

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATO VEGETAL E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE
MILHO SUPER DOCE UENF SD08 E UENF SD09**

LORENA PROVALERO MENDANHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**CAMPOS DOS GOYTCAZES – RJ
SETEMBRO/2022**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATO VEGETAL E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE
MILHO SUPER DOCE UENF SD08 E UENF SD09**

LORENA PROVALERO MENDANHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dsc. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO/2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M537

Mendanha, Lorena Provalero.

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATO VEGETAL E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE MILHO SUPER DOCE UENF SD08 E UENF SD09 / Lorena Provalero Mendanha. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

79 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientadora: Daniela Barros de Oliveira.

1. *Zea Mays* L.. 2. Bioativos. 3. Compostos fenólicos. 4. CLAE. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATO VEGETAL E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE
MILHO SUPER DOCE UENF SD08 E UENF SD09

LORENA PROVALERO MENDANHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em: 01/09/2022

Comissão Examinadora:

Prof.^a Luana Pereira de Moraes (D.Sc., Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UENF

Prof.^a Sílvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Engenharia e Ciência dos Materiais) - UENF

Prof.^a Sheila Andrade Abrahão Loures (D.Sc., Ciência dos Alimentos) – IFFluminense

Prof.^a Daniela Barros de Oliveira (D.Sc, Química de Produtos Naturais) – UENF – Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por me ajudar e me guiar todos os dias de minha vida. Por ser minha força, minha alegria e meu refúgio. Agradeço a minha Mãezinha Nossa Senhora de Fátima por interceder em minha vida e interceder por meus pedidos junto de Jesus Cristo.

A UENF agradeço pela oportunidade de desenvolver meu trabalho de mestrado e à CAPES pelo fomento da bolsa, sem financiamento não há pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Daniela de Oliveira Barros por me orientar e por me auxiliar a percorrer os caminhos durante o mestrado, além de orientadora também se tornou uma querida amiga.

Agradeço as membras da banca que participaram deste momento tão importante. Em especial a professora Sheila Abrahão que esteve presente em momentos muito importantes durante minha trajetória acadêmica. Um agradecimento também a Silvia e Luana pelas contribuições.

A minha mãe, Ana Lucia, agradeço por seu o bem maior de minha vida, minha fortaleza, minha rede de apoio e minha maior incentivadora. Mãe, sem você eu não seria metade do que sou hoje. Você é incrível, obrigada por tudo!

Ao meu pai Gilmar agradeço, pois, também teve sua importância durante

esse período. Agradeço meus familiares que foram importantes na construção de quem sou hoje.

Ao meu namorado Paulo Henrique agradeço por seu meu ombro amigo, meu companheiro e meu maior incentivador, meu amor, você foi fundamental para que eu me mantivesse bem durante esse período tão desafiador.

A todas colegas que dividiram casa comigo durante minha estadia em Campos, Dandara, Gessica, Amanda e em especial minha amiga Juliana que foi minha companheira e ombro amigo desde o início.

A minha colega de laboratório Taynara a qual compartilhei inúmeros momentos maravilhosos, engraçados e de enorme aprendizado, Tay, você foi uma das melhores coisas que a pós graduação me presenteou.

As técnicas de laboratório, Valdineia e Aninha do LTA que sempre me ajudaram quando precisei. Ao professor Alexandre do LFIT que sempre me auxiliou para liofilizar minhas amostras e os alunos do laboratório do professor Ivo.

A Silvia faço um agradecimento especial pois construímos uma relação incrível, ela me ensinou todos os dias em que estivemos juntas e eu a ensinei um pouco do que sei. Obrigada pela ajuda, por ser companheira e por não me deixar perder a fé. Você vai estar pra sempre no meu coração!

Agradeço aos meus amigos Gustavo, Caroline, Raíza, Letícia, Diego, Adaelson, Lívia, Lísia, a minha tia Jacinta, meu primo e afilhado Gustavo, minha sogra querida Nair, minhas cunhadas Jaqueline e Janaína, Elano e meu sobrinho Lázaro. Agradeço também meus familiares, Vera, Vinícius, João, Izabella, Renato, Lucas, Licia e em especial minha afilhada Zoe. A minha avó Maria de Lourdes um agradecimento especial e dedicatória, Vó, com muito orgulho sou sua primeira neta a ser Mestre.

Agradeço a minha psicóloga Myllena Ferraro que foi responsável por me ajudar a vencer um período bastante difícil com leveza e me ensinou a aceitar minhas vulnerabilidades.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente dessa caminhada, vocês foram importantes pra que eu pudesse concluir.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 O milho (<i>Zea mays</i> L.)	4
3.1.1 Estrutura, composição e características nutricionais do milho	5
3.1.2 O Milho Doce e o Milho Super Doce	6
3.2 Alimentos funcionais e compostos bioativos	8
3.2.1 Principais compostos bioativos no grão de milho	11
3.2.1.1 Compostos fenólicos – Ácidos Fenólicos	13

3.3 Radicais livres e substâncias antioxidantes	18
3.4 Cromatografia.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS _____	22
4.1 Material	22
4.2 Obtenção do extrato vegetal	23
4.3 Fracionamento do extrato vegetal.....	23
4.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	26
4.5 Cromatografia em Coluna	26
4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	27
4.7.1 Método DPPH fotolorimétrico	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	30
5.1 Análises cromatográficas	30
5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	30
5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	33
5.1.2.1 Cromatograma do extrato bruto metanólico	34
5.1.2.2 Cromatograma da fração butanólica	37
5.1.2.3 Cromatograma da fração C1	41
5.1.2.4 Cromatograma da fração acetato de etila	42
5.1.2.5 Cromatograma da fração A3	46
5.1.2.6 Cromatograma da fração A4	48
5.3 Atividade antioxidante	52
6. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos bioativos identificados em milho.....	12
Figura 2. Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico.....	14
Figura 3. Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico.....	14
Figura 4. Biossíntese de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico.....	16
Figura 5. Biossíntese de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico.....	17
Figura 6. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.....	19
Figura 7. Fluxograma de obtenção de extratos e frações.....	24
Figura 7 (continuação). Fluxograma de obtenção de extratos e frações.....	25
Figura 8. Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante.....	29
Figura 9. Cromatograma em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e das frações obtidas a partir do extrato metanólico de milho super doce UENF SD08 e UENF SD09 mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol:	

ácido acético: água (3:1:1), revelação física em luz UV 254/365nm e química com sulfato cérico, respectivamente.....	32
Figura 10. Cromatograma do extrato bruto de milho super doce.....	35
Figura 11. Espectro UV do pico 1 (sinalizado em azul na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce.....	35
Figura 12. Espectro UV do pico 2 (sinalizado em vermelho na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce.....	35
Figura 13. Espectro UV do pico 3 (sinalizado em verde na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce.....	36
Figura 14. Cromatograma da fração butanólica.....	37
Figura 15. Espectro UV do pico 1 (sinalizado em roxo na Figura 14) da amostra de fração butanólica.....	37
Figura 16. Espectro UV do pico 2 (sinalizado em amarelo na Figura 14) da amostra de fração butanólica.....	38
Figura 17. Espectro UV do pico 3 (sinalizado em azul na Figura 14) da amostra de fração butanólica.....	38
Figura 18. Espectro UV do pico 4 (sinalizado em amarelo na Figura 14) da amostra de fração butanólica.....	39
Figura 19. Cromatograma da fração C1.....	40
Figura 20. Espectro UV do pico da fração C1.....	41
Figura 21. Cromatograma da fração acetato de etila.....	42
Figura 22. Espectro UV do pico 1 (sinalizado em vermelho na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila.....	42
Figura 23. Espectro UV do pico 2 (sinalizado em verde na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila.....	43
Figura 24. Espectro UV do pico 3 (sinalizado em laranja na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila.....	43
Figura 25. Espectro UV do pico 4 (sinalizado em azul na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila.....	44
Figura 26. Estrutura química do ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico.....	44
Figura 27. Cromatograma da fração A3.....	45

Figura 28. Espectro UV do pico 1 (sinalizado em vermelho na Figura 26) da amostra de fração A3.....	45
Figura 29. Espectro UV do pico 2 (sinalizado em laranja na Figura 26) da amostra de fração A3.....	46
Figura 30. Espectro UV do pico 3 (sinalizado em azul na Figura 26) da amostra de fração A3.....	46
Figura 31. Cromatograma da fração A4.....	47
Figura 32. Espectro UV do pico 1 (sinalizado em verde na Figura 30) da amostra de fração A4.....	48
Figura 33. Espectro UV do pico 2 (sinalizado em vermelho na Figura 30) da amostra de fração A4.....	48
Figura 34. Espectro UV do pico 3 (sinalizado em laranja na Figura 30) da amostra de fração A4.....	48
Figura 35. Espectro UV do pico 4 (sinalizado em azul na Figura 30) da amostra de fração A4.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alelos utilizados em híbridos de milho doce.....	7
Tabela 2. Grupos de substâncias bioativas e respectivos compostos bioativos.....	10
Tabela 3. Sistema de gradiente utilizado para a realização de CLAE.....	28
Tabela 4. Absorbância máxima UV λ_{\max} de ácidos fenólicos.....	34
Tabela 5. Atividade antioxidante pelo método DPPH das amostras e dos padrões de referência.....	52

RESUMO

MENDANHA, Lorena Provalero; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2022. AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE EXTRATO VEGETAL E VALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOTRAS DE MILHO SUPER DOCE UENF SD08 E UENF SD09. Orientadora: Prof(a). D.Sc. Daniela Barros de Oliveira.

O milho é um alimento de grande importância econômica e é bastante utilizado em diversas preparações. O milho super doce, uma das cultivares de milho, tem sua produção voltada para a alimentação humana. Neste trabalho, foram realizados estudos sobre o perfil químico do extrato vegetal e atividade antioxidante. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos – LTA/UENF. O material sólido foi submetido a extração por maceração estática em metanol, filtrado, evaporado e seco. Após a obtenção do extrato bruto vegetal foram realizadas as demais análises. O extrato foi separado em uma partição líquido-líquido em três principais frações de acordo com polaridade dos solventes. As frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e foram levadas para as colunas cromatográficas de purificação. A cada resultado obtido de uma fração foi realizado uma análise de CCD para avaliar o material obtido. As frações que

apresentavam aspectos característicos de ácidos fenólicos foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foram obtidos os cromatogramas das frações e do extrato bruto e os respectivos espectros. A partir de dados na literatura, e comparando com os dados obtidos, pôde-se caracterizar a possível presença de ácidos fenólicos no extrato. Com a leitura dos espectros, observou-se a possível presença de ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico. No ensaio antioxidante realizado, observou-se que as amostras tiveram resultados positivos de capacidade antioxidante frente ao radical DPPH. O que corrobora com a presença de compostos com atividade antioxidante na amostra. Os resultados obtidos aumentam o conhecimento acerca da cultivar produzida na UENF e demonstram a presença de compostos fitoquímicos nas amostras.

Palavras chaves: cromatografia; compostos bioativos; alimentos funcionais.

ABSTRACT

MENDANHA, Lorena Provalero; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2022. EVALUATION OF THE CHEMICAL PROFILE OF PLANT EXTRACT AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SUPER SWEET CORN SAMPLES UENF SD08 AND UENF SD09. Advisor: Daniela Barros de Oliveira.

Corn is a food of great economic importance and is widely used in various preparations. Super sweet corn, one of the varieties of corn, is produced for human consumption. In this work, studies were carried out on the chemical profile of the plant extract and antioxidant activity. The work was developed at the Food Technology Laboratory – LTA/UENF. The solid material was subjected to extraction by static maceration in methanol, filtered, evaporated and dried. After obtaining the crude plant extract, the other analyzes were performed. The extract was separated in a liquid-liquid partition into three main fractions according to solvent polarity. The fractions obtained were analyzed by Thin Layer Chromatography (TCD) and were taken to the chromatographic columns for purification. For each result obtained from a fraction, a TCD analysis was performed to evaluate the material obtained. The fractions that presented characteristic aspects of phenolic acids were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The chromatograms of the fractions and the

crude extract and the respective spectra were obtained. From data in the literature, and comparing with the obtained data, it was possible to characterize the possible presence of phenolic acids in the extract. With the reading of the spectra, the possible presence of gallic acid and p-hydroxybenzoic acid was observed. In the antioxidant assay performed, it was observed that the samples had positive results of antioxidant capacity against the DPPH radical. This corroborates the presence of compounds with antioxidant activity in the sample. The results obtained increase the knowledge about the cultivar produced at UENF and demonstrate the presence of phytochemical compounds in the samples.

Keywords: chromatography; bioactive compounds; functional foods.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos que possuem atividade antioxidante têm despertado interesse, principalmente devido a ação desses compostos no estresse oxidativo, mas as formas de interações moleculares e mecanismos de bioatividade desses compostos ainda proporcionam um desafio para os cientistas (Costa e Rosa, 2016).

Os estudos acerca de compostos naturais que apresentem atividade antioxidante vêm se intensificando nos últimos anos, pois eles podem atuar como uma alternativa para prevenir o estresse oxidativo produzido no organismo e atuarem como substitutos de antioxidantes sintéticos, que a longo prazo pode causar reações tóxicas ao organismo. A busca por substâncias com potencial antioxidante, principalmente de origem natural, tem sido objeto de diversos estudos, pois contribui para o interesse científico como uma possibilidade no desenvolvimento de novos medicamentos destinados ao tratamento de patologias relacionadas aos radicais livres, como doenças neurodegenerativas e degenerativas (Nariya, et al., 2012; Colegate e Molyneux, 2007).

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em uma variedade de produtos naturais. Em fontes vegetais, os compostos antioxidantes são

encontrados em frutas, hortaliças, ervas (utilizadas no preparo de chás), sementes e em alguns cereais (Oliveira, et al., 2009).

As substâncias presentes nessas fontes que são capazes de agir como antioxidantes, são os minerais, as vitaminas, flavonoides e compostos fenólicos (Andreo e Jorge, 2006).

O milho comum (*Zea mays L.*) possui grande importância econômica, além da importância nutricional. É fonte de importantes nutrientes na alimentação humana e animal, em alguns estados do Brasil compõem as principais refeições (Oliveira Junior et al., 2011). De acordo com dados da Embrapa Milho e Sorgo, na safra 2019/2020 o levantamento foi de 196 espécies de cultivares disponíveis no mercado de sementes do Brasil. Tal diversidade, garante a produção de diversos tipos de milho em condições adversas (Pereira Filho e Borghi, 2020).

Dentro da pluralidade em espécies de milho, encontram-se o milho doce e super doce. São espécies de milho que possuem gene mutante que confere um aumento na conversão de açúcares no endosperma do grão, garantindo maiores teores de açúcares e maior palatabilidade. Comumente, o milho doce possui maior interesse para o consumo "*in natura*", no entanto pode ser encontrado também em conserva, e no geral sua utilização é voltada para a alimentação humana (Kwiatkowski e Clemente, 2007).

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, nos últimos anos, tem atuado no melhoramento genético de espécies de milho para a região do Norte e Noroeste do Rio de Janeiro. O milho super doce UENF SD08 e UENF SD09 são cultivares desenvolvidas na UENF após anos de estudos que foram registradas junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento, com base nas características de maior interesse selecionadas de estudos realizados anteriormente (Gonçalves, 2019).

Apesar da importância econômica e nutricional do milho super doce, os estudos são escassos. Neste sentido, o presente trabalho analisou o perfil fitoquímico do extrato metanólico bruto e frações de grãos de milho super doce UENF SD08 e UENF SD09 e avaliou o potencial antioxidante dos extratos da espécie, por meio do método do sequestro do radical livre DPPH.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho é analisar o perfil químico do extrato de grãos de milho super doce (*Zea mays* L.) cultivares UENF SD 08 e UENF SD 09 a fim de identificar compostos bioativos no extrato vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato vegetal a partir de grãos de milho super doce por maceração estática;
- Obter as frações a partir da partição líquido-líquido por ordem de polaridade de solventes;
- Purificar as frações obtidas em coluna;
- Determinar o perfil químico do extrato vegetal bruto de milho e suas frações;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto de milho e de suas frações.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O milho (*Zea mays* L.)

O milho é um cereal, pertence à família Poaceae, cultivado em todo o mundo, sendo uma das culturas mais cultivadas mundialmente (Guia do Milho, 2006). Em termos econômicos, o milho é uma das vertentes extremamente importantes do agronegócio brasileiro. Sua produção primária corresponde a cerca de 37% dos grãos produzidos no país e em números, passou de 35.715,6 mil toneladas, no ano de 1997, para 102 milhões de toneladas nos anos de 2019/2020, em que aproximadamente 66% atende ao consumo do país (CONAB, 2021).

No panorama mundial, os três principais produtores são: Estados Unidos, China e Brasil, que juntos somam 66,39% da produção total no mundo. Sendo que no Brasil sua produção se concentra principalmente no Centro-oeste e Sul (Artuzo et al., 2018).

A utilização do milho é variada, cerca de 70% da produção é voltada para a alimentação animal, no entanto, também é utilizado na alimentação humana e nas indústrias de alimentos e de alta tecnologia (Paes, 2006). Tal multiplicidade de uso é o que confere ao milho sua grande importância. Nos últimos anos houve um maior incentivo de utilização do milho na produção de etanol, uma alternativa

de produção de biocombustível em países da Europa e nos Estados Unidos. Na alimentação humana, o milho representa fonte de importantes nutrientes, garantindo energia, sendo em alguns estados do Brasil o principal alimento da dieta, aparecendo em diversos pratos e preparações (Menegaldo, 2011).

Quando se fala de subprodutos ou derivados de milhos, fala-se de três vertentes principais: o uso para consumo humano, o consumo animal e a utilização na indústria. Em relação ao processamento desses produtos, no Brasil, as principais formas são a moagem via seca e a moagem por via úmida. A moagem por via seca irá resultar em alimentos como o fubá, o milho debulhado, a quirera e os farelos de milho; já a moagem por via úmida produz principalmente o amido, o gérmen e a farinha de milho (Ponciano et al., 2011).

Segundo Strazzi (2015), o aumento da demanda dos produtos e derivados do milho para o consumo humano cresce de acordo com a procura por alimentos funcionais, como probióticos, alimentos prontos, congelados e de rápido preparo. Dessa forma, o estudo de híbridos se torna extremamente importante, tanto para garantir que a demanda crescente seja suprida na alimentação e na indústria, quanto para melhorar o rendimento e a qualidade do cereal.

3.1.1 Estrutura, composição e características nutricionais do milho

Segundo Paes (2006), a estrutura física do milho se apresenta, no geral, com aspecto amarelo ou branco, podendo variar entre a coloração preta a vermelha. É composto em média por 72% por amido, 9,5% por proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo, em sua base seca.

Seu grão é dividido em quatro estruturas principais: endosperma, gérmen, pericarpo (ou casca) e ponta, sendo que cada um desses apresenta diferentes composições químicas. De acordo com Lima, Paes e Queiroz (2011), o endosperma corresponde, em média, a 83% do peso seco do grão, com constituição predominante de amidos e proteínas de reserva, que irão fornecer a energia necessária ao processo de germinação. Também é no endosperma que se encontram os carotenoides, responsáveis pela coloração do grão. Castro

et al. (2009) afirmam que a dureza do endosperma é o que irá definir seu rendimento e valor agregado aos seus derivados.

No gérmen encontra-se quase a totalidade de óleo, vitamina e minerais presentes no grão. Também é constituído por concentrações expressivas de proteína e açúcares (Lima et al., 2011). É dessa parte que se extrai o óleo de milho.

Já o pericarpo representa, em média, 5% do grão e possui a importante função de proteger as demais estruturas da umidade, dos insetos e demais organismos que possam afetar a qualidade do grão. Possui sua composição majoritariamente de fibras, tendo polissacarídeos como hemicelulose e celulose, e lignina (Lima et al., 2011).

E por último, a ponta, menor parte da estrutura com 2% do grão, é a responsável por realizar a conexão do grão ao sabugo e não é protegida pela estrutura do pericarpo (Lima et al., 2011).

Os carboidratos constituem a maior concentração de nutrientes do milho, o que o torna um alimento energético e fonte de energia para as dietas humanas e animais. Além da presença de carboidratos o milho possui em sua composição lipídeos, proteínas e fibras alimentares (Paes, 2006).

No óleo do milho há a importante presença dos tocoferóis (vitamina E) e dos carotenoides. Os tocoferóis fazem parte das estruturas dos hormônios e possuem também função antioxidante, enquanto os carotenoides irão atuar como antioxidantes e são citados na literatura com ação anticancerígena (Tintori, 2018). O milho se destaca, então, pela presença de compostos bioativos e sua capacidade antioxidante que proporcionam benefícios à saúde.

3.1.2 O Milho Doce e o Milho Super Doce

O milho doce (*Zea mays* L. *saccharata*) apresenta características diferentes dos milhos comuns, sendo o sabor, o seu principal diferencial. A presença de genes mutantes originou variantes do milho que são capazes de alterar a síntese de carboidratos no endosperma dos grãos, o que diferencia as características de sabor (Tracy, 2001).

O milho doce, então, é um tipo especial quando comparado ao milho comum devido ao seu elevado teor de açúcares no grão, o que o confere uma

maior palatabilidade, com sabor adocicado (Tracy, 2001; Camilo et al., 2015; Nihei et al., 2020). Dodson e Tracy (2015) explicam em seu artigo que isso ocorre, pois, esse tipo de milho possui um ou mais genes de alelo recessivo (Tabela 1) que trabalham inibindo a conversão de açúcar em amido dentro do endosperma, elevando a concentração de açúcar no cereal.

São divididos em dois grupos fenotípicos: “doce”, que possui o gene açucarado; e o “super doce”, que terá os genes *brittle* (*bt*), *shrunk* (*sh*) e *sugaryenhancer* (*se*) (Nihei et al., 2020). Segundo Nihei et al. (2020), os grãos que carregam os alelos *sh* terão o paladar mais doce e maior teor de sacarose. Entretanto, qualquer um deles acarreta mudanças na composição do endosperma em relação à concentração de carboidrato, bem como a concentração de amido e açúcares, tais mudanças além do paladar alteraram a textura do grão, viabilidade da semente e aparência da planta (Batista e Teixeira, 2013).

Tabela 1 - Alelos utilizados em híbridos de milho doce

Alelo	Símbolo	Enzima	Fenótipo
amilose-extender 1	ae ₁	Ramificação do amido Lib	Doce
brittle1	bt ₁	Oligossacarídeo sintase	Super Doce
brittle 2	bt ₂	ADP-glucose fosforilase	Super Doce
dull 1	du ₁	Amido solúvel sintase	Doce
shrunk 2	sh ₂	ADP-glucose pirofosforilase	Super Doce
sugary 1	su ₁	Desramificação de amido isoamilase	Doce
sugaryenhancer 1	se ₁	Desconhecido	Super Doce

Fonte: Adaptado de Tracy (2001).

Segundo Pereira Filho e Teixeira (2016), no Brasil são cultivados em torno de 36 mil hectares de milho-doce, sendo 100% da produção destinada ao consumo humano com processamento industrial, com renda anual em média de R\$ 550 milhões. Uma das dificuldades enfrentadas pela cultura no Brasil é a ausência de cultivares que se adequam às condições brasileiras. Devido a isso, apenas uma cultivar é considerada como a principal linha de produção do milho doce no Brasil, a cultivar Tropical Plus (*sh2*).

Os principais alelos utilizados para o desenvolvimento dos grãos comerciais do milho super doce são os *shrunk 2*, o *brittle 1* e o *brittle 2* (conforme já visto na Tabela 2 acima) (Gonçalves, 2019). O grupo super doce tem a vantagem de possuir um período de colheita maior quando comparado ao milho comum, contudo, em desvantagem, possui uma menor concentração de polissacarídeos que são solúveis em água (Tracy, 2001).

Segundo Gonçalves (2019), a presença dos genes mutantes afeta não só a concentração de açúcar, mas todo o metabolismo da planta, como por exemplo, a germinação, sendo essa em torno de 65% no milho doce enquanto no milho comum esse percentual é de 80%. No caso do super doce essas consequências se acentuam, com sementes mais frágeis e índice elevado de danos mecânicos.

Apesar de um aumento na demanda, o cultivo do milho doce e do milho super doce são pouco explorados no território brasileiro. Silva et al. (2020) afirmam que é necessário que se aumente o desenvolvimento de novas tecnologias para esse cultivo no Brasil, bem como as pesquisas deste tipo de cultura visando incrementar os futuros programas de melhoramento deste grão.

3.2 Alimentos funcionais e compostos bioativos

O conceito de alimentos funcionais foi inicialmente proposto no Japão em meados dos anos 80, onde recebeu a designação em inglês de FOSHU (Food For Specified Health Use). Em geral, em vários países esses alimentos recebem designações que os definem como alimentos que possuem compostos que oferecem benefícios à saúde, além do objetivo básico do alimento que é a

nutrição. Dentre os alimentos funcionais pode-se citar como exemplo os: hortaliças, frutos, grãos e alimentos fortificados (Costa e Rosa, 2016).

A presença de substâncias bioativas também chamada de compostos bioativos pode ser encontrada em diversos alimentos. Tais compostos, podem ser responsáveis pelos benefícios à saúde e até à prevenção de algumas doenças (Vidal et al., 2012).

A denominação de alimento funcional em suma se refere a presença de substâncias bioativas que podem exercer funções além da nutrição. Os grupos de substâncias bioativas está esquematizado na Tabela 2:

Tabela 2 - Grupos de substâncias bioativas e respectivos compostos bioativos.

Grupo de substâncias	Composto ativo
Fitoquímicos	Compostos fenólicos
	Alcaloides
	Compostos organosulfúricos
	Carotenoides
	Fitoesteróis
Probióticos	Bifidobactérias e Lactobacilos
Prebióticos	Fibras e oligossacarídeos
Ácidos graxos Poli-insaturados	Ômega 3
	Ômega 6
Vitaminas antioxidantes	A
	C
	E
Proteína de soja	Peptídeos bioativos

Fonte: Adaptado de Henrique et al., (2018).

Na busca de um estilo de vida saudável que possa contribuir com a prevenção de doenças, a alimentação possui papel muito importante. O consumo de alimentos mais saudáveis e naturais têm sido alvo de consumidores que procuram melhorar o estilo de vida. Logo, o consumo principalmente de alimentos com propriedades funcionais (frutas, vegetais, grãos e outros) podem suprir a necessidade básica nutritiva e ainda ser fonte de outros benefícios para a saúde do consumidor (Pozzo, 2014).

3.2.1 Principais compostos bioativos no grão de milho

Segundo Siyuan, Tong e Liu (2018), dentre os compostos bioativos mais encontrados nos grãos de milho os principais são: os compostos fenólicos (como os flavonoides e os ácidos fenólicos), os carotenoides, as antocianinas e o tocoferol (vitamina E), e suas concentrações irão se diferenciar de acordo com o tipo de grão do milho. Por exemplo, segundo os autores, os carotenoides se concentram em grãos amarelo e vermelhos, enquanto as antocianinas se encontram em maior proporção nos grãos vermelhos, azuis e pretos.

É importante ressaltar que os vegetais possuem dois tipos de metabolismo, o primário e o secundário. O primário é aquele responsável pela sobrevivência da planta, tem papel ativo no funcionamento e desenvolvimento do vegetal; já os secundários são aqueles que se relacionam mais com as estratégias de defesa das plantas, não possuem relação direta com o metabolismo essencial e podem ser estimulados por diversos fatores bióticos e abióticos, dentre os compostos do metabolismo secundário destacam-se os grupos: compostos fenólicos, terpênicos e esteroides e os alcaloides (Fumagali et al., 2008; Rockenbach et al., 2018).

Dentre os compostos bioativos presentes nos alimentos, e no milho, Barbosa (2016) esquematizou (Figura 1) os compostos já identificados em amostras milho.

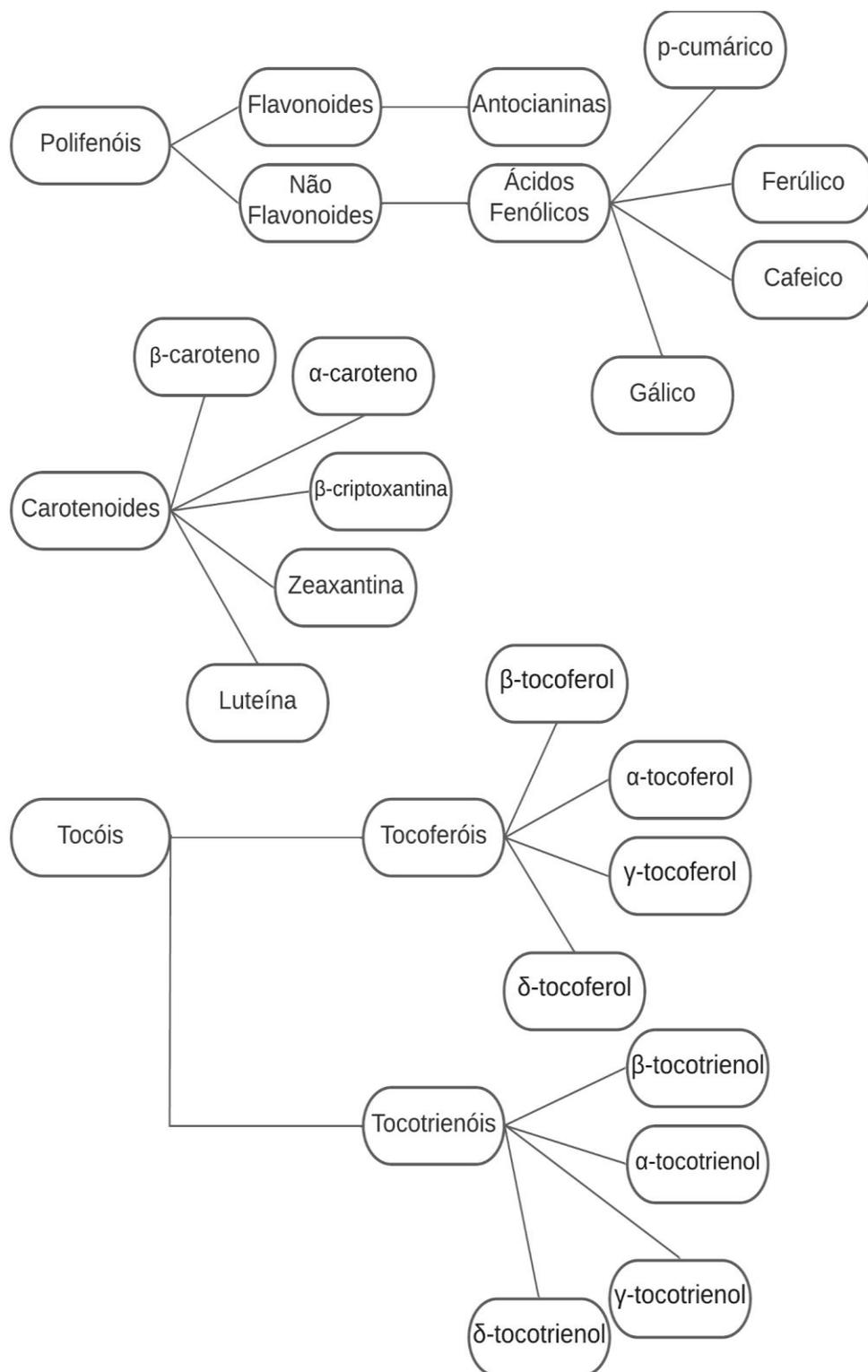


Figura 1- Compostos bioativos identificados em milho adaptado de Barbosa (2016).

Conforme esquematizado na Figura 1, diversos compostos já foram identificados em amostras de milho. O enfoque principal do trabalho será no grupo de compostos fenólicos.

3.2.1.1 Compostos fenólicos – Ácidos Fenólicos

Os compostos fenólicos se caracterizam por possuírem um anel aromático, com um ou mais grupos de hidroxila e com potencial funcional e são responsáveis pelo crescimento da planta, reprodução, dentre outros, além da potencialidade de exercerem funções de conservantes naturais e antioxidantes (Oliveira e Badiale-Furlog, 2008; Zitka et al., 2011).

No grupo de fenólicos são encontradas desde moléculas mais simples a moléculas com alto grau de polimerização, sendo encontrados nos vegetais de forma livre ou ligados a moléculas de açúcares (glicosídeos) ou proteínas. São divididos em diversas classes, principalmente de acordo com o seu número de anéis aromáticos. Neste trabalho foram destacados os ácidos fenólicos, grupo de moléculas polares que desempenham diversas funções bioativas importantes, com destaque para a função antioxidante (Bravo, 1998).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácido hidroxibenzóico (ácido siríngico, gálico, protocatecuíco e vanílico) (Figura 2) e derivados de ácido hidroxicinâmico (ácido caféico, cumárico e ferúlico) (Figura 3) e geralmente irão atuar sobre o milho no seu sabor e adstringência. Sua função antioxidante é determinada pela posição em que se encontram seus grupos de hidroxila, bem como a proximidade do grupo $-CO_2H$ com o grupo fenil, pois quanto mais perto do grupo fenil maior sua capacidade de antioxidante (Silva et al., 2010).

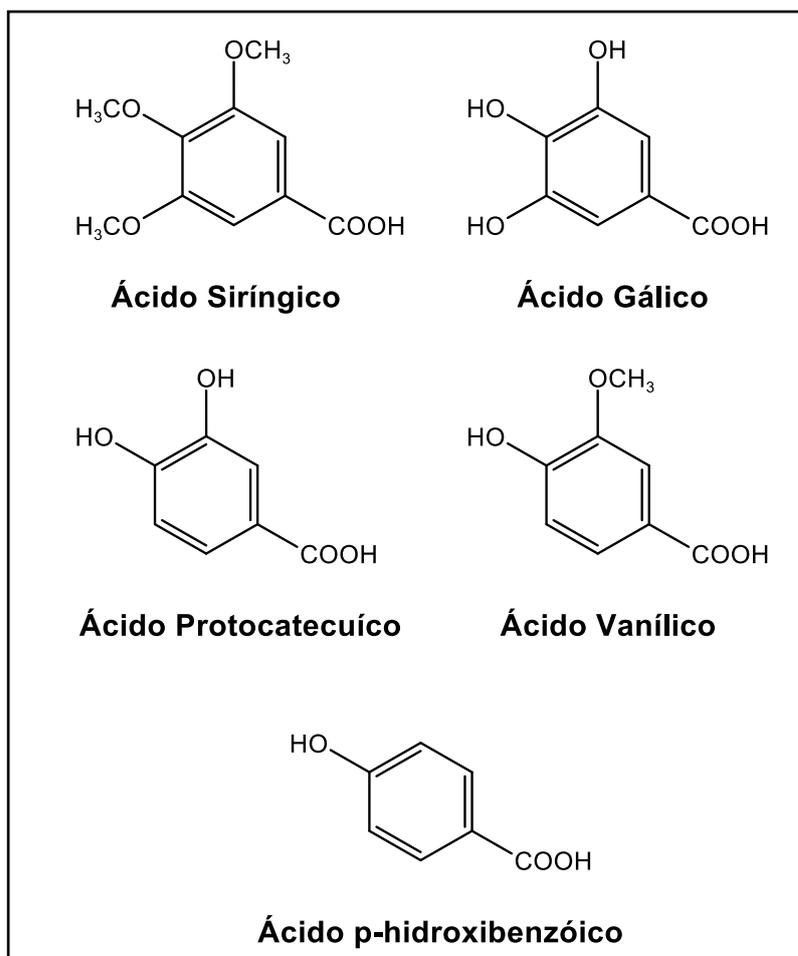


Figura 2 – Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzóico

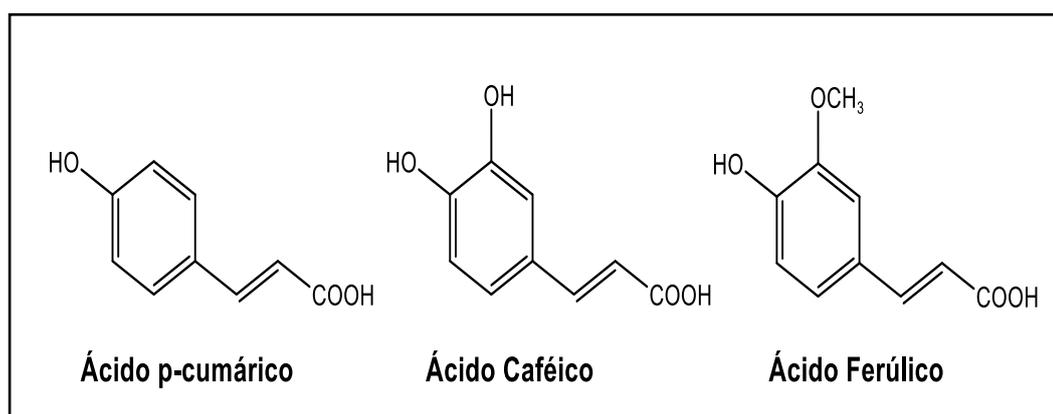


Figura 3 – Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico

A biossíntese dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico ocorre através da via do chiquimato a qual possui o ácido chiquímico como intermediário (Figura 4). Alguns produtos naturais podem ser sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano. A síntese dos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico possui a L-fenilalanina como precursora (Figura 5) (Dewick, 2009).

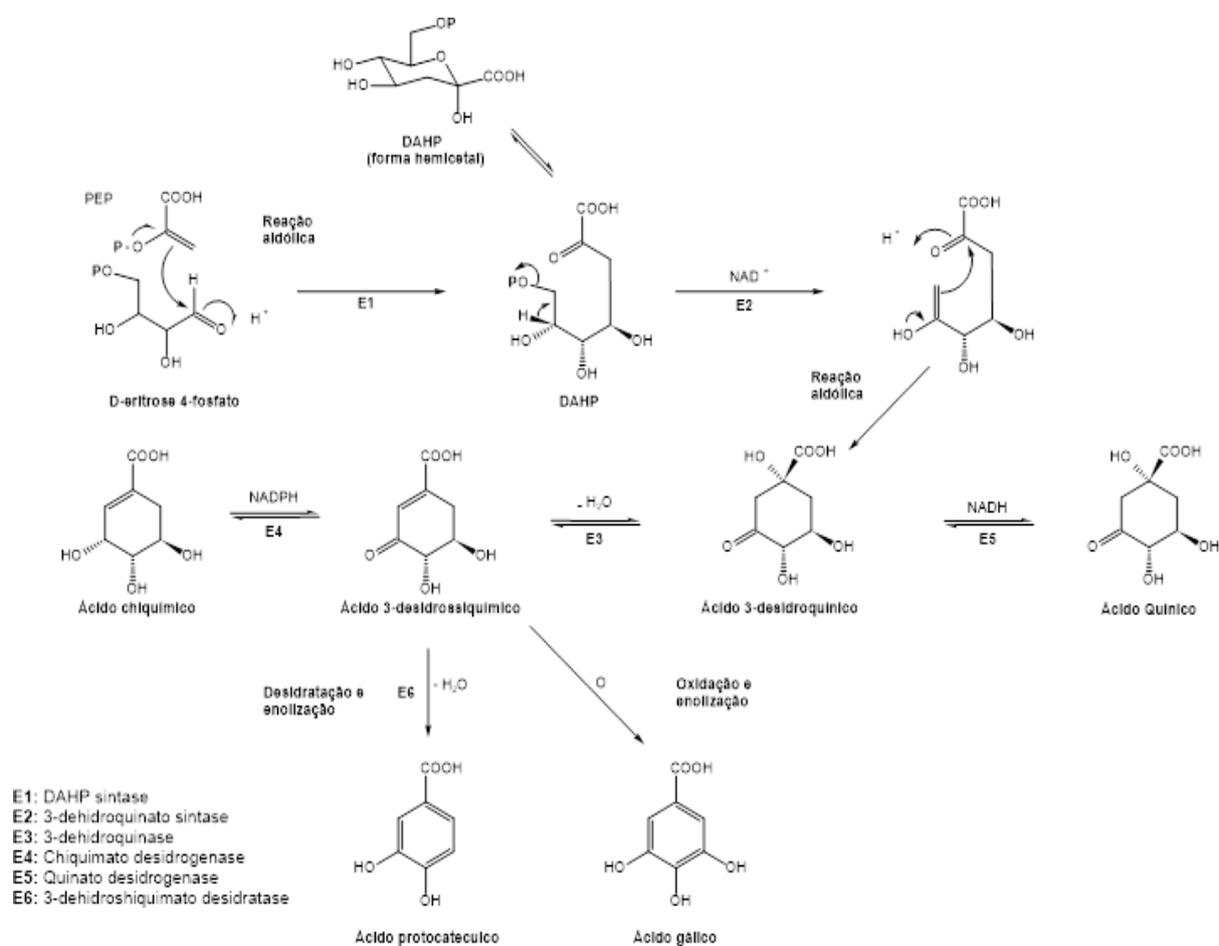


Figura 4 – Biossíntese de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico adaptado de Dewick, 2009.

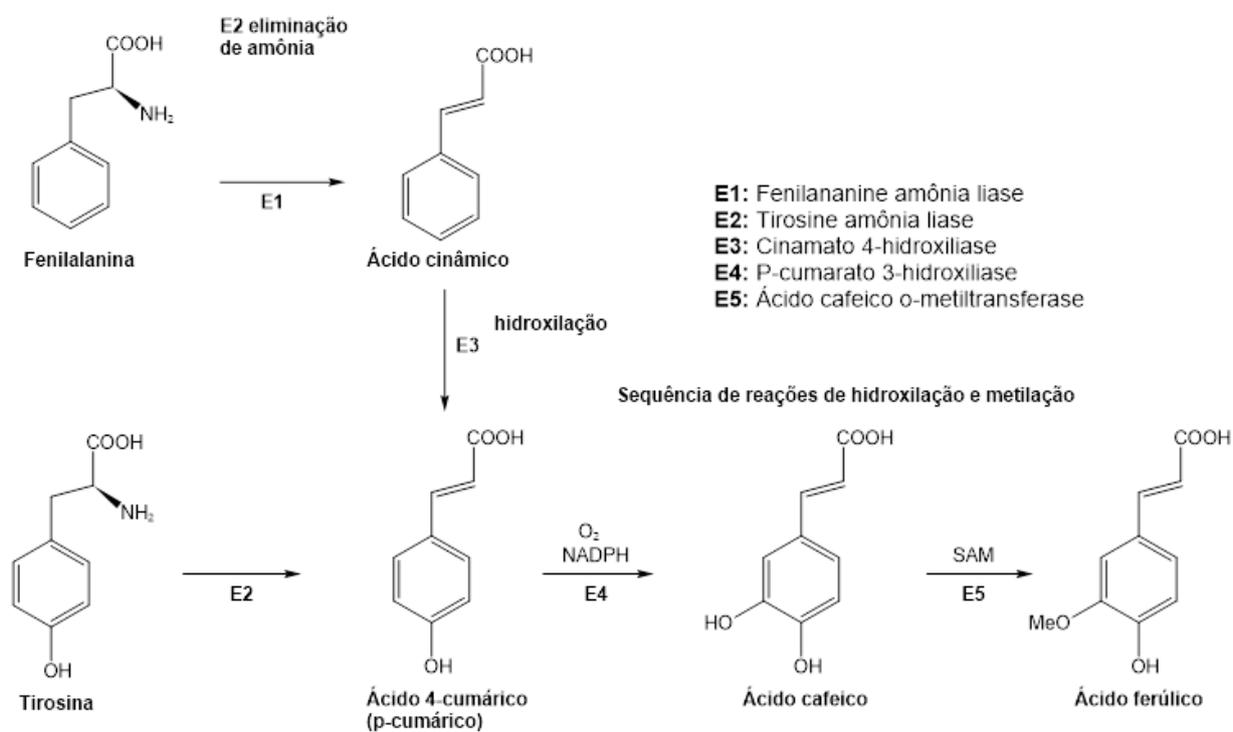


Figura 5 – Biossíntese de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico adaptado de Dewick, 2009

Os ácidos fenólicos, além de sua função antioxidante, contribuem para uma melhora geral da saúde pois possuem atividade anti-inflamatória, atuam na prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Também apresentam atividades antimicrobianas, antimutagênicas, hipoglicêmicas e antiagregantes plaquetárias (Rashmi e Negi,2020).

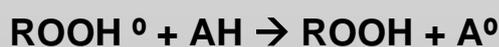
3.3 Radicais livres e substâncias antioxidantes

Os radicais livres (RL) são substâncias que possuem ao menos um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa. São formados pela redução incompleta do oxigênio, o que ocasiona na formação de espécies altamente reativas quimicamente e de baixa instabilidade. Os RL são denominados como espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Martelli e Nunes, 2014; Pereira e Pereira, 2012).

Os radicais livres e ERs são altamente reativos, instáveis e possuem meia-vida curta. A formação ocorre de forma natural no organismo de todos seres vivos devido a exposição ao oxigênio molecular. Os RL são propulsores das reações de oxidações que promovem envelhecimento celular, podendo também ocasionar danos ao DNA o que propiciar processos de mutagênese e carcinogênese. As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e de oxigênio (EROs) possuem alta reatividade com moléculas de proteínas, lipídeos, DNA, carboidratos, vitaminas e outras biomoléculas essenciais para o funcionamento dos organismos. A produção ampla das espécies reativas de oxigênio ou o desequilíbrio com a disponibilidade de substâncias antioxidantes para neutralizar estas espécies podem resultar no processo chamado de estresse oxidativo (Vasconcelos et al., 2015; Shami e Moreira, 2004).

Os danos causados pelo estresse oxidativo nas células e tecidos têm sido relacionados com diversas doenças, tais como câncer, aterosclerose e cardiopatias (Vasconcelos et al., 2015; Pereira e Pereira, 2012). Em alimentos, a presença de RL e ERs podem ocasionar a oxidação lipídica. Por ser uma alteração que promove alterações sensoriais nos produtos, logo, faz se necessário o uso de técnicas de conservação como o uso de substâncias com função antioxidante (Soares et al., 2012).

As substâncias antioxidantes são capazes de inibir a oxidação em diversos substratos, tanto em moléculas simples quanto em polímeros e biosistemas complexos. Conforme seu modo de ação podem ser classificados em dois grupos: primários e secundários. Os antioxidantes primários (Figura 6) atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, o que os converte em produtos mais estáveis, e ou reagindo com os RL, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os secundários irão atuar em variados mecanismos que englobam a complexação de metais, absorção da radiação ultravioleta, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical ou desativação de EROs (Silva et al., 2010; Soares, 2002).



Onde: ROO^\bullet e R^\bullet : são radicais livres

AH: substância antioxidantes com átomo de hidrogênio ativo

A[•]: radical inerte

Figura 6 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários

No organismo humano, inserção de alimentos com potencial antioxidante pode trazer benefícios. Pois os mesmos auxiliam na prevenção a oxidação proveniente dos fatores intrínsecos ao organismo como a radiação UV, tabagismo, álcool, poluição ambiental, estresse, dentre outros. Os fatores extrínsecos a geração de radicais livres no organismo humano como a presença de doenças degenerativas, câncer e envelhecimento celular podem ser minimizados com o consumo de alimentos com potencial antioxidante (Degáspari et al., 2005).

3.4 Cromatografia

A cromatografia é um dos métodos instrumentais responsáveis pela análise de compostos químicos. Além disso, é uma técnica de separação físico-química na qual é possível quantificar e identificar substâncias que estejam presentes em uma mistura a partir da interação dos constituintes com a fase móvel e estacionária do sistema cromatográfico (Juszczak et al., 2019). Os compostos contidos na mistura são separados à proporção que a fase móvel passa pela fase estacionária (Collins et al., 1993).

As técnicas cromatográficas são subdivididas em duas: Cromatografia planar e Cromatografia em coluna. Na Cromatografia planar a fase estacionária é distribuída em uma superfície planar, e a Cromatografia em coluna a fase estacionária é disposta em um tubo cilíndrico. As fases móveis podem ser diferentes, sendo elas, gasosas (fase móvel em gás), líquida (cromatografia líquida) e vapor pressurizado (cromatografia supercrítica) (Collins et al., 1993).

Neste trabalho foram utilizadas algumas técnicas com subdivisões cromatográficas de coluna e planar, e as fases móveis utilizadas exclusivamente líquidas. Sendo elas:

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD): técnica planar, fase estacionária sólida e fase móvel líquida;
- Cromatografia em Coluna (CC): técnica em coluna, fase estacionária sólida e fase móvel líquida;
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): técnica em coluna, fase estacionária sólida e fase móvel líquida.

A utilização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) se baseia no uso de uma superfície plana, comumente chamada de placas cromatográficas. Sobre as placas contém uma camada delgada de material adsorvente, podendo ser composto de sílica, alumina, celulose, poliamida e outros materiais onde serão depositados a fração de amostra a ser analisada. Quando a fase móvel inicia a corrida pela placa ocorre a separação dos componentes da mistura (Collins et al., 1993).

Para que se obtenha uma separação eficiente é importante que a fase móvel seja selecionada cuidadosamente uma vez que ela possui papel importante na separação de misturas. Além disso, para a seleção da fase móvel

é fundamental que se considere a natureza química das substâncias que serão separadas e sua polaridade, tendo em vista que pode ocorrer uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra na superfície do adsorvente contido na placa (Collins et al., 1993).

Seguida a eluição da fase móvel na placa, é necessário que seja realizada a revelação das substâncias pois algumas podem não possuir coloração. A revelação pode ser realizada através de métodos físicos, como o uso de lâmpadas ultravioletas (UV) que revelam substâncias fluorescentes quando são excitadas por radiações em determinado comprimento de onda, e por métodos químicos, onde são utilizados solventes (Collins et al., 1993). A CCD é uma técnica de fácil execução, versátil, utiliza-se pouco tempo para a execução, possui boa reprodutibilidade e baixo custo (Collins et al., 1993).

A Cromatografia em Coluna constitui-se na utilização de um tubo de vidro com abertura na parte superior e com uma torneira na parte inferior, o que permite o controle na vazão da fase móvel. A coluna é disposta verticalmente e é preenchida pelo material (fase estacionária) o qual pode-se utilizar a sílica. A separação da mistura ocorre através da eluição das substâncias na coluna. O material utilizado para preencher a coluna pode variar e deve possuir características adequadas para a separação da mistura (Collins et al., 1993).

Dentre outras técnicas cromatográficas anteriormente citadas está a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Com a CLAE é possível realizar a separação de compostos diversificados presentes em uma mesma amostra em um período de tempo (Collins et al., 1993).

A CLAE utiliza um líquido como fase móvel, comumente uma mistura de 2 a 4 solventes. E a fase estacionária é formada de partículas muito pequenas que são especialmente preparadas e empacotadas em colunas que resistem a alta pressão o que necessita de uma bomba de alta pressão para eluir a fase móvel através da fase estacionária. As colunas são preenchidas com partículas porosas cujo diâmetro pode variar entre 1,8 a 5 μm , tais partículas porosas com fase ligada quimicamente que permite a separação dos componentes da amostra. Em suma, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica capaz de realizar separações de misturas complexas e quantificar uma considerável proporção de seus componentes com alta resolução, sensibilidade e eficiência (Embrapa, 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

4.1 Material

O material vegetal utilizado neste trabalho foi milho super doce (sh₂) (*Zea mays* L) codificado por UENF SD 08 e UENF SD 09 e as amostras cedidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético do CCTA/UENF.

As cultivares de milho super doce UENF SD 08 (nº 38733) e UENF SD 09 (nº 38734) foram registradas junto ao MAPA (Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento) após anos de pesquisa desenvolvida na universidade (Pereira et al., 2019).

4.2 Obtenção do extrato vegetal

As amostras UENF SD 08 e UENF SD 09 de milho super doce foram reunidas objetivando maior massa para as avaliações. As amostras utilizadas se encontravam congeladas já separadas das espigas e identificadas em embalagens. Os grãos de milho foram triturados em liquidificador e em seguida o extrato vegetal foi obtido por maceração estática ao abrigo da luz, submetendo as amostras extração exaustiva em álcool metílico PA. Em dias alternados, o material líquido foi filtrado em filtro de papel e armazenado sob refrigeração para as etapas seguintes e o material sólido remanescente adicionado do mesmo solvente (BARBOSA, et al. 2016).

Os extratos obtidos foram evaporados em rota evaporador à 45°C marca Fisatom modelo 802 e armazenados sob refrigeração. Posteriormente, o restante do solvente contido no extrato foi evaporado em chapa aquecedora à 50°C aproximadamente com auxílio de banho-maria em capela de exaustão. Após evaporação do solvente, as amostras foram liofilizadas em liofilizador da marca Liotop modelo L101 até secagem completa do material e obtenção de peso constante (28,4746g).

4.3 Fracionamento do extrato vegetal

Foram pesados (25,0142 g) de material vegetal e diluídos em 300mL de água destilada. A fração não solubilizada foi retida em filtro de papel.

O fracionamento do extrato foi obtido através de uma separação líquido-líquido em funil de separação com solventes orgânicos seguindo a ordem crescente de polaridade dos solventes: Hexano (C_6H_{14}), Acetato de Etila ($C_4H_8O_2$) e Butanol ($C_4H_{10}O$).

Após obtenção das 3 frações prévias, nomeadas de fração hexano (FH), fração acetato de etila (FAEt) e fração butanólica (FB), o material foi evaporado em chapa aquecedora à 50°C aproximadamente com auxílio de banho-maria em capela de exaustão até o peso constante. A fração remanescente da separação líquido-líquido foi nomeada de fração restante.

O fluxograma correspondente a Figura 7 descreve de forma esquematizada a obtenção dos extratos e frações.

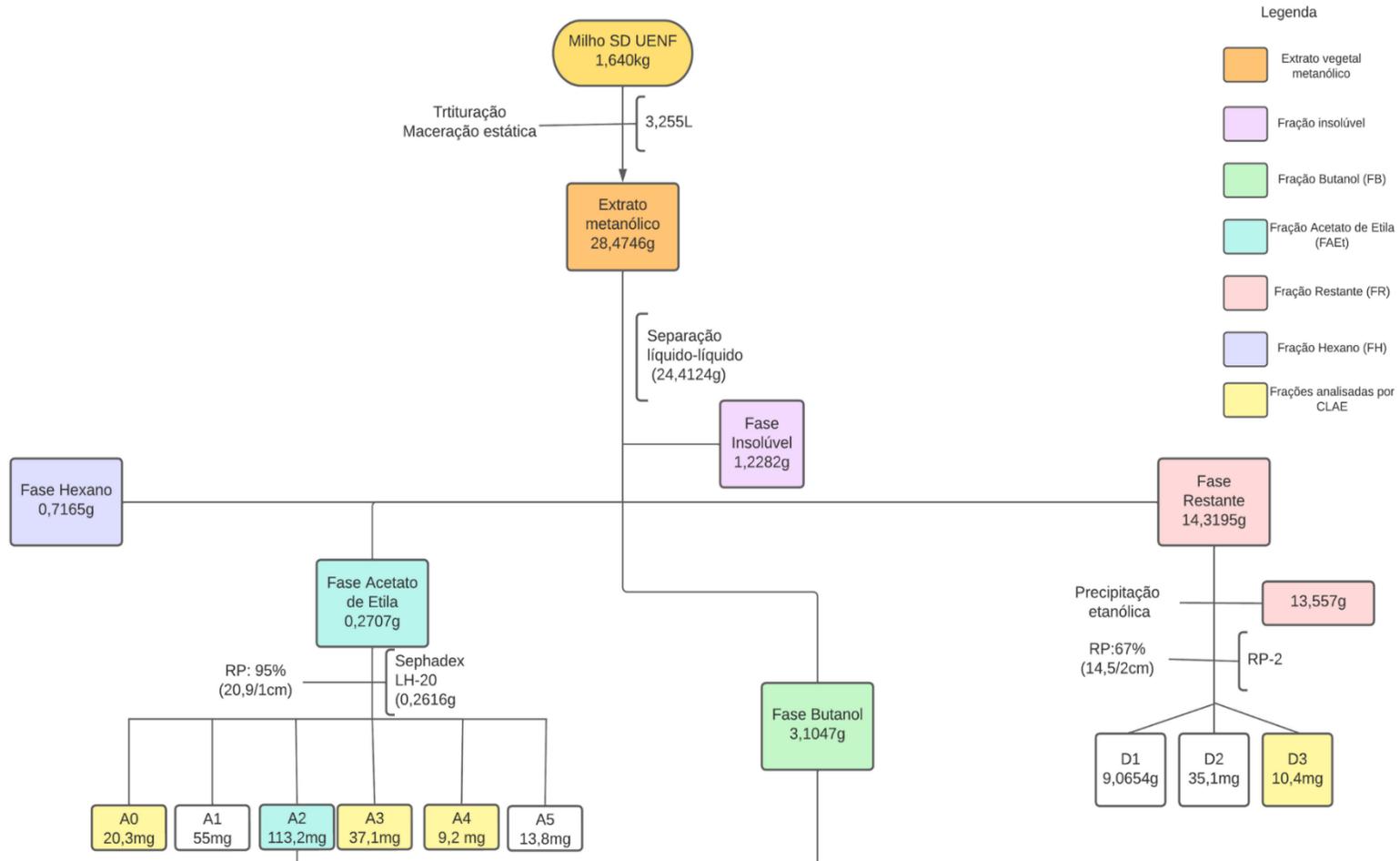


Figura 7 – Fluxograma de obtenção de extratos e frações

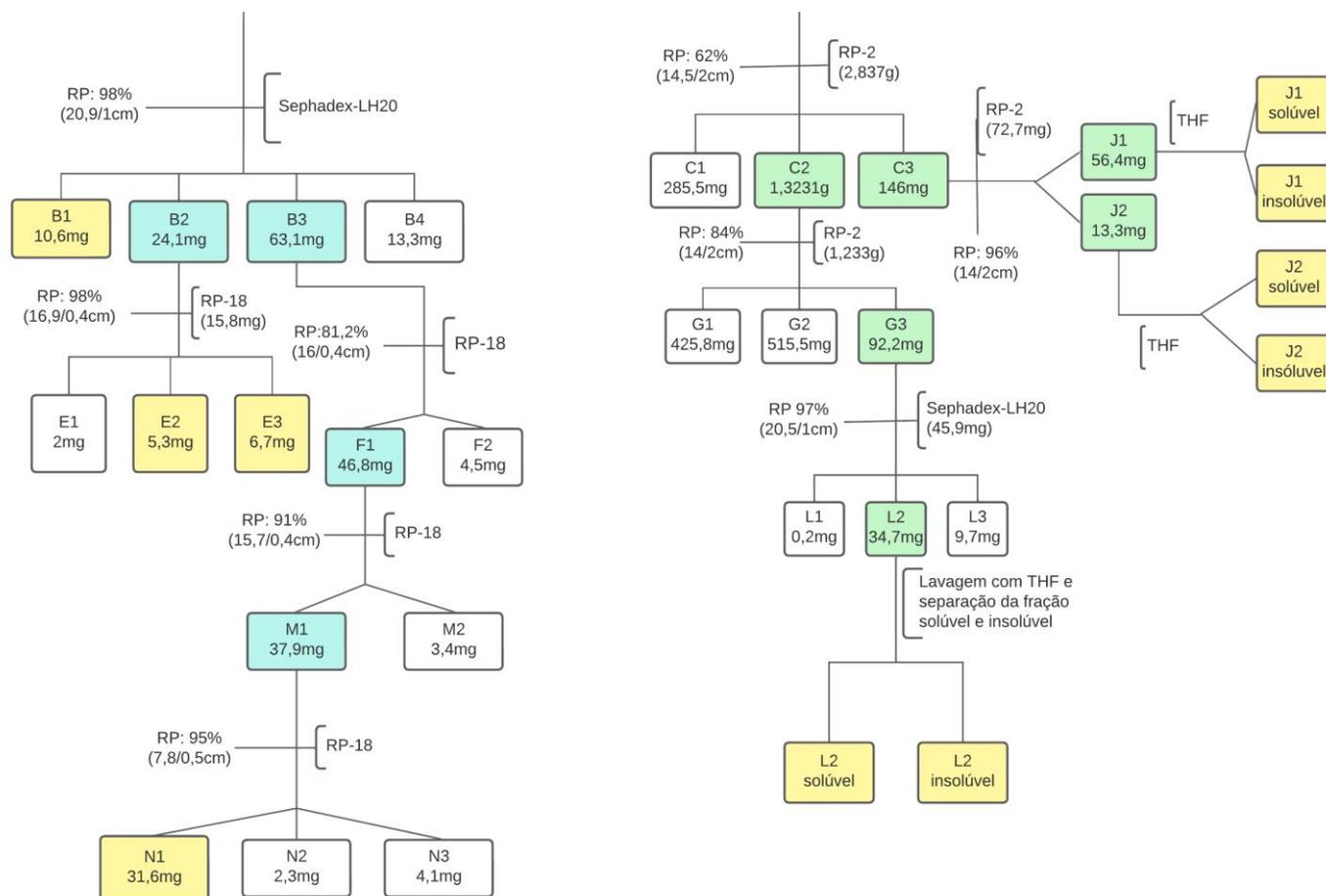


Figura 7 – (continuação) Fluxograma de obtenção de extratos e frações

Todas as amostras e frações obtidas foram analisadas através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) a fim de observar as amostras que continham substâncias bioativas, como os compostos fenólicos.

Após a avaliação do perfil químico pela CLAE das amostras selecionadas com características de compostos fenólicos (destacadas em amarelo no fluxograma), foram selecionadas cinco amostras para a determinação de atividade antioxidante.

4.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato obtido e respectivas frações foram avaliadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a qual consiste em uma técnica rápida e com custo baixo para a realização de análise qualitativa e semiquantitativa (Mogollón et al., 2014; Reis, 2011).

Foram usadas placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 em alumínio, com espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm). As placas utilizadas foram cortadas com 4 cm de comprimento e as amostras aplicadas aproximadamente 0,7 cm acima da borda inferior da placa e com distância de 0,5 cm das bordas laterais. A fase móvel utilizada foi butanol: ácido acético: água (3:1:1) (Glória, 2013).

Seguida a realização da cromatografia, é necessário o uso de reveladores químicos ou físicos. Como as placas cromatográficas possuíam material fluorescente pré impregnado, foram reveladas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 254 e 350 nm (método físico). As placas também foram reveladas utilizando a solução ácida de sulfato cérico como método químico.

4.5 Cromatografia em Coluna

Após a análise preliminar por CCD, as frações prévias foram submetidas a cromatografia em Coluna para purificação. Conforme a obtenção das frações realizou-se o acompanhamento por CCD seguindo o protocolo descrito anteriormente.

As sílicas empregadas para a montagem das colunas cromatográficas foram:

Sílica para cromatografia de fase Inversa RP-2 e RP-18: Consiste em uma fase estacionária não-polar constituída de 2 átomos de carbono e 18 átomos de carbono, respectivamente, e a fase móvel relativamente polar, o oposto do que ocorre no sistema cromatográfico de fase normal, no qual a fase estacionária é altamente polar, suportada em partículas de sílica, e a fase móvel é relativamente não-polar. O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi de soluções de álcool metílico/metanol (MeOH) e água, nas concentrações de 10 a 100% MeOH (Skoog et al., 2002);

Sílica para a Cromatografia de exclusão por tamanho. Foi utilizada sílica Sephadex LH-20, a qual consiste de partículas pequenas de sílica (~10µm) ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais 27 moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Dessa forma, moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção, sendo as primeiras a serem eluídas. Já as moléculas com diâmetro menores que dos poros podem penetrar pelo emaranhado de poros e ficar retidas por tempos maiores, sendo as últimas a serem eluídas. O solvente utilizado como fase móvel foi o álcool etílico (etanol) (Skoog et al., 2002).

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para avaliar e conhecer o perfil químico com a identificação das substâncias foram realizadas análises em CLAE no extrato e frações, previamente selecionados através de CCD. Esta é uma técnica valiosa, pois apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do detector utilizado, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004).

A seleção das amostras foi guiada pelo uso de CCD em amostras que apresentavam os aspectos característicos da presença de compostos fenólicos, como a presença de manchas amareladas. As amostras submetidas à CLAE foram o Extrato metanólico, fase acetato de etila, fase butanólica e as frações A0, A3, A4, B1, C1, D3, E2, E3, F2, J1, J2, L2 e N1 (destacadas em amarelo no fluxograma).

As análises foram realizadas no Cromatógrafo Líquido Shimadzu Class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm (detector por varredura de

espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 μ L. A coluna empregada foi a RP-18 da Macherey-Nagel (5m, 4,0 x 250mm), na temperatura de 35°C. O sistema de solvente utilizado foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) (bomba A) e acetonitrila (bomba B) usando fluxo de 1 mL/min e com sistema gradiente de eluição conforme descrito na Tabela 3. A amostra do extrato foi preparada na concentração de 5 mg/mL e as demais frações foram preparadas variando a concentração de 2 a 5 mg/mL. Os padrões de ácidos fenólicos foram utilizados na avaliação do perfil químico e preparados na concentração de 100 μ g/mL.

Tabela 3 – Sistema de gradiente utilizado para a realização de CLAE

Concentração de água acidificada (pH 3,2) (Bomba A)	Concentração de Acetonitrila (Bomba B)
0,01	0
5	30
10	50
15	70
20	80
25	90
30	100
32	0

4.7 Atividade antioxidante de extrato vegetal e das frações obtidas

4.7.1 Método DPPH fotocolorimétrico

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH[•]) é utilizado comumente a partir do método fotocolorimétrico para avaliar a capacidade antioxidante natural em sequestrar radicais livres. A análise baseou-se na adição de 1 mL de extrato metanólico e das frações em concentrações variando entre 10 e 1000 µL.

Foi adicionado 1 mL de solução metanólica de DPPH (0,1mM), ao extrato, e a reação se processou em temperatura ambiente ao abrigo da luz por cerca de 1 hora. Após, foi realizada a leitura da absorbância do DPPH a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Rocha et al., 2013; Bernardes, et al., 2011).

A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e foi calculada mediante a seguinte fórmula:

Equação 1:

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \frac{(Abs1 - Abs2)}{Abs1} \times 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução (Oliveira, 2015).

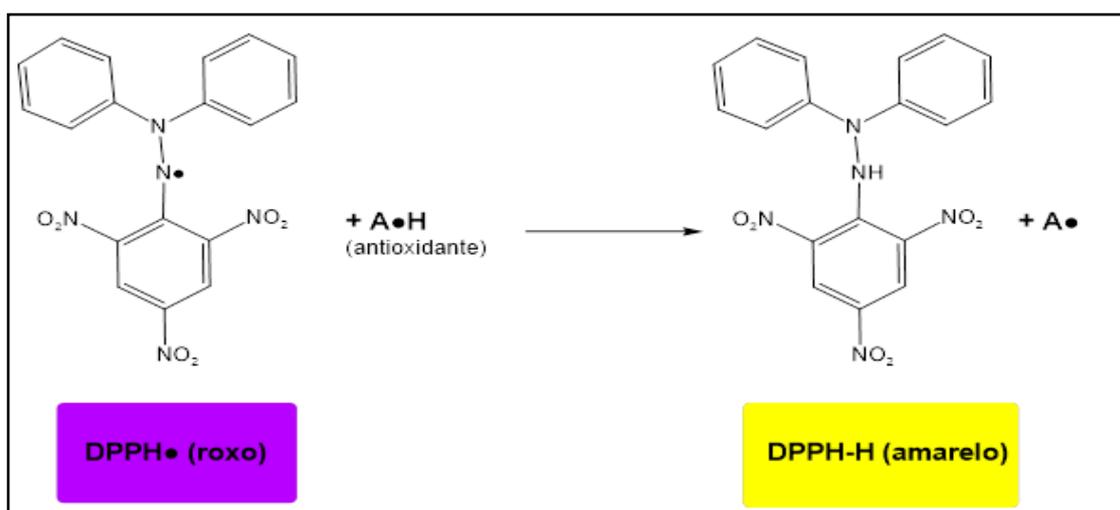


Figura 8 – Representação da reação do radical DPPH com um antioxidante adaptado de Oliveira, 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises cromatográficas

Tanto o extrato bruto de milho super doce UENF SD08 e UENF SD09, quanto todas as frações oriundas do fracionamento desse extrato através de Cromatografias em Coluna (RP-2, RP-18 e Sephadex-LH20) foram analisados também de acordo com mais dois tipos de cromatografias: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Vale ressaltar que este estudo foi guiado e, portanto, o fracionamento foi realizado de acordo com os resultados obtidos nas análises em CCD.

5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato metanólico obtido foi avaliado por CCD com finalidade de avaliar previamente a presença de alguma mancha característica e a separação dos componentes da mistura no sistema de solventes empregados. O sistema de solventes empregado foi o baw 3:1:1 (baw - butanol: ácido acético: água, respectivamente). Após a avaliação prévia foi realizada posteriormente uma partição líquido-líquido do extrato descrita no item 4.3.

Os resultados obtidos a partir de CCD nas frações iniciais pode guiar as amostras através da observação do comportamento de cada fração. Na Figura 9 está mostrada a CCD das principais frações oriundas do fracionamento do Extrato bruto: Ex bruto, fração butanólica (FBut), C1, fração acetato de etila (FAEt), A3 e A4. A fração Ex bruto é referente ao extrato metanólico do milho super doce, FBut é a fração butanólica oriunda do fracionamento do extrato em partição líquido-líquido, a fração C1 é oriunda do fracionamento da FBut em coluna cromatográfica aberta de fase reversa RP-2, FAEt é a fração em acetato de etila oriunda da partição líquido-líquido, e as frações A3 e A4 oriundas do fracionamento em coluna aberta *Sephadex-LH20* da amostra FAEt.

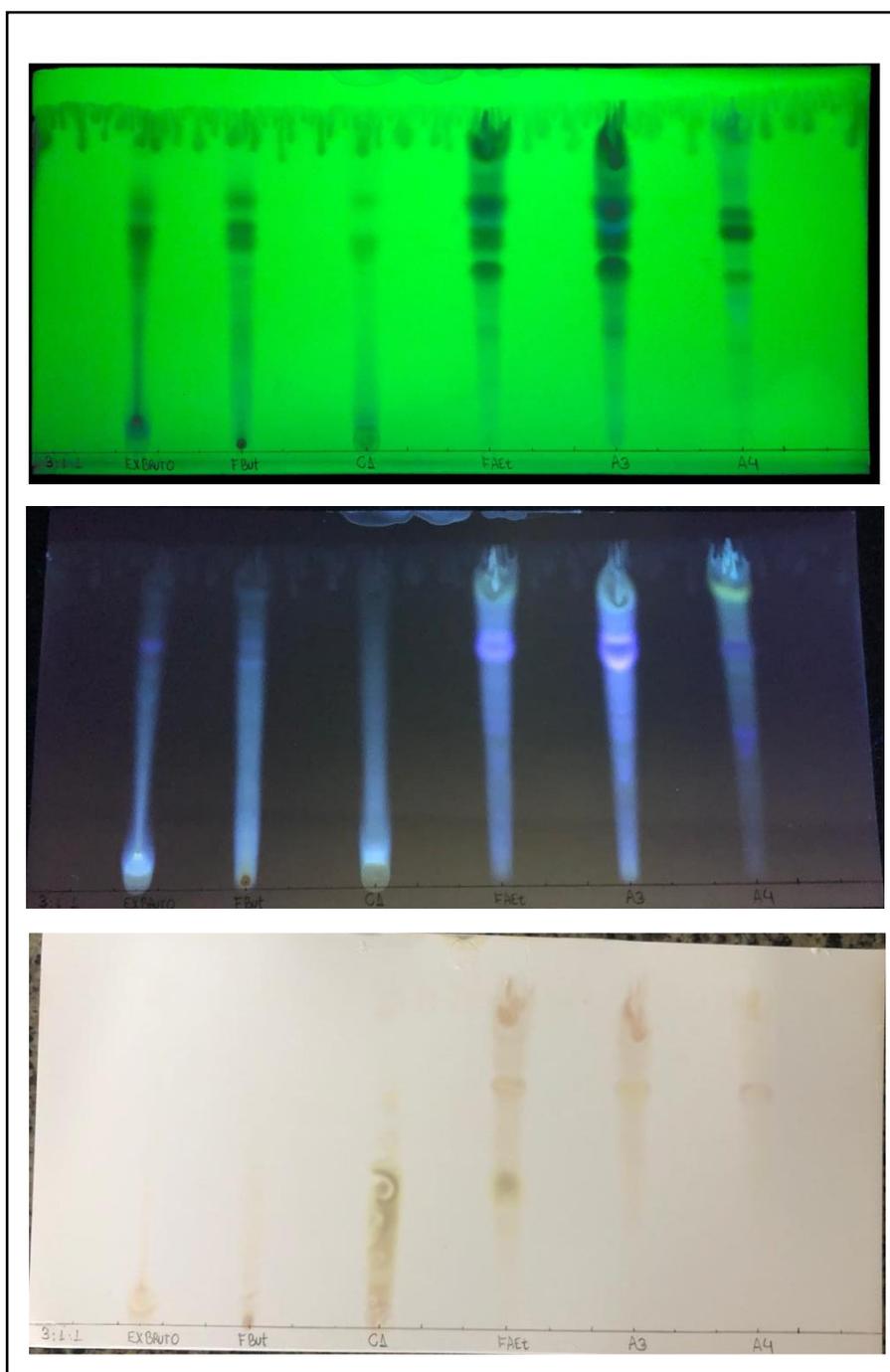


Figura 9 – Cromatograma em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e das frações obtidas a partir do extrato metanólico de milho super doce UENF SD08 e UENF SD09 mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (3:1:1), revelação física em luz UV 254/365nm e química com sulfato cérico, respectivamente. Legenda: Ex bruto: fração extrato bruto; FBut: fração butanólica; C1: fração C1 obtida a partir da RP-2 da fração butanólica; FAEt: fração acetato de etila; A3: fração A3 obtida a partir da fração acetato de etila em Sephadex-LH20; A4: fração A4 obtida a partir da fração acetato de etila em Sephadex-LH20.

A amostra do extrato bruto em CCD inicialmente não foi possível ocorrer a separação dos compostos na eluição da placa. Ponto importante para guiar as etapas de partição e purificação do extrato com a finalidade de que se obtivesse uma separação mais eficiente entre os compostos presentes.

Após a purificação e obtenção de diversas frações, algumas amostras selecionadas apresentaram algumas manchas com tonalidade mais amarelada quando reveladas com solução ácida de sulfato cérico, e manchas azul-arroxeadas sob a revelação em luz UV no comprimento de onda de 365nm. Tais características obtidas após a revelação química e física indica a presença de compostos fenólicos, tendo em vista também o sistema de solventes utilizados (Chaves, 1997).

5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o propósito de conhecer o perfil químico do extrato e as frações de milho super doce, estes foram submetidos a CLAE. Essa técnica desempenha um papel importante na separação de misturas complexas, como substâncias provenientes do metabolismo primário ou secundário a partir de fontes vegetais.

A partir dos cromatogramas das amostras obtidas, com análise dos picos e principalmente nos espectros UV obtidos foram avaliadas as possíveis substâncias presentes.

Na Tabela 4 estão descritos os valores já elucidados na literatura de comprimentos onda máximos de absorbância UV dos principais ácidos fenólicos já identificados em amostras de milho. Tais resultados irão guiar a compreensão dos resultados dos espectros UV obtidos a partir da análise em CLAE.

Tabela 4 – Absorbância máxima UV λ_{\max} de ácidos fenólicos

Ácido fenólico	UV λ_{\max} (nm)	Referência
Ácido gálico	217,272	(Robbins, 2003)
Ácido cafeico	220, 240(br), 295 (ps), 326	(Robbins, 2003)
Ácido ferúlico	218, 236 (sh), 295	(Robbins, 2003)
Ácido p-cumárico	226,312 → 328	(Robbins, 2003)
Ácido p-hidroxibenzoico	255	(Campos e Markham, 2007)

Legenda: → = extends out to; (br)= broad; (sh) = shoulder; (ps)= pre-shoulder.

5.1.2.1 Cromatograma do extrato bruto metanólico

A análise em CLAE produzida a partir do extrato bruto, demonstrou três picos majoritários, os quais podem ser observados na Figura 10 com respectivos tempos de retenção de 4,014, 4,800 e 5,398 minutos, respectivamente no comprimento de onda de 254nm. O espectro de ultravioleta (UV) referente ao pico 1 revelou bandas de absorção de 236 e 262 (Figura 11), o espectro UV do pico 2 revelou bandas de 236 e 257 nm e o espectro do pico 3 revelou bandas de absorção de 232 e 258.

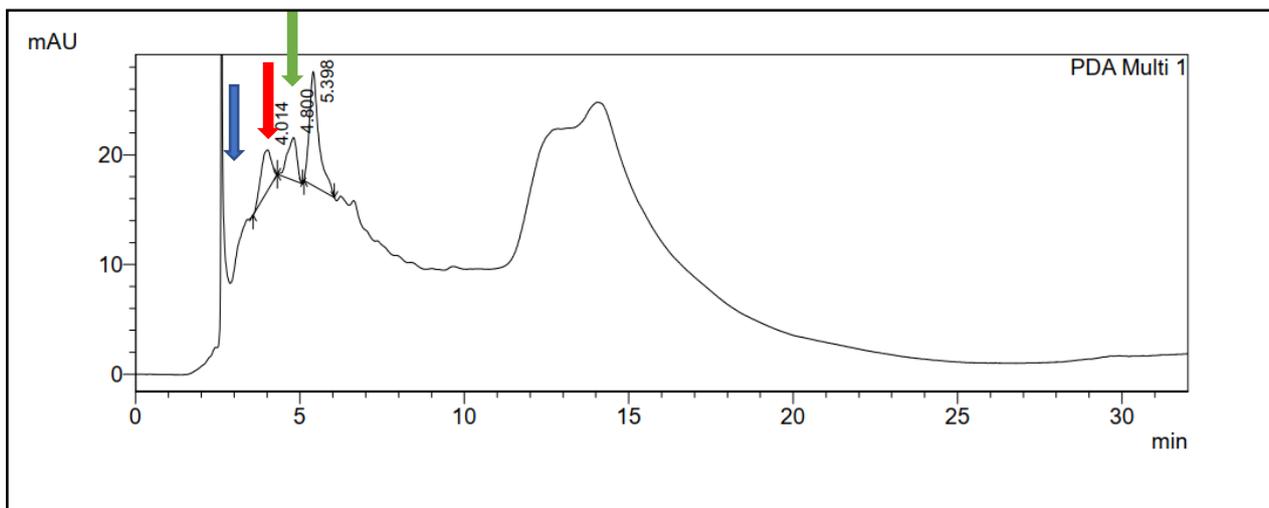


Figura 10 – Cromatograma do extrato bruto de milho super doce

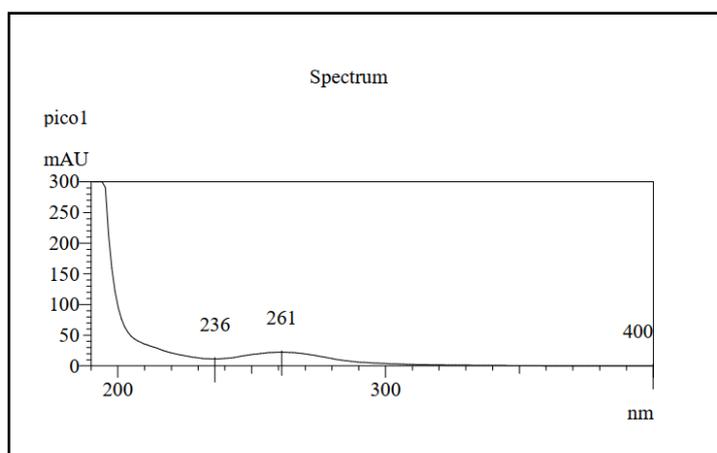


Figura 11 – Espectro UV do pico 1 (sinalizado em azul na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce

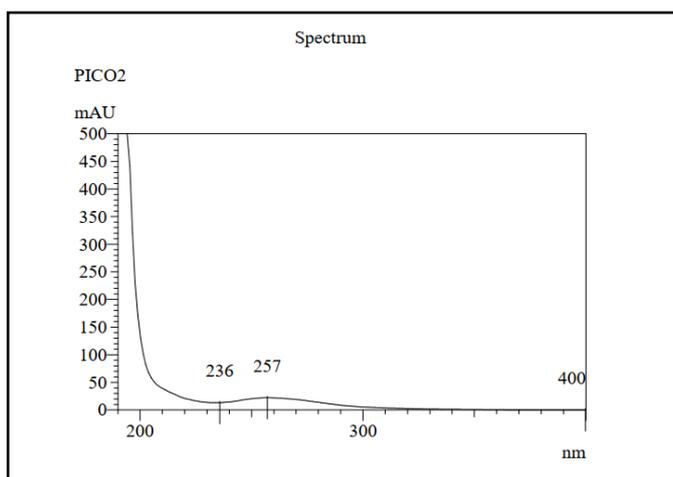


Figura 12 – Espectro UV do pico 2 (sinalizado em vermelho na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce

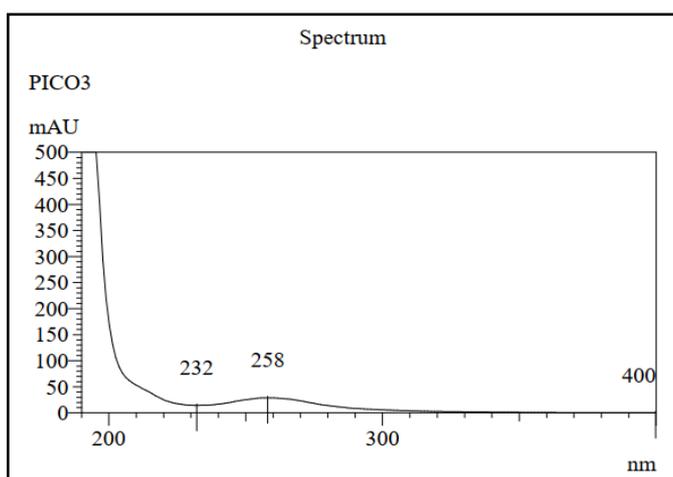


Figura 13 – Espectro UV do pico 3 (sinalizado em verde na Figura 10) da amostra de extrato bruto de milho super doce

A partir da observação do cromatograma obtido da amostra de extrato bruto, nota-se a presença de picos mais largos. Tal característica é devido a não purificação e concentração das substâncias presentes no extrato.

Os picos identificados apresentaram bandas de absorção nos espectros de ultravioleta com valores bem próximos, havendo pouca diferença entre as absorbâncias obtidas. Tendo observado a Tabela 4 e de acordo com dados elucidados na literatura e do conhecimento pode-se observar que tais espectros UV

são correspondentes a substâncias com características fenólicas, o que sugere a possível presença do ácido p-hidroxibenzoico (Pavia, et al., 2010).

Os compostos fenólicos possuem anel aromático, e em alguns casos se encontram conjugados, com isso, apresentam espectros de absorção UV característicos. Podem apresentar um ou mais picos de absorção que estão entre 230 a 340 nm. No entanto, caso sofram ionização por algum composto básico podem apresentar desvio batocrômico variando entre 15 e 50 nm, aumentando também a absorbância (Harbone, 1986).

5.1.2.2 Cromatograma da fração butanólica

A fração butanólica foi obtida a partir da partição líquido-líquido do extrato bruto, e em CCD apresentou manchas amareladas quando a amostra foi revelada com sulfato cérico. A Figura 14 mostra o cromatograma da fração onde foram observados quatro picos predominantes com os respectivos tempos de retenção: 3,647, 3,979, 4,245 e 5,047 minutos.

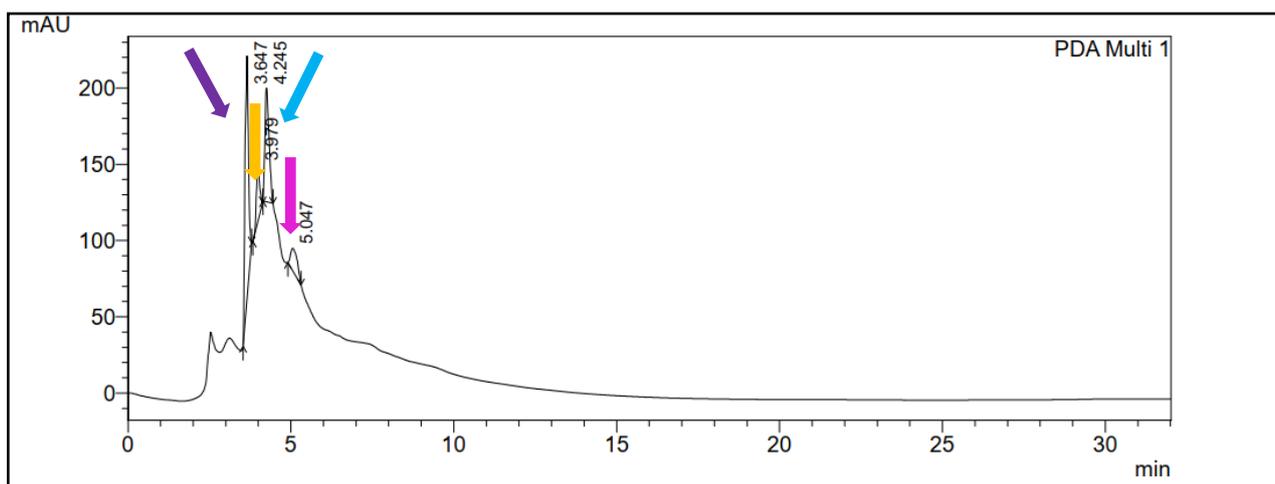


Figura 14 – Cromatograma da fração butanólica

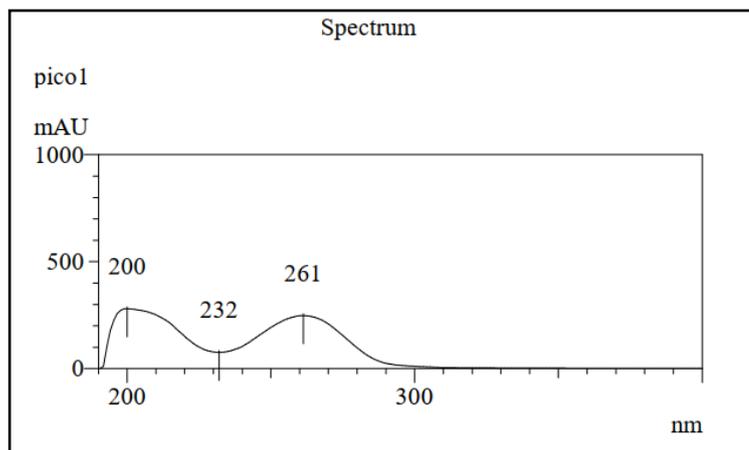


Figura 15 – Espectro UV do pico 1 (sinalizado em roxo na Figura 14) da amostra de fração butanólica

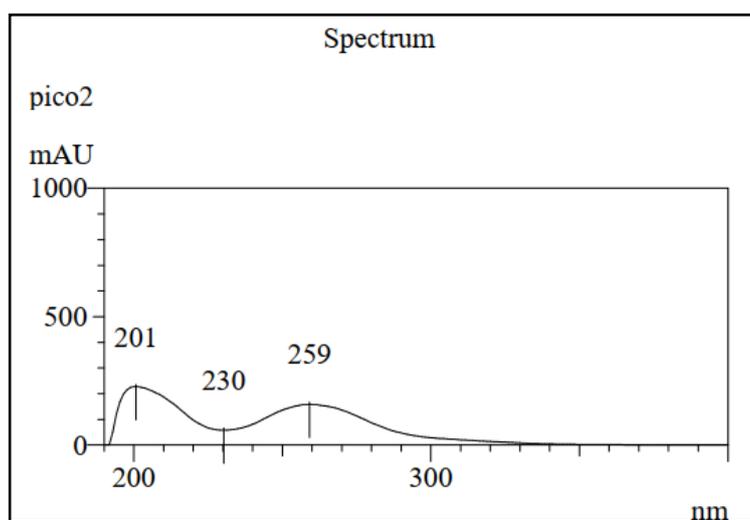


Figura 16 – Espectro UV do pico 2 (sinalizado em amarelo na Figura 14) da amostra de fração butanólica

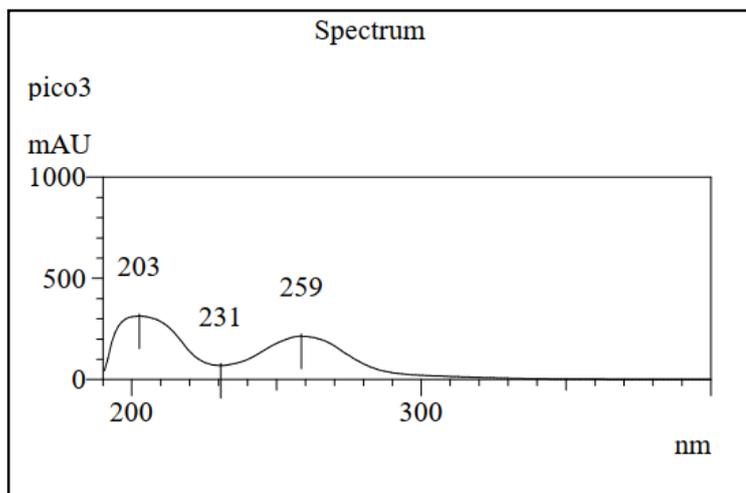


Figura 17 – Espectro UV do pico 3 (sinalizado em azul na Figura 14) da amostra de fração butanólica

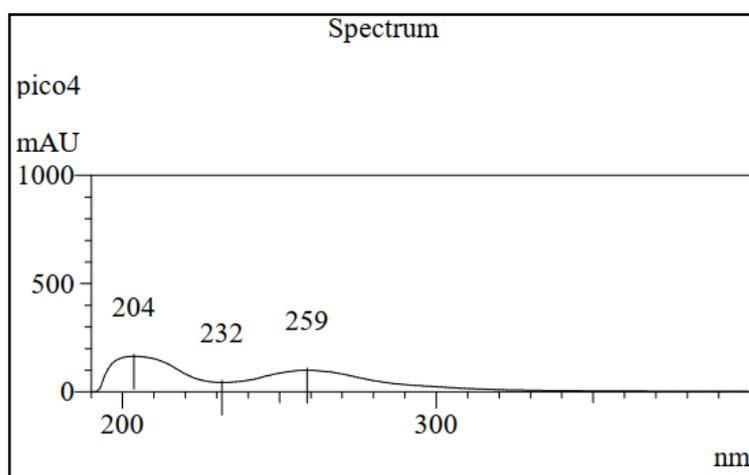


Figura 18 – Espectro UV do pico 4 (sinalizado em amarelo na Figura 14) da amostra de fração butanólica

Os espectros UV observados da fração butanólica apresentaram picos de absorvância entre 200, 230sh e 260 nm, com perfil semelhante. Os picos apresentaram como característica duas bandas e duas máximas de absorvância.

Assim como na amostra do extrato bruto, os espectros UV não apresentaram grandes variações entre os valores de absorbância.

A absorção de radiação ultravioleta resulta na excitação dos elétrons no seu estado fundamental, no entanto, os núcleos que unem os elétrons possuem um papel importante na determinação dos comprimentos de onda de absorção. Os núcleos vão determinar a força com a qual os elétrons são ligados e, desta forma vão influenciar no espaçamento de energia entre os estados fundamental e excitado. Com isso, a energia característica de uma transição e o comprimento de onda da radiação absorvida são atributos de um grupo de átomos e não dos elétrons de forma individual. O grupo de átomos responsável pela absorção é denominado de cromóforo. Na ocorrência de mudanças estruturais no cromóforo, é esperado que ocorra alteração de acordo na energia exata e na intensidade de absorção (Pavia, et al., 2010).

Em uma estrutura básica de cromóforo, a ligação de grupos substituintes no lugar do hidrogênio altera a posição e a intensidade de uma banda de absorção do cromóforo. Os grupos substituintes não vão gerar necessariamente sozinhos a absorção da radiação ultravioleta, mas a presença deles pode modificar a absorção do cromóforo central. Em exemplos de estruturas de ácidos fenólicos que possuem um perfil semelhante, com apenas alguns radicais diferentes, pode ocorrer uma variação na absorção da radiação ultravioleta. Além disso, outros substituintes podem apresentar outros efeitos na absorção dos cromóforos: deslocamento batocrômico (deslocamento para a energia mais baixa ou para um comprimento de onda maior) e deslocamento hipsocrômico (um deslocamento para energia mais alta ou para comprimento de onda menor) (Pavia, et al., 2010).

Outro ponto observado é em relação à similaridade dos espectros, o que pode ser identificado pela presença de compostos semelhantes. A variação nos pontos de absorbância pode ser entendida pelo efeito batocrômico e hipsocrômico, pois em ambos pode ocorrer um deslocamento para um comprimento de onda maior, ou menor (Pavia, et al., 2010; Campos e Markham, 2007).

5.1.2.3 Cromatograma da fração C1

A fração C1 foi obtida através do fracionamento da fração butanólica em coluna cromatográfica aberta fase inversa RP-2. Foi observado um pico majoritário com tempo de retenção de 3,647 minutos (Figura 19). O espectro de absorção UV apresentou bandas de absorção nos comprimentos de onda em 196, 233sh e 261 nm.

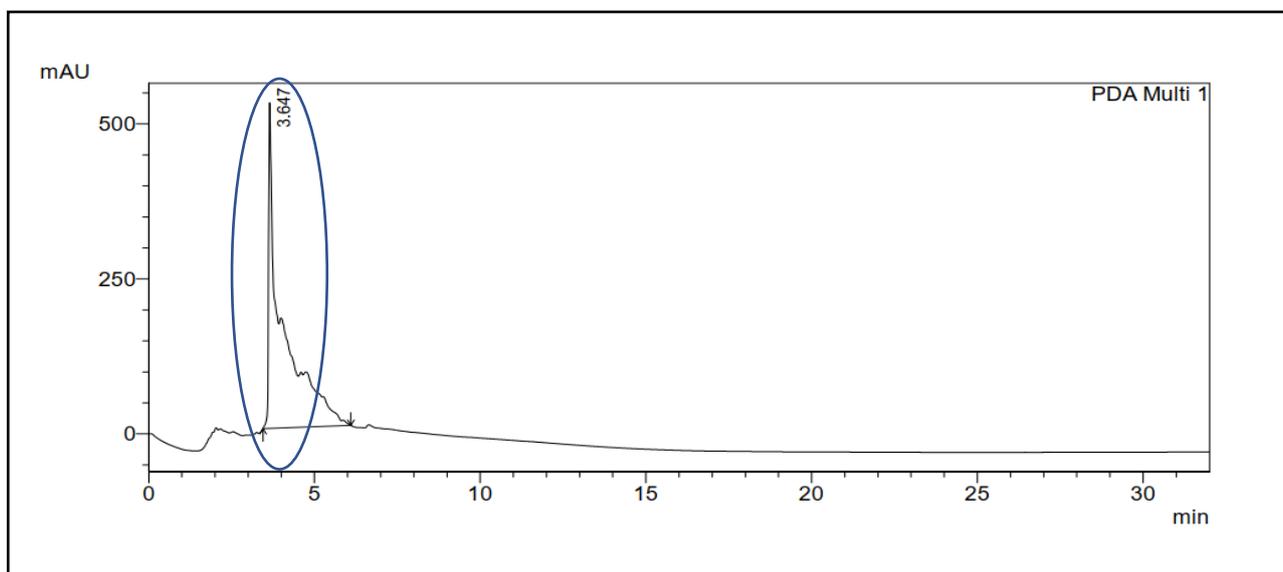


Figura 19 – Cromatograma da fração C1

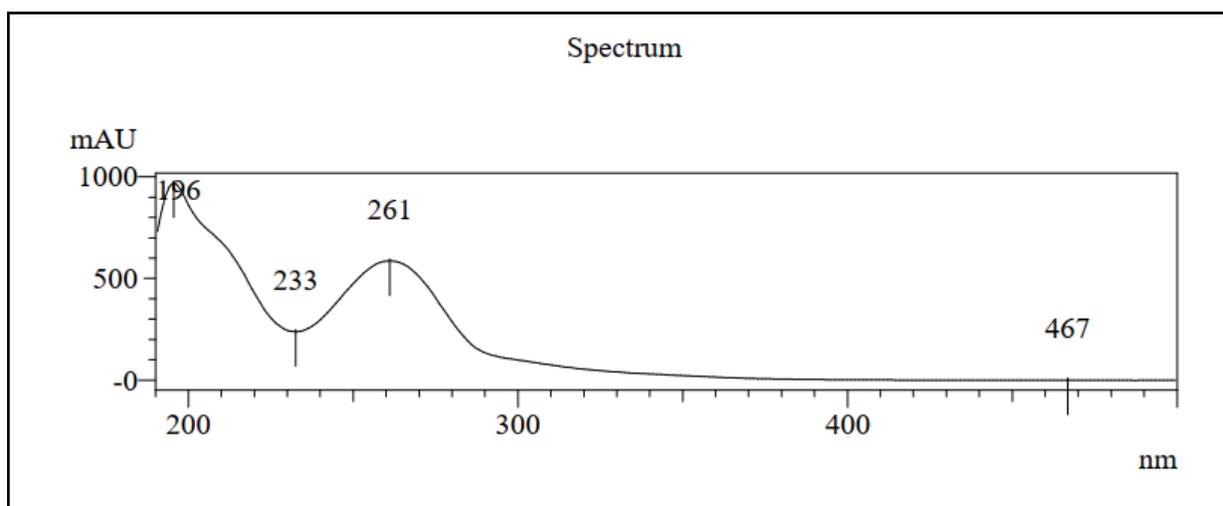


Figura 20 – Espectro UV do pico da fração C1

Através do cromatograma, observou-se que o pico majoritário da fração butanólica (3,647 minutos) manteve-se na fração C1, no entanto, o fracionamento mostrou a purificação da substância correspondente a esse pico, uma vez que a área observada foi aumentada e é de 14358792 nm².

A absorbância máxima identificada no espectro UV foi de 261 nm, de acordo com o espectro obtido e dados consultados na literatura, o espectro pode corresponder a presença de dois possíveis compostos: ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico (Robbins, 2003; Campos e Markham, 2007). A presença destes ácidos fenólicos foi identificada por alguns autores em diferentes amostras de milho, o que corrobora com o resultado observado (Ndolo e Beta, 2014; Massarolo, et al., 2018).

5.1.2.4 Cromatograma da fração acetato de etila

A fração em acetato de etila foi obtida a partir da partição líquido-líquido do extrato bruto. Foram observados quatro picos majoritários (Figura 21) com os respectivos tempos de retenção: 2,412, 3,420, 3,670 e 3,997 minutos.

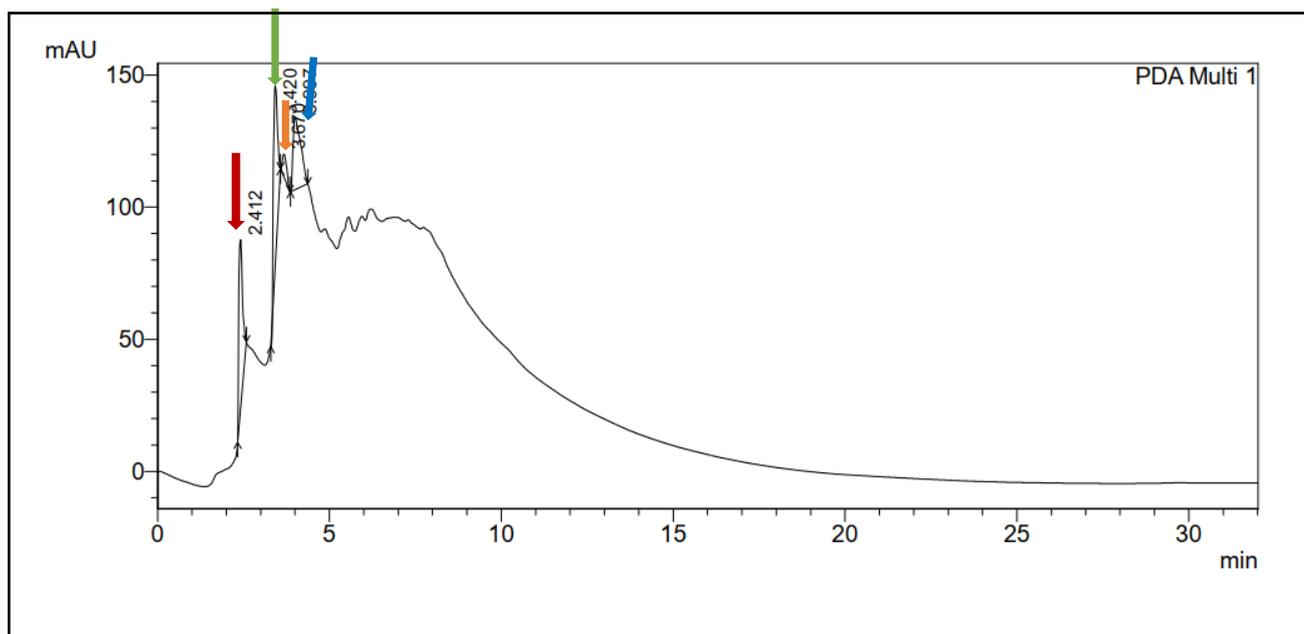


Figura 21 – Cromatograma da fração acetato de etila

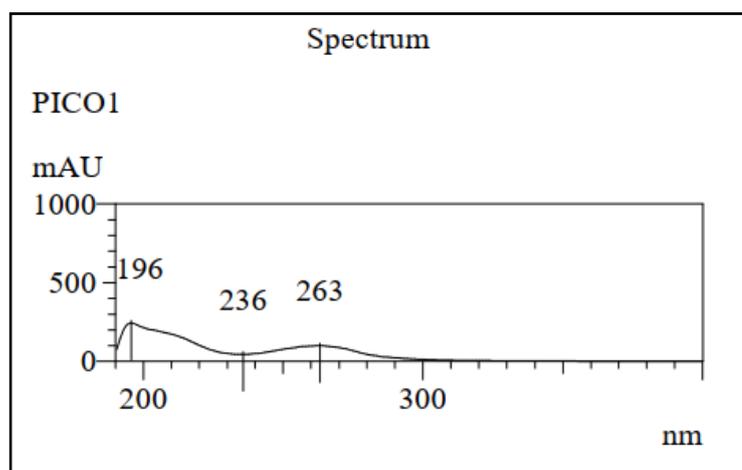


Figura 22 – Espectro UV do pico 1 (sinalizado em vermelho na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila

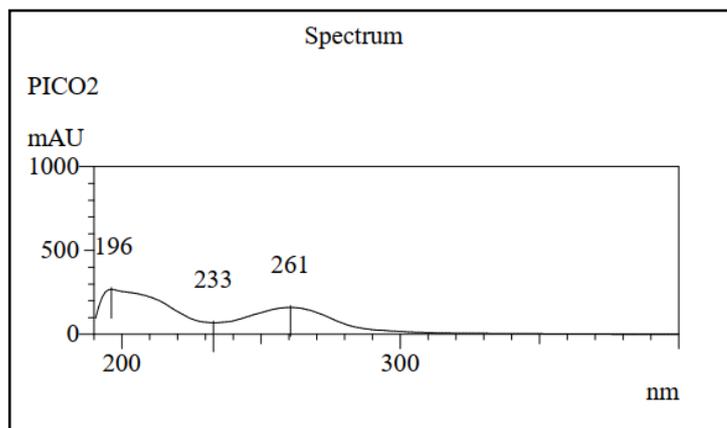


Figura 23 – Espectro UV do pico 2 (sinalizado em verde na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila

Nos picos 1 e 2 (Figura 22 e 23) foram observados as mesmas características e bandas de absorção de 196, 236sh e 263 nm., o que representa a presença de um perfil semelhante.

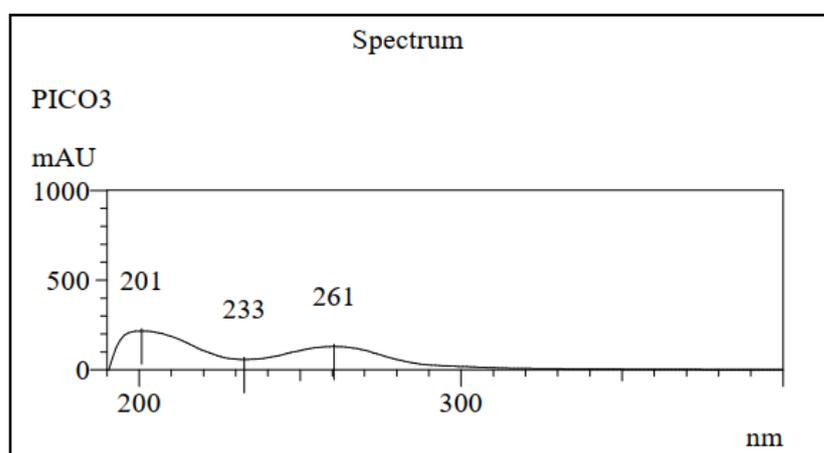


Figura 24 – Espectro UV do pico 3 (sinalizado em laranja na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila

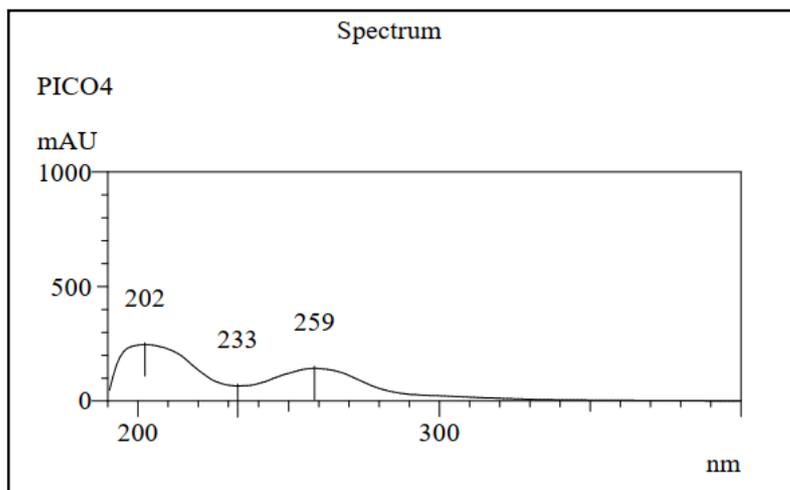


Figura 25 – Espectro UV do pico 4 (sinalizado em azul na Figura 21) da amostra de fração acetato de etila

Os picos 3 e 4 foram observados os valores de absorvância de 201, 233sh e 261. Ambos com valores semelhantes de absorvância.

Os resultados obtidos no cromatograma da fração em acetato de etila (Figura 21) apresentou picos com tempos de retenção variados, no entanto com espectros UV semelhantes entre si. A absorvância máxima UV obtida foi de 260, o que, assim como na fração C1 corrobora a possível presença de ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico (Figura 26) (Guenzi e McCalla, 1966; Robbins, 2003).

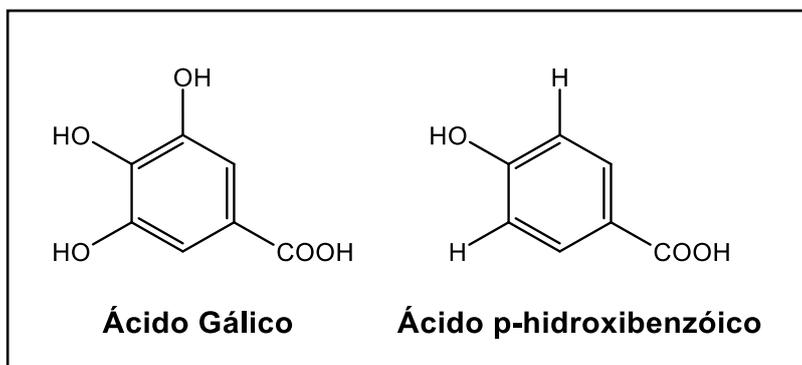


Figura 26 – Estrutura química do ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico

5.1.2.5 Cromatograma da fração A3

A fração A3 oriunda da fração em acetato de etila e obtida a partir da partição em coluna de *Sephadex*-LH20, em que foram obtidas 6 frações: A0, A1, A2, A3, A4 e A5. As frações obtidas que apresentaram manchas características em CCD foram selecionadas para análise em CLAE. No cromatograma da fração A3 (Figura 26) foram observados três picos majoritários com os tempos de retenção: 3,573, 3,870 e 4,222 minutos, respectivamente.

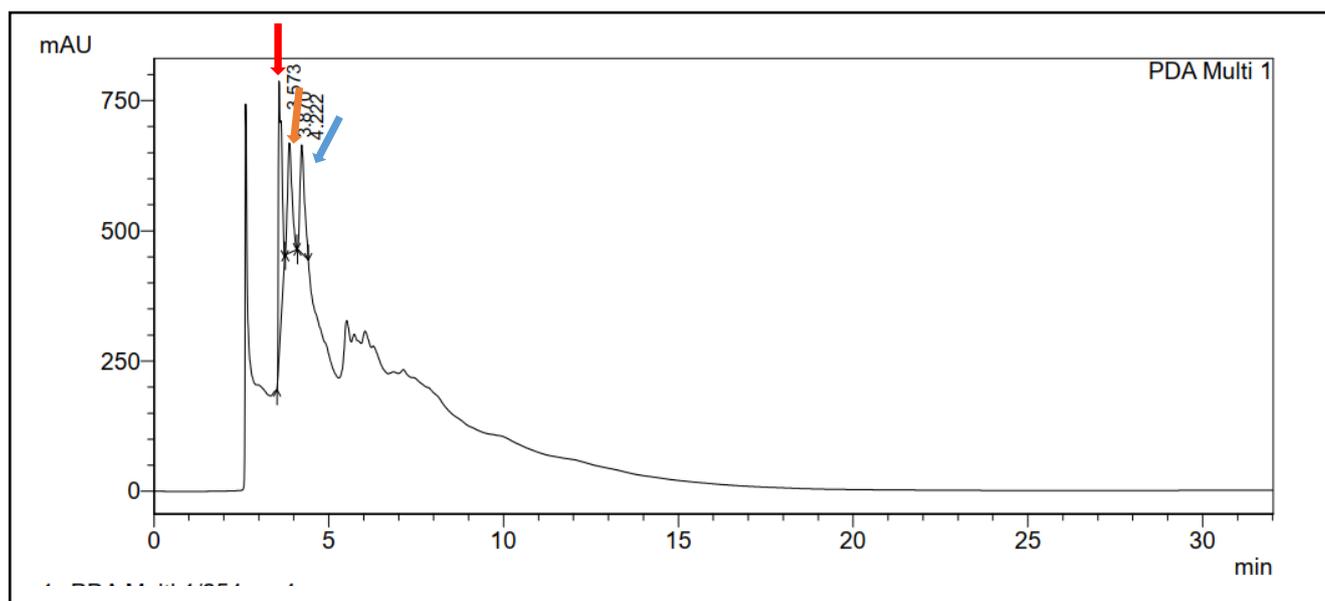


Figura 27 – Cromatograma da fração A3

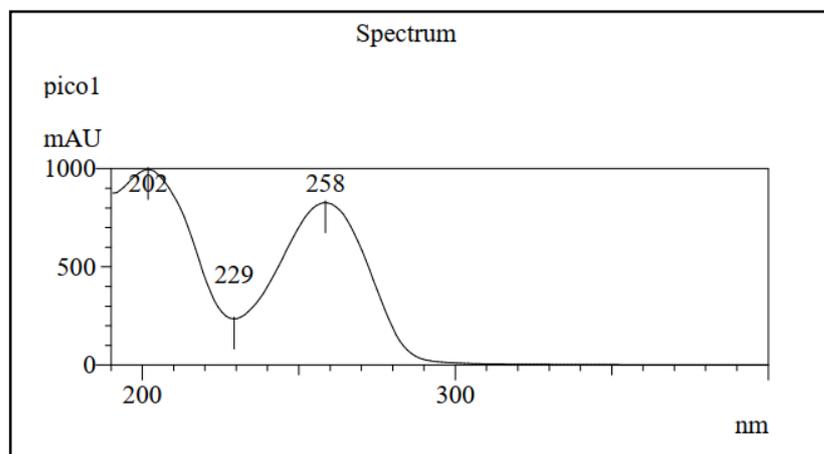


Figura 28 – Espectro UV do pico 1 (sinalizado em vermelho na Figura 26) da amostra de fração A3

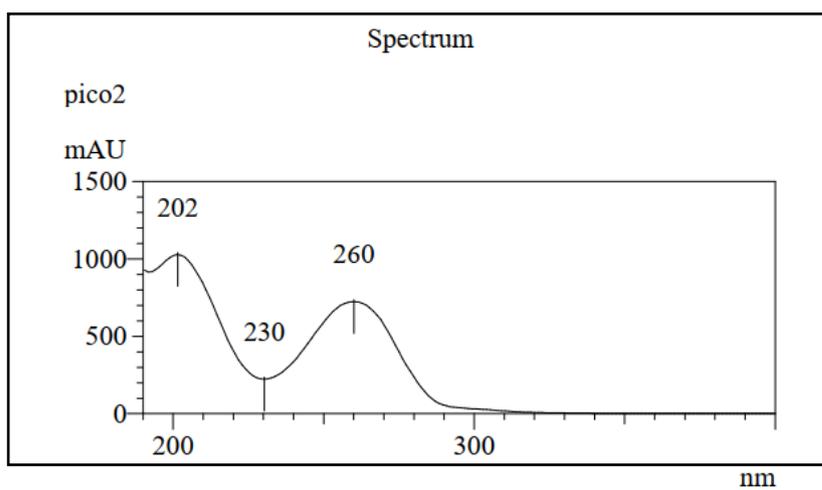


Figura 29 – Espectro UV do pico 2 (sinalizado em laranja na Figura 26) da amostra de fração A3

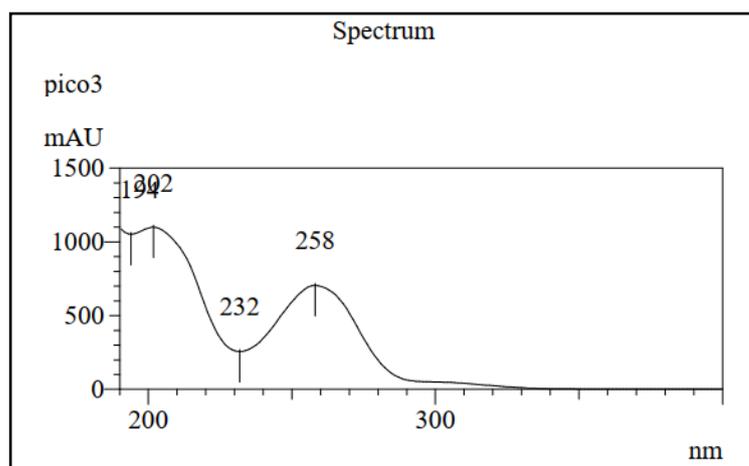


Figura 30 – Espectro UV do pico 3 (sinalizado em azul na Figura 26) da amostra de fração A3

Os espectros de UV dos picos identificados no cromatograma estão demonstrados nas Figuras 27, 28 e 29. Em ambos os espectros foram observadas duas máximas de comprimento de onda e características semelhantes de bandas de absorvância.

Os picos observados na fração A3, proveniente da fração acetato de etila, demonstraram semelhança entre si. O resultado em ambos os espectros os comprimentos de onda correspondem aos ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico – Figura 26) os quais foram detectados a presença a partir do espectro UV nas demais amostras.

5.1.2.6 Cromatograma da fração A4

A fração A4, a última analisada foi obtida a partir da partição em coluna *Sephadex*-LH20, em que foram obtidas 6 frações (dados não apresentados). Assim como na fração A3, a fração A4 foi selecionada por possuir as características compatíveis a presença dos compostos fenólicos. Na Figura 30 é demonstrado o cromatograma da fração A4 em que são observados quatro picos majoritários, os

tempos de retenção dos picos são: 3,869, 4,187, 5,423 e 5,862 minutos, respectivamente.

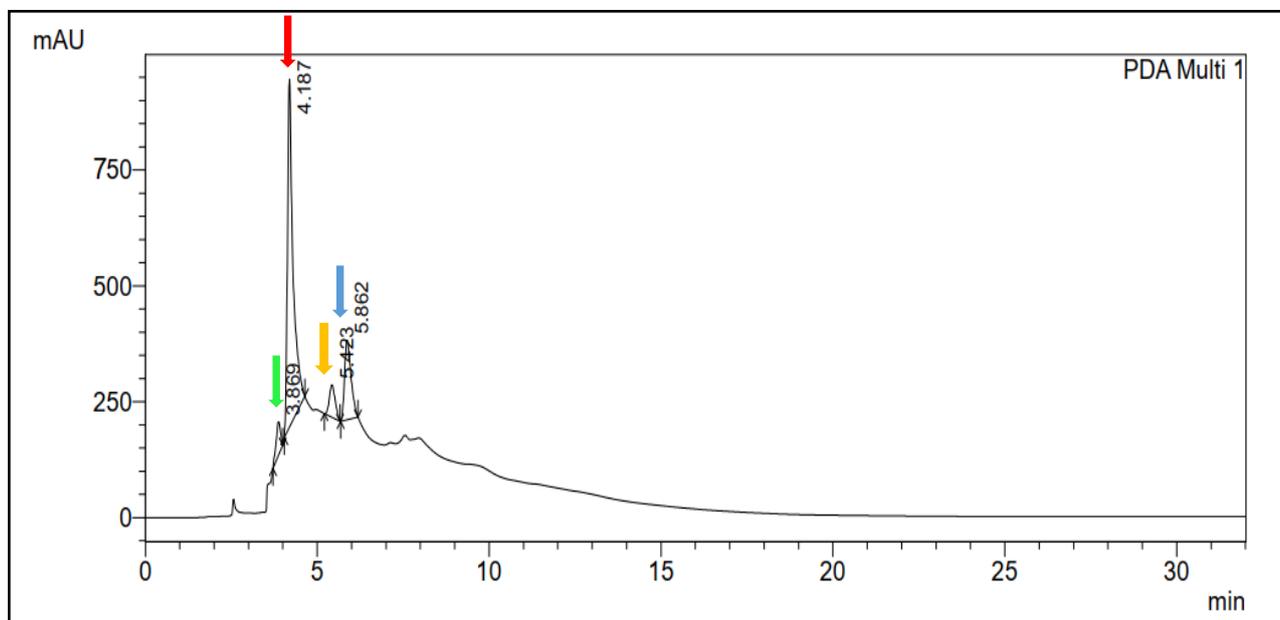


Figura 31 – Cromatograma da fração A4

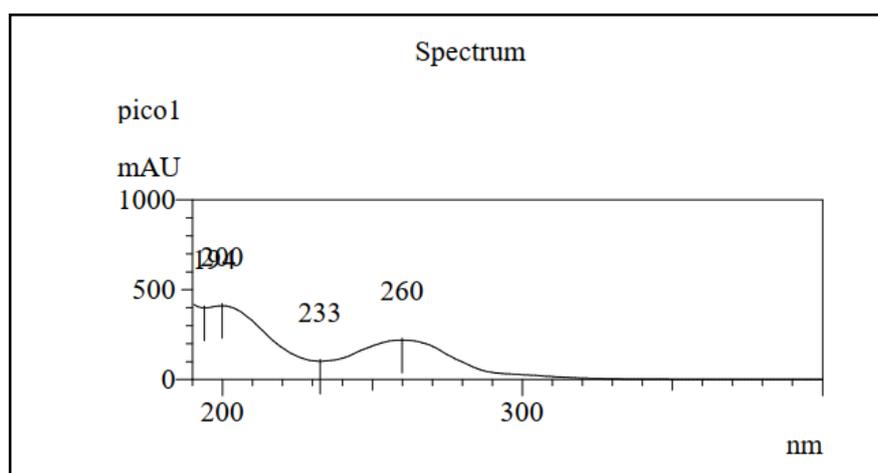


Figura 32 – Espectro UV do pico 1 (sinalizado em verde na Figura 30) da amostra de fração A4

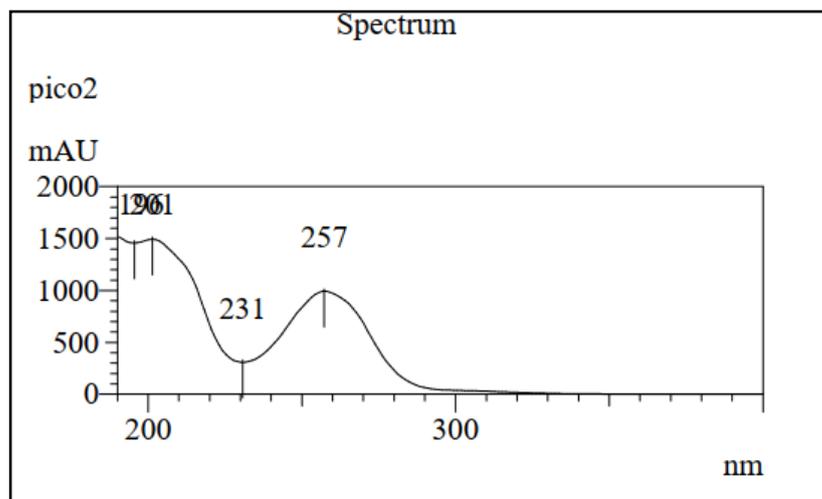


Figura 33 – Espectro UV do pico 2 (sinalizado em vermelho na Figura 30) da amostra de fração A4

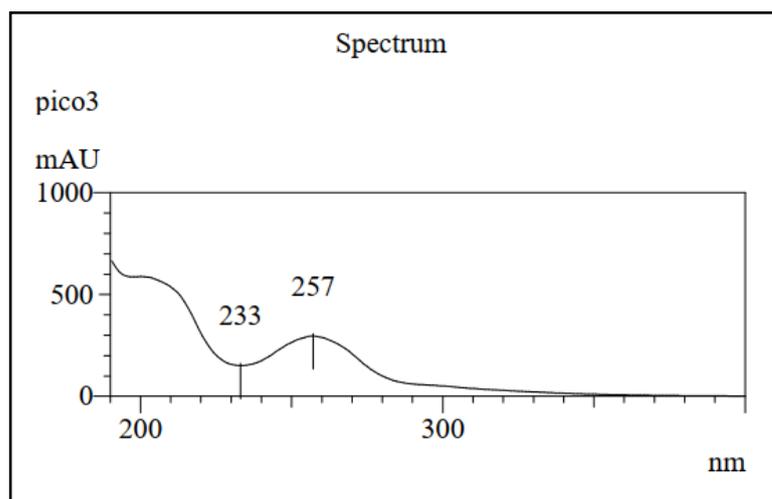


Figura 34 – Espectro UV do pico 3 (sinalizado em laranja na Figura 30) da amostra de fração A4

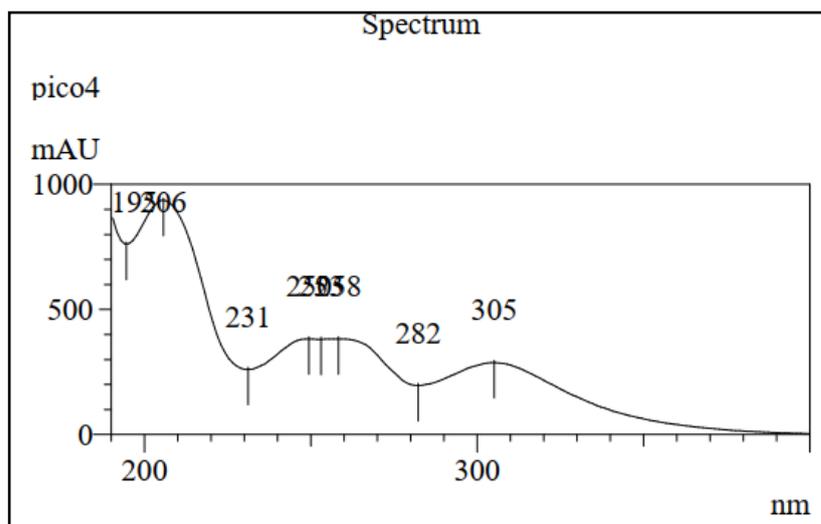


Figura 35 – Espectro UV do pico 4 (sinalizado em azul na Figura 30) da amostra de fração A4

A partir dos espectros UV foram observadas as mesmas características no pico 1 (Figura 31), no pico 2 (Figura 32) e no pico 3 (Figura 33), assim como nas frações anteriores discutidas. O pico 4 apresentou-se com três máximas de absorvância, o que não havia sido identificado anteriormente para as outras amostras, no entanto não foi possível realizar a identificação do composto a partir do espectro UV obtido.

Em todos cromatogramas, o pico com tempo de retenção de aproximadamente 3,8 minutos (de 3,647 a 3,997 minutos) e seu espectro de UV apresenta máxima de comprimento de onda que varia entre 200 e 260 nm. Tal variação no comprimento de onda e tempo de retenção pode ocorrer devido a interação entre os componentes da amostra e o solvente, o que pode gerar o deslocamento batocrômico e hipsocrômico, onde há um deslocamento do comprimento de onda para um comprimento de onda menor ou maior (Falcão, et al., 2003; Pavia, et al., 2010).

De acordo com as observações já descritas anteriormente, o pico de interesse possivelmente é correspondente a dois ácidos fenólicos, o ácido gálico e o ácido p-hidroxibenzoico. Os quais já foram identificados em farinhas de milho (Massarolo, et al., 2018), e no milho e em suas frações (Ndolo e Beta, 2014).

Os dados encontrados na literatura de espectros de UV com comprimento de onda entre 200 e 270 nm podem estar relacionados à compostos fenólicos, ácidos aromáticos ou ainda hidrocarbonetos (Yang et al., 2011; Silverstein e Webster, 2001; WaksmundzkaHajnos, 1998). No entanto, de acordo com as condições cromatográficas empregadas imagina-se que esta trata-se de uma substância fenólica ou um ácido aromático (Silverstein e Webster, 2001).

No entanto, para que fosse realizada a completa explicação estrutural dos ácidos fenólicos referente a esse pico e aos demais picos que apresentaram características semelhantes, seriam necessárias técnicas para auxiliar na sua identificação como os métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), ou ainda Espectrometria de Massas (EM) ou Infravermelho (IV) contudo o quantitativo de massa das amostras em questão era insuficiente, essas técnicas não puderam ser concluídas, e assim não se pôde efetivar a elucidação estrutural completa da substância mais purificada nesse trabalho de Dissertação de Mestrado.

5.3 Atividade antioxidante

É crescente inclusão de produtos naturais na dieta humana, e principalmente a utilização de produtos com função antioxidante em formulações alimentares e que exerçam função antioxidante. Tal tendência pode ser entendida pelas mudanças de hábitos da população, a qual têm mudado os hábitos alimentares ao longo dos anos (Martinelli e Cavalli, 2019). Alguns estudos certificam que diversas fontes vegetais biossintetizam fitoquímicos que apresentam atividade antioxidante e são utilizados como fonte natural de compostos que tem capacidade de sequestrar radicais livres (Lachman, et al., 2010).

A presença de fitoquímicos na dieta pode auxiliar na prevenção de doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, obesidade e diabetes tipo 2. Tal ação é explicada pela capacidade de controlar o estresse oxidativo produzido no organismo, a presença de radicais livres em desequilíbrio pode causar danos a membrana celular e ao DNA, conseqüentemente causando as doenças e possíveis mutações (Zhang, et al., 2015).

A atividade antioxidante foi realizada através do método DPPH fotolorimétrico, um método onde o radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil

(DPPH') é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante natural em sequestrar radicais livres. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH e o convertem em 2,2-difenil-1-picril hidrazina e o grau de descoloração da reação é o indicativo do potencial antioxidante da amostra. As amostras avaliadas que foram pré-selecionadas anteriormente de acordo com os resultados obtidos na CLAE e os padrões de referência foram avaliadas nas concentrações de 1000 a 10 µg/mL. Os resultados foram expressos em percentual de inibição da oxidação do radical.

Os padrões utilizados neste trabalho foram os ácidos fenólicos ácido gálico e ácido clorogênico, o flavonoide quercetina, o ácido ascórbico e o padrão comercial antioxidante, o BHT (Butil-hidroxi-tolueno).

Os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoide) foram usados como padrões devido sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres além de serem encontrados em espécies vegetais (Soares, 2002). O ácido ascórbico, outro padrão utilizado, possui capacidade antioxidante e é amplamente utilizado pela indústria de alimentos (Melo, et al.,2008). O Butil-hidroxi-tolueno (BHT) é uma substância de estrutura fenólica com função antioxidante utilizada há anos em alimentos como aditivo alimentar e em outras formulações de medicamentos e cosméticos (Kahl e Kappus, 1993).

Através do método DPPH foi observado que as amostras apresentaram atividade sequestrador de radicais livres nas três concentrações avaliadas (1000, 100 e 10 µg/mL) como mostra a Tabela 5.

Os percentuais de ação antioxidante demonstraram-se mais expressivos nas amostras de concentração 1000µg/mL e na concentração 100µg/mL a fração A3 (72,7%) apresentaram atividade sequestrante de radicais livres superior ao padrão comercial BHT (69,2%) o que demonstra a ação antioxidante das amostras.

Tabela 5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH das amostras e dos padrões de referência

Amostras	Concentrações		
	1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL
Extrato bruto Milho SD	76,9% ± 1,72	67,9% ± 8,03	52,7% ± 1,36
Fração butanólica	71,1% ± 2,24	53,2% ± 4,49	49,7% ± 9,54
Fração C1	76,8% ± 0,64	49,8% ± 1,46	46,4% ± 1,28
Fração Acetato de Etila	71,8% ± 0,64	67,0% ± 0,96	36,1% ± 1,60
Fração A3	74,7% ± 0,96	72,7% ± 2,57	48,8% ± 1,60
Fração A4	65,9% ± 0,64	70,4% ± 3,67	43,6% ± 1,28
Ácido ascórbico	77,7% ± 1,63	72,1% ± 3,22	65,7% ± 9,32
Ácido gálico	75,9% ± 2,76	72,4% ± 1,54	63,2% ± 0,64
Ácido clorogênico	77,3% ± 1,72	72,9% ± 0,96	67,3% ± 0,90
BHT	67,9% ± 0,32	69,2% ± 4,81	67,4,7% ± 0,26
Quercetina	71,8% ± 0,64	69,2% ± 5,42	65,7% ± 6,10

*Média ± Desvio Padrão (n=3)

A amostra de extrato bruto se apresentou como melhor antioxidante frente ao DPPH nas três concentrações avaliadas. Na concentração de 1000 µg/mL demonstrou uma maior ação antioxidante comparado aos padrões de ácido gálico, BHT e ao flavonoide quercetina.

Observa-se que os padrões de referência utilizados se mostraram com resultados positivos nas três concentrações utilizadas. O que pode ser entendido de forma que os padrões possuem ação antioxidante ainda que em menor concentração.

Barbosa, et al., 2016 em seu estudo avaliando a atividade antioxidante pelo método DPPH do milho pipoca de duas cultivares antes e após o processamento obteve valores de 52,03% de % de inibição de milhos de grão preto e 19,37% para milhos de grão amarelo. Outro ponto relevante obtidos nos resultados do estudo foram os valores de % de inibição obtidos após o processamento dos milhos, 11,68% para milhos de grão preto e 5,85% pra milhos de grão amarelo. O processamento afetou significativamente a atividade antioxidante das amostras.

Em um estudo avaliando a atividade antioxidante do extrato metanólico de grãos de milho verde de grãos pretos pelo método DPPH, Ribeiro, et al., 2014 obtiveram um % de inibição de oxidação de 66,19% para os extratos sem alteração

de pH. No mesmo estudo, avaliaram a influência do pH dos extratos no % de inibição de oxidação e obtiveram resultados diferentes, para o pH básico (8,9) 34,47% e pra o pH ácido (3,9) 54,07%.

Em geral, os resultados obtidos na análise de atividade antioxidante desta dissertação se mostraram satisfatórios. Os estudos acerca de atividade antioxidante de extrato metanólico milho super doce pelo método DPPH ainda são escassos, no entanto, neste trabalho buscou-se acrescentar o conhecimento acerca das cultivares de milho super doce UENF SD08 e UENF SD09.

6. CONCLUSÃO

O milho é um cereal que faz parte da alimentação humana e animal, por isso é um alimento comum e conhecido em diversas preparações. O milho super doce UENF SD08 e UENF SD09 registrado junto à EMBRAPA em 2019, além de possuir as condições de cultivo adequadas para a região Norte e Noroeste Fluminense, também apresentou a presença de compostos bioativos.

O estudo auxiliou no aumento do conhecimento químico acerca das amostras. Apesar de suas limitações, foram conhecidas algumas características do extrato metanólico e das frações. A partição do extrato e das posteriores frações foi responsável por purificar as amostras e concentrar os compostos contidos no extrato inicial. A partir disso, a análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência possibilitou observar a possível presença de ácido gálico e ácido p-hidroxibenzoico nas amostras.

O extrato bruto e as demais frações apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH, e tal capacidade antioxidante pode ser entendida pela presença de compostos fenólicos nas amostras.

Com isso, este estudo pode contribuir para o conhecimento técnico-científico de um híbrido de milho super doce desenvolvido na Universidade, aumentando o entendimento acerca do cultivar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreo, D., Jorge, N. (2006). Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2), 319-336.

Artuzo, F.D., Foguessato, C. R., Souza, A. R. L. de, Silva, L. X. (2018) Gestão de custos na produção de milho e soja. *Revista Brasileira de Gestão de Negócios*. 20 (2):273-294.

Baggio, S.R., Bragagnolo, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24:64-70.

Barbosa, N. A., Lopes, R., Paes, M. (2016). Compostos bioativos nos grãos de milho pipoca antes e após o processamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo.

Batista, A. M., Teixeira, F. F. (2013) Identificação de alelos que conferem o fenótipo de milho-doce no banco ativo de germoplasma de milho. *Embrapa Milho e*

Sorgo-Artigo em anais de congresso In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Sete Lagoas.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews* 1998; 56 (11):317-33

Campos, M da G., Markham, K. R. (2007) *Structure information from HPLC and On-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids*. Gráfica de Coimbra, Ltda. Imprensa da Universidade de Coimbra. 118p.

Castro M. V. L., Naves, M. M. V., Oliveira, J. P. Froes, L. de O. (2009) Rendimento industrial e composição química de milho de alta qualidade proteica em relação a híbridos comerciais. *Revista Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia*, 39 (3):233-242.

Castro, I. M.; Anjos, M. R. (2009) Determinação de aflatoxinas em milho por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência-CLAE/DF. *Embrapa Agroindústria de Alimentos - Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Chaves, M. H. (1997). Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". *Química Nova*, 20, 560-562.

Collins, C.H, Braga, G.L, Bonato, P.S)1993) Introdução a métodos cromatográficos. 5. Ed. Campinas, 279p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2021) *Acompanhamento safra brasileira de grãos– Safra 2020/21- Quarto levantamento*, Brasília, 8(4): 1-85.

Degáspari, C. H.; Waszczynskyj, N.; Prado, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências agrotécnicas*. 29:617-622.

Dewick, P.M. de. (2009) *Medicinal Natural Products*. 3. Ed. Reino Unido, 539p.

Dodson, H. G. S., Tracy, W. F. (2015) Endosperm carbohydrate composition and kernel characteristics of shrunken2- intermediate (sh2-i/sh2-i Su1/Su1) and shrunken2-intermediate-sugary1-reference (sh2-i/sh2-i su1-r/su1-r) in sweetcorn. *Crop Science* 55: 2647-2656.

Embrapa. (2021) *Curso de Cromatografia: Conceitos Básicos*. Apostila Módulo 4. 18p.

Falcao, L. D., Barros, D. M., Gauche, C., Luiz, M. T. B. (2003). Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 21(2).

Guenzi, W. D., McCalla, T. M. (1966). *Phenolic Acids in Oats, Wheat, Sorghum, and Corn Residues and Their Phytotoxicity*¹. *Agronomy Journal*, 58(3), 303.

Guia do Milho (2006) Tecnologia do campo à mesa. *Conselho de informação sobre biotecnologia*. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf>. Acesso em janeiro de 2021.

Gonçalves, G. M. B. (2019) *Desenvolvimento de híbridos dialélicos de milho super doce e avaliação de potencial agrônômico para a região norte/noroeste fluminense*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Campos dos Goytacazes, RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 88p.

Harbone, J.B. (1989) General procedures and measurement of total phenolics. *In: Dey, P. M.; Harbone, J. B. Methods plant biochemistry*, v.1: plant phenolics. (ed). London: Academic press.

Henrique, V. A., Nunes, C. R., Azevedo, F. T., Pereira, S. M. de F., Barbosa, J. B. Talma, S. V. (2018). Alimentos Funcionais: Aspectos nutricionais na qualidade de vida. Aracaju, IFS, 57p.

Kahl, R., Kappus, H. (1993). Toxikologie der synthetischen Antioxidantien BHA und BHT im Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch* 196, 329–338.

Kwiatkowski, A., Clemente, E. (2007) Características do milho doce (*Zea mays* L.) para industrialização. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 1(2): 93-103.

Lachman, J.; Orsak, M.; Hejtmankova, A.; Kovarova, E. (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology*. 43:52–58

Lima, G. J. M. M.; Paes, M. C. D.; Queiroz, V. A. V. (2011) O Milho na Nutrição Animal e Humana. *In: CRUZ, J. C. et al (edit.). Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde*. Embrapa Informação Técnica, ed. 1. Brasília.

Martelli, F.; Nunes, F. M. F. (2014) Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, 66(3):54-57.

Martinelli, S. S.; Cavalli, S. B. (2019) Alimentação saudável e sustentável: uma revisão narrativa sobre desafios e perspectivas. *Ciência & Saúde Coletiva*. 24(11).

Massarolo, K. C., Ferreira, C. F. J., Borba, V. S., Silva, M. N., Kupski, L., Badiale-Furlong, E. Efeito do processamento hidrotérmico na disponibilidade de ácidos fenólicos em farinhas de milho.

Melo, E. D. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. D., Nascimento, R. J. D. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44:193-201.

Menegaldo, J. G. (2011) A importância do milho na vida das pessoas. *Embrapa Meio-Norte-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)*.

Nariya, P. B., Shukla, V. J., Acharya, R. N. (2012). Phytochemical screening and in vitro evaluation of free radical scavenging activity of *Cordia macleodii* bark. (HOOK. F. & THOMSON). *Free Radicals and Antioxidants*, 2(3), 36-40.

Nihei, T. H., Bertagna, F. A. B., Kuki, M. C., Scapim, C. A., Pinto, R. J. B., Amaral Júnior, A. T. do A. (2020) Testers in supersweet corn lines. *Ciência Rural*. 50(3).

Oliveira, A. C. D., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.

Oliveira, G.L.S. (2015) Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu, 17(1): 36-44.

Oliveira Junior, G. I. de, Moraes., V. B. de, Costa, N. M. B., Paes, M. C. D. (2011) Importância nutricional do milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Org.). *Milho biofortificado*. Visconde do Rio Branco: Suprema. 107-124.

Oliveira, M. S.; Badiale-Furlong, E. (2008) Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*, 2(1): 1-10.

Paes, M. C. D. (2006) *Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Milho*. Circular Técnica, 75. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. (2010) Espectroscopia no ultravioleta. In: *Introdução à espectroscopia*. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning. 365-398.

Pereira, B. C., Pereira, A. K. da T. (2012) Radicais livres: uma nova abordagem. *Revista Brasileira de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde - RBPICS*. 1(1):35-42.

Pereira Filho, I. A.; Borghi. E. (2020) Sementes de Milho: nova safra, novas cultivares e contínua a dominância dos transgênicos. *Embrapa Milho e Sorgo*. Sete Lagoas, MG. 1, 50p.

Pereira Filho, I. A., Teixeira, F. F. (2016) O cultivo do milho-doce. *Embrapa*. Brasília, DF.

Pereira, M. G., Gonçalves, G.M.B., Durães, N.N.L., Crevalari, J.A. Ferreira Júnior, J.A. e Entringer, G.C. (2019) UENF SD 08 and UENF SD 09. Super-sweet corn hybrids for Northern Rio de Janeiro, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology. Brazilian Society of Plant Breeding*. 19: 235-239.

Ponciano, N. J., Souza, P. M., Rezende, A. M. (2011) Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. *Revista Paranaense de Desenvolvimento-RPD*, 104: 23-40.

Pozzo, D. N. (2014) O perfil do consumidor de alimentos funcionais: um estudo bibliográfico das tendências mundiais. *Gestão contemporânea: Revista de negócios do CESUCA*.1(2):18-37.

Rashmi, H. B., Negi, P. S. (2020) Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research Internacional*. 109298.

Reis, C.N. (2011) *Annona muricata L: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 126 p.

Ribeiro, E. P., Paes, M. C. D., Teixeira, F. F., Barbosa, N., de Moura, P. L. T., de Moraes, M. C. B. (2014). Atividade antioxidante de milho verde de grãos pretos. In: *Congresso nacional de milho e sorgo, 30.; Simpósio sobre lepdópteros comuns a milho, soja e algodão. Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global: resumos expandidos*. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.

Rocha, M. S., Figueiredo, R. W. de, Araújo, M. A. da M., Moreira-Araújo, R. S. dos R. (2013). Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(4): 933-941.

Rockenbach, A. P., Rizzardi, M. A., Nunes, A. L., Bianchi, M. A., Caverzan, A., Schneider, T. (2018) Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 17(1): 59-70.

Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Moraes, S. M., Sampaio, C. D. G., Pérez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.

Shami, N. J. I., Moreira, E. A. M. (2004) Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*. 17:227-236.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5ª edição, Porto Alegre: Bookman.

Silva, M. F. Maciel, G. M., Finzi, R. R., Peixoto, J. V. M., Rezende, W. S., Castoldi, R. (2020) Selection indexes for agronomic and chemical traits in segregating sweetcorn populations. *Hortic. Bras.*, Vitoria da Conquist, BA. 38(1): 71-77.

Silva, M. L. C. Costa, R. S., Santana, A. dos S., Koblitz, M. G. B. (2010) Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3): 669-681.

Silverstein, R.M., Webster, F.X. (2001) Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6a edição, LTC. Rio de Janeiro, RJ.

Siyuan, S.; Tong, L.; Liu, R. (2018) Corn phytochemical sand their health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 7(3): 185-195.

Soares, D. J., Tavares, T. M., Brasil, I. M., Figueiredo, R. W., Sousa, P. H. M. (2012) Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 30(2).

Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1): 71–81.

Strazzi, S. (2015) Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. *Revista Visão Agrícola–USP/ESALQ*, 13: 146-150.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. (2020) Universidade de São Paulo (USP). *Food Research Center (FoRC)*. Versão 7.1. São Paulo.

Tintori, F. R. P. (2018) *Bioacessibilidade in vitro de tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Piracicaba- SP. Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ. 89p.

Tracy, W.F. (2001) Sweetcorn. In: *Hallauer AR (ed) Specialtycorn*. Boca Raton,;155-198.

Vasconcelos, T. B.; Cardoso, A. R. N. R.; Josino, J. B.; Macena, R. H. M.; Bastos, V. C. D. (2015) Radicais Livres e Anioxidantes: Proteção ou Perigo? *Journal of Helth Sciences*. 16 (3): 213-219.

Vidal, A. M., Dias, D.O., Martins, E.S.M., Oliveira, R.S., Nascimento, RE. M. S., Correia, M. das G. da S. (2012) A ingestão de alimentos funcionais é sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. *Ciências Biológicas e da Saúde*. Aracaju. 15(1): 43-52.

Waksmundzka-Hajnos, M. (1998) Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *Journal of Chromatography B*. 717:93-118.

Yang, H., Ge, Y., Sun, Y., Liu, D., Ye, X., Wu, D. (2011) Identification and characterisation of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. *Food Chemistry*. 128:1128-1135.

Zhang, Y.-J.; Gan, R.-Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Li, A.-N.; Xu, D.-P.; Li, H.-B. (2015) Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*. 20(12):21138-21156

Zitka, O., Sochor, J. Rop, O. Skalickova, S., Sobrova, P., Zehnalaek, J., Beklova, M., Krska, B. Adam, V., Zizek, R. (2011) Comparison of various easy-to-use procedures for extraction of phenols from apricot fruits. *Molecules*, 16(4): 2914-2936.