mato Grosso White Straw (2109) and commercial corn (P32R22) were used to prepare polenta. The content of phenolic acid was determined using the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant properties using 'Ferric Reducing Antioxidant Power' (FRAP) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The identification of the phenolic compounds was realized using High-performance Liquid Chromatography (HPLC). **Results:** The total phenolics content in flours ranged from 794.35 to 1350.52 mg of gallic acid equivalents (GAE.Kg⁻¹), with the majority being bound (76.92%). Of all tested varieties, 76C and 2109 presented the greatest content of phenolics. The analysis of the polenta showed a release of phenolic compounds with an average increase of 129%. The highest content of phenolics was found in polenta from variety 76C. The process of preparing polenta led to an increase in antioxidant activity demonstrated using both FRAP and DPPH. The greatest total antioxidant activity was found in flour from the 76C variety, as well as its polenta. The levels of total phenolics showed a strong positive correlation with total antioxidant activity, using FRAP ($r^2 = 0.903$, $P < 0.01$) and DPPH ($r^2 = 0.794$, $P < 0.05$). Among the extracted components, FL, FE, and HT showed a positive correlation between phenolic content and antioxidant activity. FG showed a positive correlation only for the polentas. The HPLC demonstrated ferulic acid and its derivatives as major compounds of the extracts HT and FL, respectively. The identification of phenolic acids in other extracts was not possible due to the absence of commercial standards. However, in this study the chemical composition was distinct between varieties.

Similarly, the analysis of UV-vis profiles using PCA showed differences between the extracts containing soluble and bound phenolics and between the bound phenolics. **Conclusion:** Variety 76C presented the greatest potential for the production of a distinct flour and polenta due to the higher content of phenolics and antioxidant activity. It was evident as well that the process used to prepare the polenta led to an increase in the level of phenolics and total antioxidant activity. Therefore, the results found in this study are important in the field of food security as it shows corn flour as a nutraceutical (a source of soluble phenolics) and polenta as a functional food, particularly because of the content of ferulic acid which is associated with the prevention of colon cancer.

Keywords: ferulic acid; bonded phenolic acid; whole grains; food security.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do grão do milho, destacando os seus principais componentes estruturais	35
Figura 2 – Representação das principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários	38
Figura 3 – Representação da estrutura da parede celular primária de vegetais e associação de seus componentes estruturais com os compostos fenólicos	41
Figura 4 - Mapa com a localização do município de Guaraciaba, localizado na região Oeste de Santa Catarina	47
Figura 5 – Grãos das variedades de milho em estudo	48
Figura 6 – Polentas das variedades de milho com maiores teores de fenólicos (Vermelho, Comercial e Mato Grosso Palha Branca)	49
Figura 7 – Representação esquemática do processo de extração dos compostos fenólicos para obtenção de diferentes frações	51
Figura 8 – Ensaio imunocromatográfico para a detecção de OGMs na farinha da variedade milho transgênico Pioneer	58
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) a partir do DNA extraído das farinhas dos grãos de variedades locais de milho	59
Figura 10 – Perfil espectral UV-visível (200 - 700 nm) dos extratos contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados liberados por hidrólise enzimática e térmica	61
Figura 11 – Análise dos Componentes Principais (PCA) dos perfis espectrais UV-visível (200 - 380 nm) da varredura espectrofotométrica dos extratos metanólicos das farinhas de grãos integrais das variedades de milho e suas respectivas polentas	63
Figura 12 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 dos perfis espectrais UV-visível (200 - 380 nm) da varredura espectrofotométrica dos extratos metanólicos das farinhas de grãos integrais das variedades de milho e suas respectivas polentas	65
Figura 13 – Conteúdo médio de compostos fenólicos totais nas farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial	67
Figura 14 – Conteúdo médio de compostos fenólicos totais encontrado nas farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial e de suas respectivas polentas	70
Figura 15 – Atividade antioxidante das farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial determinada pelo método do DPPH	74

Figura 16 – Atividade antioxidante nas amostras de farinhas de grãos integrais e polentas das variedades locais e do milho comercial determinada pelo método do DPPH	76
Figura 17 – Atividade antioxidante determinada pelo ensaio de FRAP das farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial	78
Figura 18 – Atividade antioxidante determinada pelo ensaio de FRAP das farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial	80
Figura 19 – Conteúdo médio de compostos fenólicos totais nas farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	85
Figura 20 – Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos ligados (extrato térmico) da variedade de milho 657A, determinado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos diferentes componentes dos grãos de milho	36
Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos e seus esqueletos básicos .	39
Tabela 3 – Principais ácidos fenólicos e antocianinas encontrados nos grãos de milho	40
Tabela 4 – Porcentagem de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados (hidrólises enzimática e térmica) nas farinhas de milho em estudo	68
Tabela 5 – Conteúdo médio de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados nas farinhas das variedades locais e comercial de milho do Oeste de Santa Catarina	69
Tabela 6 – Conteúdo médio de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados nas farinhas e polentas das variedades locais de milho, do Oeste de Santa Catarina, e do comercial	72
Tabela 7 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, representada pela % de inibição do radical DPPH	75
Tabela 8 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho e polentas contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, representada pela % inibição do radical DPPH	77
Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, determinado pelo ensaio de FRAP	79
Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho e polentas contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, determinado pelo ensaio de FRAP	81
Tabela 11 – Correlações lineares entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante determinada pelos métodos de DPPH e FRAP encontrados nos diferentes extratos contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados das farinhas de grãos integrais e das polentas	83
Tabela 12- Conteúdo médio (mg de equivalentes de ácido ferúlico.kg-1) do ácido ferúlico e seu derivado encontrados nos extratos livre e térmico, respectivamente, das farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinados via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	87

Tabela 13 – Conteúdo médio do ácido ferúlico e seu derivado encontrados nos extratos livre e térmico, respectivamente, das farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinados via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – Análise de Variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CCA – Centro de Ciências Agrárias
- CFT – Compostos Fenólicos Totais
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*
- IFL - Imunoensaio de Fluxo Lateral
- LAGROBIO - Laboratório de Pesquisas em Agrobiodiversidade
- NEABIO – Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade
- OGMs - Organismos Geneticamente Modificados
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PCA – *Principal Component Analysis*
- PCR - *Polymerase Chain Reaction*
- TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
- TPC – *Total Phenolic Content*
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 MILHO	29
2.1.1 Variedades locais de milho	31
2.1.2 Composição química do milho	34
2.2 FITONUTRIENTES	37
2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS	42
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 VARIEDADES DE MILHO	47
4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	48
4.3 ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO DAS FARINHAS POR GENES TRANSGÊNICOS	48
4.4 PREPARAÇÃO DA POLENTA	49
4.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	49
4.6 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	52
4.6.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT)	52
4.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1 ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO POR GENES TRANSGÊNICOS	57
6.2 PERFIL ESPECTRAL UV-VISÍVEL	59
6.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	66
6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	73
6.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) ..	84
7 CONCLUSÕES	91
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

Uma dieta saudável e equilibrada se baseia no consumo adequado de frutas e verduras. Mais recentemente, o interesse voltou-se também para o consumo de grãos integrais e em especial de cereais integrais, os quais têm sido amplamente utilizados como alimentos funcionais e nutracêuticos, possuindo características de interesse à nutrição humana. Estes são considerados boas fontes de fibra dietética, proteína, energia, minerais, vitaminas e outros fitoquímicos (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). O milho, por exemplo, é importante fonte de ácidos fenólicos tais como os ácidos ferúlico, p-cumárico e seus derivados (CABRERA-SOTO et al., 2009).

O ácido ferúlico, composto fenólico predominante nos grãos de milho (CHIREMBA et al., 2012), possui potente atividade antioxidante (HOLGUÍN-ACUÑA et al., 2008). As frutas e verduras, por sua vez, apesar de ricas em fenólicos, são escassas em ácido ferúlico. Desse modo, tem-se recomendado utilizar o milho e demais cereais integrais para complementar a dieta humana (ZHAO & MOGHADASIAN, 2008).

Em conjunto, atribui-se aos compostos fenólicos diversos efeitos benéficos à saúde humana, tais como a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, alguns tipos de câncer, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias. Por atuarem como antioxidantes, são responsáveis pela eliminação de radicais livres, atuam como quelantes de minerais e inibidores da peroxidação lipídica, principalmente de proteínas de baixa densidade (LDL-c), como também auxiliam na redução da agregação plaquetária (FARDET et al., 2008; HARBORNE, 1988; KIM et al., 2007; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

O milho é um importante cereal cultivado em várias regiões do mundo. Embora tenha grande importância na alimentação animal, sendo utilizado como silagem ou na formulação de rações, na alimentação humana é consumido após processo térmico, do qual são desenvolvidos diversos derivados, como pães, bolos, cremes, canjicas, pipocas, tortilhas, chips, tacos e polentas. Sua importância se deve também ao elevado valor econômico, potencial produtivo, composição química e valor nutritivo (GOODMAN, 1987; LAGO et al., 2014; LOPEZ-MARTINEZ, 2009).

Em algumas regiões do mundo, ainda se tem a tradição do cultivo de sementes locais de milho. Por definição, as sementes de milho cultivadas por várias gerações, com características peculiares, alta

diversidade genética e fácil adaptabilidade a diferentes condições ambientais são denominadas de variedades locais ou crioulas (*landraces*). Essas variedades possuem grande importância para os agroecossistemas locais, pois o seu cultivo contínuo proporciona uma melhor adaptabilidade da planta às condições ambientais desfavoráveis, possibilitando a redução do uso de defensivos agrícolas. Além disso, os agricultores familiares que as mantêm possuem autonomia na produção de sementes, não ficando dependentes de empresas fornecedoras de sementes comerciais (MENEGUETTI et al., 2002; ZEVEN, 1998). Além disso, o manejo de sementes de variedades locais de milho possui estreita relação com os processos sociais, como por exemplo, na troca de sementes entre agricultores e na própria relação de gênero e divisão de tarefas da família dentro da propriedade (REBOLLAR; MILLER; CARMO, 2010).

Na região Oeste do estado de Santa Catarina, principalmente nos municípios de Anchieta, Guaraciaba e Novo Horizonte, o milho constitui uma cultura de extrema importância na manutenção da propriedade e na alimentação dos agricultores. Essa região é caracterizada em sua maioria por agricultores familiares e pequenas propriedades, os quais cultivam e selecionam suas sementes de milho, fazendo com que as diferentes variedades estejam em processo contínuo de evolução e adaptação às condições ambientais do local (OGLIARI; KIST; CANCI, 2013). Diversos estudos tem se dedicado ao estudo das características das variedades locais de milho e seus derivados em diferentes regiões do mundo, inclusive no Oeste Catarinense, visando identificar características de interesse à alimentação humana ou de usos específicos na indústria de alimentos (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014; FUMI et al., 2011; GONZÁLEZ- MUÑOZ et al., 2013; KUHNEN et al., 2011; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2011; MÉNDEZ et al., 2013).

No presente estudo, além de comparar os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante entre farinhas de variedades locais de milho, foi investigado o efeito da preparação de polenta, um alimento consumido por diferentes populações locais, sobre os teores e estabilidade daqueles compostos. É sabido que o cozimento pode induzir alterações na composição química dos alimentos, influenciando na concentração e biodisponibilidade de seus constituintes. Apesar disso, existem dados controversos sobre a biodisponibilidade de compostos antioxidantes após o processamento de alimentos, sendo fundamental a avaliação do processo utilizado durante a sua preparação, simulando condições reais (IOANNOU et al., 2012).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo comparar o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante de farinhas de grãos integrais de variedades locais de milho e o efeito do cozimento para a elaboração da polenta, um prato típico de algumas regiões do Sul do Brasil. É importante destacar que a presente proposta é parte integrante do projeto “Estratégias Integradas de Manejo, Uso e Conservação da Diversidade de Variedades Locais de Milho-comum e Milho-pipoca Conservadas por Agricultores Familiares do Oeste de SC e Centro Oeste do PR” coordenado pelo Núcleo de Agrobiodiversidade do CCA (NEABIO) que tem como objetivo elaborar um Plano Integrado e Participativo de Conservação *in situ-on farm* e *ex situ* para variedades locais, crioulas e tradicionais de milho-comum e milho-pipoca, mantidas por agricultores do Oeste de Santa Catarina e Sudoeste do Paraná. Os resultados encontrados poderão fornecer subsídios para seleção de variedades a serem mantidas em bancos comunitários de sementes e com potencial à produção de uma farinha diferenciada, com maior conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante visando a sua utilização como nutracêutico e alimento de origem local (polenta), com status de alimento funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO

A América Central é considerada o centro de origem do milho (*Zea mays*) (HALLAUER, 2001). Os mais antigos vestígios foram encontrados à 7000 anos no vale de Teotihuacan, no México. Embora não possa ser descartada a existência de uma forma extinta de milho, diversos autores, baseando-se em evidências genéticas e morfológicas, sustentam a hipótese, de que o homem tenha praticado durante vários anos a domesticação do teosinto, que resultou no surgimento de formas ancestrais do milho (BENZ, 2001; DOEBLEY & STEC, 1991; DORWEILER et al., 1993; GALINAT, 1977; MATSUOKA et al., 2003; STALLER, 2009).

Na América Central, o milho teve grande importância para as civilizações Maias e Astecas, desempenhando importante papel em suas crenças religiosas, festas e também na nutrição de suas populações. As principais variedades de milho conhecidas atualmente já eram produzidas por essas populações nativas quando o continente americano foi descoberto (FAO, 1992). Após o processo de domesticação, esta espécie difundiu-se inicialmente por toda a América Central e posteriormente para a América do Sul. Agricultores tradicionais e populações indígenas, ainda nos dias de hoje, mantém a tradição de cultivar suas próprias sementes, contribuindo para a conservação da espécie (FREITAS et al., 2003; OGLIARI et al., 2013; VOGT et al., 2009).

Atualmente, o milho é um importante cereal cultivado em várias regiões do mundo. É uma planta que possui grande adaptação às condições extremas de clima e altitude, produzido em diversas regiões do mundo, sendo colhido em algum lugar todos os meses do ano. A planta cresce desde regiões do Hemisfério Norte (Canadá e Rússia) até regiões extremas do Hemisfério Sul. É cultivado desde regiões abaixo do nível do mar até altitudes acima de 4.000 metros, como nos Andes peruanos (MANGELSDORF & REEVES, 1939).

A produção mundial em 2012 foi de 872,07 milhões de toneladas, sendo o 2º produto agrícola mais cultivado. O Brasil é o 3º produtor de milho, tendo no mesmo período produzido 71,07 milhões de toneladas (FAO, 2014). Já Santa Catarina é o 8º produtor nacional de milho, com o total de 2,87 milhões de toneladas produzidas em 2012, estando grande parte de sua produção concentrada na região oeste do estado (IBGE, 2013).

A maior parte do milho cultivado em Santa Catarina é utilizada como silagem para a alimentação de bovinos e os seus grãos são componentes essenciais na formulação de rações tanto para bovinos, como para aves e suínos. Na cidade de Anchieta, no Oeste Catarinense, onde há o predomínio do cultivo de variedades locais de milho, o mesmo é utilizado em sua maioria na forma de grãos (33%) e silagem (24%) para a alimentação do gado proveniente de pecuária leiteira (VOGT et al., 2009).

Apesar deste cenário, o milho é também amplamente utilizado para a alimentação humana, sendo considerado o cereal base da alimentação dos povos das Américas Central e do Sul. Na indústria alimentícia possui grande importância, sendo os principais produtos finais derivados de milho, o amido, a farinha e o óleo. O amido e seus derivados são utilizados como componentes básicos de diversos produtos, como por exemplo, biscoitos, pó para pudins, fermentos em pó, bolos, balas de goma, geleias, dentre outros, como também adicionados em quantidades pequenas em diversos produtos com a finalidade de melhorar a consistência (espessantes) e conservação (conservantes). Produtos derivados de hidrólise, como o xarope de glucose é utilizado na fabricação de balas, frutas cristalizadas, biscoitos, xaropes, sorvetes e cervejas. Já a maltodextrina, é utilizada em aromas, essências, sopas desidratadas, complexos vitamínicos e achocolatados. O corante caramelo extraído do milho é utilizado na fabricação de refrigerantes, bebidas alcólicas e molhos (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003; UDRY & DUARTE, 2000).

O preparo caseiro do milho merece destaque, principalmente a tradição que alguns povos têm em consumir pratos típicos derivados de milho. No Brasil, o milho verde em espiga é consumido cozido, e em outras preparações típicas como pamonha, pipoca, cuscuz, broa, angu, sopa, pães, bolos, farofa, creme, canjica e polenta (UDRY & DUARTE, 2000). No México, o milho é comumente utilizado para fazer tortilhas, chips e tacos após o processo denominado de nixtamalização, que consiste no cozimento dos grãos em uma solução alcalina (AGUAYO-ROJAS et al., 2012; GOODMAN, 1987). No Peru, a água proveniente do cozimento de variedades de milho de coloração escura, é utilizada para o preparo de bebida típica denominada de Chicha Morada (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

A polenta, uma preparação culinária popular da região norte da Itália, foi introduzida na alimentação brasileira pelos colonizadores italianos, principalmente na região sul do Brasil. O preparo da polenta consiste em um lento processo de cozimento da farinha de milho com

água e sal, por até 1 hora. Segundo a TACO (2011) (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), a polenta possui a cada 100 g, 23,3 g de carboidratos, 2,3 g de proteínas, 0,3 g de lipídeos, 2,4 g de fibras alimentares e 1,4 g de cinzas. O teor de umidade é de 72,7% e os minerais são o fósforo (17 mg), potássio (100 mg), sódio (442 mg), magnésio (4 mg), cálcio (1 mg), zinco (0,1 mg) e cobre (0,04 mg). A principal vitamina é a B₁ (0,04 µg). Recentemente, pesquisadores italianos desenvolveram uma variedade de milho pigmentada, com o objetivo de preparar uma polenta rica em compostos antioxidantes visando o desenvolvimento de um alimento funcional (LAGO et al., 2014). Neste estudo, os autores estudaram o efeito da preparação da polenta sobre o conteúdo e estabilidade das antocianinas, pigmentos responsáveis pela coloração dos grãos de milho. No entanto, são escassos na literatura estudos sobre a composição fenólica e a atividade antioxidante da polenta, apesar da sua associação com os principais efeitos benéficos à saúde humana.

2.1.1 Variedades locais de milho

As variedades locais, tradicionais ou crioulas de milho têm sido cultivadas, ao longo dos anos, por agricultores familiares ou comunidades tradicionais, resultando em uma grande diversidade de genótipos. Na região Oeste catarinense, onde a agricultura está baseada na unidade de produção familiar, o cultivo de milho representa, em muitos casos, a principal atividade agrícola (CAMPOS, 2007; SHIVA, 2001). Muitos agricultores dessa região mantém a tradição de cultivar variedades locais de milho, as quais são utilizadas em sua maioria, nas próprias propriedades (OGLIARI et al., 2013). Vogt et al. (2009), verificaram que 60% dos agricultores da cidade de Anchieta (importante município produtor de variedades locais de milho do Oeste catarinense) produziam as variedades locais em áreas menores de 2 ha e que 90% as utilizavam para o autoconsumo.

É importante destacar que no presente trabalho, os termos variedades tradicionais, crioulas e locais serão utilizados como sinônimos, conforme definido na Legislação Brasileira. A Lei 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Mudas e Sementes, define variedades tradicionais, crioulas e locais como: “variedade desenvolvida, adaptada ou produzida por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, com características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do MAPA, considerados

também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizam como substancialmente semelhantes às cultivares comerciais” (BRASIL, 2003). No entanto, é importante considerar que para alguns autores há diferenças entre estes termos. Thurston et al. (1999), por exemplo, define variedade tradicional como populações ou raças que obtiveram adaptação ao meio devido às condições ambientais ou pela seleção humana e aquela cultivada em um mesmo agroecossistema por no mínimo três gerações seguidas. Já Hardon & Boef (1993), definem variedade local como populações que estão sob o contínuo manejo dos agricultores a partir de ciclos dinâmicos de cultivo e seleção, sendo necessário no mínimo cinco ciclos de cultivo para que possam ser assim chamadas. Por outro lado, Shiva (2001) entende que a variedade crioula tem sido utilizada para designar aquelas sementes que tiveram o seu melhoramento genético limitado a intervenção manual humana, sem interferência de métodos tecnológicos.

A importância do cultivo de variedades locais para os agricultores familiares está em proporcionar a capacidade de gerenciamento e conservação da biodiversidade à nível local, com ênfase na diversidade dos recursos genéticos vegetais, proporcionando o aumento do poder na tomada de decisões da comunidade, além de garantir o acesso e controle de seus recursos biológicos e genéticos (CANCI et al., 2002). O melhor aproveitamento dos recursos genéticos vegetais contribui para o apoderamento dos agricultores, seja na conservação das espécies ou na gestão da exploração desses recursos que é fundamental para a conservação do ecossistema. Dessa maneira, a conservação das variedades locais contribuem para a segurança alimentar e a sustentabilidade do sistema de produção (BOEF et al., 2013).

Com o objetivo de alcançar a sustentabilidade, é necessário dar ênfase à agricultura de base ecológica, a qual é baseada no (re)estabelecimento da reciclagem de nutrientes, na utilização de energia de fontes renováveis, na substituição de insumos, no manejo de pragas e doenças, no respeito às limitações físicas da propriedade, na adaptação do potencial genético e biológico das plantas e animais, no estímulo da conservação do solo, água, energia e demais recursos naturais e na incorporação da ideia de sustentabilidade à longo prazo, o qual auxilia no planejamento do agroecossistema. A aplicação destes princípios visa obter um sinergismo entre eles, contribuindo para a sustentabilidade do sistema. Embora se possa dar mais ênfase à alguns dos princípios, a adoção de todos é fundamental para que se alcance uma agricultura de base ecológica (GLIESMANN, 1998). A agroecologia vai além do tipo de cultivo ou manejo empregado na produção agrícola, pois possui um

enfoque amplo, baseado na conservação do meio ambiente (ALTIERI, 1999).

Nesse contexto de promoção do desenvolvimento sustentável, foi desenvolvido um projeto de conservação e produção de variedades locais no município de Guaraciaba, tendo como objetivo melhorar a qualidade nutricional, reduzir o uso de defensivos agrícolas, fortalecer a segurança alimentar e promover o desenvolvimento sustentável. Em 2004, agricultores da região demonstraram interesse em revitalizar o hábito de cultivar sementes de variedades locais de alimentos para sua subsistência. No ano seguinte, os agricultores já participavam de cursos de formação, onde foram demonstradas práticas exitosas. A partir desse momento, decidiram adotar o cultivo de variedades locais como estratégia para fortalecer a soberania alimentar. Diversos atores estavam envolvidos no projeto, como por exemplo, universidades, órgãos do governo, associações locais e membros da comunidade. Durante a implantação do projeto, os agricultores recebiam sementes de diferentes culturas e variedades locais, denominado “kit diversidade”. O projeto foi desenvolvido em diferentes etapas, as quais puderam ser avaliadas e obtiveram resultados satisfatórios, no que diz respeito à redução dos custos dos alimentos utilizados como meio de subsistência, melhoria da qualidade do alimento produzido e importante ferramenta para a recuperação da soberania alimentar (CANCI et al., 2013).

Nesse contexto, no final da década de 90 e início de 2000 observava-se que os agricultores familiares na região do extremo Oeste catarinense, em particular nos municípios de Anchieta, Guaraciaba e Novo Horizonte, resistiam à introdução de sementes híbridas/transgênicas de grandes empresas, as quais proporcionavam grande dano ambiental, difícil de ser mensurado. De uma maneira geral, o milho era cultivado em pequenas áreas, utilizando pouca tecnologia, poucos insumos externos e 90% da produção era consumida dentro da propriedade, utilizada na alimentação humana e animal, sendo comercializado somente o excedente, que em muitos casos era utilizado para a troca de sementes entre agricultores (CAMPOS, 2007; ALVES et al., 2004). No entanto, apesar deles ainda manterem a tradição de cultivar diversos genótipos, estudos recentes mostraram que o milho transgênico passou a ser amplamente cultivado em todo o país, inclusive na região Oeste Catarinense. Costa (2013) identificou no município de Anchieta diversos estabelecimentos que cultivavam na mesma propriedade variedades locais e transgênicas. Também identificou que a proporção de área plantada de milho transgênico foi superior às variedades locais, o que poderia aumentar o risco de contaminação por

fluxo gênico, devido a quantidade produzida de pólen estar diretamente relacionada a proporção da área de cultivo e número de plantas.

A contaminação por transgênicos é um problema real e pode causar danos irreparáveis ao meio ambiente, provocando a redução da diversidade genética. Variedades locais de milho cultivadas e adaptadas durante dezenas e até centenas de anos poderão desaparecer com a expansão do cultivo de plantas geneticamente modificadas. As consequências embora imprevisíveis, poderão causar alterações metabólicas que acarretem na diminuição da adaptação das variedades locais à variações climáticas ou aos diferentes ecossistemas (DOEBLEY, 1990; NODARI & GUERRA, 2001). A diversidade química entre os genótipos existentes naquela região foi verificada por alguns autores, demonstrando a importância da sua conservação (COSTA, 2013; LEMOS, 2010; KUHNEN et al., 2011). Apesar disso, sementes daquelas variedades não foram conservadas *ex situ* (conservação de componentes da diversidade biológica fora de seu *habitat* natural), e hoje encontram-se ameaçadas.

2.1.2 Composição química do milho

A qualidade nutricional do milho está associada a composição química de suas sementes. Os grãos são constituídos pelo endosperma, gérmen, pericarpo e pedicelo (ponta) (Figura 1), representando 82%, 11%, 5% e 2% do peso seco, respectivamente. O endosperma contém um nível elevado de amido (80 à 90%), 8% de proteínas e baixo conteúdo de lipídios. O gérmen é caracterizado por seu elevado teor de lipídios (43,2%) e um conteúdo médio de proteínas (18,4%), com elevado valor nutricional. O pericarpo é a camada externa do grão, o qual possui função estrutural e de proteção, sendo constituído basicamente por fibras, tais como hemicelulose (67%), celulose (23%) e lignina (0,1%). O pedicelo é o menor componente, a qual possui função estrutural e é formado basicamente de celulose e lignina (BOYER & HANNAH, 2001; DOMBRINK-KURTZMAN & BIETZ, 1993).

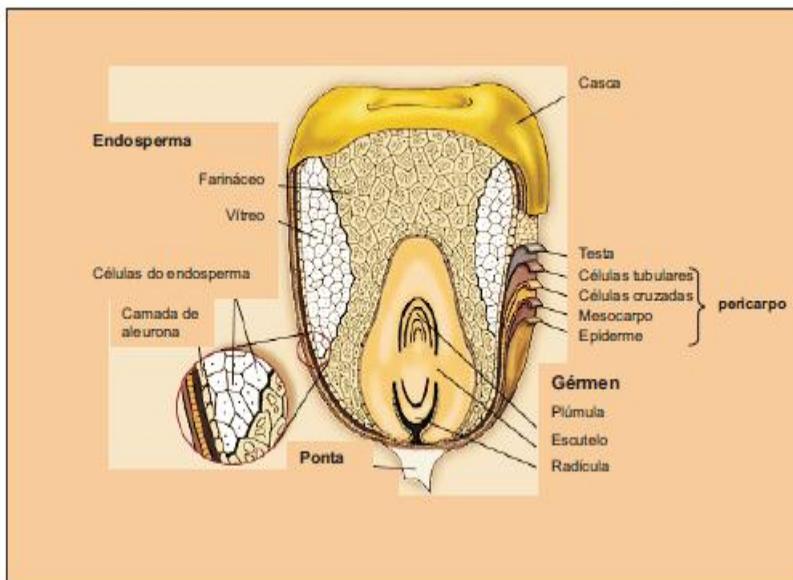


Figura 1 – Representação esquemática do grão do milho, destacando os seus principais componentes estruturais. **Fonte:** BRASIL, 2006.

Os grãos de milho possuem características distintas de textura e aspecto em decorrência da sua composição química. De acordo com essas características são classificados em amiláceo, opaco, ou farinhoso (*floury*), dentado (*dent*), duro, translúcido ou cristalino (*flint*), pipoca (*popcorn*), doce (*sweet*) e ceroso (*waxy*) (DOMBRINK-KURTZMAN & BIETZ, 1993).

De uma maneira geral, a maior parte do grão de milho é constituída por carboidratos, com o amido representando mais de 70% do total dos nutrientes. As proteínas são denominadas de prolaminas (52%), glutelinas (25%), albuminas (7%) e globulinas (5%). As prolaminas, que representam a principal classe de proteínas são conhecidas como zeínas, as quais contêm importantes aminoácidos como a glutamina, prolina, leucina e alanina. Além disso, os grãos de milho contêm em média 4,4% de lipídeos, podendo haver grande variabilidade entre os diferentes genótipos. O triacilglicerol é o principal componente lipídico. Dentre os ácidos graxos, destacam-se o ácido linoleico (19 à 71%) e o ácido oleico (14 à 64%), também sendo encontrados o ácido palmítico (12%) e o ácido esteárico (2%). A

composição química constituinte das diferentes estruturas do grão de milho está descrita na Tabela 1 (BOYER & HANNAH, 2001).

Tabela 1 – Composição química dos diferentes componentes dos grãos de milho (% de matéria seca).

Estruturas	% grão	Amido	Lipídeos	Proteínas	Minerais	Açúcares	Fibras
				% da parte (base seca)			
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	
Gérmen	11	1,3	82,6	26	78,4	69,3	12
Pericarpa	5	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1	0,8	7

Fonte: Adaptado de WATSON, 2005.

No Brasil, a TACO é utilizada como referência para a consulta da composição química dos alimentos. Segundo a TACO (2011), o milho possui a cada 100 g de farinha, 79,1g de carboidratos, 7,2 g de proteínas, 1,5 g de lipídeos, 5,5 g de fibras alimentares e 0,5 g de cinzas. O teor de umidade é de 11,8% e os minerais identificados são o fósforo (84 mg), potássio (58 mg), sódio (45 mg), magnésio (31 mg), ferro (2,3 mg), cálcio (1 mg), zinco (0,6 mg) e cobre (0,27 mg). As principais vitaminas identificadas são as vitaminas A (18 µg), B₁ (0,25 µg) e B₆ (0,25 µg).

O valor nutricional do milho se assemelha a outros grãos de cereais, como o trigo e arroz. No entanto, uma dieta à base de milho deve ser complementada com leguminosas (feijão, lentilha, grão-de-bico, entre outros), leite e derivados, soja e derivados e sementes e folhas de amaranto. O objetivo dessa complementação é adequar o consumo de quantidade suficiente de proteínas e aminoácidos essenciais. A combinação desse cereal com leguminosas, por exemplo, justifica-se pelo fato de que o milho é deficiente em lisina e triptofano. Por outro lado, possui quantidades significativas de metionina e cistina, enquanto as leguminosas são fonte de lisina e triptofano, porém deficientes em metionina e cistina. Dessa forma, a combinação entre aqueles alimentos torna-se completa na recomendação de aminoácidos essenciais (FAO, 1992).

O milho constitui ainda uma importante fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas do complexo B (tiamina, ácido fólico, piridoxina), vitamina E, minerais e fitoquímicos, incluindo lignanas, ácidos fenólicos, carotenoides (luteína e zeaxantina), esteróis e saponinas, os

quais exercem atividades biológicas diversas (GLISZCZYNSKA-SWIGLO, 2006; OBOH; ADEMILUYI; AKINDAHUNSI, 2010).

2.2 FITONUTRIENTES

As plantas produzem milhares de fitonutrientes diferentes, também designados de metabólitos secundários. O papel exato desses metabólitos permanece, ainda em grande parte, desconhecido. Estes são sintetizados e armazenados através de complexas vias biossintéticas, altamente reguladas, localizadas em diversos compartimentos celulares. Aparentemente parte das vias de biossíntese dos metabólitos secundários não estão totalmente ativas, existindo enzimas ocultas sem qualquer substrato endógeno aparente ou função. A produção desses metabólitos (enzimas e coenzimas) não está diretamente ligada com a manutenção da vida do organismo, porém proporciona vantagens para sobrevivência e manutenção da espécie no ecossistema (LEWINSOHN & GIJZEN, 2009; SIMÕES et al., 2010).

Esses compostos conferem sabor, aroma e tem sido utilizados como fitonutrientes, no desenvolvimento de alimentos funcionais e na formulação de medicamentos pela indústria farmacêutica, devido à seus efeitos terapêuticos. Nas plantas, esses compostos são importantes para auxiliar na proteção contra bactérias, fungos, predadores e adaptação ao clima, além de servirem como moléculas de sinalização para atração de polinizadores, dispersores de sementes e interação com parasitas (LEWINSOHN & GIJZEN, 2009).

A síntese dos metabólitos secundários é resultado de interações entre os processos de biossíntese, transporte, estocagem e degradação de nutrientes. É sabido que algumas dessas vias são ativadas em determinados estágios de crescimento e desenvolvimento ou em situações de estresse causada por condições ambientais desfavoráveis ou em resposta ao ataque de organismos invasores (WINK, 1990).

A origem dos metabólitos secundários é dependente do metabolismo da glicose, podendo ocorrer pela via do Ácido Chiquímico ou pela via do Mevalonato, os quais são responsáveis pela produção de uma grande diversidade de compostos químicos (Figura 2).

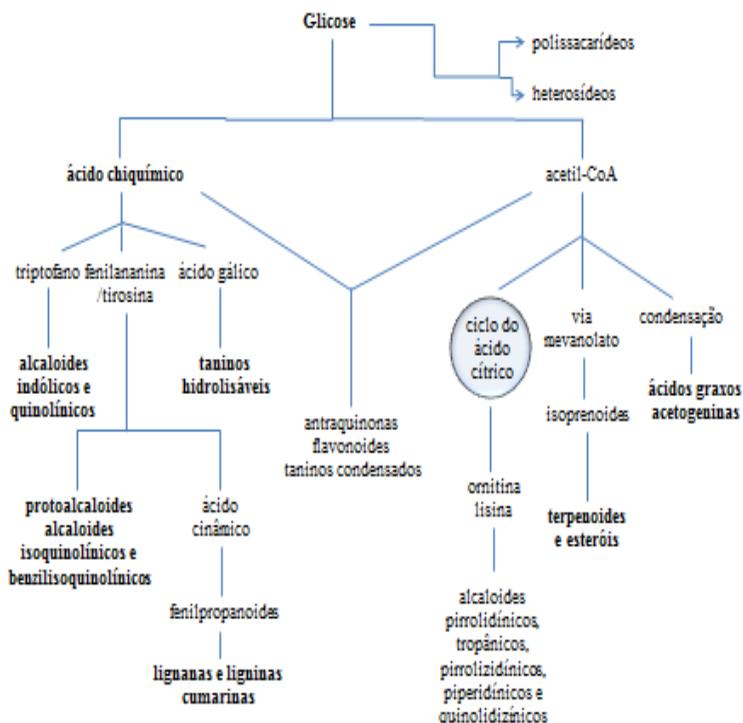


Figura 2 – Representação das principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários. **Fonte:** SIMÕES et al., 2010.

Os principais metabólitos secundários são os compostos fenólicos, terpenos ou isoprenoides, alcaloides e glicosinolatos (AHARONI & GALILI, 2010). Os compostos fenólicos são um grupo de moléculas que apresentam em sua estrutura química pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Apresentam estrutura química bastante diversa e são classificados de acordo com a sua cadeia constituinte de átomos de carbono ligada ao anel aromático (C_6) (Tabela 2) (MANACH et al., 2004; SIMÕES et al., 2010).

Tabela 2 – Classes de compostos fenólicos e seus esqueletos básicos.

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C_6	Fenóis simples, benzoquinonas
C_6-C_1	Ácidos fenólicos
C_6-C_2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos
	Fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos, antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides e isoflavonoides
$(C_6-C_3)_2$	Lignanais
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Diflavonoides
$(C_6)_n$	Melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

Fonte: SIMÕES et al., 2010.

Nas plantas, os compostos fenólicos possuem diversas funções, como por exemplo, proteção contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores, coloração, proteção contra a ação prejudicial dos raios ultra-violeta, auxílio na fertilidade e germinação do pólen, crescimento das plantas e atividade enzimática (HARBORNE, 1986; HARBORNE, 1988; FORKMANN & MARTENS, 2001). Na alimentação humana, os compostos fenólicos podem conferir características aos alimentos, como por exemplo, sabor, cor, aroma, odor, adstringência e estabilidade oxidativa (ÂNGELO & JORGE, 2007).

A maioria das propriedades benéficas das frutas, verduras e cereais têm sido atribuídas aos metabólitos secundários. Os compostos fenólicos são amplamente estudados, devido à sua atividade antioxidante, no controle dos radicais livres, como agentes quelantes de minerais e inibidores da peroxidação lipídica, principalmente de proteínas de baixa densidade (LDL-c), como também auxiliando na redução da agregação plaquetária (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014; KIM et al., 2007; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

Nos grãos de milho, já foram relatados diversos compostos fenólicos, como os ácidos ferúlico, p-cumárico, protocatecuico, sinápico, vanílico e gálico, além de antocianinas tais como cianidina,

pelargonidina, peonidina, luteolinidina e malvidina (Tabela 3) (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; MONTILLA et al., 2011; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Os compostos fenólicos são encontrados em sua maioria no pericarpo (ligados a parede celular) e na camada denominada de aleurona. Devido à concentração elevada de ácidos fenólicos nas paredes celulares do pericarpo e aleurona, estes compostos podem afetar as propriedades estruturais dos grãos, como na sua dureza (CHIREMBA et al., 2012).

Tabela 3 – Principais ácidos fenólicos e antocianinas encontrados nos grãos de milho.

Compostos fenólicos	Referências
Ácido ferúlico	Ohashi et al., 1987; Lapierre et al., 2001; Rouau et al., 2003; Bunzel et al., 2005; Del Pozo-Insfran et al., 2006; Salinas-Moreno et al., 2007; Allerdings et al., 2006; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007; Lopez-Martinez et al., 2009; Mora-Rochin et al., 2010; Montilla et al., 2011; Urias-Peraldí et al., 2013.
Ácido p-cumárico	Ohashi et al., 1987; Lapierre et al., 2001; Rouau et al., 2003; Del Pozo-Insfran et al., 2006; Salinas-Moreno et al., 2007; Allerdings et al., 2006; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007; Montilla et al., 2011.
Ácido protocatecuico	Del Pozo-Insfran et al., 2006; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007.
Ácido sinápico	Ohashi et al., 1987; Salinas-Moreno et al., 2007.
Ácido vanílico	Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007.
Ácido gálico	Del Pozo-Insfran et al., 2006.
Cianidina	Styles & Ceska, 1972; Cortés et al., 2006; Del Pozo-Insfran et al., 2006; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007; González-Manzano et al., 2008; Yang & Zhai, 2010; Montilla et al., 2011.
Pelargonidina	Styles & Ceska, 1972; Cortés et al., 2006; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007; González-Manzano et al., 2008; Yang & Zhai, 2010; Montilla et al., 2011.
Peonidina	Styles & Ceska, 1972; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007; González-Manzano et al., 2008; Yang & Zhai, 2010; Montilla et al., 2011.
Luteolinidina	Styles & Ceska, 1972.
Malvidina	Cortés et al., 2006.

Os compostos fenólicos e seus derivados são considerados as principais fontes de antioxidantes dos cereais, principalmente do milho. Neste cereal, são encontrados fenólicos tanto na forma livre (em sua

maioria flavonoides), quanto ligados, constituídos principalmente por ácidos fenólicos (MONTILLA et al., 2011). O ácido ferúlico é o composto fenólico predominante nos grãos de milho, ligado a polissacarídeos da parede celular, tais como arabinoxilanas ou pectinas e é o principal promotor da atividade antioxidante (HOLGUIN-ACUÑA et al., 2008; MONTILLA et al., 2011) (Figura 3). Além disso, quando comparado com outros cereais como o arroz, trigo e aveia, o milho possui maior conteúdo de ácido ferúlico (ADOM & LIU, 2002). As frutas e verduras contêm quantidades significativamente inferiores quando comparadas aos cereais (cerca de 20 vezes menos), e principalmente quando comparado ao milho, que parece ser excelente fonte de ácido ferúlico. Esse composto é um excelente nutracêutico, podendo ser utilizado para a prevenção de inúmeras doenças. Desse modo, é de interesse a inclusão de cereais integrais na alimentação humana, em especial grãos integrais de milho (que não tenham sido beneficiados), principalmente por aquelas pessoas que buscam uma alimentação saudável (ZHAO & MOGHADASIAN, 2008).

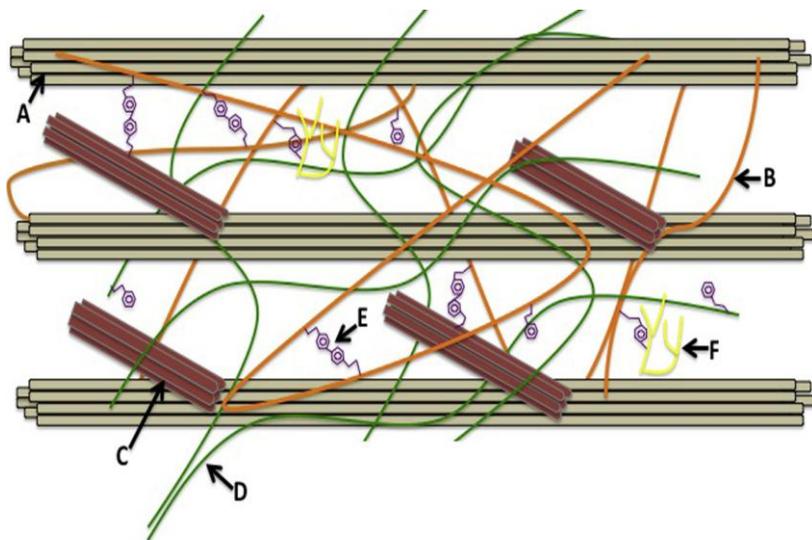


Figura 3 - Representação da estrutura da parede celular primária de vegetais e associação de seus componentes estruturais com os compostos fenólicos. (A) celulose, (B) hemicelulose, (C) proteínas estruturais, (D) pectina, (E) ácidos fenólicos e (F) lignina. **Fonte:** ACOSTA-ESTRADA et al., 2014.

2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A busca pela saúde baseada em uma alimentação saudável vem sendo o objetivo das pessoas desde a antiguidade. Há relatos de 3.000 anos atrás de que o alimento era utilizado para fins medicinais. Nesta época, foi atribuída a Hipócrates, considerado atualmente como o pai da medicina, a seguinte frase: “que o alimento seja seu medicamento e o medicamento seja o seu alimento” (GARCIA, 2003).

Desde a antiguidade até os dias atuais, a necessidade alimentar não é apenas uma questão de sobrevivência, mas está diretamente relacionada a qualidade de vida do indivíduo. Portanto, é essencial a inclusão de alimentos na dieta que contenham substâncias que auxiliam na promoção da saúde. É de interesse incluir na dieta substâncias naturais que apresentem potencial nutracêutico, exercendo funções específicas no organismo e atuando na prevenção ou tratamento de alguma doença ou disfunção e na melhoria dos mecanismos de defesa biológica (GARCIA, 2003; WHO, 2013).

Os alimentos podem contribuir no restabelecimento ou manutenção do estado de saúde. Nesse sentido, os alimentos funcionais aparecem como importante alternativa de prevenção e/ou tratamento de inúmeras complicações. São definidos como uma substância ou componente de um alimento que propicia benefícios comprovados cientificamente à saúde humana, contribuindo para a prevenção e tratamento de inúmeras doenças (ANJO, 2004).

Na literatura internacional são utilizados diversos termos referentes aos alimentos funcionais, como por exemplo, “functional foods”, “nutraceuticals”, “pharmafoods”, “therapeutic foods”, “medifoods”, “nutritional foods”, “health foods”, “foodaceuticals”, “pharmaconutrients”, entre outros (BASHO & BIN, 2010). Segundo a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é definido como uma alegação de propriedade funcional: “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Ainda complementa que “o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Já a Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002 da ANVISA, estabelece a regulamentação técnica de substâncias bioativas e

probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde. As substâncias que constam nessa resolução são classificadas em carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolipídeos, organosulfurados, polifenóis e probióticos. Os nutracêuticos também são uma alternativa de prevenção e/ou tratamento de doenças. Podem ser encontrados como nutrientes isolados, suplementos dietéticos, produtos herbais e alimentos processados (MORAES & COLLA, 2006).

Uma dieta contendo alimentos funcionais ou nutracêuticos que possuem elevado potencial antioxidante é de interesse para a manutenção da saúde. Nesse contexto, alimentos produzidos com farinhas de milho, como por exemplo, polentas, podem auxiliar para aumentar o poder antioxidante da dieta e contribuir para a prevenção de doenças (LAGO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de farinhas de grãos inteiros e o efeito do cozimento na preparação da polenta de variedades locais de milho cultivadas e desenvolvidas no Oeste de Santa Catarina, visando avaliar seu uso como alimento funcional e nutracêutico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os teores de compostos fenólicos totais, livres, glicosilados, esterificados e ligados às farinhas de grãos integrais de variedades locais e comercial de milho.
- Comparar a atividade antioxidante dos extratos contendo os compostos fenólicos livres, glicosilados, esterificados e ligados às farinhas de grãos integrais de variedades locais e comercial de milho.
- Verificar a relação entre os teores de compostos fenólicos livres, glicosilados, esterificados e ligados às farinhas de grãos integrais de variedades locais e comercial de milho com a atividade antioxidante.
- Avaliar o efeito do cozimento para a preparação da polenta sobre os teores de compostos fenólicos totais, livres, glicosilados, esterificados e ligados e a atividade antioxidante.
- Determinar a composição fenólica via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos diferentes extratos obtidos das farinhas de grãos integrais e das polentas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 VARIEDADES DE MILHO

Amostras de grãos de variedades locais de milho da safra 2012/2013 foram resgatadas pelo Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABIO), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), nas cidades de Anchieta e Guaraciaba, região oeste de Santa Catarina (Figura 4).



Figura 4 - Mapa com a localização do município de Guaraciaba, localizado na região Oeste de Santa Catarina. **Fonte:** GOOGLE MAPS, 2013.

No presente estudo, foram selecionadas as variedades de milho com indicação de uso para consumo humano, principalmente aquelas utilizadas para a preparação de polenta. As variedades selecionadas (n=5) foram Amarelão, Composto 8 carreiras, Comum, Vermelho e Mato Grosso Palha Branca, as quais estão sendo mantidas no banco de sementes do Laboratório de Pesquisas em Agrobiodiversidade (LAGROBIO/UFSC) com os seguintes códigos: 1105A, 694A, 657A, 76C e 2109,. Para efeitos de comparação, uma amostra de milho comercial (híbrido não transgênico), foi adquirida da empresa Pioneer (P32R22), totalizando 6 variedades de milho (Figura 5).



Figura 5 – Grãos das variedades de milho em estudo (Amarelão, Composto 8 Carreiras, Comum, Comercial, Vermelho e Mato Grosso Palha Branca).

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de milho foram secas em estufa à 35°C, até peso constante, e trituradas em moinho, utilizando tamis (60 mesh) e armazenadas a -80°C para posterior análise.

4.3 ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO DAS FARINHAS POR GENES TRANSGÊNICOS

Inicialmente, investigou-se a contaminação das farinhas de milho das variedades locais e comercial por genes transgênicos, utilizando-se o método Imunoensaio de Fluxo Lateral. Para isso, os grãos de 15 sementes de cada amostra de milho foram moídos e após a adição de 10 mL de água destilada, foram utilizadas as fitas de detecção Envirologix para os eventos Cry 1Ab, Cry 1F e Roundup Ready.

Para confirmação do resultados, procedeu-se com análise da contaminação pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que

consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA. O DNA das amostras foi extraído com o kit de extração NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel). Na reação foram utilizados 9,2 µL de água destilada autoclavada, 4 µL de solução tampão (Buffer), 1 µL de dNTP, 1 µL Forward Primer (35S), 1 µL Reverse Primer (35S), 3 µL DNA, 0,6 µL DMSO, 0,2 µL TAQ polimerase, totalizando 20 µL por reação. A programação do termociclador consistiu de desnaturação inicial do DNA à 98°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 98°C por 10 s, 62°C por 30 s e 72°C por 30 s. A amplificação final foi realizada à 72°C por 10 min. O produto da amplificação foi submetido à gel de agarose (2%), contendo brometo de etídio ($0,5 \text{ g.mL}^{-1}$). A visualização do gel foi realizada em transiluminador UV.

4.4 PREPARAÇÃO DA POLENTA

As variedades de milho com os maiores teores de fenólicos foram selecionadas para o estudo do efeito do cozimento durante a preparação da polenta (Figura 6). Para isso, à 30 g de farinha de milho foram adicionados 120 mL de água destilada. A mistura foi aquecida à 70°C durante 50 min, sob agitação constante. Após o cozimento, as polentas foram secas em estufa à vácuo durante 7 horas e armazenadas à -80°C para posterior análise.

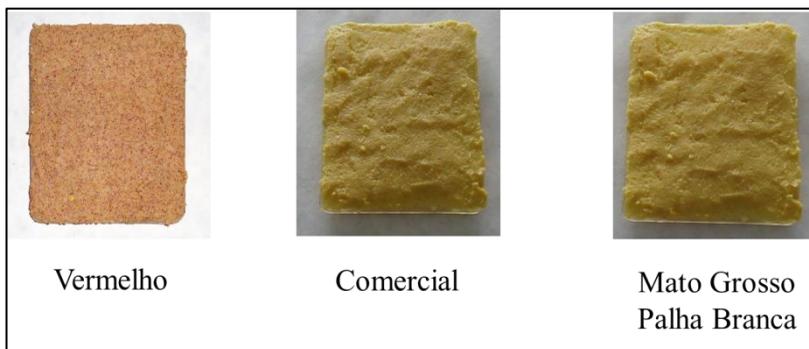


Figura 6 – Polentas das variedades de milho com maiores teores de fenólicos (Vermelho, Comercial e Mato Grosso Palha Branca).

4.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Para as extrações dos compostos fenólicos foram utilizadas as metodologias descritas por Montilla et al. (2011) e Wang et al. (2011),

com modificações. Para a extração dos compostos fenólicos foram adicionadas à 1 g de amostra (farinha ou polenta) 10 mL de metanol 80%, seguido de vórtex e incubação à temperatura ambiente por 1 h. Todos os procedimentos foram realizados em atmosfera modificada com nitrogênio gasoso e ao abrigo da luz para evitar a degradação dos compostos de interesse. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas à 3.600 rpm por 5 min para retirada do sobrenadante. O processo de extração foi repetido por mais duas vezes, utilizando 30 min. de incubação. Diferentes tempos de incubação foram testados (dados não mostrados) (30 min., 1 h, 24 h e 48 h). O maior teor de fenólicos foi encontrado após 1 hora de incubação para a 1ª extração e 30 min para as demais. Também foram testadas a utilização de homogeneizador ultraturrax e outras re-extrações (1, 2, 3 e 4 vezes), tendo sido verificado os maiores teores de fenólicos sem a utilização de homogeneizador e com 3 re-extrações. Os sobrenadantes foram reunidos e utilizados para extração dos compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados). O resíduo (pellet) foi utilizado para extração dos compostos fenólicos ligados, utilizando dois processos de hidrólises: enzimática e térmica.

Os compostos fenólicos livres, glicosilados e esterificados foram extraídos sequencialmente a partir do extrato metanólico bruto. Para isso, o volume do extrato bruto foi reduzido a 6 mL em rotaevaporador à 40°C, e em seguida acidificado com HCl 6M até pH 2,0. Após acidificação, a solução foi particionada com 10 mL de acetato de etila:éter etílico (1:1, v/v) (3 vezes). Esta fração organossolvente continha os fenólicos livres e a fração aquosa foi utilizada para as extrações subsequentes. Ao extrato aquoso adicionou-se 1 mL de NaOH 4M, contendo EDTA 10 mM e ácido ascórbico 1%, o qual foi incubado por 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi acidificado com HCl 6M até pH 2,0 e particionado com 10 mL de acetato de etila:éter etílico (1:1, v/v), (3 vezes). Esta fração organossolvente continha os fenólicos esterificados. À fração aquosa adicionou-se 1 mL de HCl 6M, seguido de incubação à 85°C durante 30 min. Após esse período, procedeu-se com a partição líquido-líquido com acetato de etila:éter etílico (1:1, v/v) (3 vezes). Esta fração continha os fenólicos glicosilados. Todas as frações organossolventes foram filtradas em sulfato de sódio anidro, rotaevaporadas à 40°C e ressuspensas em metanol 80% para posterior análise.

Já os fenólicos ligados foram extraídos do resíduo da farinha obtido após a primeira extração, através de hidrólise enzimática e hidrólise térmica. Inicialmente, adicionou-se 10 mL de Ca(OH)₂ 1 mM

ao resíduo e ajustou-se o pH para 5,0. À esta solução adicionou-se um mix de enzimas, consistindo de 500 μL de pectinase (Pectinex UF), 500 μL de amilase (BAN 480 L) e 250 μL de celulase (Cellubrix L), seguido de incubação por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 3600 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante seco em estufa à vácuo à 40°C durante 5 h e ressuspenso em metanol 80%. Por último, o resíduo de farinha foi submetido a hidrólise térmica, adicionando-se 10 mL de NaOH 2M e incubando-o à 95°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram agitadas à temperatura ambiente, durante 1 h, e posteriormente foi adicionado 2 mL de HCl e hexano (1:1, v:v). Após homogeneização em vórtex, o sobrenadante foi descartado. O extrato foi particionado com acetato de etila:éter etílico (1:1, v:v), por 3 vezes. Esta fração organossolvente, contendo os fenólicos ligados liberados após hidrólise térmica, foi filtrada em sulfato de sódio anidro, rotaevaporada à 40°C e ressuspenso em metanol 80% para posterior análise (Figura 7).

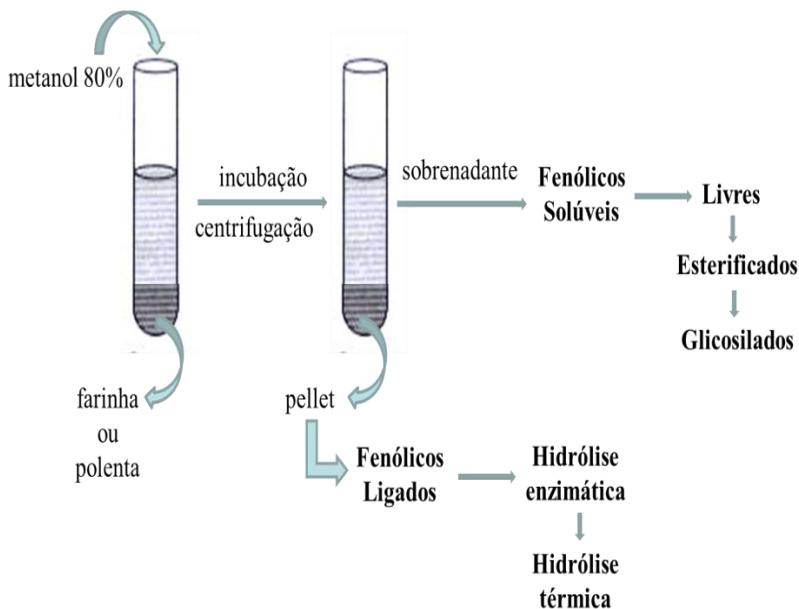


Figura 7 – Representação esquemática do processo de extração dos compostos fenólicos para obtenção dos extratos contendo os fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados (enzimática e térmica).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

4.6.1 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A determinação dos teores de compostos fenólicos totais nos extratos metanólicos das amostras de farinha e polenta foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme protocolo proposto por Singleton & Rossi (1965). Os teores foram calculados com o auxílio de uma curva padrão externa de ácido gálico – Sigma ($5-100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $r^2= 0,99$), e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico.g⁻¹ (mgEAG. Kg⁻¹). Adicionalmente, os extratos metanólicos foram submetidos a varredura em espectrofotômetro UV-Visível (200 à 700 nm), considerando o intervalo de 1 nm por ponto amostral. As análises foram realizadas em triplicatas para as farinhas e polentas.

4.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Aliquotas (20 μL) dos extratos metanólicos foram injetados em cromatógrafo líquido (Thermo Fisher Scientific, Dionex UltiMate 3000), equipado com coluna C18 de fase reversa (Acclaimtm 120, 5 μm C18, 4,6 x 250 mm, Thermo Fisher Scientific) e pré-coluna (Acclaimtm, 5 μm , 4,6 x 10 mm), termostatizado à 35°C, em fluxo de 1 mL/min. Para a detecção dos compostos de interesse utilizou-se detector DAD, operando em 240, 260, 280 e 320 nm. A eluição consistiu de um gradiente das soluções A (metanol) e B (água Milli-Q/ pH 2,3), na proporção 15% da solução A e 85% da solução B (5 min), 15 à 100% da solução A (5 à 40 min) e de 85 à 0% de solução B (40 à 50 min).

A identificação dos compostos de interesse foi realizada baseando-se nos tempos de retenção e nos valores máximos de λ , determinados a partir das análises de compostos padrões comerciais, obtidos sob as mesmas condições experimentais ou com base na literatura. Os teores foram calculados com o auxílio de uma curva padrão externa de ácido ferúlico ($y= 1,6183x$; $r^2= 0,9998$). Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, sendo expressos em μg de equivalentes de ácido ferúlico.g⁻¹ (peso seco).

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante total foi determinada pela técnica “*Ferric Reducing Antioxidant Power*” (FRAP), utilizando o complexo Fe³⁺tripiridiltriazona (TPTZ), conforme descrito em Benzie & Strain

(1996). Em tubos protegidos da luz, uma alíquota das amostras (10 μL) foi misturada à 300 μL do reagente FRAP (tampão acetato [pH 3,6], TPTZ [10 mM], FeCl_3 [20mM]), e incubados à 37°C por 10 minutos. A absorbância foi medida à 595 nm em leitor de Elisa. O teor de antioxidantes totais foi expresso em equivalentes de Sulfato de Ferro (μM FeSO_4). As análises foram realizadas em triplicatas. Adicionalmente, os extratos também foram submetidos ao sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1picrilhidrazil), conforme descrito em Kim, Guo e Parker (2002). Em tubos protegidos da luz, uma alíquota das amostras (10 μL) foi misturada à 290 μL do reagente DPPH (0,1 mM) em metanol e incubados à 25°C, durante 5 horas. O tempo de incubação das amostras com o reagente DPPH foi padronizado (dados não mostrados), (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h e 6 h), tendo sido verificada maior atividade antioxidante após 5 h de incubação, representando a atividade antioxidante total. A absorbância foi medida à 515 nm em leitor de Elisa e os resultados foram expressos em % de inibição do DPPH. Os agentes antioxidantes proporcionam um decréscimo na absorbância da solução de DPPH, sendo a concentração remanescente do radical calculada pela fórmula $\text{DPPH}\% = \frac{[\text{DPPH}t=0 - \text{DPPH}t]}{[\text{DPPH}t=0]} \times 100$, onde $\text{DPPH}t=0$, é igual à absorbância no tempo zero e $\text{DPPH}t$, é a absorbância final da amostra. As análises foram realizadas em triplicatas.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conteúdo de compostos fenólicos totais e sua atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH e nos diferentes extratos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey's HSD para comparação entre médias. Os resultados de FRAP por não terem apresentado normalidade, foram submetidos a transformação Box-Cox (BOX & COX, 1964). As correlações foram analisadas através do coeficiente de correlação de Spearman. Para todas as análises utilizou-se o programa computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) com nível de significância de 5%. Para o cálculo dos componentes principais (PCAs) do conjunto de dados brutos espectrais UV-visível (200-380 nm) e conteúdos dos diferentes ácidos fenólicos determinados por CLAE utilizou-se o pacote estatístico *The Unscrambler* (versão 9.7).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO POR GENES TRANSGÊNICOS

As variedades locais de milho foram inicialmente avaliadas para confirmar a ausência de contaminação com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), devido à ampla comercialização e cultivo de sementes transgênicas na região em estudo (COSTA, 2013). Para isso, foram utilizados os testes de Imunoensaio de Fluxo Lateral (IFL) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O IFL é utilizado para a detecção qualitativa de proteína transgênica em tecidos vegetais, com limite de detecção de aproximadamente 0,1%. É considerado um teste de moderada sensibilidade, sendo aplicado para a triagem das variedades locais de milho. No presente estudo, foram utilizados os imunoensaios para a detecção das proteínas da família *Cry* (endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*), que conferem resistência contra insetos, e *Roundup Ready*, que confere resistência ao herbicida glifosato (STAVE, 2002). Os resultados das leituras nas fitas de detecção para as 5 variedades locais foram negativos para os eventos *Cry 1Ab*, *Cry 1F* e *Roundup Ready*. Para efeitos de comparação e validação da metodologia, uma amostra de milho transgênico, adquirida da empresa Pioneer (P32 R22 H) foi utilizada, com resultado positivo para o evento *Cry 1F*, conforme esperado (Figura 8). Apesar dos resultados negativos para as variedades locais, as amostras foram analisadas também por PCR, tendo em vista a moderada sensibilidade do ensaio IFL (STAVE, 2002).



Figura 8 – Ensaio imunocromatográfico para a detecção de OGMs na farinha da variedade milho transgênico Pioneer (P32R22H)

O método de PCR por amplificar sequências específicas da molécula de DNA é considerado um método de alta sensibilidade, específico e seguro (NIKOLIC et al., 2008). Para os OGMs comerciais são utilizadas as sequências do promotor 35s que está presente em 75% dos casos, facilitando a detecção dos mesmos (CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006). Os resultados negativos foram confirmados por PCR, utilizando-se o promotor 35s, exceto para a variedade transgênica Pioneer (P32R22H). A Zeína foi utilizada como controle positivo (Figura 9).

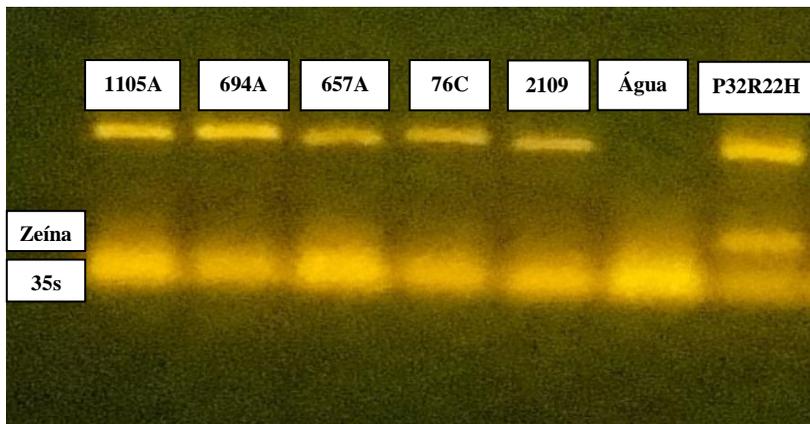


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA extraído das farinhas dos grãos de variedades locais de milho Amarelão (1105A), Composto 8 Carreiras (694A), Comum (657A), Vermelho (76C), Mato Grosso Palha Branca (2109) e a variedade transgênica Pioneer (P32R22H).

A metodologia empregada mostrou que as amostras das sementes crioulas utilizadas no estudo estavam livres da contaminação por transgênicos. No entanto, não há garantia de que a variedade cultivada naquela região ainda não esteja contaminada, considerando o cultivo de sementes transgênicas nas mesmas propriedades (COSTA, 2013). O fortalecimento de iniciativas para a conservação e valorização das variedades locais de milho nas propriedades torna-se imprescindível, especialmente de forma integrada com a conservação *ex situ*. Isto porque a conservação dos diferentes genótipos em bancos de sementes minimizará os riscos de contaminação por fluxo gênico que está ocorrendo naquela região.

6.2 PERFIL ESPECTRAL UV-VISÍVEL

A análise dos perfis espectrais UV-visível (200 a 700 nm) dos diferentes extratos (Figura 10) revelou os maiores valores de absorbâncias entre 200 e 320 nm. Esta região é característica para compostos aromáticos, sugerindo, neste caso, a presença de compostos fenólicos em todos os extratos (HARBORNE, 1986). Diferenças nos perfis UV-Vis entre os extratos denominados de livres, esterificados, glicosilados e ligados foram encontradas, sugerindo composição química distinta entre os mesmos. Já, diferenças entre variedades para cada um

dos extratos não foram prontamente percebidas, justificando a utilização da análise multivariada dos dados.

A Análise de Componentes Principais ou *Principal Component Analysis* (PCA) é um método estatístico empregado para a análise multivariada de dados que tem sido amplamente utilizado. Através dessa técnica, já foi possível discriminar amostras de farinhas, folhas, flores, leite e própolis analisadas por UV-visível, IV ou RMN (LEMOS, 2010; KUHNEN et al., 2010a; KUHNEN et al., 2010b; KUHNEN et al., 2014; MARASCHIN et al., 2012). O PCA é capaz de reduzir os dados, eliminar as sobreposições e escolher formas mais representativas dos dados a partir das variáveis originais. É considerada uma transformação linear ótima, geralmente utilizada quando uma representação gráfica não é possível, ou quando não se consegue identificar visualmente uma possível variabilidade das amostras, como no presente estudo (VARELLA, 2008). Através do PCA é possível visualizar as amostras em poucas dimensões, separando as informações importantes e auxiliando na verificação de hipóteses a partir dos dados obtidos (SOEIRO et al., 2010).

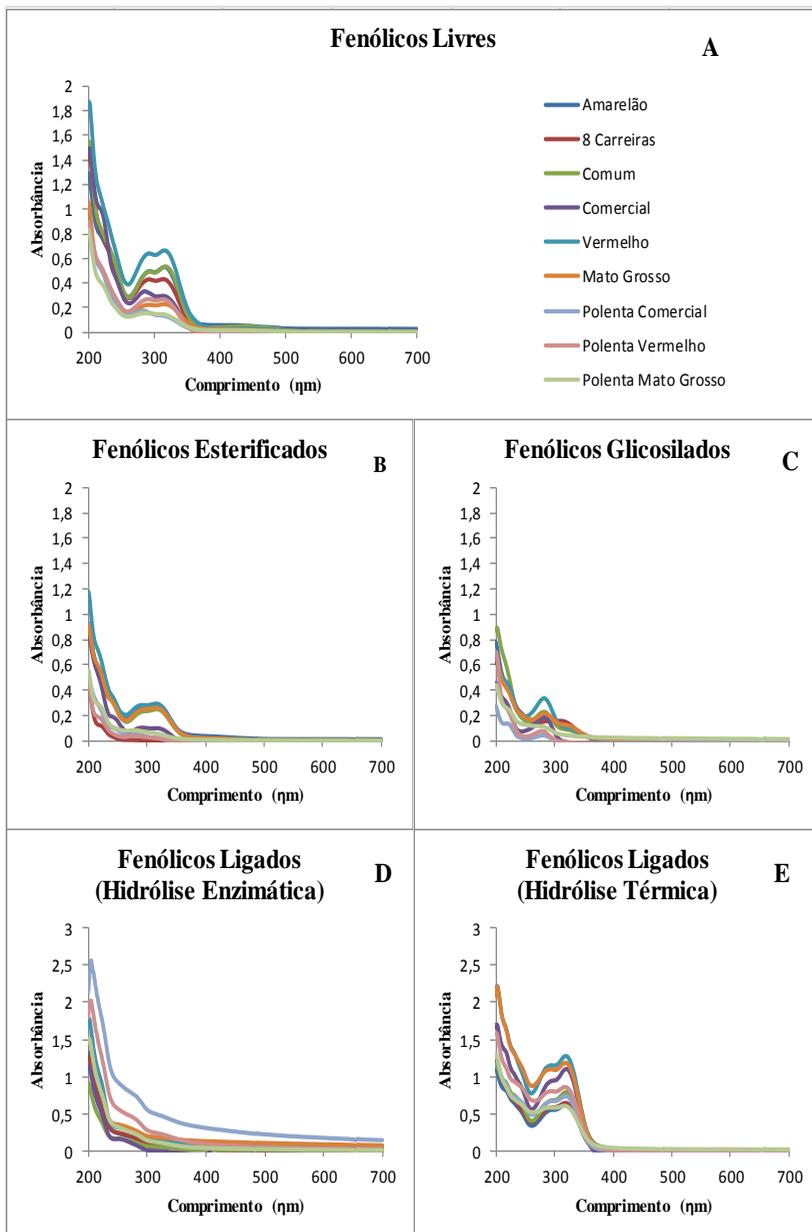


Figura 10 – Perfil espectral UV-visível (200 - 700 nm) dos extratos contendo os fenólicos livres (A), esterificados (B), glicosilados (C) e ligados liberados por hidrólise enzimática (D) e térmica (E).

A análise de todos os extratos (solúveis e ligados) por PCA resultou na discriminação das amostras em três grupos: fenólicos ligados liberados por hidrólise enzimática, fenólicos ligados liberados pelo tratamento térmico e fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados, exceto para as amostras 76C da fração livre e a polenta da variedade comercial (PP32R22), que não agruparam-se aos seus respectivos grupos). Os eixos PC1 e PC2 explicaram em 90 e 8% a variabilidade dos dados, respectivamente (Figura 11A). Através da análise de *loading* que tem como objetivo identificar as variáveis que contribuíram de forma mais significativa para os resultados encontrados verificou-se que os valores espectrais de maior influência para a distribuição dos autovetores foram de 200 – 234 nm em PC 1 (+) e 235 – 252 nm em PC 1 (-) (Figura 12A). Portanto, a análise de PCA sugeriu uma composição química distinta dos extratos, principalmente entre os fenólicos ligados e entre os ligados e os solúveis. Tais resultados só poderão ser confirmados por CLAE, que poderá vir a validar o UV-Vis acoplada ao PCA como metodologia adequada para a discriminação de extratos contendo compostos fenólicos.

Procedeu-se também com a análise de PCA dos perfis UV-Vis para os extratos separadamente, com o objetivo de investigar possíveis diferenças na composição dos fenólicos solúveis e ligados entre as farinhas e as polentas. A análise dos extratos contendo os fenólicos livres mostrou a clara distinção da amostra 76C das demais, inclusive da sua polenta (Figura 11B). Cabe ressaltar que esta variedade é a que possui maior pigmentação dos grãos (Figura 5). Já as polentas das variedades 2109 e P32R22 agruparam-se com as suas respectivas farinhas. A análise de *loading* (Figura 12B) revelou que os valores espectrais de maior influência foram de 200 – 233 nm em PC 2 (+) e 234 – 380 nm em PC 1 (+). Diferentemente, os extratos contendo os fenólicos esterificados (Figura 11C), glicosilados (Figura 11D) e ligados liberados por hidrólise térmica (Figura 11F) das polentas diferiram de suas respectivas farinhas, possivelmente, em decorrência do processamento térmico utilizado durante a preparação do alimento. Para os fenólicos ligados liberados por hidrólise enzimática, observou-se apenas a clara distinção da polenta do milho Comercial (PP32R22) das demais (Figura 11E). A análise de *loading* está mostrada na Figura 12.

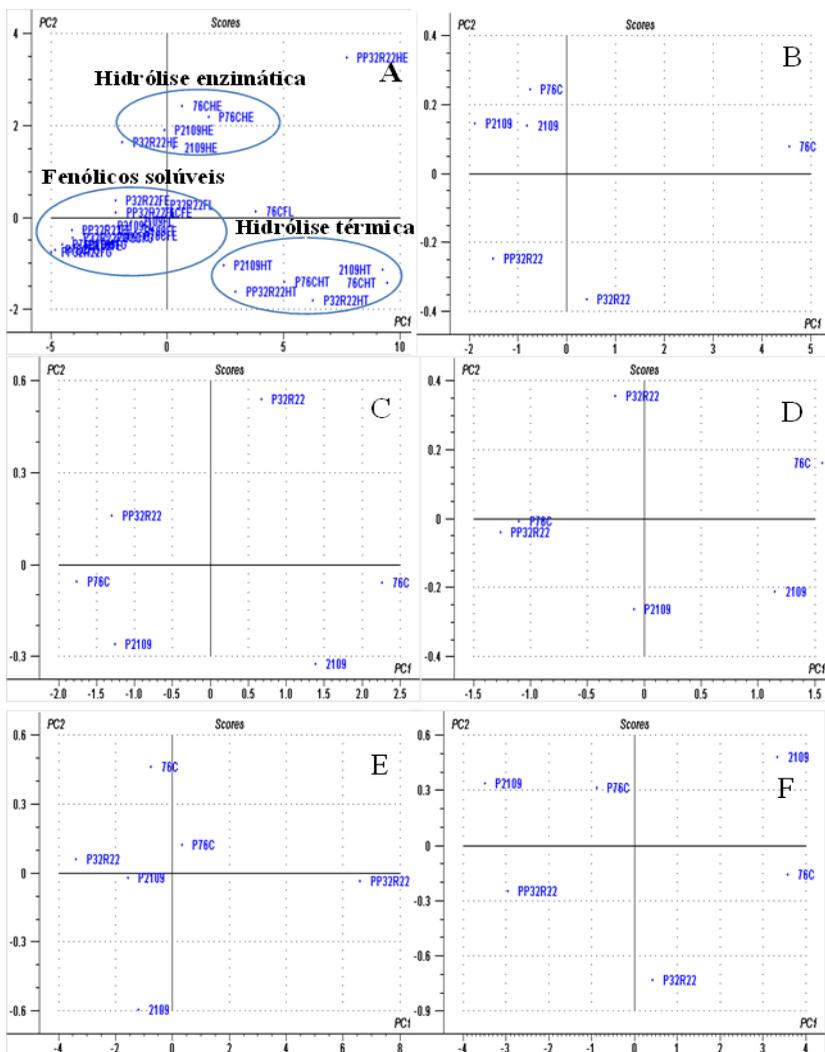


Figura 11 – Análise dos Componentes Principais (PCA) dos perfis espectrais UV-visível (200 - 380 nm) da varredura espectrofotométrica dos extratos metanólicos das farinhas de grãos inteiros das variedades de milho Comercial (P32R22), Vermelho (76C) e Mato Grosso Palha Branca (2109) e suas respectivas polentas PP32R22, P76C e P2109 (A), contendo os compostos fenólicos livres (B), esterificados (C), glicosilados (D), e ligados liberados por hidrólise enzimática (E) e térmica (F).

De uma maneira geral, a análise dos perfis UV-Vis por PCA revelou que o conteúdo e a composição polifenólica das polentas diferem das farinhas. De maneira similar, perfis UV-Vis de extratos brutos de flores femininas de variedades locais de milho foram discriminadas por PCA, como resultado de diferenças significativas na composição dos ácidos fenólicos protocatecuico, gálico, t-cinâmico e de antocianinas determinadas por MALDI-TOF (KUHNNEN et al., 2010b). No presente estudo, os resultados encontrados pela análise de PCA sugerem a necessidade de um aprofundamento analítico para verificar as alterações ocorridas no perfil fenólico durante a preparação da polenta. Para isso, as amostras em estudo foram analisadas quanto ao teor e a composição de fenólicos totais e a atividade antioxidante utilizando métodos colorimétricos e por cromatografia líquida de alta eficiência.

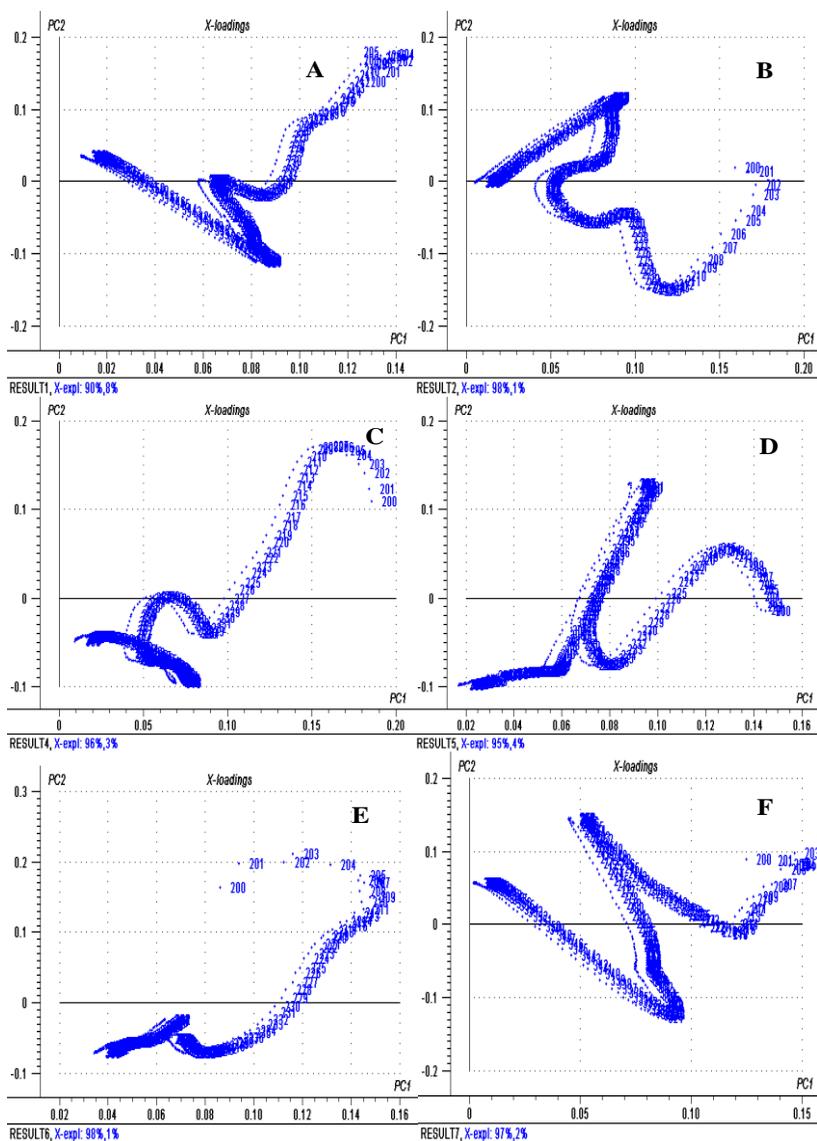


Figura 12 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 dos perfis espectrais UV-visível (200 - 380 nm) dos extratos metanólicos das farinhas de grãos inteiros das diferentes variedades de milho e suas respectivas polentas (A), contendo os compostos fenólicos livres (B), esterificados (C), glicosilados (D), e ligados liberados por hidrólise enzimática (E) e térmica (F).

6.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os conteúdos de compostos fenólicos totais das farinhas, representados pela soma de cada um dos extratos (solúveis e ligados), variaram de 794,35 à 1.350,52 mg de EAG.Kg⁻¹. Os maiores conteúdos foram encontrados nas variedades 76C e 2109, diferindo das demais (Figura 13). Estes valores estão de acordo com os encontrados por outros autores recentemente (GONZÁLEZ-MUÑOZ et al., 2013; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2011; MONTILLA et al., 2011). É importante destacar que resultados de trabalhos mais antigos não podem ser comparados aos do presente estudo por terem utilizado métodos de extração que não permitiam a liberação dos compostos fenólicos ligados, subestimando os conteúdos encontrados (STYLES & CESKA, 1972). Foram Adom & Liu (2002) que alertaram para a necessidade de uma metodologia que permitisse a extração dos compostos fenólicos ligados do milho, principalmente de ácido ferúlico presente nas camadas externas dos grãos.

Mora-Rochin et al. (2010), utilizando metodologia similar a do presente estudo, encontraram nas farinhas de variedades locais de milho mexicano conteúdos que variaram de 1.377 à 1.674 mg de EAG.Kg⁻¹. No entanto, foi a variedade branca que apresentou conteúdos superiores quando comparada as farinhas de milhos pigmentados, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo. Já na Nigéria, foram encontrados maiores teores de fenólicos nas farinhas de variedades locais de milho amarelo (3.002,5 mg de EAG. Kg⁻¹) comparado ao milho branco (2.870,5 mg de EAG.Kg⁻¹) (OBOH; ADEMILUYI; AKINDAHUNSI, 2010). Zilic et al. (2012), por sua vez, ao avaliarem os conteúdos de fenólicos das farinhas de variedades locais de milho originário de diferentes países (México, Estados Unidos, França, Sérvia e Holanda) encontraram conteúdos cerca de 2 a 5 vezes superiores aos relatados no presente estudo (4.494,1 à 10.528,8 mg de EAG.Kg⁻¹). Ainda neste estudo, os maiores teores foram encontrados em variedades de pigmentação azul, seguido das vermelhas, branca e colorida.

Em conjunto, estes resultados demonstraram que o milho é uma importante fonte de compostos fenólicos, consolidando o seu potencial como nutracêutico ou na preparação de alimentos funcionais. Em comparação a outros cereais como trigo, aveia e arroz, o milho destaca-se por possuir conteúdos de fenólicos 2 vezes superiores (ADOM & LIU, 2002). No entanto, é preciso considerar que há grande variabilidade no conteúdo entre diferentes genótipos e que não é possível fazer uma correlação direta com a pigmentação dos grãos

(MORA-ROCHIN et al., 2010). Trabalhos recentes tem verificado a existência da relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a dureza dos grãos. Chiremba et al. (2012), por exemplo, identificaram correlação positiva entre o conteúdo de ácidos fenólicos e características físicas dos grãos de milho, principalmente com a dureza. A concentração elevada de ácidos fenólicos e a ligação desses compostos com componentes estruturais presentes no pericarpo, conforme mostrado na Figura 3, podem explicar a relação com a dureza dos grãos.

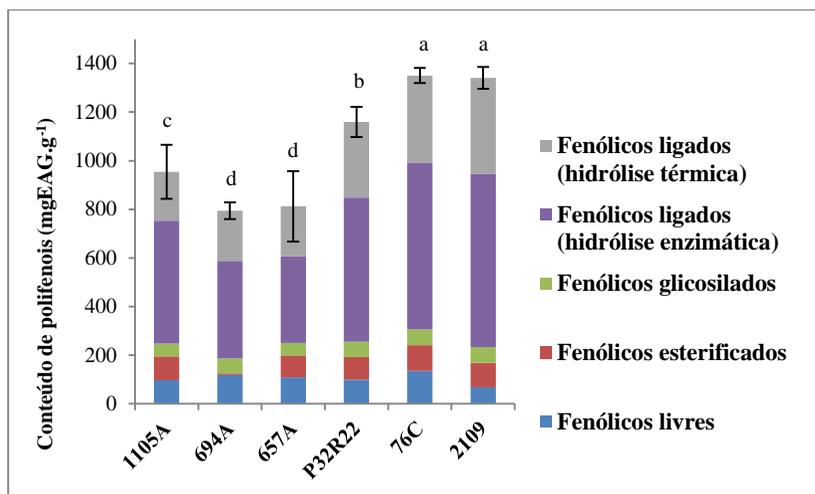


Figura 13 – Conteúdo médio de compostos fenólicos totais nas farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial. 1105A – Amarelão; 694A – Composto 8 Carreiras, 657A – Comum; P32R22 - Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão do conteúdo total de fenólicos. ^{a-b} valores com letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho ($P < 0,05$).

Os fenólicos ligados representaram, em média, 76,92% do conteúdo total, com a maior contribuição do extrato obtido por hidrólise enzimática (50,74%), diferindo dos fenólicos solúveis e dos ligados liberados por hidrólise térmica ($p < 0,05$) (Tabela 4). Resultado similar foi encontrado por Aguayo-Rojas et al. (2012), que verificaram que os fenólicos ligados às farinhas de variedades locais de milho cultivadas no México variaram de 76,2 à 84,3%. Da mesma forma, Cabrera-Soto et al. (2009), verificaram que os fenólicos ligados constituíram 70% do total

de fenólicos nas farinhas de 5 genótipos de milho mexicano. Como mencionado anteriormente, a maior parte dos compostos fenólicos nos grãos de milho encontram-se ligados aos componentes da parede celular tais como hemicelulose e celulose (CHIREMBA et al., 2012; HOLGUÍN-ACUÑA et al., 2008; MÉLIDA et al., 2010; MONTILLA et al., 2011). Já os fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados), no presente estudo, contribuíram em 9,78%, 7,67% e 5,63% para o conteúdo de fenólicos totais, respectivamente, os quais diferiram entre si ($p < 0,05$). Tais resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que verificaram maiores teores de fenólicos solúveis livres, seguido dos esterificados e glicosilados, dentre os solúveis (CABRERA-SOTO et al., 2009; MONTILLA et al., 2011). Esses resultados ressaltam a importância do consumo de farinhas de grãos integrais, tendo em vista a localização dos compostos fenólicos nas camadas externas dos grãos (pericarpo e aleurona). Dessa forma, o beneficiamento dos grãos, *i.e.*, a remoção das camadas externas, deve ser evitado, já que grande parte dos fenólicos não seria consumido. Por outro lado, desde que a farinha seja produzida a partir de grãos integrais, fica evidenciado que o milho possui um grande potencial à ser utilizado como alimento funcional ou nutracêutico (ADOM & LIU, 2002; CHIREMBA et al., 2012).

Tabela 4 – Porcentagem de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados (hidrólises enzimática e térmica) nas farinhas de milho em estudo (mg de EAG. Kg⁻¹).

Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
Livres	Esterificados	Glicosilados	Enzimática	Térmica
9,78% ^C	7,67% ^D	5,63% ^E	50,74% ^A	26,18% ^B

^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os extratos ($P < 0,05$).

Na Tabela 5 estão apresentados os conteúdos de fenólicos solúveis e ligados encontrados nas farinhas das diferentes variedades de milho. Dentre os compostos solúveis, conteúdos superiores de fenólicos livres foram encontrados nas farinhas das variedades 76C e 694A, as quais diferiram de 1105A e 2109. Dentre ao conteúdo de fenólicos glicosilados, 694A, 76C e 2109 diferiram de 657A. O menor conteúdo de fenólicos esterificados foi encontrado na farinha de 694A, cerca de 10 vezes menos ($P < 0,05$). Dentre os compostos fenólicos ligados, 2109 e 76C continham os maiores valores na hidrólise térmica, como também na hidrólise enzimática, juntamente com P32R22.

Tabela 5 – Conteúdo médio de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados (mg EAG. Kg⁻¹) nas farinhas das variedades locais e comercial de milho do Oeste de Santa Catarina.

Variedade	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
1105A	97,45 ^{Ccd} (8,97)	97,03 ^{Ca} (5,05)	52,88 ^{Dab} (1,08)	505,98 ^{Ab} (70,86)	170,14 ^{Bd} (26,47)
694A	117,55 ^{Cab} (2,59)	7,47 ^{Ec} (1,47)	62,13 ^{Da} (3,45)	400,88 ^{Ac} (51,51)	183,45 ^{Bd} (18,67)
657A	108,4 ^{Cbc} (4,68)	90,25 ^{Db} (14,02)	51,98 ^{Eb} (6,52)	355,32 ^{Ad} (78,77)	206,6 ^{Bc} (45,65)
P32R22	102,83 ^{Cbc} (12,95)	95,15 ^{Ca} (6,59)	53,05 ^{Dab} (3,4)	563,93 ^{Aab} (41,77)	310,67 ^{Bb} (16,26)
76C	135,65 ^{Ca} (5,86)	105,52 ^{Da} (4,31)	64,85 ^{Ea} (1,69)	683,62 ^{Aa} (2,64)	360,88 ^{Bab} (30,22)
2109	68,27 ^{Dd} (5,14)	99,87 ^{Ca} (1,53)	64,9 ^{Da} (3,78)	713,82 ^{Aa} (50,42)	393,55 ^{Ba} (5,75)

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre os extratos ($P < 0,05$) e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho ($P < 0,05$).

Após a análise das farinhas, os conteúdos de fenólicos foram determinados nas amostras de polentas preparadas com as variedades 76C e 2109, tendo em vista os maiores conteúdos encontrados. A variedade comercial (P32R22) foi inserida na análise para efeitos de comparação. A Figura 14 mostra os conteúdos de fenólicos totais, representando a soma do que foi encontrado em cada um dos extratos. Foram encontrados em todas as polentas conteúdos de fenólicos totais superiores (aumento médio de 129%) aos de suas respectivas farinhas ($P < 0,05$). Esse resultado difere da associação entre processamento térmico e perdas significativas de compostos fenólicos descrita por alguns autores (IOANNOU et al., 2012; SÓLYOM et al., 2014). Os valores das polentas variaram de 2.311,2 à 3.553,1 mg de EAG.Kg⁻¹. A polenta da variedade de pigmentação vermelha (P76C) apresentou o maior conteúdo, diferindo das demais ($P < 0,05$). Diferentemente das farinhas, estudos sobre a composição fenólica de preparações culinárias utilizando farinhas de milho, como a polenta, são escassos na literatura. Recentemente, Lago et al. (2014) desenvolveram um cultivar de milho

pigmentado e encontraram perdas significativas de antocianinas após o processamento térmico para a produção de polenta. Já, o efeito sobre a composição fenólica não foi avaliado por aqueles autores. Para o melhor do nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que tenham estudado o efeito da preparação da polenta sobre o teor e perfil de fenólicos.

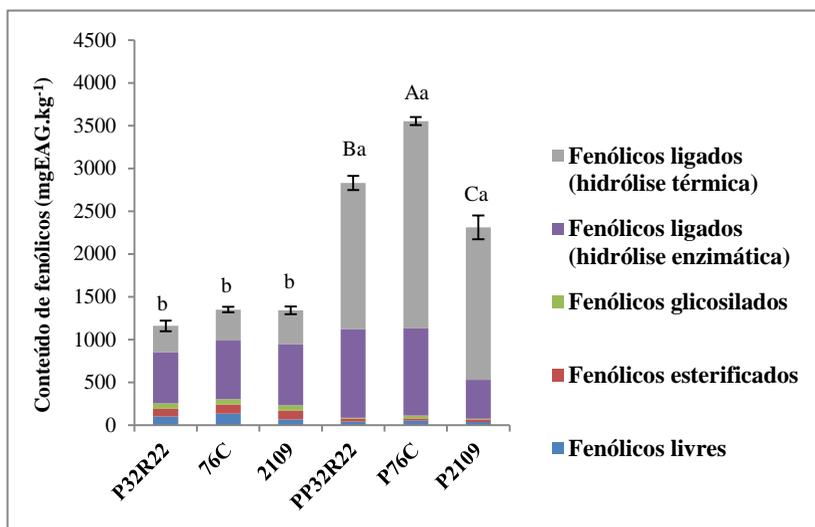


Figura 14 – Conteúdo médio de compostos fenólicos totais encontrado nas farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial e de suas respectivas polentas. P32R22 – Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca; PP32R22 – Polenta do Comercial; 76C – Polenta do Vermelho e P2109 – Polenta do Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão do conteúdo total de fenólicos. ^{a-b} valores com letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$). ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas indicam diferenças significativas entre as polentas ($P < 0,05$).

Na Tabela 6 estão mostrados os conteúdos de fenólicos solúveis e ligados encontrados nas farinhas e suas respectivas polentas. Os conteúdos de fenólicos solúveis foram inferiores nas polentas comparados as farinhas ($P < 0,05$). Perdas significativas de compostos fenólicos após o processamento térmico podem ser explicadas pela exposição dos compostos a temperaturas elevadas (IOANNOU et al., 2012; SÓLYOM et al., 2014). Já para os fenólicos ligados, houve um aumento significativo no conteúdo após o preparo da polenta, cerca de

182%. Estes resultados sugerem que apesar da degradação dos fenólicos solúveis durante o cozimento da farinha, o processamento acarreta na liberação de ácidos fenólicos ligados aos componentes da parede celular, como celulose e hemicelulose. Este resultado já havia sido observado por Dewanto et al. (2002) ao avaliarem uma variedade de milho doce quanto ao conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante. Naquele estudo, os grãos de milho submetidos ao tratamento térmico (115 °C por 25 min.) apresentaram aumento no conteúdo de fenólicos (54%) e atividade antioxidante (44%). Esses resultados reforçam a hipótese de que o processamento térmico utilizado na preparação de alimentos a base de grãos inteiros de milho é benéfico por contribuir na liberação de fenólicos ligados a componentes estruturais dos grãos de milho.

Enquanto os compostos fenólicos solúveis são rapidamente absorvidos no estômago e intestino delgado, proporcionando uma ação rápida e sistêmica, contribuindo para diversos benefícios à saúde, os compostos fenólicos ligados, resistem à degradação no estômago e intestino delgado, sendo grande parte absorvidos no intestino grosso (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Portanto, o principal efeito atribuído a esses compostos tem sido a prevenção do câncer de cólon (ADOM & LIU, 2002; ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Além disso, o consumo de alimentos ricos em fenólicos pode ser uma importante estratégia alimentar para auxiliar no controle de doenças crônicas como o diabetes mellitus (DM) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS). González-Muñoz et al. (2013), constataram a relação positiva entre os fenólicos de farinhas de variedades locais de milho Chileno com a inibição *in vitro* de enzimas chave desencadeadoras de doenças crônicas como o diabetes (α -glicosidase e α -amilase) e a hipertensão (enzima conversora de angiotensina I). Ainda neste trabalho, verificou-se que todos os extratos contendo os fenólicos livres inibiram a enzima α -glicosidase, o que reforça a afirmação de que os fenólicos livres possuem uma ação rápida e sistêmica.

Tabela 6 – Conteúdo médio de compostos fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) e ligados (mg EAG. Kg⁻¹) nas farinhas e polentas das variedades locais de milho, do Oeste de Santa Catarina, e do milho comercial.

Tratamento	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
<u>Farinhas</u>					
P32R22	102,83 ^a (12,95)	95,15 ^a (6,59)	53,05 ^a (3,4)	563,93 ^b (41,77)	310,67 ^b (16,26)
76C	135,65 ^a (5,86)	105,52 ^a (4,31)	64,85 ^a (1,69)	683,62 ^b (2,64)	360,88 ^b (30,22)
2109	68,27 ^a (5,14)	99,87 ^a (1,53)	64,9 ^a (3,78)	713,82 ^a (50,42)	393,55 ^b (5,75)
<u>Polentas</u>					
PP32R22	41,57 ^{Cb} (0,54)	31,93 ^{Db} (0,53)	11,75 ^{Eb} (1,87)	1037,62 ^{Ba} (29,71)	1707,55 ^{Aa} (97,21)
P76C	53,9 ^{Cb} (1,69)	28,84 ^{Eb} (1,89)	15,87 ^{Db} (4,55)	1018,72 ^{Ba} (58,72)	2422,28 ^{Aa} (37,36)
P2109	39,17 ^{Cb} (1,09)	21,68 ^{Db} (3,2)	7,42 ^{Eb} (0,76)	454,12 ^{Bb} (26,09)	1783,08 ^{Aa} (111,86)

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as frações (P<0,05) e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas (P<0,05).

No presente trabalho, a variedade 76C apresentou alto conteúdo de fenólicos solúveis. Da mesma forma, apresentou alto conteúdo de fenólicos ligados, juntamente com a variedade 2109, sugerindo ser a melhor alternativa de consumo para aqueles que desejam ter um benefício maior para a saúde, como uma ação sistêmica (prevenção e controle de doenças crônicas) ou na prevenção do câncer de cólon (Tabela 6). A polenta da variedade 76C também apresentou os maiores conteúdos de fenólicos entre as polentas e quando comparada com a sua respectiva farinha (Tabela 6). Desse modo, nossos resultados sugerem que a variedade 76C seja a melhor alternativa para o consumo humano através de preparação culinária (polenta) ou para extração de compostos

fenólicos de interesse, podendo ser considerado um alimento funcional e/ou nutracêutico.

6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A ação antioxidante é a principal atividade atribuída aos compostos fenólicos, podendo ser determinada por diferentes métodos, os quais tem a finalidade de mensurar a eliminação de radicais livres e/ou reduzir o poder ou atividade quelante (ANTOLOVICH et al., 2002). O método do DPPH, por exemplo, avalia o poder de redução do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil. O ensaio “*Ferric Reducing Antioxidant Power*” (FRAP), por sua vez, estima o poder antioxidante através da redução de ferro. O uso de diferentes métodos para avaliar a capacidade antioxidante de extratos ou compostos tem sido justificada, uma vez que nas moléculas existem diversos tipos de radicais e diferentes sítios de ação. Dificilmente um único método é capaz de representar de forma segura e precisa a atividade antioxidante de um determinado composto (SMET et al., 2008). Os extratos contendo os compostos fenólicos possuem propriedades potencialmente antioxidantes devido à presença de um anel aromático na sua estrutura química. Acredita-se que esses compostos podem estabilizar espécies reativas que possuem elétrons não emparelhados, atuando como sequestradores de radicais livres (FARDET et al., 2008).

A atividade antioxidante total determinada pelo método de DPPH, representada pela soma da porcentagem de inibição do radical DPPH está apresentada na Figura 15. A variedade 694A apresentou a menor atividade antioxidante, diferindo das demais. 76C teve a maior atividade, diferindo das demais, enquanto 1105A, 657A e P32R22 apresentaram valores intermediários ($P < 0,05$) (Figura 15).

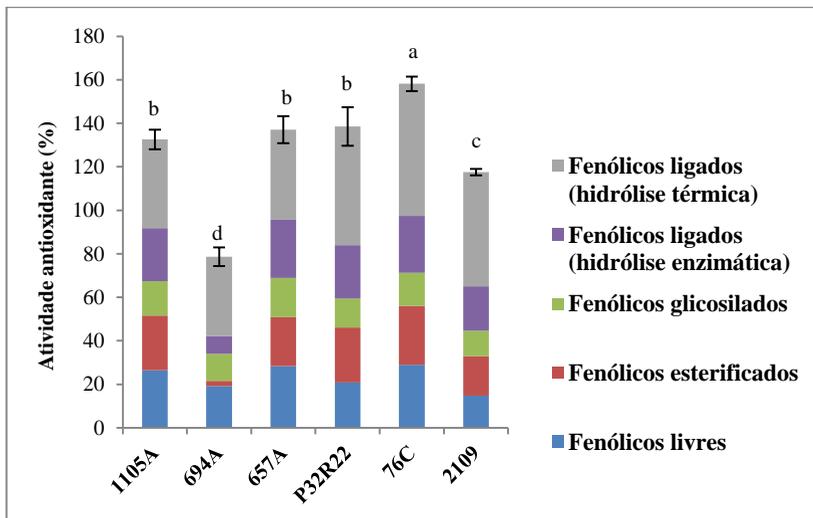


Figura 15 – Atividade antioxidante das farinhas dos grãos inteiros das variedades locais e do milho comercial determinada pelo método do DPPH. 1105A – Amarelo; 694A – Composto 8 Carreiras, 657A – Comum; P32R22 – Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão de cada extrato.

A atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH de cada um dos extratos, variou de 14,42 à 47,77%, sendo representada pela média da porcentagem de inibição do radical DPPH (Tabela 7). Dentre os fenólicos ligados, o extrato térmico apresentou atividade superior, diferindo do extrato enzimático e dos solúveis. Os resultados encontrados sugerem que os compostos fenólicos liberados pela ação térmica possuem importante atividade antioxidante e que possuem composição distinta do extrato enzimático, como verificado na análise de PCA dos perfis espectrais UV-vis (Figura 10A). Entre os compostos fenólicos solúveis, os livres apresentaram a maior atividade, seguido dos esterificados e glicosilados que mostraram a menor atividade antioxidante ($P < 0,05$).

A análise das diferenças entre as variedades de milho revelou que entre os compostos fenólicos livres, as variedades 657A e 76C apresentaram maior atividade, diferindo de 2109 e P32R22. Entre os fenólicos esterificados, a menor atividade foi encontrada na farinha da variedade 694A, a qual diferiu das demais. Para o extrato contendo os fenólicos glicosilados, 657A, 1105A e 76C apresentaram maior atividade, diferindo de 2109. Já entre os compostos fenólicos ligados, os

maiores valores do extrato enzimático foram encontrados nas variedades 657A, P32 R22, 76C e 1105A, diferindo de 694A e 2109. No extrato térmico, a variedade 76C apresentou maior atividade, diferindo das demais.

Tabela 7 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, representada pela % de inibição do radical DPPH.

Tratamento	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
1105A	26,52 ^{Bbc} (2,97)	25,14 ^{Ba} (0,85)	15,82 ^{Cab} (0,94)	24,28 ^{Ba} (0,95)	40,81 ^{Ac} (2,35)
694A	19,29 ^{Bd} (1,01)	2,31 ^{Ec} (0,54)	12,35 ^{Cbc} (0,87)	8,2 ^{Dc} (1,84)	36,52 ^{Ac} (2,25)
657A	28,39 ^{Bab} (2,12)	23,67 ^{Ba} (0,87)	18,12 ^{Ca} (0,56)	26,78 ^{Ba} (1,17)	41,34 ^{Ac} (5,85)
P32R22	20,87 ^{Bcd} (2,4)	25,25 ^{Ba} (4,49)	13,29 ^{Cbc} (1,74)	24,6 ^{Ba} (1,21)	54,58 ^{Ab} (0,81)
76C	29,04 ^{Ba} (0,56)	26,99 ^{Ba} (2,29)	15,23 ^{Cab} (0,15)	26,15 ^{Ba} (1,19)	60,76 ^{Aa} (5,03)
2109	14,78 ^{Be} (0,98)	18,2 ^{Bb} (1,15)	11,72 ^{Cc} (0,5)	20,29 ^{Bb} (0,87)	52,61 ^{Ab} (0,68)
Média Total	23,15^B	20,06^C	14,42^D	21,72^{BC}	47,77^A

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as frações ($P < 0,05$) e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho ($P < 0,05$).

A Figura 16 mostra a atividade antioxidante total, representada pela soma do que foi encontrado em cada um dos extratos, das polentas e suas respectivas farinhas. Os valores das polentas variaram de 117,61 à 180,59%, não tendo diferido das suas farinhas. A comparação da atividade antioxidante considerando as polentas, revelou que a P76C exibiu o maior valor, diferindo das demais ($P < 0,05$).

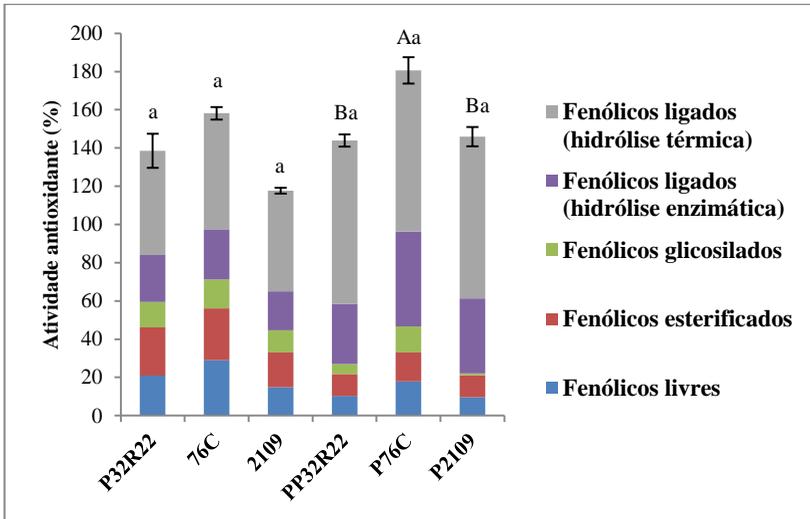


Figura 16 – Atividade antioxidante nas amostras de farinhas de grãos integrais e polentas das variedades locais e do milho comercial determinada pelo método do DPPH. P32R22 – Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca; PP32R22 – Polenta do Comercial; 76C – Polenta do Vermelho e P2109 – Polenta do Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão de cada extrato. ^{a-b} valores com letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$). ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas indicam diferenças significativas entre as polentas ($P < 0,05$).

Na Tabela 8 estão mostradas as atividades antioxidantes dos diferentes extratos das polentas e de suas respectivas farinhas. As polentas apresentaram redução significativa da atividade antioxidante nos extratos contendo os fenólicos solúveis, exceto para o extrato glicosilado da polenta P76C. Os resultados encontrados estão relacionados com o conteúdo de compostos fenólicos totais solúveis, os quais também apresentaram redução após o preparo da polenta. Por outro lado, a atividade antioxidante dos extratos contendo os fenólicos ligados das polentas foi significativamente maior, cerca de 87,96% ($P < 0,05$). Nessa mesma fração, houve aumento de 182% no conteúdo de fenólicos. Os resultados encontrados demonstraram que os fenólicos ligados exercem importante atividade antioxidante.

Tabela 8 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho e polentas contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, representada pela % de inibição do radical DPPH.

Tratamento	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
Farinhas					
P32R22	20,87 ^a (2,4)	25,25 ^a (4,49)	13,29 ^a (1,74)	24,6 ^a (1,21)	54,58 ^b (0,81)
76C	29,04 ^a (0,56)	26,99 ^a (2,29)	15,23 ^a (0,15)	26,15 ^b (1,19)	60,76 ^b (5,03)
2109	14,78 ^a (0,98)	18,2 ^a (1,15)	11,72 ^a (0,5)	20,29 ^b (0,87)	52,61 ^b (0,68)
Polentas					
PP32R22	10,3 ^{Cb} (0,37)	11,37 ^{Cb} (0,39)	7,05 ^{Db} (1,67)	35,54 ^{Ba} (4,37)	85,48 ^{Aa} (0,07)
P76C	17,95 ^{Cb} (1,68)	11,49 ^{Cb} (2,03)	9,35 ^{Da} (2,51)	49,52 ^{Ba} (1,64)	84,35 ^{Aa} (0,19)
P2109	9,66 ^{Db} (0,8)	11,39 ^{Ca} (4,61)	1,05 ^{Eb} (0,28)	39,15 ^{Ba} (1,05)	84,68 ^{Aa} (0,07)

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as frações ($P < 0,05$) e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$).

A atividade antioxidante determinada pelo ensaio de FRAP (resultados expressos em equivalentes de μM de FeSO_4) variou de 5,45 à 12,54 $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$ (Figura 17), tendo sido a maior e menor atividade encontrada nas farinhas das variedades 76C e 2109, respectivamente. Yang & Zhai (2010) ao utilizarem metodologia semelhante para a avaliação da atividade antioxidante das antocianinas de grãos de milho roxo, encontraram atividade superior, que variou de 16,2 à 18,7 $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$.

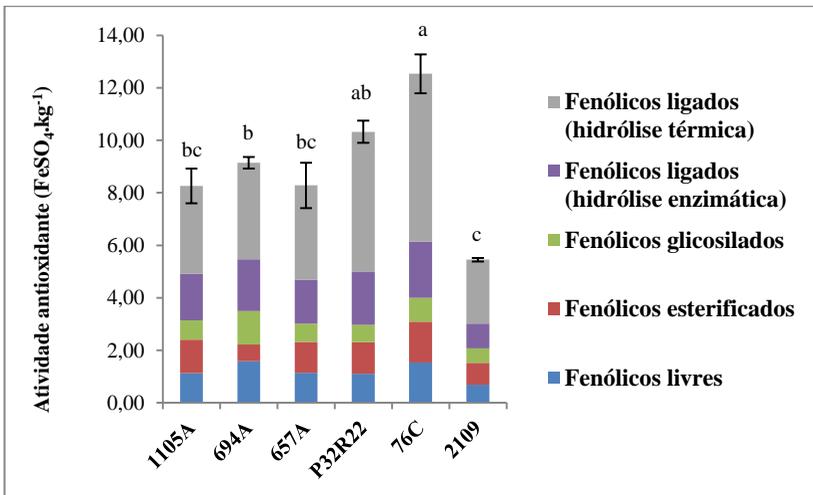


Figura 17 – Atividade antioxidante determinada pelo ensaio de FRAP das farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial. 1105A – Amarelão; 694A – Composto 8 Carreiras, 657A – Comum; P32R22 – Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão do conteúdo total. ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$).

A Tabela 9 mostra a atividade antioxidante de cada um dos extratos, determinada pelo ensaio de FRAP. Os compostos fenólicos ligados apresentaram atividade antioxidante superior, diferindo dos solúveis. Dentre os compostos fenólicos ligados, o extrato térmico apresentou atividade superior, diferindo do extrato enzimático. Entre os compostos fenólicos solúveis, os livres e esterificados apresentaram maior atividade, diferindo dos glicosilados ($P < 0,05$). Diferentemente da atividade antioxidante total, esses resultados estão de acordo com os encontrados pelo método de DPPH.

Além disso, verificou-se que dentre os extratos contendo os fenólicos solúveis, a maior e menor atividade dos livres foram encontrados nas variedades 76C e 2109, respectivamente. Da mesma forma, o extrato contendo os fenólicos esterificados de 2109 e também 694A exibiram atividade antioxidante inferior. Para o extrato glicosilado a maior atividade antioxidante foi encontrada nas farinhas de 694A. Dentre os compostos fenólicos ligados liberados por hidrólise enzimática, a menor atividade antioxidante foi encontrada no extrato da farinha de 2109, diferindo das demais. Os fenólicos ligados liberados

por hidrólise térmica da variedade 76C também apresentaram a maior atividade antioxidante pelo método de FRAP.

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, determinado pelo ensaio de FRAP ($\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tratamento	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
1105A	1,13 ^{Cb} (0,16)	1,28 ^{Cab} (0,10)	0,73 ^{Dbc} (0,02)	1,78 ^{Ba} (0,07)	3,35 ^{Ac} (0,4)
694A	1,58 ^{BCa} (0,02)	0,64 ^{De} (0,02)	1,28 ^{Ca} (0,06)	1,98 ^{Ba} (0,09)	3,67 ^{Ac} (0,27)
657A	1,15 ^{Cb} (0,10)	1,17 ^{Ccd} (0,15)	0,71 ^{Dc} (0,01)	1,67 ^{Bb} (0,04)	2,70 ^{AcD} (0,75)
P32R22	1,11 ^{Db} (0,22)	1,20 ^{Cbc} (0,13)	0,67 ^{Ec} (0,05)	2,03 ^{Ba} (0,07)	5,32 ^{Ab} (0,07)
76C	1,54 ^{Ca} (0,01)	1,55 ^{Ca} (0,05)	0,91 ^{Db} (0,03)	2,13 ^{Ba} (0,02)	6,39 ^{Aa} (0,67)
2109	0,69 ^{Cc} (0,04)	0,84 ^{Bd} (0,05)	0,54 ^{Bd} (0,02)	0,94 ^{Bc} (0,04)	2,44 ^{Ad} (0,03)
Total	7,19^C	6,68^C	4,83^D	10,53^B	24,77^A

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as frações ($P < 0,05$) e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho ($P < 0,05$).

A Figura 18 mostra a atividade antioxidante total, representando a soma do que foi encontrado em cada um dos extratos, das polentas e suas respectivas farinhas. Os valores das polentas variaram de 38,70 à 42,06 $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$, tendo sido maior comparadas às farinhas ($p < 0,05$). As polentas das farinhas das variedades P32R22, 76C e 2109 apresentaram um aumento de 274,8%, 235,65% e 618,28%, respectivamente. A polenta P76C apresentou a maior atividade antioxidante, diferindo das demais ($P < 0,05$).

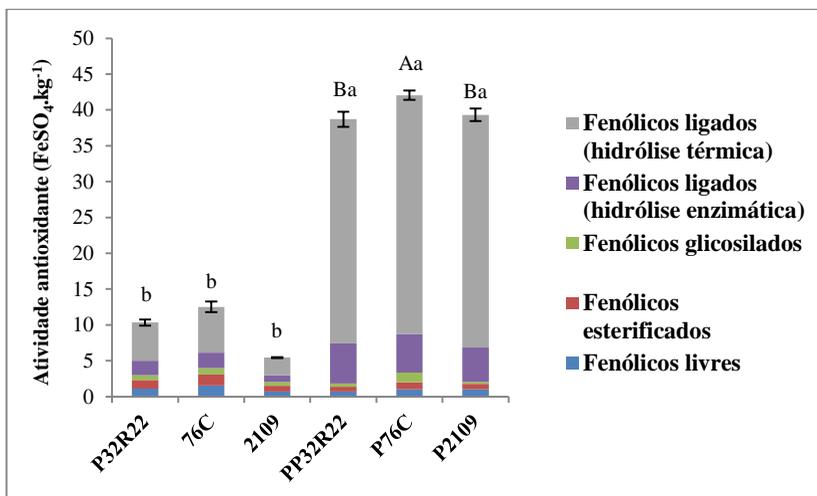


Figura 18 – Atividade antioxidante determinada pelo ensaio de FRAP das farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial. P32R22 – Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca; PP32R22 – Polenta do Comercial; P76C – Polenta do Vermelho e P2109 – Polenta do Mato Grosso Palha Branca. As barras verticais representam o erro padrão de cada extrato. ^{a-b} valores com letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$). ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas indicam diferenças significativas entre as polentas ($P < 0,05$).

Na Tabela 10 estão mostradas as atividades antioxidantes determinada pelo método de FRAP de cada um dos extratos das polentas e de suas respectivas farinhas. No extrato contendo os compostos fenólicos livres da polenta P2109, observou-se aumento significativo da atividade antioxidante, enquanto nas polentas P32R22 e P76C verificou-se redução. Já as atividades antioxidantes dos extratos esterificados e glicosilados das polentas e suas respectivas farinhas foram similares, exceto os fenólicos glicosilados da polenta P2109 que apresentou menor atividade comparado a sua farinha ($P < 0,05$). Por outro lado, a atividade antioxidante dos extratos contendo os fenólicos ligados das polentas foi significativamente maior, cerca de 397,56% ($P < 0,05$). Nessa mesma fração, houve aumento de 182% no conteúdo de fenólicos, explicando o aumento da atividade antioxidante. É importante destacar que o aumento no conteúdo de fenólicos nas polentas esteve acompanhado do aumento da atividade antioxidante, evidenciando o efeito positivo da preparação da farinha em polenta. Isto porque independentemente do método

utilizado (DPPH ou FRAP), evidenciou-se, no presente estudo, que com a preparação da polenta, ocorreu um aumento da atividade antioxidante, principalmente dos extratos contendo os fenólicos ligados.

Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos das farinhas de milho e polentas contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados, determinado pelo ensaio de FRAP ($\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tratamento	Compostos Fenólicos Solúveis			Compostos Fenólicos Ligados	
	Livre	Esterificada	Glicosilada	Enzimática	Térmica
Farinhas					
P32R22	1,11 ^a (0,22)	1,20 ^a (0,13)	0,67 ^a (0,05)	2,03 ^b (0,07)	5,32 ^b (0,07)
76C	1,54 ^a (0,01)	1,55 ^a (0,05)	0,91 ^a (0,03)	2,13 ^b (0,02)	6,39 ^b (0,67)
2109	0,68 ^p (0,04)	0,84 ^a (0,05)	0,54 ^a (0,02)	0,94 ^b (0,04)	2,44 ^b (0,03)
Polentas					
PP32R22	0,68 ^{Cb} (0,02)	0,68 ^{Cb} (0,01)	0,46 ^{Db} (0,09)	5,62 ^{Ba} (0,23)	31,25 ^{Aa} (1,00)
P76C	1,02 ^{Cb} (0,01)	0,82 ^{Db} (0,21)	0,69 ^{Db} (0,18)	5,39 ^{Ba} (0,07)	33,34 ^{Aa} (0,22)
P2109	1,01 ^{Ca} (0,05)	0,94 ^{Da} (0,16)	0,29 ^{Eb} (0,18)	4,82 ^{Ba} (0,69)	32,30 ^{Aa} (0,28)

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. Os valores entre parênteses representam o erro padrão da média. ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as variedades de milho e suas respectivas polentas ($P < 0,05$).

Da mesma forma que para o conteúdo de fenólicos, Dewanto et al. (2002) verificaram que o tratamento térmico (115°C por 25 min.) utilizado no processamento dos grãos de milho doce resultou no aumento da atividade antioxidante (44%), corroborando com a hipótese de que o processamento térmico contribui para liberação de fenólicos ligados a componentes estruturais dos grãos de milho, os quais não são degradados, mantendo a sua atividade antioxidante. De maneira similar, Oboh, Ademiluyi e Akindahunsi (2010) ao avaliarem a atividade antioxidante de farinhas de milho após processo térmico (torrefação),

verificaram um aumento médio da atividade antioxidante de 147,25%, utilizando o ensaio de FRAP. No entanto, através do método de DPPH uma redução de 26,50% após a torrefação foi observada. Esse estudo demonstrou a importância de se avaliar a atividade antioxidante através de diferentes métodos, visto que os mecanismos de ação são diferentes, dependendo da natureza química da molécula, podendo acarretar em resultados distintos (CAO & PRIOR, 1998).

Diferentemente do processamento térmico, a nixtamalização dos grãos de milho, comumente utilizado em outros Países da América do Sul, reduz significativamente (55%) a atividade antioxidante das massas. Já nas tortilhas observou-se um ligeiro aumento da atividade antioxidante comparado as suas respectivas massas (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2011), demonstrando mais uma vez que o processamento térmico auxilia na liberação de fenólicos ligados à componentes estruturais do milho, e que este é acompanhado do aumento da atividade antioxidante do alimento. O cozimento por extrusão, método alternativo a nixtamalização na preparação de tortilhas, apesar de também reduzir o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante, resulta em perdas significativamente inferiores (MORA-ROCHIN et al., 2010). Assim, o consumo de preparações culinárias à base de variedades locais de milho, como a polenta, tem se mostrado como uma importante fonte de fenólicos, contribuindo para diversos benefícios à saúde humana, em decorrência da atividade antioxidante demonstrada para aqueles compostos.

A análise de correlação entre os teores de fenólicos e a atividade antioxidante está mostrada na Tabela 11. Uma forte correlação positiva entre os valores de FRAP e DPPH (0,66) foi encontrada, mostrando que, neste caso, ambos são métodos eficientes para a determinação da atividade antioxidante. Yang & Zhai (2010) ao avaliaram a atividade antioxidante das antocianinas de grãos de milho roxo, também pelos ensaios de DPPH e FRAP, encontraram alta correlação (0,828).

Tabela 11 – Correlações lineares entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante determinada pelos métodos de DPPH e FRAP encontrados nos diferentes extratos contendo os fenólicos livres, esterificados, glicosilados e ligados das farinhas de grãos integrais e das polentas.

Extratos	CFT x FRAP	CFT x DPPH	DPPH x FRAP
Farinhas			
Livres	0,82**	0,71**	0,49**
Esterificados	0,57**	0,63**	0,83**
Glicosilados	ns	- 0,25	ns
Enzimático	ns	- 0,11	ns
Térmico	0,43**	0,83**	0,53**
Polentas			
Livres	ns	0,83**	ns
Esterificados	0,52*	ns	0,88**
Glicosilados	0,81**	0,94**	0,85**
Enzimático	0,70**	ns	ns
Térmico	0,55**	- 0,68	- 0,52
Soma dos extratos			
Farinhas	ns	ns	0,49*
Polentas	0,69**	0,73**	0,51**
Farinhas e Polentas	0,88**	0,71**	0,66**

* P<0,05, ** P<0,01.

Da mesma forma, os conteúdos de fenólicos totais e a atividade antioxidante tanto por FRAP como DPPH, incluindo a soma de todos os extratos de todas as amostras (farinhas e polentas), mostraram alta correlação (Tabela 11). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que identificaram forte correlação entre o conteúdo de antocianinas e a atividade antioxidante via DPPH (0,842) e FRAP (0,936) (Yang & Zhai, 2010). No entanto, quando a análise de correlação entre o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante foi realizada retirando-se os valores encontrados para as polentas, as correlações não foram significativas (Tabela 11). Zilic et al. (2012) também não encontraram correlação significativa entre o conteúdo de fenólicos dos grãos de milho e a atividade antioxidante dos extratos determinada pelo método de DPPH. No presente estudo, tais resultados podem ser explicados pela correlação negativa encontrada entre o conteúdo de fenólicos glicosilados e ligados liberados por hidrólise enzimática e a atividade antioxidante (DPPH). Já os extratos contendo os fenólicos livres, esterificados e ligados liberados por hidrólise térmica apresentaram correlação positiva significativa, estando correlacionado com a atividade antioxidante, tanto para as farinhas como para polentas. O extrato dos fenólicos glicosilados mostrou correlação positiva

significativa somente para as polentas. Neste caso, evidenciando o efeito positivo do processamento térmico sobre a liberação de compostos com atividade antioxidante. De uma maneira geral, nossos resultados demonstraram que os fenólicos solúveis (livres, esterificados e glicosilados) possuem atividade antioxidante efetiva, podendo agir de forma rápida e sistêmica após a sua ingestão. Por outro lado, a atividade antioxidante entre os ligados esteve associada aos liberados por hidrólise térmica, os quais devem ter uma ação localizada no intestino humano, atuando principalmente na prevenção de câncer de cólon.

6.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE é uma técnica amplamente utilizada para identificar e quantificar diversos compostos químicos, incluindo os compostos fenólicos dos grãos de milho (GONZÁLEZ-MANZANO et al., 2008; GONZÁLEZ-MUÑOZ et al., 2013; KUHNEN et al., 2011; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). No presente estudo, esta técnica foi utilizada para a identificação da composição fenólica dos diferentes extratos, através da utilização de padrões comerciais de compostos fenólicos. De acordo com a bibliografia, foram utilizados como padrões compostos previamente identificados em diferentes genótipos de milho, tais como os ácidos gálico, protocatecuico, p-hidroxibenzoico, vanílico, cafeico, siríngico, p-cumárico, sinápico, ferúlico, hidroxicinâmico, t-cinâmico, hesperidina e quercetina (BUNZEL et al., 2005; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; SALINAS-MORENO et al., 2007; ALLERDINGS et al., 2006; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009; MORA-ROCHIN et al., 2010; MONTILLA et al., 2011; URIAS-PERALDÍ et al., 2013) (Tabela 3). O método utilizado permitiu a identificação e quantificação dos ácidos ferúlico, além de um derivado, cafeico e de um derivado, p-cumárico e um derivado, sinápico, vanílico, um derivado de quercetina e um derivado do ácido p-hidrozibenzoico. No entanto, 15 diferentes compostos não foram identificados mesmo após a comparação dos tempos de retenção, perfil UV-Vis e cromatografia com padrões comerciais. No extrato contendo os fenólicos livres, 3 compostos não foram identificados, enquanto 7 e 8 compostos não foram identificados nos extratos contendo os fenólicos esterificados e glicosilados. Entre os compostos fenólicos ligados, não foram identificados 4 compostos em ambos os extratos (enzimático e térmico) (Figura 19).

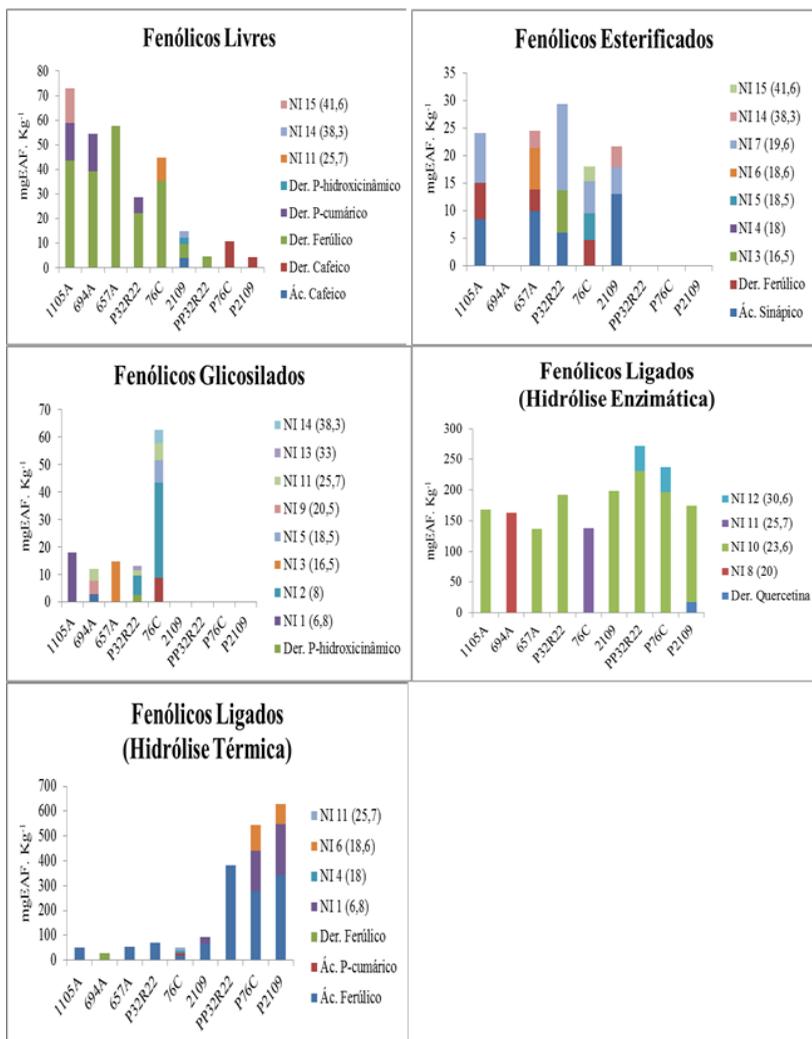


Figura 19 - Conteúdo médio de compostos fenólicos totais nas farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 1105A – Amarelão; 694A – Composto 8 Carreiras, 657A – Comum; P32R22 - Comercial; 76C – Vermelho e 2109 – Mato Grosso Palha Branca; PP32R22 – Polenta do Comercial; P76C – Polenta do Vermelho; P2109 – Polenta do Mato Grosso Palha Branca. NI - composto não identificado.

No extrato térmico, o composto majoritário foi o ácido ferúlico (Figura 19). No extrato dos fenólicos livres, o composto majoritário foi um derivado de ácido ferúlico para as farinhas de todas as variedades. Os valores de λ máximo encontrados para o ácido ferúlico foram 217, 236 e 323 nm e tempo de retenção de 20,7 min. O seu derivado apresentou os mesmos valores de λ máximo e tempo de retenção de 22,2 min. Para os extratos contendo os fenólicos esterificados e glicosilados, não detectou-se um composto majoritário entre as farinhas estudadas e muitos compostos não puderam ser identificados assim como para o extrato enzimático. Entre as polentas, foi possível observar a presença do derivado de ácido ferúlico apenas no extrato contendo os fenólicos livres da polenta comercial. No extrato térmico, o composto majoritário foi o ácido ferúlico, que apresentou conteúdo significativamente superior ao encontrado nas farinhas. O ácido ferúlico tem sido identificado em diversos genótipos de milho (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; SALINAS-MORENO et al., 2007; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009; MORA-ROCHIN et al., 2010; MONTILLA et al., 2011; URIAS-PERALDÍ et al., 2013). Este é encontrado também no arroz, trigo e aveia (ADOM & LIU, 2002), os quais juntamente com o milho, possuem quantidades muito superiores as encontradas em frutas e verduras.

Embora a cromatografia líquida permita a identificação e quantificação de inúmeras moléculas, a inexistência de padrões comerciais está entre uma das desvantagens da metodologia. Recentemente, Dobberstein & Bunzel (2010) identificaram em farelo de milho dímeros (8-8, 8-8 (ariltetralina), 8-8 (tetrahidrofurano), 5-5, 8-O-4, 8-5 (benzofurano), 5-5(metilado) e 8-5(descarboxilado)) e trímeros de ácido ferúlico (8-8 (ariltetralina), 5-5,8-O-4 e 8-O-4,8-0-4)), apresentando valores de λ máximo semelhantes ao encontrado no presente estudo, o que sugere que o derivado encontrado possa ser um dímero ou trímero de ácido ferúlico.

A comparação do conteúdo de fenólicos determinado por CLAE foi realizada apenas para os extratos dos fenólicos livres e obtidos por hidrólise térmica, uma vez que apenas nesses foi possível a identificação dos compostos majoritários (Tabela 12).

Tabela 12 – Conteúdo médio (mg de equivalentes de ácido ferúlico.kg⁻¹) do ácido ferúlico e seu derivado encontrados nos extratos livre e térmico, respectivamente, das farinhas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinados via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Tratamento	Extrato Livre	Extrato Térmico	
		Ácido Ferúlico	Derivado de Ácido Ferúlico
Farinhas			
1105A	43,67 ^b	50,61 ^b	n.d.
694A	39,21 ^b	n.d.	28,22
657A	57,57 ^a	54,03 ^b	n.d.
P32R22	22,26 ^c	69,83 ^a	n.d.
76C	35,28 ^b	17,47 ^c	n.d.
2109	5,46 ^d	66,75 ^a	n.d.
Polentas			
PP32R22	4,68	381,95 ^a	n.d.
P76C	n.d.	277,25 ^b	n.d.
P2109	n.d.	344,4 ^a	n.d.

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. ^{a-}
^{b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas das variedades de milho e polentas entre si (P<0,05).

No extrato dos fenólicos livres, as farinhas diferiram entre si quanto ao teor do derivado de ácido ferúlico. O maior conteúdo foi encontrado na farinha da variedade 657A (Figura 20), que diferiu das demais (P<0,05).

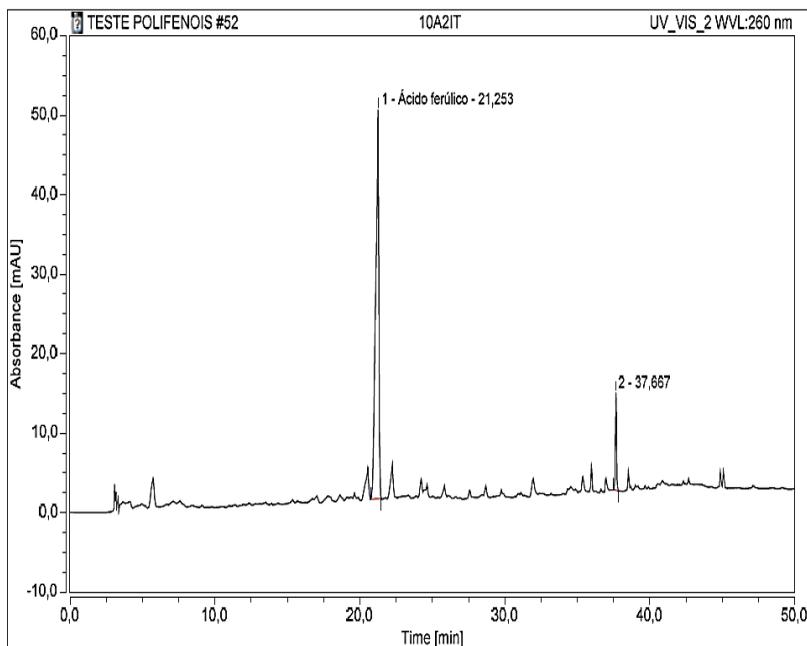


Figura 20 - Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos ligados (extrato térmico) da variedade de milho 657A, determinado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). ¹ ácido ferúlico, ² composto não identificado.

No extrato térmico, os maiores conteúdos de ácido ferúlico foram encontrados nas farinhas das variedades 657A, P32R22 e 2109, enquanto os menores conteúdos foram encontrados na farinha de 76C. O menor conteúdo de ácido ferúlico na variedade pigmentada sugere a presença de outros compostos fenólicos, uma vez que para esta variedade foi encontrado alto conteúdo de fenólicos totais determinado por Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante (Figuras 12, 14 e 16). Dentre os candidatos em potencial estão os compostos denominados de flobafenos. Estes são pigmentos insolúveis de coloração vermelha, associados aos polissacarídeos da parede celular, encontrados principalmente no pericarpo dos grãos de milho e sorgo (HASLAM, 1966; KOES et al., 2005). São classificados no grupo dos taninos condensados e ao contrário dos ácidos fenólicos, possuem estrutura complexa de difícil identificação (LEMOS, 2010; STAFFORD, 1998). A presença de flobafenos em duas variedades de milho pigmentadas daquela mesma região foi sugerida em um estudo anterior, sendo esses

compostos associados a alta atividade antioxidante, conforme Tabelas 7 e 9 (KUHNNEN, 2007).

Teores de ácido ferúlico superiores aos do presente estudo foram encontrados por Montilla et al. (2011). Os conteúdos variaram de 140 à 1.590,4 mg EAF.Kg⁻¹ nos extratos contendo os fenólicos ligados de variedades de milho boliviano. Urías-Peraldi et al. (2013) também encontraram valores superiores (863 à 2.221 mg EAF.Kg⁻¹) em variedades de milho mexicano assim como Zilic et al. (2012) (1.188,93 à 4074,1 mg EAF.Kg⁻¹).

As polentas não diferiram entre si quanto ao conteúdo de ácido ferúlico (Tabela 13). No entanto apresentaram conteúdos superiores aos das farinhas (P<0,001).

Tabela 13 – Conteúdo médio (mg de equivalentes de ácido ferúlico.kg⁻¹) do ácido ferúlico e seu derivado encontrados nos extratos térmico e livre, respectivamente, das farinhas e polentas dos grãos integrais das variedades locais e do milho comercial, determinados via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Tratamento	Extrato Livre		Extrato Térmico	
	Derivado de Ácido Ferúlico	Ácido Ferúlico	Derivado de Ácido Ferúlico	Ácido Ferúlico
Farinhas				
P32R22	22,26	69,83 ^{bc}	n.d.	
76C	35,28	17,47 ^c	n.d.	
2109	5,46	66,75 ^{bc}	n.d.	
Polentas				
PP32R22	4,68	381,95 ^a	n.d.	
P76C	n.d.	277,25 ^{ab}	n.d.	
P2109	n.d.	344,4 ^{ab}	n.d.	
Grupo Milho x Polenta		<0,001		

Os valores apresentados representam a média de três extrações independentes. ^{A-B-C} valores com letras distintas maiúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as polentas e ^{a-b-c} valores com letras distintas minúsculas sobrescritas indicam diferenças significativas entre as farinhas e suas respectivas polentas (P<0,05). n.d. não determinado.

A polenta da farinha 76C apresentou aumento de 1487,01% no conteúdo de ácido ferúlico, enquanto a polenta de P32R22 e 2109 exibiram aumentos de 446,97% e 415,95%, respectivamente. O aumento no conteúdo de ácido ferúlico é responsável, em grande parte, pelo aumento do conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante das polentas (Figuras 13, 15 e 17). Os teores de ácido ferúlico de grãos de milho, oriundos da América do Norte, submetidos à tratamento térmico, variaram de 206,21 à 331,25 mg EAF. Kg⁻¹, os quais são similares ao presente estudo (Tabela 12). No entanto, naquele estudo foi evidenciada a redução (36,9%) de ácido ferúlico após o processamento térmico.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que as variedades de milho em estudo possuem composição fenólica peculiar e que o preparo do alimento (polenta) contribuiu para o aumento do teor de fenólicos e da atividade antioxidante total, principalmente entre os fenólicos ligados. Esses resultados são de interesse uma vez que os fenólicos ligados tem sido associados a efeitos benéficos sobre a saúde, principalmente no intestino, como a prevenção do câncer de cólon. No entanto, cabe destacar que os fenólicos das demais frações (FL, FE e FG), os quais são mais biodisponíveis à absorção intestinal apresentaram redução com o preparo do alimento. Como perspectiva, espera-se que os resultados possam subsidiar a seleção de variedades com maior potencial à produção de uma farinha diferenciada e/ou extração de compostos de interesse ou elaboração de outras preparações culinárias, com maior conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante, como a variedade 76C do presente estudo. A variedade comercial apresentou valores intermediários de fenólicos e atividade, não diferindo da maioria das variedades locais. Dessa forma, os resultados encontrados sugerem a utilização das farinhas de milho como nutracêuticos (fonte de fenólicos solúveis) e a polenta como alimento funcional, principalmente pelo elevado conteúdo de ácido ferúlico, o qual tem sido associado à prevenção do câncer de cólon.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-ESTRADA, B.A. et al. Improvement of dietary fiber, ferulic acid and calcium contents in pan bread enriched with nejayote food additive from white maize (*Zea mays*). **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 6, 2014.

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

ADOM, K.K.; LIU, R.H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6182–6187, 2002.

AGUAYO-ROJAS, J. et al. Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Tortillas Obtained after Lime-Cooking Extrusion Process of Whole Pigmented Mexican Maize. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 67, p. 178-185, 2012.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2010.

ALLERDINGS, E. et al. Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1276-1286, 2006.

ALTIERI, M.A. **Agroecologia: Bases científicas para una agricultura sustentable**. Editorial Nordan–Comunidad. 1999.

ALVES, A.C. et al. Variedades locais de milho e a agricultura familiar do Extremo Oeste Catarinense. In: CANCI, A.; VOGT, G.A.; CANCI, I.J. A diversidade das espécies crioulas em Anchieta: diagnóstico, resultados de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade. São Miguel do Oeste: Mclee, p. 67-85, 2004.

ÂNGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Br.**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANTOLOVICH, M., et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

BASHO, S.M.; BIN, M.C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n. 1, 2010.

BENZ, B.F. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guila Naquitz, Oaxaca. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 2104–2106, 2001.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70-76, 1996.

BOEF, W.S. et al. **Community Biodiversity Management: Promoting resilience and the conservation of plant genetic resources**. USA: Routledge, 2013, 418p.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, n. 2, p. 211–252, 1964.

BOYER, C.D.; HANNAH, C. **Kernel Mutants of Corn**. In: Hallauer, A.R. Specialty Corns. 2 ed., USA: CRC Press LLC, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999: Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2ae442804cb7934a834797c8a8d1b925/RESOLU%C3%87%C3%83O+N%C2%BA+18.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 12/05/2014.

BRASIL. Lei Nº 10.711, de 5 de agosto de 2003: Anexo – regulamento da lei no 10.711. Que dispõe sobre o sistema nacional de sementes e mudas – SNSM. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110711.htm. Acessado em 05 de Maio de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília, DF, 2006.

BUNZEL, M. et al. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 5845-5850, 2005.

CABRERA-SOTO, M.L. et al. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. **Agrociencia**, v. 43, p. 827-839, 2009.

CAMPOS, A.V. **Milho crioulo: sementes de vida - Pesquisa, melhoramento e propriedade intelectual**. Editora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Campus de Frederico Westphalen. Rio Grande do Sul, 2007.

CANCI, A. **Sementes crioulas: construindo soberania, a semente na mão do agricultor**. São Miguel do Oeste: McLee, 2002, 161 p.

CANCI, A. et al. **The diversity kit: restoring farmer's sovereignty over food, seed and genetic resources in Guaraciaba, Brazil**. In: BOEF, W.S. et al. *Community Biodiversity Management: Promoting resilience and the conservation of plant genetic resources*. USA: Routledge, 2013, 418p.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Comparason of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum . **Clin Chem**, v. 44, p. 1309-1315, 1998.

CHIREMBA, C. et al. Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. **Food Chemistry**, v. 134, p. 81-88, 2012.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; BINSFELD, P.C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.

CORTÉS, G.A. et al. Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 57-62, 2006.

COSTA, F.M. **Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação *on farm* e *ex situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina.** Dissertação p. 212. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis. Santa Catarina . 2013.

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

DEWANTO, V. et al. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 50, p. 4959-4964, 2002.

DOBBERSTEIN, D.; BUNZEL, M. Separation and Detection of Cell Wall-Bound Ferulic Acid Dehydrodimers and Dehydrotrimers in Cereals and Other Plant Materials by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8927-8935, 2010.

DOEBLEY, J. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. **BioScience**, v. 40, n. 6, p. 443-448, 1990.

DOEBLEY, J.; STEC, A. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. **Genetics**, v. 129, p. 285–295, 1991.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; BIETZ, J.A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 105-108, 1993.

DORWEILER, J.; STEC, A.; KERMICLE, J.; DOEBLEY, J. Teosinte glume architecture 1: a genetic locus controlling a key step in maize evolution. **Science**, v. 262, p. 233–235, 1993.

FAO (Food and Agriculture Organization). Maize in Human Nutrition. Rome:FAO, 1992. 168 p.

FAO. FAOSTAT. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 21/04/2014.

FARDET et al. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, v. 48, p.258-276, 2008.

FORKMANN, G.; MARTENS, S. Metabolic Engineering and applications of Flavonoids. **Plant Biotechnology**, v. 12, p. 155-160, 2001.

FREITAS, F.O. et al. DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. **Journal of Archaeological Science**, v. 30, p. 901-908, 2003.

FUMI, M.D. et al. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 568-573, 2011.

GALINAT, W.C. **The origin of corn**. In G.F. Sprague, ed. Corn and corn improvement, p. 1 -47. Madison, Wis., USA, Am. Soc. Agron, 1977.

GARCIA, Rosa Wanda Diez. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. **Revista Nutrição**, Campinas – SP, v. 16, n. 4, 2003.

GLIESMANN, S.R. **Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture**. Sleeping Bear Press. 1998.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. **Food Chemistry**, v. 96, p. 131–136, 2006.

GONZÁLEZ-MANZANO S. et al. Flavanol– anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 521-526, 2008.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, A. et al. Potential of Chilean Native Corn (*Zea mays* L.) Accessions as Natural Sources of Phenolic Antioxidants and in Vitro Bioactivity for Hyperglycemia and Hypertension Management.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 61, p. 10995-11007, 2013.

GOODMAN, M. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E., VIÉGAS, G. P.

Melhoramento e Produção do milho, São Paulo: Fundação Cargill, v. 1, 1987.

HALLAUER, A.R. **Specialty Corns**. CRC Press, 2 ed., 2001.

HARBORNE, J.B. Flavonoid in the Environment: Structure-Activity Relationships. In **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical Cellular and Medicinal Properties**. New York: Alan R. Liss, 1988.

HARBORNE, J.B. Nature, Distribution and Function of Plant Flavonoids. In **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships**. New York: Alan R. Liss, 1986.

HARDON, J.J.; BOEF, W.S. **Linking farmers and plant breeders in local crop development**. In: BOEF, W.S. et al. (Ed.). *Cultivating Knowledge. Genetic diversity, farmers experimentation and crop research*. London: Intermediate Technology Publications, 1993.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins**. London: Academic Press, 1966. 179p.

HOLGUÍN-ACUÑA, A.L. et al. Maize bran/oat flour extruded breakfast cereal: A novel source of complex polysaccharides and an antioxidant. **Food Chemistry**, v. 111, p. 654-657, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: estatística de produção agrícola, 2013. Disponível em ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2013/estProdAgr_201309.pdf. Acesso em 21/04/2014.

IOANNOU, I.; HAFSA, I.; HAMDI, S.; CHARBONNEL, C.; GHOUL, M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 208-217, 2012.

KIM, M.J. et al. Relationship between 178 phenolic compounds, anthocyanin content and antioxidant activity in colored barley germoplasm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4802-4809, 2007.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous Extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends in Plant Science**, v.10, n. 5, p. 236-242, 2005.

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*zea mays* L.)**. Tese p. 267. (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis. Santa Catarina . 2007.

KUHNEN, S.; OGLIARI, J. B. DIAS, P. F.; BOFFO, E. F.; CORREIA, I.; FERREIRA, A. G.; DELGADILLO, I. MARASCHIN, M. ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. **International Journal of Food Science and Technology**. v.45, p. 1673–1681, 2010a.

KUHNEN, S.; OGLIARI, J. B.; DIAS, P. F.; SANTOS, M. S.; FERREIRA, A. G.; BONHAM, C. C.; VERNON WOOD, K.; MARASCHIN, M. Metabolic Fingerprint of Brazilian Maize Landraces Silk (Stigma/Styles) Using NMR Spectroscopy and Chemometric Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2194–2200, 2010b.

KUHNEN, S. et al. Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1548-1553, 2011.

KUHNEN, S. et al. Phenolic content and ferric reducing-antioxidant power of cow's milk produced in different pasture-based production systems in southern Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 3110-3117, 2014.

LAGO et al. Development and study of a maize cultivar rich in anthocyanins: coloured polenta, a new functional food. **Plant Breeding**, v. 133, p. 210-217, 2014.

LAPIERRE, C. et al. The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. **Phytochemistry**, v. 57, p. 765-772, 2001.

LEMOS, P. M. M. **Determinação do metaboloma foliar parcial de variedades crioulas de milho (Zea mays), visando a caracterização dos extratos foliares contendo (poli)fenóis e carotenóides**. 220 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos e Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 2010. 220 p.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M. Phytochemical diversity: the sounds of silent metabolism. **Plant Science**, v. 176, p. 161-169, 2009.

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

LOPEZ-MARTINEZ, L.X., PARKIN, K.L.; GARCIA, H.S. Phase II-Inducing, Polyphenols Content and Antioxidant Capacity of Corn (*Zea mays* L.) from Phenotypes of White, Blue, Red and Purple Colors Processed into Masa and Tortillas. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 66, p. 41-47, 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANGELSDORF, P.C.; REEVES, R.G. The origin of Indian corn and its relatives. Bulletin No. 574, Texas Agric. Exp. Stn., College Station, Texas, USA, 1939.

MARASCHIN, M.; KUHNEN, S.; LEMOS, P. M.M.; OLIVEIRA, S. K. et al. **Metabolomics and Chemometrics as Tools for Chemo(bio)diversity Analysis - Maize Landraces and Propolis Chemometrics in Practical Applications**. 2012.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, G.J.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize

shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 99, p. 6080–6084, 2003.

MÉLIDA, H. et al. The phenolic profile of maize primary cell wall changes in cellulose-deficient cell cultures. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1684-1689, 2010.

MÉNDEZ, L.I.R. et al. Nutraceutical Properties of Flour and Tortillas Made with an Ecological Nixtamalization Process. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 10, 2013.

MENEGUETTI, G. A. et al. Milho crioulo: tecnologia viável e sustentável. **Revista de Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 3, n. 1, 2002.

MONTILLA, E.C. et al. Soluble and Bound Phenolic Compounds in Different Bolivian Purple Corn (*Zea mays L.*) Cultivars. **Journal of Agricultural and Cereal Science**, v. 59, p. 7068-7074, 2011.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

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

NIKOLIC, Z. et al. Qualitative triplex PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.**, v. 22, n. 3, 2008.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 1, p. 81-116, 2001.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A.O.; AKINDAHUNSI, A.A. The effect of roasting on the nutritional and antioxidant properties of yellow and white maize varieties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1236–1242, 2010.

OGLIARI, J. B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: **Community Biodiversity Management** – Promoting resilience and the conservation of plant genetic resources. Ed. Earthscan from Routledge, 2013.

OGLIARI, J.B. et al. Manejo e uso participativo de variedade crioula de milho como estratégia de conservação: experiência do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade no Oeste de Santa Catarina. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.

OHASHI, H. et al. 5-Hydroxyferulic acid in *Zea mays* and *Hordeum vulgare* cell walls. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, 1915-1916, 1987.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v. 100, p. 956-963, 2007.

PONCIANO, N.J.; SOUZA, P.M.; REZENDE, A.M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, v. 104, p. 23-40, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Viena, Áustria, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acessado em: 15 de junho de 2014.

REBOLLAR, P.B.M.; MILLER, P.R.M.; CARMO, V.B. Desenvolvimento rural e práticas tradicionais de agricultores familiares: o caso do milho no Vale do Rio Capivari, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 174-186, 2010.

ROUAU, X. et al. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. **Phytochemistry**, v. 63, p. 899-903, 2003.

SALINAS-MORENO, Y. et al. Phenolic compounds of maize grain and their relationship with darkening in dough and tortilla. **Agrociencia**, v. 41, p. 295-305, 2007.

SHIVA, V. A biodiversidade tem diferentes propriedades que podem ser utilizadas para satisfazer as necessidades humanas. In: CAMPOS, A.V. (2007). **Milho crioulo: sementes de vida - Pesquisa, melhoramento e**

propriedade intelectual. Editora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Campus de Frederico Westphalen. Rio Grande do Sul. Brasil. (2001).

SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6^a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINGLETON, V.L. & ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SMET, K. et al. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 520–530, 2008.

SOEIRO, B.T. et al. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 618-624, 2010.

SÓLYOM, K. et al. Thermal degradation of grape marc polyphenols. **Food Chemistry**, v. 159, p. 361-366, 2014.

STAFFORD, H.A. Teosinte to maize some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of pathways. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 285-293, 1998.

STALLER, J.E. **Maize Cobs and Cultures: History of *Zea mays* L.** Springer: Chicago, USA, 2009.

STAVE, J.W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations and practical considerations. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 780-786, 2002.

STYLES, E.D.; CESKA, O. Flavonoid pigments in genetic strains of maize. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3019-3021, 1972.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 4^a ed, Campinas – SP, 2011.

THURSTON, H.D. et al. **Tradicional management of agrobiodiversity**. In: WOOD, D; LENNÉ, J.M. (Ed.). *Agrobiodiversity: characterization, utilization and management*. Wallingford: CABI Publishing, 1999.

UDRY, C.V.; DUARTE, W. **Uma história brasileira do milho**: o valor dos recursos genéticos. Brasília: Paralelo, 2000.

URIAS-PERALDÍ, M. et al. Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. **Field Crops Research**, v. 141, p. 69-76, 2013.

VARELLA, C.A.A. **Análise Multivariada Aplicada as Ciências Agrárias: Análise de Componentes Principais**. Seropédica: UFRJ, 2008.

VOGT, G.A. et al. Retrato do sistema de manejo de variedades locais de milho em Anchieta/SC. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

WANG, B.N. et al. Distribution of Phenolic Acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1288-1292, 2011.

WATSON, J.D.; BERRY, A. **DNA: o segredo da vida**. Tradução de Malferrari CA. São Paulo. Companhia das letras, 2005, 470p.

WHO. World Health Organization. **Promoting fruit and vegetable consumption around the world**. Information Sheet [Online].World Health Organization, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.

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**, v. 11, p. 169-176, 2010.

ZEVEN, A.C. Landraces: a review of definitions and classifications. **Euphytica**, v. 104, p. 127-139, 1998.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M.H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691-702, 2008.

ZILIC, S. et al. Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1224-1231, 2012.