

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS DE
GRÃOS E EXTRATO CONCENTRADO DE CEVADA
VISANDO APLICAÇÕES NUTRICIONAIS**

TESE DE DOUTORADO

Aline Sobreira Bezerra

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS DE GRÃOS E
EXTRATO CONCENTRADO DE CEVADA VISANDO
APLICAÇÕES NUTRICIONAIS**

Aline Sobreira Bezerra

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bezerra, Aline Sobreira

Avaliação de compostos funcionais de grãos e extrato concentrado de cevada visando aplicações nutricionais / Aline Sobreira Bezerra.-2012.

123 f.; 30cm

Orientador: José Laerte Nörnberg

Coorientador: Leandro Machado de Carvalho

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, RS, 2012

1. Cevada 2. Atividade antioxidante 3. Compostos bioativos I. Nörnberg, José Laerte II. de Carvalho, Leandro Machado III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos**

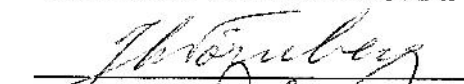
A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**AValiação de Compostos Funcionais de Grãos e Extrato
Concentrado de Cevada visando Aplicações
Nutricionais**

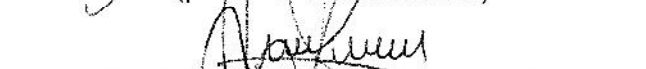
Elaborada por
Aline Sobreira Bezerra

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:



José Laerte Nörnberg, Dr.
(presidente/orientador)



Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)



Neidi Garcia Penna, Dr^a. (UFSM)



José Maria Monserrat, Dr. (FURG)



Tatiana Emanuelli, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 04 de dezembro de 2012.

Ao único que é digno de receber toda honra, glória e louvor; ao meu criador e autor da minha fé. Ao Rei eterno, imortal, invisível, mas real, a Deus dedico todo esse trabalho!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, o autor e consumidor da minha fé, que renovava diariamente minhas forças e por ter colocado pessoas maravilhosas e ajudadoras para que esse trabalho se realizasse. Obrigada Senhor por fazer desse sonho uma realidade em minha vida!

Ao meu marido Marcelo, companheiro nas horas de alegria e estresse, e pela ajuda sempre que necessário; agradeço por estar ao meu lado e por me apoiar nesse sonho. Eu te amo demais!

Aos meus amados filhos Mariana e Daniel.

Aos meus pais por ter me ensinado a ter humildade e a batalhar pelos meus sonhos.

A todos os amigos e familiares que com palavras de apoio e em oração me sustentaram.

Ao meu orientador Professor José Laerte Nörnberg por depositar sua confiança neste trabalho, pela sua paciência, auxílio e estímulo para que esse trabalho acontecesse. Muito obrigada professor por todo o conhecimento passado, pela amizade ao longo de todos esses anos e por acreditar nesse sonho!

Ao meu co-orientador Professor Leandro Machado de Carvalho que sempre me auxiliou junto ao departamento de Química na execução de cada etapa dessa pesquisa e desde o mestrado. Sua presença foi importante para que tudo fosse concluído na mais perfeita ordem! Muito obrigada pela sua amizade, grande ajuda e auxílio durante esses seis anos!

Ao Professor José María Monserrat (FURG), pela experiência e disposição. Agradeço de coração toda a ajuda prestada e por ter aberto as portas do seu departamento para que parte dessa pesquisa fosse realizada!

Aos Professores Maurício Reis Bogo (PUC/RS) e Carla Beatriz Grespan Bottoli (UNICAMP) pelo auxílio e grande contribuição nas pesquisas e análises.

Aos professores que sempre estiveram perto em momentos de auxílio e dúvidas e contribuições, em especial aos professores Luisa Helena R. Hecktheuer, Neila Richards, Neidi G. Penna e Tatiana Emanuelli. Obrigada pela colaboração e participação nesse trabalho!

Aos amigos, meus grandes colaboradores nas análises e companheiros de todas as horas: Simoní Da Ros, Fernanda Oliveira Lima, Géssica Silveira de

Oliveira, Mariana Novack, Gitane Fuke, Diego Prado de Vargas, Camila Somavilla, Rudolf Brand Scheibler e demais colegas do NIDAL e LACHEM que direta ou indiretamente transformaram esse projeto em algo concreto. Fe e Simo, obrigada pela amizade e companheirismo ao longo dos anos e nas altas horas de análises. Vocês foram muito importantes em todas as etapas desse projeto. Obrigada por tudo!

Ao amigo e irmão Rodrigo Jappe pela grande ajuda nas revisões dos artigos em inglês.

À Empresa *Megazyme Irland International*, que prontamente contribuiu na análise de β -glicanas por meio da doação do kit para análise, por intermédio do Sr. Gary Power e Gerald Gutscher. Thank you so much!

À Embrapa Trigo de Passo Fundo pelas amostras concedidas em especial ao Dr. Euclides Minella.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Lia e Carlos pelo auxílio sempre que necessário.

À todos o meu muito obrigada!

Deus quer, o homem sonha e a obra nasce.

Fernando Pessoa

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência,
e para chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, QUERER.

Amyr Klink

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS DE GRÃOS E EXTRATO CONCENTRADO DE CEVADA VISANDO APLICAÇÕES NUTRICIONAIS

AUTORA: ALINE SOBREIRA BEZERRA

ORIENTADOR: JOSÉ LAERTE NÖRNBERG

Santa Maria, 04 de dezembro de 2012

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os compostos funcionais fibra alimentar e frações, antioxidantes, minerais, bem como a atividade antioxidante de cultivares de cevada, e de um extrato concentrado obtido a partir de grãos integrais de cevada por meio de metodologias *in vitro* e investigar a influência da região de cultivo e dos fatores climáticos no conteúdo dos compostos funcionais das cultivares. O trabalho está dividido em três capítulos tratando respectivamente de: Revisão de literatura sobre cevada (*Hordeum vulgare* L.) abordando as características anatômicas do grão de cevada, componentes funcionais do grão de cevada (fibra alimentar, β -glicanas, minerais, flavonóides), identificação e funções dos compostos fenólicos (rutina, ácido caféico, ácido ferúlico, miricetina, ácido gálico, catequina, ácido tânico, ácido p-cumárico), metodologias analíticas para detecção e quantificação de compostos fenólicos (Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), Espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS/MS), método de Folin-Ciocalteu, atividade antioxidante *in vitro* (determinação da capacidade antioxidante pela captura do radical livre DPPH, determinação de espécies reativas de oxigênio (ANCOMROS) e radical ânion superóxido); Desenvolvimento (subdividido na forma de capítulos temáticos, conforme as normas de publicação do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e revistas científicas da área) e das considerações finais da autora sobre os seus achados.

Palavras-chave: Cevada, atividade antioxidante, compostos bioativos.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Postgraduate Program in Science and Food Technology
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF GRAIN FUNCTIONAL COMPOUNDS AND BARLEY CONCENTRATE EXTRACT IN SEARCH OF NUTRITIONAL APPLICATIONS

AUTHOR: ALINE SOBREIRA BEZERRA

ADVISOR: JOSÉ LAERTE NÖRNBERG

Santa Maria, December 04th, 2012

The present study aims to evaluate the functional compounds dietary fibre and fractions, antioxidants, minerals, and antioxidant activity of barley cultivars, and a concentrated extract made from whole grains of barley through methodologies *in vitro* and to investigate the influence of the growing region and climatic factors on the content of functional compounds of cultivars. The work is divided into three chapters dealing respectively with: Literature review on barley (*Hordeum vulgare* L.) addressing the anatomical characteristics of barley grain, functional components of barley grain (dietary fibre, β -glucans, minerals, flavonoids), identification and functions of the phenolic compounds (rutin, caffeic acid, ferulic acid, myricetin, gallic acid, catechin, tannic acid, p-coumaric acid), analytical methods for detection and quantitation of phenolic compounds (High-liquid chromatography (HPLC), Mass spectrometry electrospray ionization (ESI-MS/MS), Folin-Ciocalteu's method, antioxidant activity *in vitro* (determination of antioxidant capacity by capturing the free radical DPPH, determination of reactive oxygen species (ANCOMROS), and superoxide anion radical); Development (subdivided in the form of thematic chapters, according to the standards published by the National Institute of Industrial Property (INPI) and scientific journals in the area) and the final considerations from the author about their her findings.

Keywords: Barley, antioxidant activity, bioactive compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do grão de cevada.	21
Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides.....	26
Figura 3. Eluição dos analitos pela coluna cromatográfica.....	32
Figura 4. Conceitos fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC).	33
Figura 5. Ionização por electrospray.	34
Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.	37

-CAPÍTULO 1-

Figura 1. Processo de obtenção do extrato seco.	57
Figura 2. Teor médio de antioxidantes em extrato hidroalcoólico entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.	57
Figura 3. Teor médio de antioxidantes em extrato aquoso entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.	58
Figura 4. Percentual de capacidade antioxidante da cevada em diferentes concentrações.	58
Figura 5. Percentual de capacidade antioxidante do extrato seco em diferentes concentrações	59
Figura 6. Teor inicial e final de proteínas, lipídeos, minerais, fibra total e antioxidantes no extrato seco e na cevada.	59

-CAPÍTULO 2-

Figure 1. Majority chemical characterization of the studied barley products.	70
------------------------------------------------------------------------------------------	----

-CAPÍTULO 3-

Figure 1. Chromatogram obtained from a standard mixture 25 mg·mL ⁻¹ with gradient separation. (1) gallic acid; (2) (+)-catechin; (3) caffeic acid; (4) rutin; (5) p-coumaric acid; (6) ferulic acid; (7) quercitrin; (8) myricetin; (9) fisetin; (10) resveratrol; (11) quercetin; (12) kaempferol; (13) chrysin; (14) flavone.	85
Figure 2. Chromatogram ($\lambda=320\text{nm}$) of barley extract after alkaline hydrolysis. (1) p-coumaric acid; (2) ferulic acid.	92
Figure 3. Correlation between antioxidant activity by ANCOMROS and content medium of ferulic and p-coumaric acids quantified by HPLC of three crops from Passo Fundo.....	92

-CAPÍTULO 4-

Figure 1. Relation between β -glucan content (%) and mean temperature (°C) in Passo Fundo.	100
Figure 2. Relation between β -glucan content (%) and insolation (hours) in Passo Fundo .	101
Figure 3. Relation between β -glucan content (%) and mean temperature (°C) in Victor Graeff.	101
Figure 4. Relation between β -glucan content (%) and rainfall (mm) in Passo Fundo.....	102
Figure 5. Relation between β -glucan content (%) and rainfall (mm) in Victor Graeff.....	1033

LISTA DE TABELAS

-CAPÍTULO 1-

Tabela 1. Teor de proteína, lipídeos e carboidratos no extrato seco e cevada.	51
Tabela 2. Teor de minerais no extrato seco e cevada.	52
Tabela 3. Teor de fibra total (FT), fibra solúvel (FS), fibra insolúvel (FI) e β -glucanas no extrato seco e cevada.....	52

-CAPÍTULO 2-

Table 1. Minority chemical composition of the studied barley products.....	69
Table 2. Percentage antioxidant activity by methodologies analyzed.....	72

-CAPÍTULO 3-

Table 1. Quantification of phenolic compounds and antioxidant activity by different methodologies in barley cultivars analyzed of three crop years (2008, 2009 and 2010) in two localities of Rio Grande do Sul / Brazil.....	87
Table 2. Ranking and correlation between varieties of barley and crops analyzed by different methodologies based in mean values of total content from ferulic and p-cumaric acids quantified by HPLC.....	90

-CAPÍTULO 4-

Table 1. β -Glucan and total dietary fibre contents of barley samples grown in different crop years.....	105
Table 2. β -Glucan and total dietary fibre contents of barley samples grown in different crop years.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

AAPH - 2, 2'- azobis-(2- amidinopropano) diidrocloreto

CLAE - Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ESI-MS/MS - Electrospray ionization in mass spectrometry

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6 ácido sulfônico)

ANCOMROS – Antioxidant competence mensured by ROS determination

H₂DCF-DA - 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato

ABAP - Cloreto de 2,2'-azobis (2-metilaminopropano)

EROS - Espécies reativas de oxigênio

HPX/XOD - Hipoxantina/xantina oxidase

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

NBT - Cloreto de nitrotetrazólio azul

XOD - Xantina oxidase

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

LISTA DE ANEXOS

TERMO DE DEPÓSITO DA PATENTE E DOCUMENTOS NIT.....	122
-----------------------------------------------------------	------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	19
2.1	Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	20
2.1.1	Característica anatômica do grão de cevada	20
2.2	Componentes funcionais do grão de cevada	22
2.2.1	Fibra alimentar	22
2.2.2	β -glicanas	23
2.2.3	Minerais	24
2.2.4	Flavonóides	25
2.3	Identificação e funções dos compostos fenólicos	27
2.3.1	Rutina	28
2.3.2	Ácido caféico	28
2.3.3	Ácido ferúlico	29
2.3.4	Miricetina	29
2.3.5	Ácido gálico	30
2.3.6	Catequina	30
2.3.7	Ácido tânico	31
2.3.8	Ácido p-cumárico	31
2.4	Metodologias analíticas para detecção e quantificação de compostos fenólicos	32
2.4.1	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) - High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	32
2.4.2	Espectrometria de massas por ionização electrospray (ESI-MS/MS)	33
2.4.3	Método de Folin-Ciocalteu	35
2.4.4	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	36
2.4.5	Determinação da capacidade antioxidante pela captura do radical livre DPPH \cdot	37
2.4.6	Capacidade antioxidante mensurada pela determinação de espécies reativas de oxigênio (ANCOMROS – Antioxidant competence measured by ROS determination).	38
2.4.7	Radical ânion superóxido	39
3.	DESENVOLVIMENTO	41
-CAPÍTULO 1-	PRODUTO CONCENTRADO EM COMPOSTOS BIOATIVOS A BASE DE CEREALIS, E, AO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO	43
-CAPÍTULO 2-	CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO EVALUATION OF DRY EXTRACT OBTAINED FROM BARLEY (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	61
-CAPÍTULO 3-	ANTIOXIDANT PROPERTIES OF BARLEY EXTRACTS (<i>Hordeum vulgare</i> L.) USING IN VITRO TECHNIQUES	78
-CAPÍTULO 4-	EFFECTS OF GENOTYPE AND ENVIRONMENT ON B-GLUCAN AND DIETARY FIBRE CONTENTS IN WHOLE GRAIN OF BARLEY GROWN IN BRAZIL	96
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
5.	ANEXOS	121
	BIOGRAFIA DO AUTOR	123

1 INTRODUÇÃO GERAL

O papel exercido pela alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado interesse pela comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Qualquer alimento, sendo ele natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias classificadas como nutrientes ou não nutrientes, os quais são capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, retardando o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas, melhorando a qualidade e expectativa de vida das pessoas, inibindo a degradação oxidativa, limitando assim o fenômeno da oxidação lipídica durante as fases de processamento e armazenamento de alimentos a nível industrial tem sido amplamente investigados e atualmente denominados como alimentos funcionais (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Os componentes que fazem com que um alimento seja funcional sempre estiveram presentes na natureza, mas estes têm sido analisados nas últimas décadas por pesquisadores que começaram a identificá-los e a determinar os benefícios concretos que estes proporcionam ao nosso organismo (ARABBI, 2001).

Sendo assim, podemos selecionar os alimentos naturais que por si mesmos contenham estas substâncias benéficas, sem necessidade de se recorrer aos alimentos enriquecidos ou fortificados que se englobam no conceito de alimento funcional (ARABBI, 2001). Dentre os componentes dos alimentos mais destacados, com funções biotivas, encontra-se a fibra alimentar, β -glicanas, vitaminas, minerais, ácidos graxos poliinsaturados (ω_3 e ω_6) e os antioxidantes.

As fibras alimentares têm sido fortemente implicadas na prevenção e tratamento da síndrome metabólica. O efeito benéfico dos alimentos ricos em fibras e fibras isoladas, tanto insolúveis como solúveis, sobre a obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 tem sido mostrado em estudos randomizados (MCKEOWN et al., 2004; SAHYOUN et al., 2006).

Dietas ricas em fibra contribuem na melhoria do controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 (BRENNAN, 2005), reduz a lipoproteína de baixa densidade (LDL) na hipercolesterolemia (BROWN et al., 1999; ANDERSON et al., 2000), e contribui positivamente a longo prazo no controle de peso (SLAVIN, 2005). Em estudos epidemiológicos, associações positivas foram observadas entre aumento no consumo de cereal, fonte de fibras insolúveis e solúveis, e diminuição

do risco de síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, e dos marcadores de inflamação sistêmica (LIU et al., 2003; QI et al., 2006). Dietas ricas em grãos integrais têm sido negativamente associadas à síndrome metabólica (MCKEOWN et al., 2004; ESMALLZADEH, MIRMIRAN, AZIZI, 2005; SAHYOUN et al., 2006).

Em comparação com as fibras insolúveis, as fibras solúveis são mais potentes em atenuar a presença de componentes da síndrome metabólica em animais e seres humanos. Adições de α -ciclodextrina, uma fibra dietética solúvel, em uma dieta rica em gordura para ratos Wistar machos durante seis semanas atenuou o ganho de peso e o aumento nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos, reduzindo o conteúdo de gordura fecal em relação ao grupo controle (ARTISS et al., 2006).

Com relação às β -glicanas, observa-se um aumento no interesse nas duas últimas décadas em função de suas propriedades bioativas e funcionais. De todas as fibras, os efeitos desempenhados por essa fração da fibra solúvel têm sido documentados e o uso da alegação de alimento saudável, em produtos que a contêm, tem sido permitido em vários países do mundo, incluindo o Canadá, os Estados Unidos da América, Suécia, e outros. Não existem relatos de efeitos adversos após o consumo de uma dieta rica em β -glicana de aveia ou farinha de cevada ou seus extratos (HALLFRISCH & BEHALL, 2003; KHOURY et al., 2012).

Avaliações recentes também demonstram algumas vantagens da aplicação da farinha de cevada (em função da fibra solúvel e/ou β -glicanas) na redução dos seguintes parâmetros bioquímicos em ratos: colesterol, triglicerídeos e glicose (FUKE, 2007), indicando assim a possível funcionalidade e aplicabilidade deste produto na alimentação humana.

O papel antioxidante da cevada tem sido observado por metodologias *in vitro* e diante da diminuição da peroxidação lipídica do fígado de ratos expostos a dietas ricas em gordura, pela adição de extrato aquoso de cevada em dietas padrões, obtido a partir de um extrato hidroetanólico previamente evaporado do solvente etanólico (BEZERRA, 2009; ZIMMERMANN, 2010).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar os compostos funcionais (fibra alimentar total, solúvel e insolúvel, β -glicanas, antioxidantes, minerais) de cultivares de cevada e de um concentrado obtido a partir de grãos integrais de cevada, bem como a atividade antioxidante de extratos elaborados, através de metodologias *in vitro*.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Cevada (*Hordeum vulgare* L.)

Segundo dados da Embrapa Trigo (2012) a cevada é um cereal de inverno que ocupa a quinta posição, em ordem de importância econômica, no mundo, onde o grão é utilizado na industrialização de bebidas (cerveja e destilados), na composição de farinhas ou flocos para panificação, na produção de medicamentos e na formulação de produtos dietéticos e de sucedâneos de café.

A mesma vem sendo cultivada no Brasil desde a década de 1930 e como consequência dos esforços do melhoramento genético e do desenvolvimento de técnicas de manejo cada vez mais apropriadas, a cultura foi difundida pelo sul do Brasil, onde se localizam as áreas mais adequadas em termos de clima e solo para o desenvolvimento deste cereal. Este incremento ocorreu, também, graças ao trabalho de fomento realizado pelas companhias cervejeiras Brahma e Antártica. O seu cultivo ocupa uma área superior a 120.000 hectares, sendo distribuída nos planaltos do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, mostrando assim, uma significativa importância econômica (BOROWSKI, 2012).

Na maioria dos países do mundo, principalmente na Europa e América do Norte, a cultura da cevada tem múltiplos propósitos, sendo utilizada pela indústria cervejeira, como ração animal e na alimentação humana. No Brasil, por existirem alternativas de menor custo de produção para alimentação animal e humana, mais de 95% da cevada é cultivada para fins cervejeiros (EMBRAPA, 2012). Este fato faz com que todos os programas de melhoramento genético de cevada no Brasil tenham a qualidade cervejeira e malteira como foco de pesquisa, pois a mesma é determinante no lançamento de novas cultivares mais produtivas, de melhor qualidade de malte e adaptada as condições de cultivo (BOROWSKI, 2012).

2.1.1 Característica anatômica do grão de cevada

O grão de cevada (Figura 1) é constituído por casca, aleurona, endosperma, escutelo e embrião. A casca é formada pela palha, que é eliminada no beneficiamento e por uma fina camada, a aleurona, que recobre o endosperma e o

embrião. O endosperma é constituído basicamente de amido e proteína sendo responsável pela formação de enzimas durante a malteação, enquanto que o embrião é o local das atividades vitais do grão (VICENZO, 2007).

Dentre os embriões das monocotiledôneas (Figura 1), o das gramíneas é o mais altamente diferenciado. Este, quando totalmente formado, possui um cotilédone maciço, o escutelo, estreitamente aderente ao endosperma. O escutelo encontra-se preso a um lado do eixo do embrião que possui uma radícula em sua extremidade inferior e uma plúmula em sua extremidade superior (ANATOMIA VEGETAL, 2012).

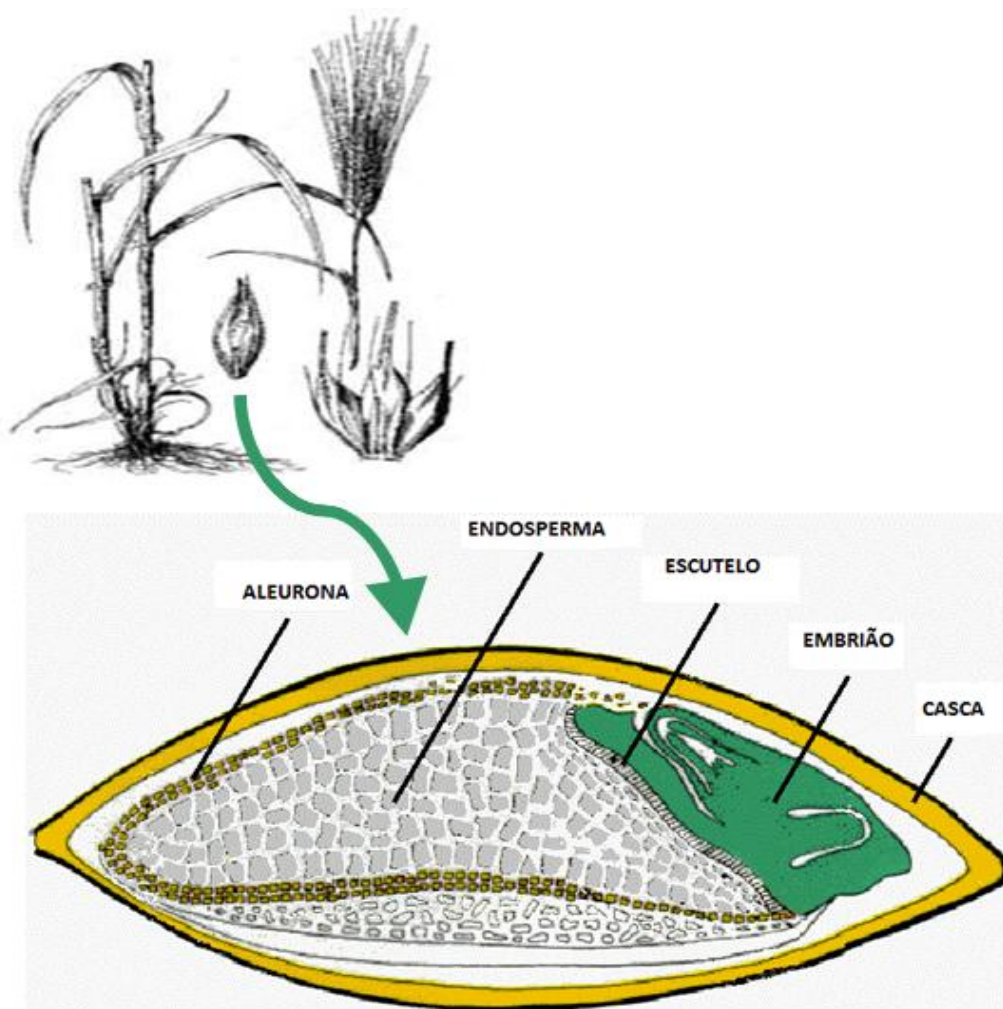


Figura 1. Estrutura do grão de cevada. (fontes: <http://www.crc.dk/flab/the.htm>; http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_anatomy.html).

A casca tem a função de proteção, contém fibras, antioxidantes, minerais e vitaminas. A diferença da cevada para outros grãos se deve ao fato de que a fibra alimentar está distribuída em todo o grão e não apenas na camada externa (YALÇIN et al., 2007). Assim, quando se remove a casca, ou a camada externa, apenas parte da fibra é perdida (XUE et al., 1997). No entanto, o descascamento dos grãos de cevada reduz a concentração de proteína bruta, de extrato etéreo, de cinzas, de fibra solúvel, e, em especial, nos teores de fibra total e de fibra insolúvel (MAYER et al., 2007).

2.2 Componentes funcionais do grão de cevada

2.2.1 Fibra alimentar

O consumo apropriado de fibra alimentar vem sendo valorizado em função de seu efeito benéfico à saúde, pois atua na prevenção e tratamento da obesidade, redução do colesterol sanguíneo, regulação da glicemia pós-prandial e diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Estudos científicos têm mostrado que dietas contendo cevada, em virtude de seu expressivo conteúdo de fibra alimentar, em especial da fração solúvel (β -glicanas), tem exercido efeitos benéficos na saúde humana (BEHALL; SCHOLFIELD; HALLFRISCH, 2006).

Com exceção da lignina, as fibras alimentares pertencem ao grupo dos carboidratos e são considerados polissacarídeos não amiláceos compostos por moléculas de açúcares (pentoses, hexoses, 6-deoxyhexoses ou ácidos urônicos). Por definição, são polímeros com mais de onze unidades destes açúcares unidas por ligações glicosídicas. As cadeias laterais ou ramificadas da estrutura básica são responsáveis pela solubilidade das fibras alimentares totais (FAT), sendo estas divididas em fibra solúvel (FS) e fibra insolúvel (FI) sendo essa classificação útil para o entendimento das propriedades fisiológicas exercidas pelas fibras alimentares (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

As fibras insolúveis, presentes em expressiva quantidade nos farelos de cereais, exercem sua ação fundamentalmente no intestino, e pela sua extrema

capacidade em reter água, aumentam em volume, distendem a parede do cólon e facilitam a eliminação do bolo fecal. No entanto, devido a sua insolubilidade, as mesmas não são fermentáveis pela flora intestinal, não sendo então praticamente metabolizadas pelo organismo. Dentro desse grupo encontram-se as ligninas, celulosas e algumas hemicelulosas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

Já as fibras solúveis, assim com as insolúveis, agem igualmente sobre a velocidade do trânsito intestinal, porém sem aumento da adsorção de água. As mesmas sofrem reações de fermentação pelas bactérias intestinais, produzindo altas concentrações de substâncias específicas denominadas de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são os principais promotores da motilidade do conteúdo fecal e regularizam o trânsito intestinal de forma suave. Além disso, funcionam como agentes protetores e como fonte de energia para a mucosa intestinal, bem como retardam a absorção da glicose e diminuem os níveis de colesterol sanguíneo. Dentro deste grupo encontram-se as pectinas, algumas hemicelulosas, gomas, mucilagens e β -glicanas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

Segundo MAYER et al. (2007), valores médios de FAT entre cultivares de cevada, na forma integral (22,06%) é aproximadamente o dobro do verificado em grãos sem casca (11,10%). Quanto ao teor de FI observa-se um aumento cerca de 2,5 vezes maior na forma integral (16,63%) do que na forma descascada (6,46%). Já a FS, composta predominantemente por β -glicanas, os valores médios observados foram de 5,43%, em grãos integrais e 4,64% em grãos sem casca.

2.2.2 β -glicanas

As β -glicanas (ou β -glucanas) são componentes da fibra solúvel presentes principalmente na aveia e na cevada e sua importância deve-se às propriedades funcionais e aos efeitos hipocolesterolêmicos e hipoglicêmicos apresentados. Estão contidas no endosperma da semente e são caracterizadas por uma cadeia linear de unidades β -D-glicopiranosil unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) e β (1 \rightarrow 3). As ligações β (1 \rightarrow 4) respondem por aproximadamente 70% das ligações glicosídicas, ocorrendo em sequência de uma, duas a três unidades de glicose, interrompidas por ligação β (1 \rightarrow 3) isolada, sendo encontradas em um alto nível na parede celular de fungos,

leveduras, aveia, cevada, assim como nas bactérias. Suas estruturas são diferentes das β -glicanas fúngicas, sendo esta uma cadeia ramificada β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6) (CHEN & RAYMOND, 2008).

Produtos naturais que contêm β -glicanas têm sido usados a milhares de anos com benefícios à saúde humana, mas essa fração foi identificada como componente ativo apenas recentemente. Desde então, têm sido estudada extensivamente seus efeitos na estimulação imunológica e no tratamento de várias doenças, incluindo câncer, *Diabetes mellitus* e doenças cardíacas (CHEN & SEVIOUR, 2007; AKRAMIENÉ et al., 2007; CHEN & RAYMOND, 2008).

Estudo realizado por FUJITA & FIGUEROA (2003) sobre teores de β -glicanas, encontrou valores entre 2,04 a 9,68% desse componente em cultivares de cevada, de 0,55 a 0,72%, em trigo e na aveia entre 5,94% a 6,48% (aveia preta).

2.2.3 Minerais

Os minerais constituem uma classe de micronutrientes, sendo em sua maioria considerados essenciais. São comumente divididos entre macroelementos (cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio, enxofre) e microelementos (ferro, cobre, cobalto, manganês, zinco, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, silício), de acordo com maiores ou menores quantidades encontradas no organismo humano (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

A ingestão de uma dieta balanceada é essencial para o bom funcionamento do organismo e para manutenção da saúde. Porém, o atual estilo da sociedade tem depreciado tais conhecimentos em detrimento de alimentos de preparo rápido, mas nem sempre, com valor nutricional balanceado. Este fato é o principal responsável pela incidência de uma alimentação pobre em nutrientes, a qual é causada pela baixa ingestão de minerais e vitaminas, que são elementos essenciais para o bom funcionamento do organismo humano.

De acordo com CORDAIN (1999), o conteúdo de minerais na cevada é representativo em relação a outros grãos e em 100 gramas de amostra está em torno de 452 mg de potássio (K), 12 mg de sódio (Na), 33 mg de cálcio (Ca), 264 mg de fósforo (P), 133 mg de magnésio (Mg), 3,6 mg de ferro (Fe), 2,77 mg de zinco

(Zn), 0,5 mg de cobre (Cu), 1,95 mg de manganês (Mn) e 0,066 mg de selênio (Se) e dentro desses valores a cevada pode suprir até 120% das necessidades dietéticas recomendadas para adultos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

2.2.4 Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos que se diferenciam tanto em estrutura química quanto em suas características, sendo encontrados em plantas, frutas, vegetais e bebidas como vinho e chá (OLIVEIRA et al., 2010). Desempenham um importante papel acerca da fisiologia vegetal, uma vez que respondem a luz e controlam os níveis de auxinas reguladoras do crescimento e diferenciação das plantas. Apresentam uma grande capacidade antioxidante que depende das propriedades redox de seus grupos hidroxifenólicos e da ação inibitória do radical hidroxila, altamente reativo na cadeia de peroxidação lipídica (RUSSOA & SÁNCHEZ, 2006).

Os mesmos constituem compostos de baixo peso molecular contendo um esqueleto comum de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), composto por anéis de fenil (A e B) ligados através de um anel C pirano (heterocíclico). Os átomos de carbono nos anéis C e A se numeram de 2 a 8, e os do anel B desde o carbono 2 ao carbono 6, conforme Figura 2 (MARTÍNEZ- FLORES et al., 2002).

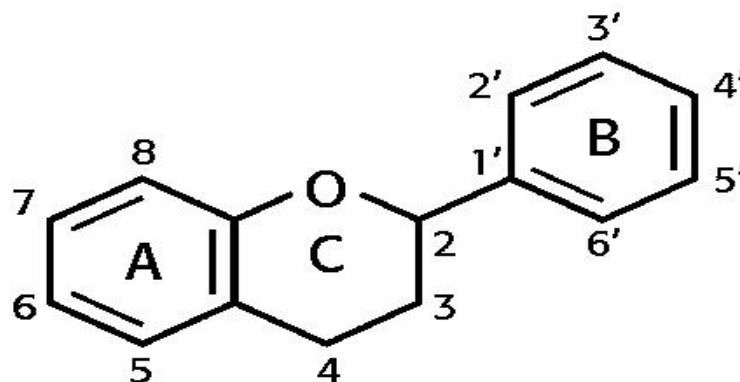


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides (Fonte: Russoa & Sánchez, 2006).

As variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (HOLLMAN & KATAN, 1999).

Nos últimos anos, se tem descrito uma série crescente de compostos que demonstram emergente potencial antioxidante, entre estes, os polifenólicos como ácidos fenólicos, polifenóis e flavonóides. Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nos alimentos. Estudos realizados correlacionam aos mesmos, propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE et al., 2007).

A literatura tem referido a capacidade destes compostos na prevenção da agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos) e na proteção da oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL), prevenindo assim a formação de placas de ateroma (RUSSOA & SÁNCHEZ, 2006).

Entre as funcionalidades interessantes está a capacidade de proteger as plantas contra patógenos e predadores herbívoros (alguns compostos podem atuar como toxinas naturais ou conferir sabor indesejado ao alimento tornando-o menos palatável) (BRAVO, 1998) e principalmente contra estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (YANG et al., 2001).

2.3 Identificação e funções dos compostos fenólicos

A identificação e quantificação dos níveis de compostos fenólicos em cevada também é uma importante etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica a respeito desses constituintes para posterior estímulo ao consumo desse cereal, bem como sua utilização com fins farmacológicos e a nível industrial.

Segundo BRAVO et al. (1993; 1994), os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos: extraíveis e não extraíveis. Os extraíveis são compostos de baixo ou médio peso molecular que podem ser extraídos empregando solvente aquoso e aquoso-orgânico. Os não extraíveis são compostos de elevado peso molecular ou polifenóis ligados a fibra dietética ou a proteínas que podem ser encontrados nos resíduos das extrações.

Os polifenóis extraíveis podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em ácidos fenólicos, estruturas simples que podem aparecer livres, como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, ou esterificados, como os ácidos clorogênico, isoclorogênico, neoclorogênico e criptoclorogênico; e flavonóides, estruturas muito mais complexas que se formam a partir de fenilalanina, tirosina e grupos acetato, e que por sua vez se subdividem em flavonas (luteolina, apigenina, crisina), flavonóis (quercetina, rutina, kaempferol e miricetina), flavanóis (catequina, epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (taxifolina, hesperetina, naringenina), antocianidinas (pelargonidina, delphinidina, malvidina, cianidina), isoflavonas (daidzeina, gliciteína, genisteína), entre outros (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007; HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Entretanto, os polifenóis não extraíveis incluem os taninos hidrolisáveis e condensados com um elevado número de unidades na cadeia polimérica, como as ligninas. Os taninos hidrolisáveis são estruturas poliméricas que podem ser derivados do ácido gálico ou de produtos oriundos da condensação como o ácido hexahidroxidifênico (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

2.3.1 Rutina

A rutina, um composto fenólico pertencente, a classe dos flavonóis, é tradicionalmente empregada como potente antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, e também na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta (GUARDIA et al., 2001).

A suplementação nutricional com rutina tem demonstrado um importante papel na prevenção da aterosclerose, segundo estudo conduzido por RODRIGUES et al. (2003). Nesse estudo foi observado uma elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) de $35,82 \pm 2,31$ mg/dL para $44,40 \pm 3,11$ mg/dL, demonstrando os efeitos benéficos da rutina, com consequente diminuição dos fatores de risco para a aterosclerose e doença cardiovascular (DCV), associado à elevação na atividade da enzima antioxidante superóxido-dismutase. A atuação da rutina como ativadora desta importante enzima antioxidante foi evidente.

2.3.2 Ácido caféico

Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, aquele mais comumente encontrado e de maior representatividade na dieta é o ácido caféico (AC), composto sensível ao calor (DIMBERG et al., 1996) e produzido a partir da L-fenilalanina ou L-tirosina.

Os estudos acerca dos efeitos fisiológicos do AC incluem relatos sobre a sua capacidade de atuar como anti-inflamatório (CHEN; TSAI; WU, 1995), inibidor da xantina oxidase (CHIANG; LO; LU, 1994), ligante metálico (NARDINI et al., 1995) e como agente protetor contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (NAKAYAMA, 1994).

Estudos com AC em sistemas lipídicos indicaram um potencial deste polifenol em atenuar na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (CASTELLUCIO et al., 1995; 1996) e mesmo inibir a oxidação de LDL catalisada por íons metálicos (NARDINI et al., 1995).

Em estudo sobre avaliação do potencial dos ácidos caféico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico e *p*-cumárico em banha na concentração de 200mg/kg, utilizando o método Rancimat à temperatura de 90°C, foi observado que os ácidos caféico e protocatequínico apresentaram uma maior atividade antioxidante do que o α -tocoferol e BHT na mesma concentração (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

2.3.3 Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (AF), um polifenol natural pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, extraído de grãos de alguns cereais como o arroz e a cevada, exerce efeito antioxidante, hipotensivo e anti-inflamatório de acordo com estudos publicados na literatura (UCHIDA et al., 1996; SUZUKI et al., 2002).

Segundo FUJITA et al. (2008) o ácido ferúlico pode exercer também um efeito benéfico na prevenção da neuropatia diabética em ratos, efeito esse muito mais exacerbado quando comparado ao do α -tocoferol. De acordo com os autores, isso pode ser possível em função do efeito exercido pelo mesmo na redução do stress oxidativo gerado por este processo.

Em estudos realizados, quatro ácidos apresentaram atividade antioxidante significativa quando aplicados em óleo de soja, sendo esses o ácido clorogênico, caféico, *p*-cumárico e ferúlico, tendo este último a maior atividade antioxidante. A oxidação foi acompanhada através do índice de peróxidos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

2.3.4 Miricetina

Estudos investigaram os diversos efeitos terapêuticos biológicos de miricetina, incluindo seu uso como um potente antioxidante, como um agente anticarcinogênico e antimutagênico, na prevenção da agregação plaquetária, doenças cardiovasculares, com propriedades antimicrobianas contra bactérias de diferentes cepas, entre outros (KIAN & HOON-ENG, 1997; TIJBURG et al., 1997).

Derivados de miricetina também têm sido sugeridos para expor outras relevantes atividades farmacológicas, como os relacionados à geração de radicais fenoxil na inibição da peroxidação lipídica em cultura de hepatócitos (MOREL et al., 1998; AHERNE & O'BRIEN, 1999).

2.3.5 Ácido gálico

O ácido gálico é uma substância fenólica, originado pela rota biossintética via ácido chiquímico, sendo um derivado do ácido benzóico. É frequentemente encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico, e ambos são constituintes de taninos hidrolisáveis, dos quais são liberados por hidrólise ácida. É utilizado como antioxidante agindo na inibição de radicais livres e como adstringente (LONGHINI, 2006).

MASAKI, ATSUMI e SAKURAI (1994) verificaram a sua atividade antioxidante como scavenging de ânions superóxidos, de oxigênio singlete, de radical orgânico, pelo método de DPPH e na peroxidação de lipídeos biliares por AAPH (2, 2'- azobis-(2- amidinopropano) diidrocloreto), conferindo proteção dos fibroblastos contra dano celular.

2.3.6 Catequina

As catequinas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e adstringência. De acordo com NAGAO et al. (2005), o consumo em longo prazo de bebidas que contêm catequinas tende a inibir a formação de lipídios oxidados, tais como malonaldeído-LDL (MDA-LDL), sendo este um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, além de diminuir a gordura corporal, contribuindo então para a prevenção e melhoria de várias doenças relacionadas com o estilo de vida, particularmente obesidade.

2.3.7 Ácido tânico

Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas que se encontram sob as formas hidrolisáveis e condensadas. O ácido tânico (AT), que faz parte do primeiro grupo, tem uma estrutura consistindo de um carboidrato central (glicose) e 10 grupos galoil. O mesmo é encontrado na casca e frutos de muitas plantas e apresenta ações antimutagênica, anticarcinogênica e atividade antioxidante, mas os mecanismos envolvidos nestas atividades não são completamente compreendidos. A atividade antioxidante do AT foi anteriormente atribuída à sua capacidade de formar um complexo com íons de ferro, o que interfere com a reação de Fenton, que gera radicais livres (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999).

2.3.8 Ácido p-cumárico

O ácido p-cumárico é um fenólico derivado do ácido hidroxicinâmico que apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A atividade antiplaquetária deste composto foi analisada tanto *ex vivo* como *in vitro* (LUCERI et al., 2007).

Segundo estudo conduzido por SALAMEH et al. (2012) com vinhos, o ácido p-cumárico manteve-se estável à temperatura de 20-30°C, mas instável em temperaturas superiores a 75°C. Os autores observaram por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectros de infravermelho (IV) que o ácido p-cumárico pode reagir com etanol, assim como todos os polifenóis do vinho. Segundo os mesmos, esta reação parece ser uma esterificação e sua taxa torna-se maior quando a concentração de etanol aumenta no meio.

2.4 Metodologias analíticas para detecção e quantificação de compostos fenólicos

2.4.1 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) - High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

A cromatografia objetiva separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária (Figura 3) por intermédio de uma fase móvel (ARGENTON, 2010).

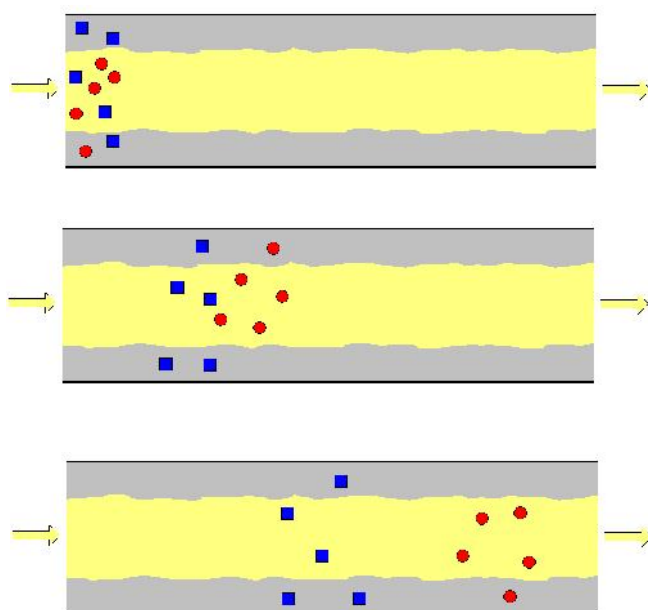


Figura 3. Eluição dos analitos pela coluna cromatográfica. (Fonte: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de Cromatografia, Editora Unicamp, 2006, Campinas, capítulo 1, página 17).

Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e percorrem mais lentamente que a fase móvel devido ao efeito retardante da fase estacionária (Figura 4). O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema (ARGENTON, 2010).

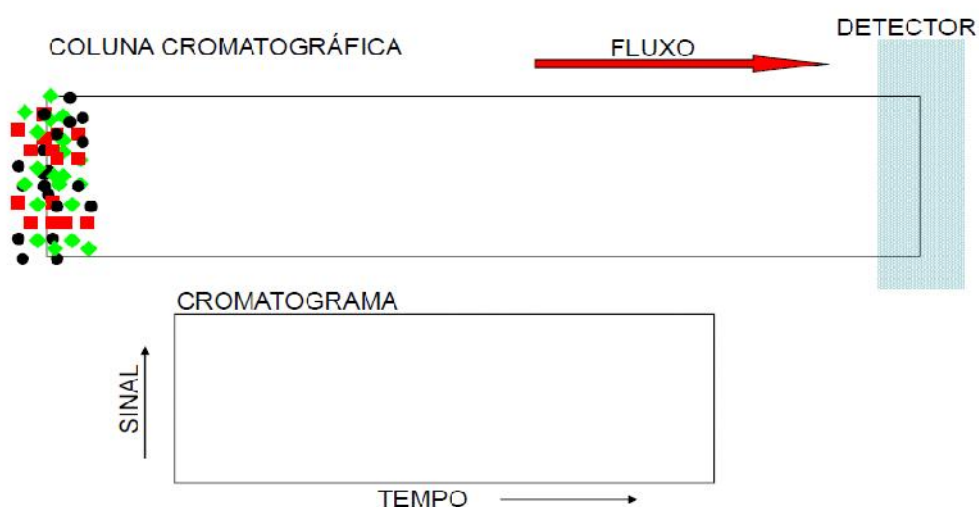


Figura 4. Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC) (Fonte: www.crq4.org.br).

2.4.2 Espectrometria de massas por ionização electro spray (ESI-MS/MS)

A Espectrometria de massas com ionização por electro spray (ESI-MS/MS) é uma técnica que apresenta sensibilidade e especificidade da detecção do MS. Uma das vantagens da ESI-MS é que não é necessária a preparação de amostras e pode produzir íons com cargas múltiplas ou isoladas. Tipicamente, compostos que apresentam elevado peso molecular têm cargas múltiplas, como por exemplo, peptídeos e proteínas. Esta técnica é particularmente adequada para a análise de moléculas polares de massa menores que 2000 Da e não requer qualquer derivatização prévia na maioria das aplicações (UNIVERSITY COLLEGE LONDON, 2010).

A amostra é pulverizada através de um fino capilar (Figura 5). Uma forte carga elétrica é aplicada ao capilar em gotículas carregadas. Para auxiliar a evaporação do eluente um banho quente de gás (normalmente nitrogênio) flui em torno da ponta do capilar. Uma vez que a gota deixa o tubo capilar e entra no nitrogênio continua a perder solvente até que a densidade de carga exceda a tensão de superfície (constante de Raleigh), a gota explode resultando em menores gotículas carregadas. Este processo continua até que as gotículas sejam suficientemente pequenas para íons de desorção. A criação destes íons facilita a transferência das moléculas da amostra a partir da fonte para o MS. Os íons são aceleradamente atraídos para dentro do analisador de massas. A ionização por electrospray pode ser operada tanto no modo positivo como negativo, dependendo da carga do composto de interesse (UNIVERSITY COLLEGE LONDON, 2010).

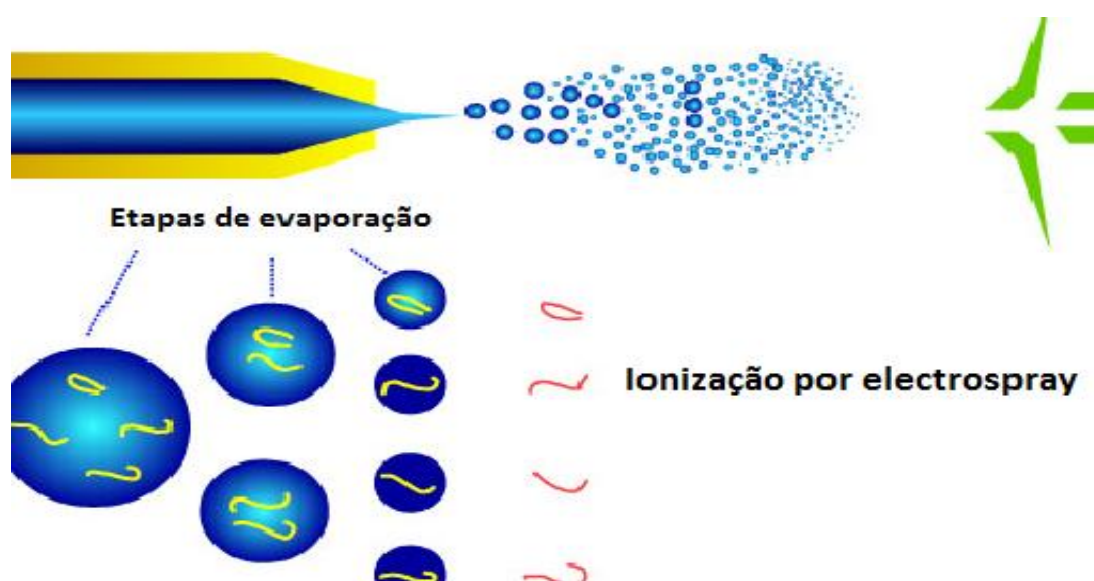


Figura 5. Ionização por electrospray (Fonte: <http://www.dionex.com/en-us/markets/life-science/protein-sciences/proteomics/lp-80196.html>).

2.4.3 Método de Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu (FCR) é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis em uma amostra, portanto também conhecido como ensaio de fenóis total. Foi desenvolvido inicialmente por Singleton et al. em 1965 e em 1999 o ensaio foi delineado e padronizado para quantificação de fenóis totais (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), a partir daí o ensaio encontrou outras aplicações.

O método Folin-Ciocalteu trata-se de uma reação simultânea de transferência de um átomo de H (*HAT - Hidrogen Atom Transfer*) e de transferência de um elétron (*SET - Single Electron Transfer*), não sendo exatamente um método de determinação da atividade antioxidante, mas sim do conteúdo de polifenóis. Devido ao importante papel dos polifenóis na atividade antioxidante dos alimentos, em muitos trabalhos são referidos como um método de determinação da atividade antioxidante, embora seja apenas um indicador. Baseia-se na reação de redução de um heteropoliânion ($[XM_{12}O_{40}]^{x-8}$) que contém molibdênio (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

O reagente de Folin-Ciocalteu é o mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação e baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm na quantificação de fenólicos totais. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Este método espectrofotométrico, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo aquelas proteínas extraíveis (ANGELO & JORGE, 2007).

De acordo com MOREIRA E MANCINI-FILHO (2004), os compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza e são derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, bem como de flavonóides.

LIMA, MELO e LIMA (2002) ressaltam que dentre os compostos fenólicos com propriedade antioxidante, destacam-se os flavonóides que, quimicamente, englobam as antocianinas e os flavonóis.

Segundo VELIOGLU et al. (1998) a atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo frutos, folhas, sementes e plantas medicinais, está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais. KÄHKÖNEN et al. (1999) também afirmaram que os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante de diversos vegetais.

2.4.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato. Adicionalmente, os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas. Existem duas categorias básicas de antioxidantes não enzimáticos denominadas de sintéticos como, por exemplo, o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) e os naturais (HALL III & CUPPETT, 1997).

De acordo com KAUR E KAPOOR (2001), os antioxidantes são importantes na prevenção de doenças, tanto para plantas quanto para animais, inibindo ou retardando a oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou da propagação da cadeia de reações de oxidação. Agentes redutores, cuja função é transferir átomos de hidrogênio, como o ácido ascórbico, são considerados antioxidantes. Alguns antioxidantes também são capazes de quelar íons metálicos como cobre e ferro, os quais catalisam a oxidação lipídica.

Os antioxidantes sintéticos requerem testes extensos e de custo elevado para comprovar a sua segurança para aplicação em alimentos e, por esta razão, existe o interesse no uso de antioxidantes naturais. Além disso, estudos têm mostrado a associação dos mesmos com processos carcinogênicos em animais experimentais (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; PROVAN, 2002; SVILAAS et al., 2004).

Dessa forma, a busca por substitutos naturais para os antioxidantes sintéticos tem elevado o número de pesquisas envolvendo alimentos de origem vegetal, que são fontes potenciais destas substâncias. Frutas, hortaliças e cereais contêm diversos compostos com propriedades antioxidantes. Entre estes o ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides e uma ampla variedade de compostos fenólicos.

Entre os métodos mais utilizados para a determinação da atividade antioxidante em frutas e hortaliças estão: DPPH, FRAP, sistema β -caroteno/ácido linoléico e o ABTS. Conforme alguns trabalhos de pesquisa em frutas e cereais, os mais usados têm sido o DPPH e o ABTS (LEONG & SHUI, 2002; NENADIS et al., 2004; WU et al., 2005).

2.4.5 Determinação da capacidade antioxidante pela captura do radical livre DPPH•

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; HILGEMANN et al., 2010), baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produz um decréscimo da absorbância a 515-522 nm. Esse método foi modificado por SÁNCHEZ-MORENO et al. (1998) para medir os parâmetros cinéticos.

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Figura 6).

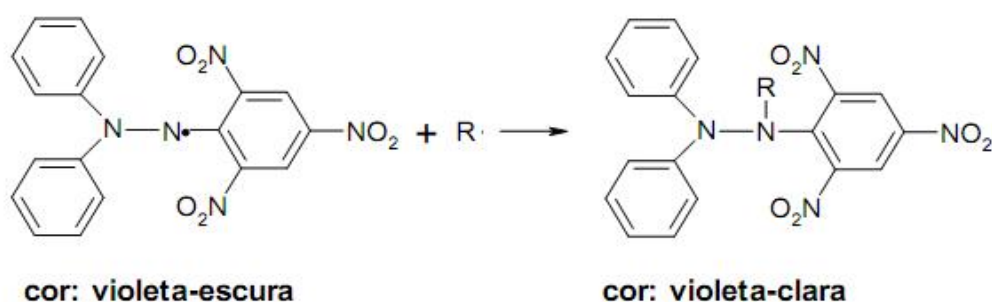


Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH. (Fonte: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf).

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^+ sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua

intensa absorção na região visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH na amostra, em solução e mensurado pela capacidade da amostra de reduzir o DPPH.

A capacidade da amostra de reduzir o DPPH é expressa em percentual (% AA_{DPPH}), e calculada em relação ao controle, segundo a expressão:

$$\% AA_{DPPH} = \frac{A_C - (A_A - A_B)}{A_C} \times 100$$

Onde A_C é a absorvância do DPPH, A_A é a absorvância da amostra e A_B é a absorvância do branco da amostra.

2.4.6 Capacidade antioxidante mensurada pela determinação de espécies reativas de oxigênio (ANCOMROS – Antioxidant Competence Measured by ROS determination).

A metodologia é baseada na determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS) através da detecção indireta por método fluorimétrico ($\lambda = 485/520$ nm), empregando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) como substrato. O H₂DCF-DA, após sofrer desacetilação, pode ser oxidado por espécies reativas de oxigênio, gerando fluorescência. Os radicais peroxila são gerados através da termodegradação do reagente cloreto de 2,2'-azobis (2-metilaminopropano) (ABAP) a 37°C. A capacidade antioxidante total (CAT) contra radicais peroxil é estimada como a diferença na área de EROS com e sem ABAP, em relação à fluorescência registrada sem o reagente ABAP (AMADO et al., 2009).

A atividade antioxidante frente ao radical peroxil (AA_{ROO·}) é determinada com base na medida referente ao tempo de 30 minutos de reação. A capacidade da amostra de reduzir radicais peroxil é calculada segundo a expressão a seguir:

$$\% AA_{ROO\cdot} = \frac{1 - (F_A - F_{AB})}{(F_S - F_{SB})} \times 100$$

Onde F_A é a fluorescência da amostra, com ABAP, F_{AB} é a fluorescência do branco da amostra, sem ABAP, F_S é a fluorescência do solvente utilizado nas amostras, com ABAP, e F_{SB} é a fluorescência do branco do solvente, sem ABAP.

2.4.7 Radical ânion superóxido

O radical ânion superóxido, um redutor de elétrons de um oxigênio molecular, tem recebido muita atenção pela conexão com a toxicidade por oxigênio em sistemas biológicos. Para entender o papel do superóxido e também para contabilizar os efeitos tóxicos observado em sistemas biológicos que tenham sido expostos ao mesmo, é necessário saber se rapidamente o mesmo reage com várias moléculas biológicas e também a rapidez com que é eliminado por antioxidantes (GOTOH & NIKI, 1992).

Conforme metodologia descrita por ZHAO et al. (2006) o poder da ação dos antioxidantes frente ao radical $O_2^{\cdot-}$ é determinada pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase (HPX/XOD), em presença do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT) e da enzima xantina oxidase (XOD).

A xantina oxidase (XOD) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido, sendo por isso considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio. A atividade de um grande número de substâncias pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido gerado nesse sistema enzimático (DEW; DAY; MORGAN, 2005).

No método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o radical superóxido produzido reduz o NBT à formazan em pH 7,4 e em temperatura ambiente, e a geração do formazan é acompanhada por espectrofotometria através da mudança na coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura no comprimento de onda de 560 nm. Assim, as moléculas que atuam como antioxidantes no extrato reagem com o radical superóxido inibindo a formação de

formazan, observado a partir do decaimento da absorvância e formação da coloração púrpura (ALVES et al., 2010).

A leitura espectrofotométrica realizada em 560 nm é calculada como percentual de atividade antioxidante (% AA_{O₂^{-•}}), conforme a equação:

$$\% \text{AA}_{\text{O}_2^{\cdot-}} = \frac{1 - (A_A - A_{AB})}{(A_C - A_{CB})} \times 100$$

Onde A_A é a absorvância da amostra, A_{AB} é a absorvância do branco da amostra, A_C é a absorvância do controle e A_{CB} é a absorvância do branco do controle.

3 DESENVOLVIMENTO

Esta seção será discutida na forma de capítulos temáticos, conforme as normas de publicação do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e revistas científicas da área.

-CAPÍTULO 1-

(Conforme normas do Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI)

*Registro PI 1101649-3 - Revista da Propriedade Industrial n°. 2137 de
20 de dezembro de 2011.

DOCUMENTO CONFIDENCIAL

CIRCULAÇÃO RESTRITA

ESTE DOCUMENTO É DESTINADO AO USO EXCLUSIVO DO INDIVÍDUO OU ENTIDADE À QUAL O MESMO É ENDEREÇADO E CONTÉM INFORMAÇÕES PRIVILEGIADAS, CONFIDENCIAIS E QUE NÃO DEVEM SER REVELADAS.

Se você ler este documento e não for o destinatário pretendido, estará por meio deste notificado de que qualquer disseminação, distribuição ou reprodução deste documento é estritamente proibida. Se você recebeu este documento por engano, por favor notifique-me imediatamente através dos telefones +55(21)3212-8200 ou +55(11)3087-8200.

Obrigado por sua cooperação.

THIS DOCUMENT IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHICH IT IS ADDRESSED AND CONTAINS INFORMATION THAT IS PRIVILEGED, CONFIDENTIAL AND EXEMPT FROM DISCLOSURE.

If the reader of this document is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this communication is strictly prohibited. If you have received this document in error, please notify me immediately by telephone on +55(21)3212-8200 or +55(11)3087-8200.

Thank you for your co-operation.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PRODUTO CONCENTRADO EM COMPOSTOS BIOATIVOS A BASE DE CEREAIS, E,
AO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo da engenharia de alimentos. Especialmente a um produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais e ao processo de produção do mesmo.

Antecedentes da Invenção

As tecnologias/soluções existentes são baseadas em extratos de plantas com fins antioxidantes. Porém, as mesmas são elaboradas com solventes em sua maioria tóxicos e a metodologia aplicada para a elaboração do produto é complexa para ser reproduzida industrialmente. A metodologia proposta é de fácil reprodutibilidade, podendo ser utilizada na forma de pó ou diluída em água (solvente universal, não tóxico).

A patente de número PI 9201112A, baseada na obtenção de um extrato líquido de especiarias, resolveria parcialmente a extração dos antioxidantes, porém a extrema complexidade na produção do extrato líquido para a indústria se torna inviável em larga escala. O invento elaborado se mostra diferenciado por se tratar de um pó homogêneo de fácil obtenção que pode ser utilizado também na forma de extrato aquoso.

A patente de número US 6,335,373 B1, baseada na obtenção de um extrato líquido rico em ácido carnósico a partir do alecrim, resolveria parcialmente a extração dos antioxidantes. Porém, a extrema complexidade na produção do extrato para a indústria se torna inviável em larga escala, em virtude do uso de equipamentos complexos e de solventes de mais alta toxicidade. O invento elaborado se mostra diferenciado por se tratar de um produto elaborado por tecnologia de fácil reprodutibilidade e de fácil elaboração, além de ser um pó homogêneo de fácil obtenção que pode ser utilizado também na forma de extrato aquoso.

A patente de número EP 1 541 026 A1, baseia-se em um produto obtido a partir da moagem do grão de trigo inteiro para utilização na alimentação humana, rico em antioxidantes, minerais e vitaminas. Outras frações que são excluídas (farelo, gérmen, etc) durante o processamento da farinha refinada (obtida

exclusivamente a partir do endosperma) são incorporadas durante o processamento do produto na obtenção de um “pseudo-cereal”. A tecnologia proposta resolveria parcialmente a obtenção de um produto rico em compostos bioativos, porém pelo fato de ser elaborado pela incorporação das frações desprezadas durante o processamento da farinha refinada e por conter uma grande quantidade de fibra total, o produto passa a ter uma maior quantidade de fibra insolúvel, a qual pode apresentar efeitos anti-nutricionais na saúde humana em altas concentrações. Já o invento proposto, concentra o teor de fibra solúvel e reduz o de fibra insolúvel, igualando-os na proporção de 1:1, além de concentrar outros compostos bioativos quando comparado ao grão integral, como antioxidantes, minerais, proteínas e lipídeos.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção um produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais.

É apresentado um produto que possui uma proporção fibra solúvel:fibra insolúvel de aproximadamente 1:1, e que se diferencia de outros disponíveis no mercado, que apresentam um elevado conteúdo de fibra insolúvel. As diversas ações benéficas das fibras em nosso organismo são atribuídas à fração solúvel, e altas doses de fibra insolúvel são desaconselháveis, pois o excesso pode interferir negativamente na absorção de minerais, especialmente cálcio, ferro e zinco. A invenção apresenta ainda um conteúdo de antioxidantes que varia seu conteúdo conforme o solvente utilizado na dissolução, alcançando valores 2 vezes maiores quando adicionado em solvente aquoso e aumentando em torno de 20% esse conteúdo quando adicionado em solvente hidroalcoólico (20:80, v/v), quando comparado ao grão integral. Com relação aos outros nutrientes analisados (alguns minerais, proteína, lipídeos) observa-se que o extrato seco elaborado não alterou significativamente o conteúdo dos mesmos em relação à cevada original, aumentando estatisticamente o conteúdo dos macrominerais Ca, K e P e de carboidratos em relação à farinha.

É um dos objetos adicionais da presente invenção, um processo para a produção de um produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais.

Em especial, o processo compreende as etapas de:

a) moagem de grãos de cereais escolhidos do grupo que compreende trigo, arroz, milho, painços, sorgo, centeio, aveia, cevada e combinações dos mesmos;

- b) extração com solvente aquoso-orgânico (20:80, v/v);
- c) evaporação do solvente aquoso-orgânico; e
- d) moagem do sólido obtido da evaporação da etapa c).

Além disso, o processo aplicado pode ser direcionado na produção de extrato seco em outros cereais com baixo conteúdo de lipídeos destinado com o mesmo propósito visado por essa invenção. Dessa forma, quando comparado a arte relacionada anteriormente, o produto proposto tem a vantagem de manter suas características bioativas quando solubilizado em água, diferentemente de outros extratos elaborados com o mesmo objetivo, que foram obtidos a partir de uso de solventes tóxicos como acetona, metanol, e outros. Desta forma, a aplicação da invenção é facilitada por não interferir no produto a ser empregado, bem como não apresentar toxicidade.

A presente invenção proporciona:

- a) Utilização em nível industrial do extrato seco obtido a partir de grãos e/ou cereais que não são aproveitadas pela indústria e que, no entanto, apresentam um alto potencial nutricional e antioxidante, a partir de produtos de baixo custo, não-tóxico e com propriedades funcionais;
- b) Aplicação tecnológica do extrato seco obtido que apresente elevado potencial antioxidante em produtos alimentícios à base de gordura, visando à substituição dos antioxidantes sintéticos atualmente utilizados, tendo em vista a atividade carcinogênica observada em estudos com animais;
- c) Incentivo à produção agrícola nacional e ao plantio, visando o melhoramento genético de espécies de cevada e/ou grãos e cereais com aplicação nutricional e tecnológica, que possam servir como subsídio na produção do extrato seco;
- d) Aplicação tecnológica do extrato seco em alimentos como espessante alimentar, tendo em vista sua composição em fibra alimentar (fibra solúvel e insolúvel) e β -glucanas, componentes esses que exercem atividade funcional no organismo humano.
- e) Aplicação tecnológica do extrato seco em produtos visando o enriquecimento dos mesmos, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, seja repondo quantitativamente os nutrientes destruídos durante o processamento do alimento, seja suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal.

Além dos itens descritos acima, o resíduo resultante do processamento pode ser direcionado para a alimentação animal ou como fonte de fibra insolúvel.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra o processo de obtenção do extrato seco. *Legenda: A – Cevada Integral Moída; B – Diluição Aquosa; C – Sonicação; D – Filtração; E – Secagem; F – Moagem; G – Produto.

A figura 2 mostra o teor médio de antioxidantes em extrato hidroalcoólico entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.

A figura 3 mostra o teor médio de antioxidantes em extrato aquoso entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.

A figura 4 mostra o percentual de capacidade antioxidante da cevada em diferentes concentrações.

A figura 5 mostra o percentual de capacidade antioxidante do extrato seco em diferentes concentrações.

A figura 6 mostra o teor inicial e final de proteínas, lipídeos, minerais, fibra total e antioxidantes no extrato seco e na cevada, em valores expressos em g/100g.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

A invenção envolve a obtenção de um produto à base de grãos de cevada (*Hordeum vulgare L.*), empregando a farinha integral obtida do grão, concentrado em compostos bioativos. A farinha é extraída em solvente aquoso-orgânico, a partir do qual se obtém um produto sólido (extrato seco) que concentra alguns compostos com propriedades funcionais. O processo desenvolvido permite a obtenção de um produto que concentra compostos fenólicos (antioxidantes naturais) e fibra solúvel. Além disso, o extrato seco obtido diminui a concentração inicial de fibra insolúvel, praticamente igualando-a com a concentração de fibra solúvel. Do ponto de vista funcional, a diminuição da fibra insolúvel em relação à fibra solúvel é benéfica para o organismo humano, uma vez que as propriedades funcionais relatada em estudos são atribuídas às fibras solúveis, pois as mesmas têm a capacidade de se ligar à

água e formar géis. Soma-se a isto o fato de que no trato gastrointestinal as fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito intestinal, diminuem o ritmo de absorção de glicose e o colesterol sanguíneo e constituem substratos para fermentação bacteriana que resultam em gases (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo importantes para o metabolismo intestinal. Os principais efeitos metabólicos das fibras solúveis são descritos a seguir:

1. Retardam esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal, contribuindo na sensação de saciedade;
2. Alteram o metabolismo colônico através da produção dos AGCC;
3. Modulam a mobilidade gastrintestinal;
4. Reduzem a diarreia (aumento na absorção de água);
5. Promovem o desenvolvimento da mucosa intestinal (íleo e cólon);
6. Proporcionam energia (devido à fermentação) para a mucosa intestinal;
7. Diminuem o pH do cólon;
8. Melhoram a proteção contra infecção (função de barreira, imunidade);
9. Aumentam a tolerância a glicose;
10. Absorvem ácidos biliares, diminuindo os níveis séricos de lipídeos.

Dessa forma, um produto que possui uma proporção fibra solúvel:fibra insolúvel de 1:1, como o proposto, se diferencia de outros disponíveis no mercado, que apresentam um elevado conteúdo de fibra insolúvel, que em excesso pode interferir negativamente na absorção de minerais, especialmente cálcio, ferro e zinco. As β -glucanas são componentes da fibra solúvel presente na cevada e aveia e sua importância é devido às propriedades funcionais e aos efeitos hipocolesterolêmicos e hipoglicêmicos apresentados. O teor de β -glucanas na cevada é variável, dependendo do cultivo e é influenciado por fatores genéticos e ambientais. O processo aplicado à cevada para a obtenção do extrato seco reduz o conteúdo de β -glucanas em cerca de 29,65% do valor encontrado na farinha de cevada integral. Esse fato é de extrema importância para a indústria alimentícia, que tem promovido a possibilidade de ofertar suplementos de fibras como substitutos alimentares e/ou coadjuvantes ao tratamento clínico. A ingestão de 10 gramas de fibra dietética diária tem sido associada à redução em 27% no risco de morte por enfermidade coronariana e em 14% no risco de sofrer qualquer evento coronariano.

A invenção apresenta ainda um conteúdo de antioxidantes que varia seu conteúdo conforme o solvente utilizado na dissolução, alcançando valores 2 vezes maiores quando adicionado em solvente aquoso e aumentando em torno de 20% esse conteúdo quando adicionado em solvente hidroalcoólico (20:80, v/v), quando comparado ao grão integral. Os cereais possuem uma significativa capacidade de captação de radicais livres e podem ser uma fonte potencial de antioxidantes naturais. Na cevada, os principais responsáveis por esta capacidade antioxidante são os compostos fenólicos, como os ácidos caféico e ferúlico em suas formas livres e esterificadas e também os flavonóides. O extrato seco mostrou ainda um percentual de atividade antioxidante comparado ao grão integral por meio de metodologia *in vitro*. A capacidade antioxidante do extrato foi determinada pelo método do DPPH através da determinação da capacidade do extrato de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Além disso, o selênio presente na cevada e cujo teor é mantido através do processamento aplicado na obtenção do extrato seco tem como função mais conhecida a de antioxidante pela associação desse elemento com a enzima glutathione peroxidase. Além de atuar na desintoxicação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, a glutathione peroxidase atua também na manutenção de grupos sulfidrilas vitais na forma reduzida, na síntese de hormônios derivados do ácido araquidônico e no metabolismo de compostos estranhos ao organismo, por exemplo, compostos aromáticos derivados de plantas e pesticidas; atua ainda como co-fator no metabolismo de certos aldeídos, por exemplo, o formaldeído e o metilglicoxal e, supostamente, no transporte de alguns aminoácidos nos rins. Recentemente, constatou-se que o selênio é um constituinte da 5'-iodinase, enzima atuante no metabolismo dos hormônios da tireóide, e que as síndromes de deficiência de iodo são mais graves quando há deficiência simultânea de selênio.

A aplicação do produto como aditivo ou suplemento alimentar visa (1) o enriquecimento de produtos, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, ou repondo quantitativamente os nutrientes destruídos durante o processamento do alimento, seja suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal; (2) como espessante alimentar, tendo em vista sua composição em fibra solúvel e β -glucanas, componentes esses que exercem atividade funcional no organismo humano; (3) como antioxidante em produtos alimentícios a base de gordura, visando à substituição dos antioxidantes sintéticos atualmente

utilizados, tendo em vista a atividade carcinogênica observada em estudos com animais e em produtos farmacológicos e cosméticos.

No processo de obtenção do extrato seco foram empregadas cultivares de cevada, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/Trigo), de Passo Fundo/RS, cujo grão integral foi previamente moído em moinho (Suzuki®) para se obter partículas menores que 1,5mm. Foram pesados 32g da farinha de cevada moída e misturadas em 100 mL de água destilada. A mistura permaneceu durante 30 minutos sob sonicação a 30°C, sendo em seguida filtrada em peneira 40 Mesh e a amostra remanescente lavada com 100 mL de solução hidroalcoólica (20:80, v/v), sendo a massa resultante pressionada com espátula para eliminação completa do líquido. O filtrado foi levado à estufa com circulação de ar forçada por aproximadamente 24 horas a 35 ±5°C. O sólido obtido após a secagem na estufa (extrato seco) foi moído em micro-moinho (Marconi®) por 60 segundos, obtendo-se então um pó. O peso do extrato seco foi de 12,818g. O rendimento do processo foi calculado da seguinte forma: $(12,82g \times 100)/32 = 40,0 \pm 5\%$ ($n = 10$).

O processo de obtenção do extrato seco é melhor compreendido através da Figura 1.

A caracterização química do produto obtido (extrato seco) foi realizada em relação aos seguintes parâmetros: proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais (cálcio, sódio, potássio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, manganês e selênio), antioxidantes (compostos fenólicos totais), atividade antioxidante do extrato (DPPH), fibra total (insolúvel e solúvel) e β-glucanas. Os resultados de caracterização do extrato seco obtido em relação a sua farinha original são descritos a seguir.

1. Proteínas, lipídeos e carboidratos:

Para a caracterização química do conteúdo de proteína e lipídeo do extrato seco de cevada foram realizadas as seguintes determinações: proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldahl ($\% N \times 6,25$), lipídeos pelo método de Bligh-Dyer e carboidratos não fibrosos por diferença ($100 - (\%PB + \%EE + \%CZ + \%FT)$).

Tabela 1. Teor de proteína, lipídeos e carboidratos no extrato seco e cevada.

Amostra	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos não fibrosos
Extrato seco	9,04 ^{a†} ± 0,19	1,53 ^a ± 0,23	77,51 ^a ± 0,26
Cevada	9,61 ^a ± 0,13	1,65 ^a ± 0,04	67,66 ^b ± 0,54

*valores expressos em % médio ± desvio padrão.

† Médias com diferentes letras ao longo da mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram que o conteúdo de proteínas e lipídeos entre a cevada e o extrato seco não diferiram estatisticamente ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey. Com relação ao conteúdo de carboidratos não fibrosos, observou-se uma quantidade estatisticamente mais alta no extrato seco em relação à farinha de cevada. Dessa forma, o processo aplicado na obtenção do produto não degrada o teor de proteínas e lipídeos contido no grão de cevada, porém aumenta significativamente o conteúdo de carboidratos não fibrosos a valores comparados aos encontrados em análises realizadas em cevada descascada.

2. Minerais:

O conteúdo de macrominerais [cálcio (Ca), potássio (K), fósforo (P) e magnésio (Mg)] e microminerais [ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e selênio (Se)], em relação ao produto integral, foi determinado por Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (modelo NovAA 300, Analytikjena) com o método de digestão EPA 3050B. A quantificação de selênio, expresso em $\mu\text{g}/100\text{g}$ do produto, foi realizada através de atomização por Espectroscopia de Absorção Atômica com geração de hidretos (modelo SpectrAA 200, Varian®).

Tabela 2. Teor de minerais no extrato seco e cevada.

<i>Amostra</i>	<i>Ca</i>	<i>K</i>	<i>P</i>	<i>Mg</i>	<i>Fe</i>	<i>Zn</i>	<i>Mn</i>	<i>Se</i> ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Extrato Seco	16,44 ^a $\pm 1,24$	572,38 ^a $\pm 119,68$	272,51 ^a $\pm 7,00$	163,90 ^a $\pm 24,00$	5,52 ^a $\pm 0,48$	1,47 ^a $\pm 0,04$	1,06 ^a $\pm 0,21$	18,3 ^a $\pm 1,15$
Cevada	12,96 ^b $\pm 2,24$	514,59 ^b $\pm 77,95$	228,29 ^b $\pm 8,98$	180,21 ^a $\pm 293,14$	4,39 ^a $\pm 10,88$	1,32 ^a $\pm 3,24$	1,12 ^a $\pm 3,43$	19,57 ^a $\pm 3,24$

*valores médios expressos em mg/100g \pm desvio padrão.

† Médias com diferentes letras ao longo da mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram que pelo teste de Tukey ($p < 0,01$) o conteúdo dos macrominerais Ca, K e P foram estatisticamente mais altos no extrato seco do que na cevada, enquanto que o conteúdo de Mg, Fe, Zn, Mn e Se não diferiram estatisticamente em relação à mesma. Teores de sódio e cobre, não foram detectados pelo método realizado na cevada e no extrato seco.

3. Fibra Total e frações:

Os teores de fibra total (FT), insolúvel (FI) e solúvel (FS) foram determinados conforme o método enzimico-gravimétrico nº 985.29 e nº 991.42 (AOAC, 1995). O conteúdo de FS foi determinado observando-se a diferença entre fibra total e insolúvel. Para a determinação de β -glucanas foi adotado o método da AOAC 995.16, com kit para análise de β -glucanas doado pela Empresa Megazyme Irland International Ltda.

Tabela 3. Teor de Fibra Total (FT), Fibra Solúvel (FS), Fibra Insolúvel (FI) e β -glucanas no extrato seco e cevada.

<i>Amostra</i>	<i>% FT</i>	<i>% FI</i>	<i>% FS</i>	<i>β-glucanas</i>
Extrato Seco	10,07 \pm 0,16 ^a	4,28 \pm 0,25 ^a	5,67 \pm 0,08 ^a	1,38 \pm 0,19 ^a
Cevada	19,01 \pm 0,45 ^b	14,73 \pm 0,35 ^b	4,27 \pm 0,10 ^b	1,96 \pm 0,01 ^a

*valores expressos em % médio \pm desvio padrão.

† Médias com diferentes letras ao longo da mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Os resultados mostraram pelo teste de Tukey em nível de 1% de significância, que o conteúdo de fibra total, insolúvel e solúvel entre a cevada e o extrato seco diferiu estatisticamente, onde a cultivar exibiu um elevado teor de fibra total pelo elevado conteúdo de fibra insolúvel presente no grão. Os resultados de fibra solúvel

no extrato seco foram estatisticamente mais elevados do que no grão de cevada. Com relação ao conteúdo de β -glucanas não houve diferença significativa entre a cultivar e o extrato seco ($p < 0,01$). O teor de β -glucanas quantificado no extrato seco correspondeu a um percentual de 70,35% do valor encontrado na farinha de cevada, ou seja, o processo aplicado à cevada para a obtenção do extrato seco reduz o conteúdo de β -glucanas em apenas 29,65% do valor encontrado na farinha de cevada integral.

4. Antioxidantes:

A quantificação dos compostos antioxidantes presentes na cultivar e no extrato seco foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. As medidas de absorção molecular foram realizadas por meio de espectroscopia na região do visível ($\lambda = 740$ nm) utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard (HP 8453) com arranjo de diodos. Para esta análise, foram utilizadas 2 cultivares de cevada (BRS Lagoa e BRS 195), a partir das quais foram elaborados os respectivos extratos secos. Os extratos foram elaborados com 1,25 g da amostra em 10 mL de uma solução hidroetanólica (20:80, v/v) e aquosa (100%), sonificado durante 30 minutos e filtrado, conforme Bezerra (2009). Este teste teve como objetivo avaliar o efeito do solvente na extração de antioxidantes do produto elaborado.

O teor médio de antioxidantes em extrato hidroalcoólico entre diferentes concentrados e cultivares de cevada pode ser contemplado na Figura 2.

O teor médio de antioxidantes em extrato aquoso entre diferentes concentrados e cultivares de cevada pode ser contemplado na Figura 3.

Não houve diferença significativa somente entre o extrato hidroalcoólico da cultivar 2 e seu extrato seco. Com relação ao extrato seco 1, foi observado um aumento significativo de 22,8% do teor de antioxidantes em relação a cultivar de origem. Observa-se então que quando o produto é adicionado em solvente hidroalcoólico (20:80, v/v) o conteúdo de compostos antioxidantes no extrato seco, em relação à farinha de origem pode concentrar ou aumentar esse conteúdo significativamente. Já em solvente aquoso essa concentração foi estatisticamente mais elevada no extrato seco em relação à cevada, dobrando a concentração dos mesmos quando o extrato seco é dissolvido em água.

5. Capacidade antioxidante baseada no sequestro de radicais – DPPH

A capacidade antioxidante do extrato foi determinada pelo método do DPPH através da determinação da capacidade do extrato de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), conforme Hilgemann et al. (2010). Foram elaborados extratos hidroalcoólicos em 3 diferentes concentrações (12,5; 1,0 e 0,1%) de farinha de cevada e do extrato seco em uma solução de etanol:água (80:20, v/v), o qual foi sonicado durante 30 minutos e filtrado para a análise de DPPH. As medidas de absorção foram realizadas por meio de espectroscopia na região do visível ($\lambda = 522$ nm) utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard (HP 8453) com arranjo de diodos. Os resultados foram expressos em percentual de capacidade antioxidante.

O percentual de capacidade antioxidante em diferentes concentrações da cevada pode ser contemplado na Figura 4, e do extrato seco pode ser contemplado na Figura 5.

Os resultados mostram pelo teste Tukey, que o extrato seco não diferiu estatisticamente da cevada apresentando um percentual de atividade antioxidante semelhante ao da mesma. ($p < 0,01$).

6. Resultados

De acordo com os resultados, pode-se observar que o extrato seco mantém os nutrientes analisados em sua maioria em valores estatisticamente equivalentes ao da farinha integral, bem como aumenta significativamente a concentração de determinados elementos como:

1. Fibra solúvel em 32,78% (5,67 g/100g no extrato seco e 4,27 g/100g na farinha de cevada);
2. Antioxidantes em extrato aquoso em valores acima de 100% (1,78 mg/g no extrato seco e 0,86 mg/g na farinha de cevada);
3. Cálcio em 26,85% (16,44 mg/100g no extrato seco e 12,96 mg/100g na farinha de cevada);
4. Potássio em 11,25% (572,38 mg/100g no extrato seco e 514,59 mg/100g na farinha de cevada),
5. Fósforo em 19,37% (272,51 mg/100g no extrato seco e 228,29 mg/100g na farinha de cevada) e
6. Carboidratos não fibrosos em 14,56% (77,51 g/100g no extrato seco e 67,66 g/100g na farinha de cevada).

Houve redução no teor de fibra insolúvel em nível significativo o que, conseqüentemente, repercutiu na redução do teor de fibra total no extrato seco produzido, o que foi benéfico com o propósito de se igualar os teores de fibra solúvel e insolúvel (1:1), tornando o produto obtido diferenciado de outros disponibilizados comercialmente. Outros compostos presentes na cevada e que não foram quantificados, tais como vitaminas e outros minerais, foram estimados em 1,82% no extrato seco e 2,45% no grão integral de cevada. A Figura 6, expressa quantitativamente (em g/100g) o conteúdo dos compostos bioativos pesquisados na farinha de cevada e no extrato seco comparativamente (antioxidantes, proteínas, lipídeos, minerais e fibra total). O balanço de massas foi de 98,18% no extrato seco e de 97,55% na farinha de cevada.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais caracterizado por compreender:

- a) uma proporção fibra solúvel:fibra insolúvel dentro da faixa que vai de 1:0,5 a 1:2;
- b) aumento do teor de antioxidantes quando comparado ao teor de antioxidantes do grão integral;
- c) concentração de Ca, K, e/ou P estatisticamente maior quando comparada ao grão integral.

2. Produto concentrado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção de fibra solúvel:fibra insolúvel ser de 1:1.

3. Produto concentrado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo aumento do teor de antioxidante ser dependente do solvente aquoso-orgânico utilizado quando da extração.

4. Produto concentrado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender uma concentração de carboidratos não fibrosos estatisticamente maior quando comparada ao grão integral.

5. Produto concentrado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser adicionado a alimentos e/ou produtos alimentícios.

6. Produto concentrado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conferir propriedades funcionais e antioxidantes ao alimento e/ou produto.

7. Processo de preparo de produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais caracterizado por compreender as etapas de:

a) moagem de grãos de cereais escolhidos do grupo que compreende trigo, arroz, milho, painços, sorgo, centeio, aveia, cevada e combinações dos mesmos;

b) extração com solvente aquoso-orgânico;

c) evaporação do solvente aquoso-orgânico; e

d) moagem do sólido obtido da evaporação da etapa c).

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo solvente aquoso-orgânico possuir uma razão aquoso:orgânico de 20:80 v/v.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo componente orgânico do solvente ser um solvente orgânico solúvel em água.

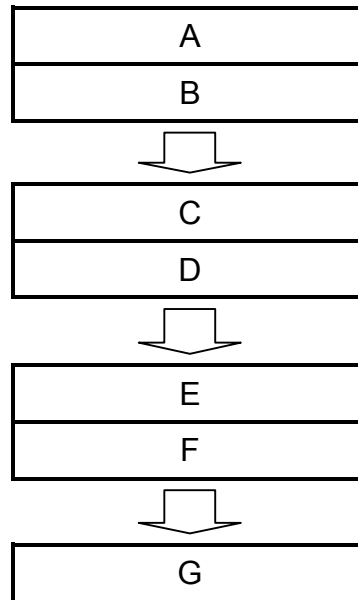
10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo solvente ser diferente de acetona, metanol, e outros de elevada toxicidade e/ou combinações dos mesmos.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo solvente ser etanol.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por compreender as etapas de mistura com água, sonicação e filtragem do conteúdo obtido ao final da etapa a) antes da extração da etapa b).

Figuras

Figura 1. Processo de obtenção do extrato seco.



***Legenda:** A – Cevada Integral Moída; B – Diluição Aquosa; C – Sonicação; D – Filtração; E – Secagem; F – Moagem; G – Produto.

Figura 2. Teor médio de antioxidantes em extrato hidroalcoólico entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.

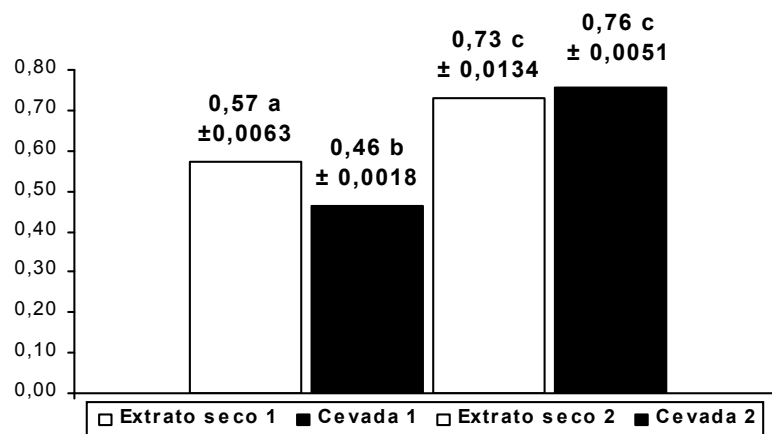


Figura 3. Teor médio de antioxidantes em extrato aquoso entre diferentes concentrados e cultivares de cevada.

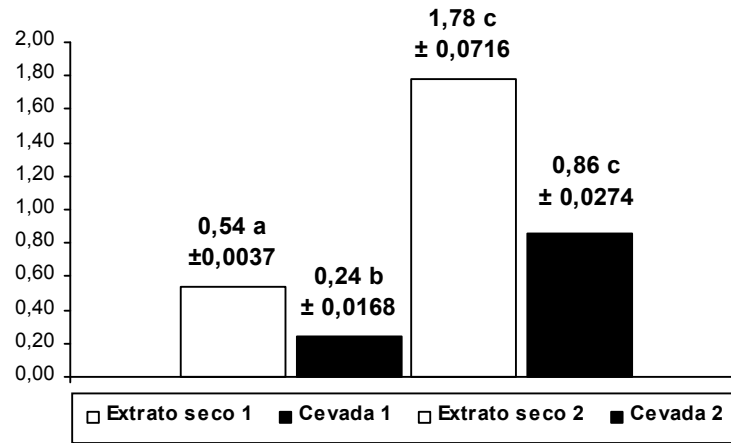


Figura 4. Percentual de capacidade antioxidante da cevada em diferentes concentrações.

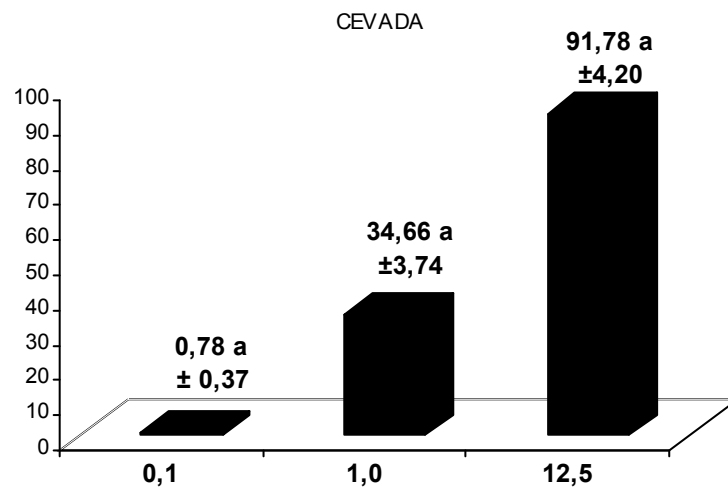


Figura 5. Percentual de capacidade antioxidante do extrato seco em diferentes concentrações.

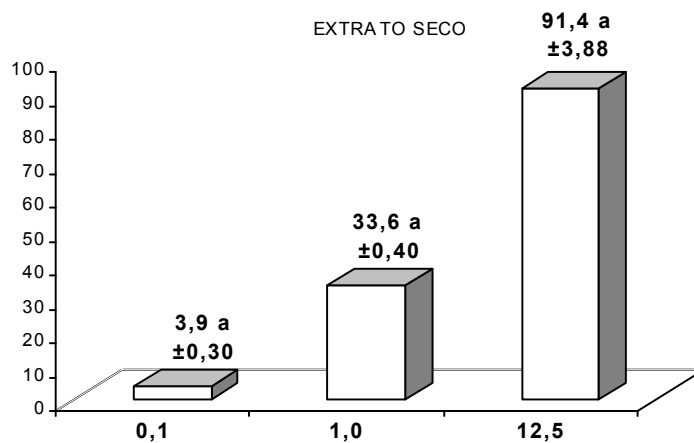
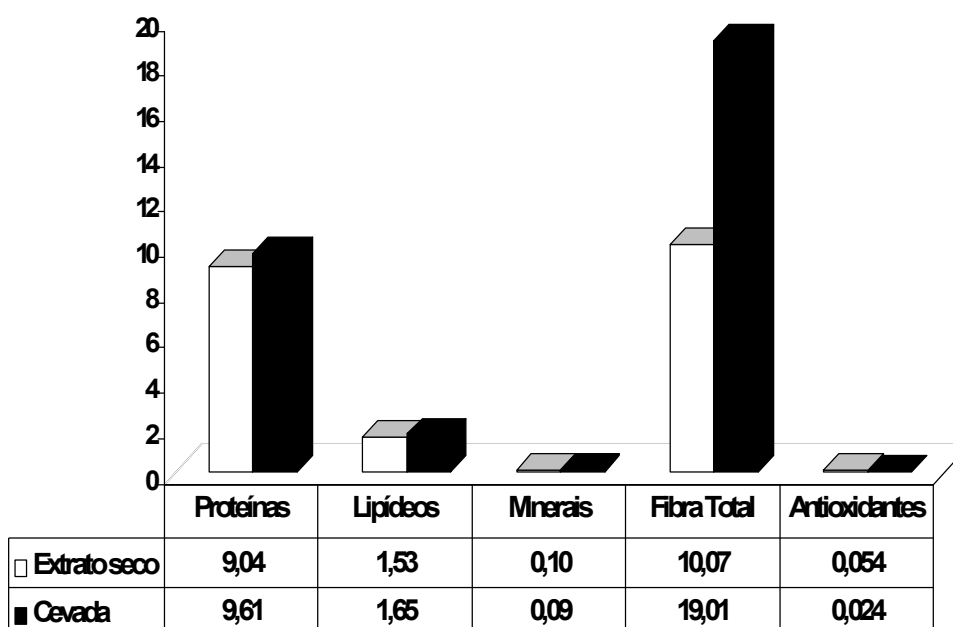


Figura 6. Teor de proteínas, lipídeos, minerais, fibra total e antioxidantes no extrato seco e na cevada, em valores expressos em g/100g.



Resumo

PRODUTO CONCENTRADO EM COMPOSTOS BIOATIVOS A BASE DE CEREAIS, E, AO SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da engenharia de alimentos. Especialmente a um produto a base de cereais concentrados em compostos bioativos e ao processo de produção do mesmo.

-CAPÍTULO 2-

(Conforme normas de publicação da Food Chemistry)

CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* EVALUATION OF DRY EXTRACT OBTAINED FROM BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)

Abstract

In this study, the chemical composition and *in vitro* activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) products were evaluated by various analytical methods. The chemical characterization, total phenolic contents and antioxidant activity of the samples were measured. The values of carbohydrates, soluble fiber, calcium, phosphorus, potassium and phenolic compounds of the dry extract were statistically higher than barley flour. Antioxidant activity was observed in aqueous and ethanol extracts (80%) of dry extract and barley flour with reduction of DPPH and peroxy radicals. Regarding the superoxide radical was observed in the ethanol extract behavior pro-oxidant of the same and antioxidant activity front of this radical by aqueous extracts. The results obtained in the present study indicated that the dry extract of barley is a potential source of carbohydrates, soluble fiber, calcium, phosphorus, potassium and phenolic compounds and that method applied in obtaining of the same was effective for obtaining a product with distinct characteristics from those commercially produced.

Keywords: Barley extract; barley flour; biological activity; *in vitro* activity; chemical characteristics.

1 INTRODUCTION

The development of food supplements that can be added to foodstuffs is a growing research field in the food industry. These can be based on the use of cereals, by-products, plants or parts of plants and others foods with some functional property.

Recent investigations have shown that the antioxidant properties of plants and cereals could be correlated with oxidative stress defense and different human diseases including cancer, atherosclerosis and the aging process (Qingming et al., 2010; Lee et al., 2010). The antioxidants can interfere with the oxidation process by reacting with reactive nitrogen species (RNS), chelating free catalytic metals and also by acting as reactive oxygen species (ROS) scavengers (Gupta, Mazumdar, Gomathi and Kumar, 2004).

The role of selenium, as a nutrient, is due to its association with the active site of the enzyme glutathione peroxidase, which is co-participant in a natural process of cellular detoxification, and in the form of glutathione peroxidase, it reacts with the hydroperoxides of toxic lipid, formed due to free radicals, and produces alcohols of non-toxic lipid (Vinson, Stella and Flanagan, 1998). The phenolic compounds have strong *in vivo* and *in vitro* antioxidant activities associated with their ability to scavenge free radicals, break radical chain reactions, and chelate metals. Antioxidants in cereals exist as easily extractable compounds (free) and as less extractable types (bound) since the latter components are covalently linked to macromolecules such as arabinoxylans. Barley also contains various photochemicals such as phenolics (Lee et al., 2010).

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is an important miscellaneous grain and a widely consumed cereal among the most ancient cereal crops, but, mainly (80–90%), barley production is for animal feeding and malt (Liu and Yao, 2007). It is a grain consumed in some countries of the world because of its dietary health benefits, ready availability, reasonable cost, and processing properties of products such as beer, barley teas, and baked products. Based on grain composition, barley is classified as waxy, non-waxy type, high lysine, high β -glucan, and proanthocyanidin-free. Also, barley is mostly known for its high amount of dietary fibre such as β -glucan

(Holtekjølen, Bævre, Rødbotten, Berg and Knutsen, 2008). The U.S. Food and Drug Administration (2006) allowed the labels of some foods containing the soluble fibre from barley products to claim that the consumption of these foods may reduce the risk of coronary heart disease.

However, barley also contains other important compounds such as arabinoxylan, tocol, and phenolic compounds (Lee et al., 2010). There are growing interests in barley products because of their high content of phenolic compounds such as phenolic acids (benzoic and cinnamic acid derivatives), proanthocyanidins, tannins, flavonols, chalcones, flavones, flavanones, and amino phenolic compounds (Qingming et al., 2010).

The aim of this study was to investigate the relationship between barley flour and a barley dry extract with respect to its chemical composition, antioxidant activity and total phenolic compounds. Barley grains were used in preparing a dry extract that was analyzed and compared with the bioactive compounds of barley source in order to show the applicability of an extract of barley for nutritional purposes to food supplements and/or as nutraceutical products.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Barley cultivars

Whole grains of the barley cultivar, namely, BRS Lagoa, were supplied from the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), propagated during the 2006 season in the Passo Fundo region, Rio Grande do Sul, Brazil. The grown sample was under climatic and agronomical conditions, in well-drained fertile loam soil under relatively cool temperatures and under full sun light conditions. The whole grains were ground using a micro-mill (Model MA-630/I, Marconi ®), rotating at maximum speed for 40 seconds to obtain barley flour with particles smaller than 1.5 mm. After grinding, the samples was put into plastic bags and stored at - 20°C for subsequent characterization.

2.2 Preparation of the dry extract

In the process of obtaining a dry extract, the barley flour was mixed in distilled water and sonicated for 30 minutes at 30°C (Bandelin Sonorex® Super RK 510H) and then filtered and washed with a hydroethanolic solution (20:80, v/v). The filtrate sample was dried at 35±5 °C in forced air circulation oven. The solid content obtained (dry extract) was ground in micro-mill (Marconi®) for 60 seconds to yield a powder (Nörnberg, Bezerra, Carvalho, Rosa and Ros, 2011).

2.3 Chemical characterization of barley products

The barley products were studied in relation to their chemical composition and in vitro biological activity. Were analyzed the following parameters: proteins, lipids, carbohydrates, minerals (calcium, sodium, potassium, phosphorus, magnesium, iron, zinc, manganese and selenium), total fibre, soluble and insoluble, β-glucan, antioxidants (phenolic compounds). Three *in-vitro* chemical methods were used to determine the antioxidant activity of barley products: DPPH, superoxide anion and peroxy radicals (ANCOMROS method).

2.3.1. Determination of total proteins, lipids and carbohydrates

For the chemical characterization of protein and lipid content of the barley products, the next determinations were followed: crude protein (CP) according to Kjeldahl's method ($\% N \times 6.25$), lipids according to Bligh-Dyer's method and non-fibre carbohydrates by difference ($100 - (\% \text{ crude protein} + \% \text{ ether extract} + \% \text{ ash} + \% \text{ total fibre})$) (AOAC, 1995; Bligh and Dyer, 1957).

2.3.2 Determination of nutrients in some minerals

The content of macro minerals (calcium, potassium, phosphorus and magnesium) and trace minerals (iron, zinc and manganese) in the barley products (dry extract and flour), expressed in mg/100g was determined by Flame Atomic

Absorption Spectroscopy (NovAA model 300, Analytikjena) with the digestion method EPA 3050B (USEPA, 1996). The quantification of selenium, expressed in $\mu\text{g}/100\text{g}$ product, was accomplished through atomization by Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy (SPECTRA model 200, Varian $\text{\textcircled{R}}$).

2.3.3 Determination of total fibre, fibre fractions (insoluble, soluble) and β -glucan

For the β -glucan analysis with an enzymic method, Megazyme β -glucan and Glucose Assay Kits were used (Megazyme International, Ireland Ltd.). β -Glucan contents were assessed using the McCleary Enzymic Method for barley (McCleary and Codd, 1991). The principle of the method is depolymerization of β -glucan with endo-(1,3)-(1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase (lichenase) to oligosaccharides, hydrolysis of the oligosaccharides to glucose with purified β -D-glucosidase and determination of glucose using a glucose oxidase-peroxidase method. Total dietary fibre (TDF) contents and fractions of barley samples were determined by using AACC Standard Method No. 32-07 (AACC, 1990). Duplicate samples of milled barleys were applied to sequential enzymatic digestion by using heat stable α -amylase (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark), amyloglucosidase and protease (Sigma, St. Louis, MO, USA) to remove starch and protein. For TDF, enzyme digestate was treated with ethyl alcohol to precipitate soluble dietary fibre (SDF) before filtering, and the TDF residue was washed with ethyl alcohol and acetone, and then dried and weighed. TDF residue values were corrected for protein, ash and blank. The content of soluble dietary fibre (SDF) was determined by observing the difference between TDF and IDF (insoluble dietary fibre).

2.4 Determination of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity

2.4.1 Preparation of crude phenolic extracts

The extracts were prepared in an ethanolic solution (80%) and ultrapure water in concentrations of 5.0 and 12.5 mg/mL, in an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex $\text{\textcircled{R}}$

Super RK 510H, 30 min) and filtered through cellulose acetate 0.45 μm and stored at -20°C for subsequent characterization.

2.4.2 Total phenolic content

The total phenolic content of barley extracts in concentration of 12.5 mg/mL was determined according to Folin-Ciocalteu's spectrophotometric method (Sousa et al., 2007), with some modifications. Briefly, 0.1 mL of extract was mixed with 2.5 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and allowed to react for 5 min. Then, 2 mL of 7.5% Na_2CO_3 solution (w/v) was added. After 1h of reaction at room temperature and in the dark, the absorbance at 740 nm was determined by a spectrophotometer (HP 8453 Diode Array; Hewlett-Packard Co.). The measurement was compared to a standard curve of a prepared gallic acid (GA) solution, and the total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry barley (mg of GAE/g of db).

2.4.3 In vitro radical scavenging activity by DPPH method

The effect of extracts on DPPH radical was monitored according to the method of Hilgemann et al. (2010) with some modifications. Ethanolic solution (80%) of DPPH radical (1.48 mL; $2.03 \cdot 10^{-4}$ M), was added to the extracts (1.5 mL in concentrations of 5.0 and 12.5 mg/mL), adjusting the final volume to 3.0 mL with ethanol (80%) or water. The mixture was shaken vigorously and left standing at room temperature for 30 min and the absorbance was measured spectrophotometrically at 522 nm. DPPH radical scavenging capacity was expressed in percentage of the depletion of absorbance according to equation: $AA_{\text{DPPH}} (\%) = [(C - (S - S_B)) / C] \times 100$, where $AA_{\text{DPPH}} (\%)$ is the percentage of antioxidant activity to reduce DPPH radical, S, S_B , C are the absorbances of the sample, the blank sample and the control, respectively.

2.4.4 In vitro radical scavenging activity by the ANCOMROS method

The methodology was based on the determination of reactive oxygen species (ROS) through the indirect detection by the fluorimetric method ($\lambda = 485/520$ nm) using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) as substrate, according Amado et al. (2009) with some modifications.

In a plate containing 96 pools previously divided into two parts 1 (with addition of ultrapure water) and 2 (with ABAP), it was added in triplicate 10 μ L the solvent used in the samples (blank sample and blank solvent), followed by the extracts (10 μ L). After, it was added to reaction buffer (127.5 μ L) in all the pools of the plate. Finally, it was added of ultrapure water (7.5 μ L) in the region 1, and ABAP solution (7.5 μ L; 4 mmol L⁻¹) in region 2. Immediately before the analysis of the plate, the fluorometer was added DCFH₂ (10 μ L; 16 mmol L⁻¹) previously deacetylated. The fluorometer was set to maintain the temperature at 37°C and measure the fluorescence at a wavelength of 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) every 5 minutes for a total range of 30 minutes.

The reaction buffer used in this determination was made of HEPES (30 mmol·L⁻¹), KCl (200 mmol·L⁻¹) and MgCl₂ (1 mmol·L⁻¹). The chemical deacetylation of DCFH₂-DA to compound DCFH₂, was performed of the addition of 2.0 mL NaOH (0.01 mol·L⁻¹) in an ethanolic solution (5 mmol·L⁻¹) DCFH₂ at room temperature and protected from light. After 30 min, was added phosphate buffer (mono and dibasic) (10 ml; 25 mmol L⁻¹; pH 7.4). The solution was stored on ice until it was analyzed. The ability of the sample to reduce peroxy radicals is calculated according to the following expression: $AA_{ROO}(\%) = \{1 - [(F_A - F_{AB}) / (F_S - F_{SB})]\} \times 100$, where $AA_{ROO}(\%)$ is the percentage of antioxidant activity to reduce peroxy radical, F_A , F_{AB} , F_S , and F_{SB} are the fluorescences of the samples with ABAP, the blank sample without ABAP, the solvent with ABAP and the blank of solvent without ABAP, respectively.

2.4.5 In vitro radical scavenging activity by the HPX/XOD method

The superoxide radical scavenging activity of barley extracts was performed following Zhao et al. (2006), based on a reaction system HPX/XOD

(hypoxanthine/xanthine oxidase). Briefly, the nitroblue tetrazolium chloride (NBT), EDTA, HPX, and XOD solution were prepared with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), respectively. Each barley extract (100 μ L) was added to the reaction solution containing 100 μ L of 30 mM EDTA, 100 μ L of 3 mM HPX, and 200 μ L of 1.42 mM NBT. After the solution had been preincubated at room temperature for 3 min and 100 μ L of 0.75 unit/mL XOD was added to the mixture. The volume was brought up to 3 mL with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4). Then, the solution was incubated at room temperature for 40 min, and the absorbance was measured at 560 nm. The superoxide radical scavenging activity was calculated by using the formula: AAO_2^- (%) = $[1 - (S - S_b)/(C - C_b)] \times 100$, where AAO_2^- (%) is the percentage of antioxidant activity to reduce superoxide radical, S, S_b , C, and C_b are the absorbances of the sample, the blank sample, the control, and the blank control, respectively.

2.4.7 Statistical analysis

The experimental results were reported as the mean (SD of three determinations for each extract in triplicate). The results were subjected to ANOVA, and the differences between the means were located using Tukey's test. The significance was determined at the $p < 0.01$ level.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical characterization

The contents of proteins, lipids, carbohydrates, mineral nutrients, total fibre and β -glucan of the dry extract and barley flour were similar in both. However, the extraction process applied significantly increased the content of SDF, total phenolic compounds (TPC), calcium, potassium, phosphorus and carbohydrates. The chemical composition of barley products are listed in Table 1.

Table 1. Minority chemical composition of the studied barley products.

Chemical composition	Concentration (mg/100g)	
	Flour	Dry extract
Ca	12.96 ± 2.24 ^b	16.44 ± 1.24 ^a
K	514.59 ± 77.95 ^b	572.38 ± 119.68 ^a
P	228.29 ± 8.98 ^b	272.51 ± 7.00 ^a
Mg	180.21 ± 293.14 ^a	163.90 ± 24.00 ^a
Fe	4.39 ± 10.88 ^a	5.52 ± 0.48 ^a
Zn	1.32 ± 3.24 ^a	1.47 ± 0.04 ^a
Mn	1.12 ± 3.43 ^a	1.06 ± 0.21 ^a
Se ^A	19.57 ± 3.24 ^a	18.29 ± 1.15 ^a
Total phenolics ^B (aqueous extract)	24.05 ± 0.02 ^b	53.98 ± 0.00 ^a
Total phenolics (ethanolic extract 80%)	46.50 ± 0.00 ^b	56.98 ± 0.01 ^a
Insoluble fibre ^C	14.73 ± 0.35 ^b	4.28 ± 0.25 ^a
Soluble fibre ^C	4.27 ± 0.10 ^b	5.67 ± 0.08 ^a
β-glucans ^C	1.96 ± 0.01 ^a	1.38 ± 0.19 ^a

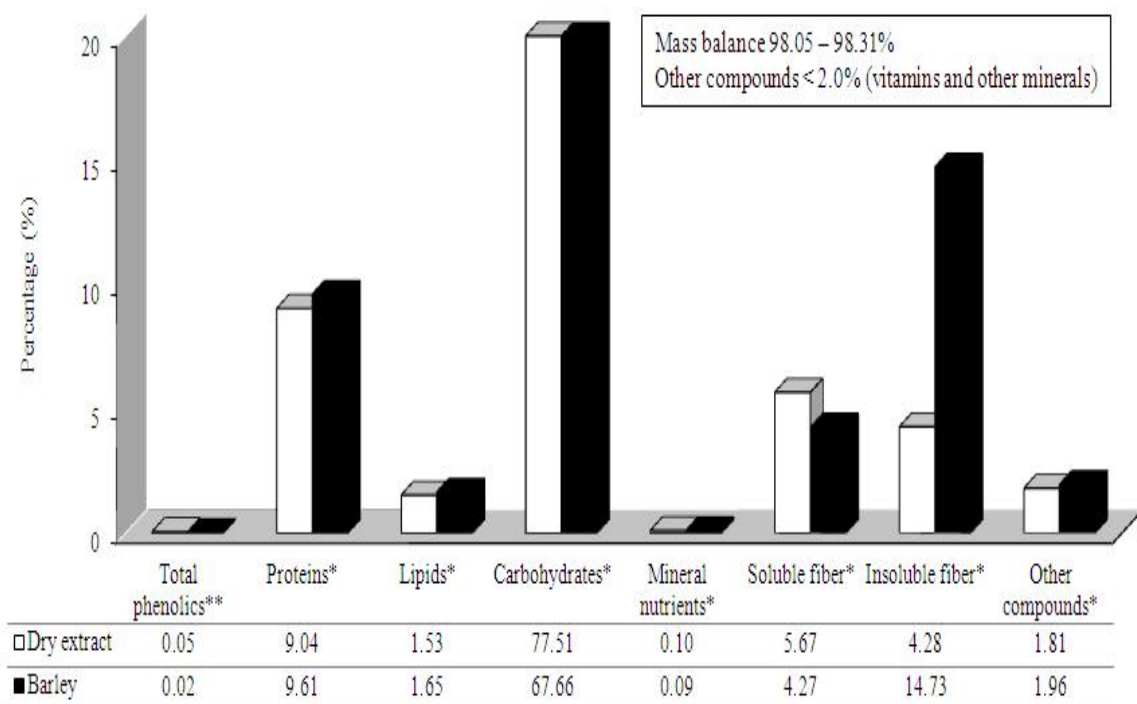
Results are the means of three determinations ± standard deviation (p<0.01).

^A Selenium content is expressed as µg/100g material.

^B Phenolic contents are expressed as mg gallic acid equivalents/100g material.

^C Fibre content (soluble e insoluble) and β-glucans are expressed as average percentage.

Environmental factors can cause variations in the concentration of nutrients in food from different geographical areas, and the selenium content of soil is the most important factor to be considered (Carvalho, Gallardo-Williams, Benson and Martin, 2003). The values of selenium in samples analyzed in our study were lower than found by Izydorczyk and Dexter (2008) that reported in barley cereals values ranged from 0.643 to 0.676 µg/g. The refining process might destroy or remove some of the selenium present in raw products. However, the content of selenium present in barley is maintained in our processing applied to obtaining a dry extract, as shown in Figure 1.



Results are means of three determinations \pm standard deviation.

* Content expressed as mg/g of material.

** Phenolic contents are expressed as mg gallic acid equivalents/g of material (water extract).

Figure 1. Majority chemical characterization of the studied barley products.

A reduction in the IDF content was consequently reflected in the reduction of TDF as result of the process applied to obtain the dry matter. However, this is beneficial for the purpose of equalizing the contents of the soluble and insoluble fibre level of 1:1, making the product obtained distinct from other ones commercially available. The various beneficial actions of fibre in our body are attributed to the soluble fraction, and a high dose of insoluble fibre is discouraged because the excess can adversely affect the absorption of minerals, especially calcium, iron and zinc (Slavin, 2008). The Figure 1, expressed quantitatively (in g/100g) the content of bioactive compounds investigated in barley flour and the dry extract compared (total phenolics, carbohydrates, proteins, lipids, mineral nutrients, soluble fibre and insoluble fibre).

The content of β -glucans in barley is influenced by both genetic and environmental factors and the interactions between the two. Barley grain is notable for a high content of β -glucans that can range from 2.5% to 11.3%. The level of β -

glucans in oats (2.2–7.8%), rye (1.2–2.0%), and wheat (0.4–1.4%) may also vary substantially, but it is generally lower than in barley (Izydorczyk and Dexter, 2008; Andersson, Armö, Grangeon, Fredriksson, Andersson and Åman, 2004). Regarding the content of β -glucans there was not a significant difference between barley and the dry extract, reaching values of 1.96 and 1.38% in the grain and dry extract, respectively of the cultivar analyzed.

The content of antioxidants in the dry extract prepared from barley varied its content according to the solvent used, reaching values two times higher when added to aqueous solvent and increasing by around 20% when added to an ethanolic solvent (80%) compared to milled barley, as noted in Table 1 at concentration of 12.5 mg/mL. Zhao et al. (2008) reported that significant amounts of total phenolics were detected in malting barley varieties and the total phenolic contents of the different malting barley varieties of 14 barley samples ranged from 2.17 to 2.56 mg gallic acid equivalence/g d.b.

3.2 *In vitro* radical scavenging capacity

The antioxidant activity of the extract determined for DPPH by determining the ability of the extract to sequester the radical 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was performed using ethanolic 80% and aqueous extracts. The values of percentage antioxidant activity to reduce DPPH radical of the extracts from cultivars analyzed are shown in Table 2. Observed that the antioxidant activity of dry extract in aqueous solvent was better when compared to milled barley by the DPPH method but showed a lower percentage than that observed in the ethanolic extract.

Kim et al. (2007) reported that the DPPH radical scavenging activities of colored barley extracts varied from 46.4 to 86.3% and average radical scavenging activity in the hullless barley groups (66.5%) was higher than that of hulled barley (63.5%), whereas Lee et al. (2010) reported that the DPPH radical scavenging activity of whole barley, milled barley, and barley by-products extracts with waxy type were 65.43, 30.84, and 54.62%, respectively, at a 500 ppm concentration level.

The antioxidant activity of the extract determined for ANCOMROS by determining the ability of the extract to sequester the peroxy radical was performed

using the ethanol and aqueous extracts. The values of percentage antioxidant activity to reduce peroxy radical of the extracts from cultivars analyzed are shown in Table 2. By this method, the dry extract in ethanol 80% and water, showed a lower percentage of antioxidant activity, respectively when compared to the milled barley. The results showed that the aqueous extract of dry extract exhibited a higher antioxidant activity than the ethanol extract (80%).

The antioxidant activity by the superoxide radical was performed using the ethanol 80% and the aqueous extract. The values of percentage antioxidant activity to reduce superoxide radical of the extracts from cultivars analyzed are shown in Table 2. By this method, the dry extract in ethanolic solvent 80%, showed a pro-oxidant activity in concentrations of 5.0 and 12.5% (w/v), respectively, as well as barley flour at a concentration of 5.0% that also showed the same effect. Only at the concentration of 12.5% barley flour was observed antioxidant activity. In the aqueous extract of barley and dry extract, was observed antioxidant activity. According Zhao et al. (2006), this behavior could also be explained by the fact that barley extracts are very complex mixtures of many different phenolic compounds with a distinct polarity as well as distinct antioxidant and pro-oxidant properties, sometimes showing synergic actions by comparison with individual compounds. All of the above data suggest that the aqueous extract of barley in relation to the ethanol 80% extract might be effective by this method for extracting agents from barley.

Table 2. Percentage antioxidant activity by methodologies analyzed.

SAMPLES	DPPH		PEROXYL		SUPEROXIDE	
	ETHANOL 80%	WATER	ETHANOL 80%	WATER	ETHANOL 80%	WATER
5.0%						
Barley	80.62 ±0.32	10.31 ±0.85	35.32 ±1.84	24.19 ±2.53	nd	11.84 ±0.03
Dry extract	71.02 ±3.21	12.37 ±0.89	17.47 ±1.39	24.66 ±1.37	nd	4.81 ±0.02
12.5%						
Barley	91.78 ±4.20	10.43 ±0.57	53.3 ±1.82	75.97 ±0.81	1.12 ±0.00	26.05 ±0.02
Dry extract	91.36 ±3.88	14.83 ±2.02	39.06 ±2.43	47.84 ±0.31	nd	27.40 ±0.03

*Results are the means of three determinations ± standard deviation. (nd= not detected).

4 CONCLUSIONS

The process developed allows to obtain a concentrated product in phenolic compounds (natural antioxidants) and SDF. In addition, the dry extract obtained decreases the initial concentration of IDF equaling its concentration with SDF. From a functional standpoint, the reduction of insoluble fibre in relation to soluble fibre is beneficial for the human organism, since the functional properties reported in studies are allocated to soluble fibre, and they have the ability to bind water and form gels.

From this study and the satisfactory results obtained, we will study the feasibility of including in the method for obtaining the dry extract, some agricultural by-products that are excellent sources of natural antioxidants or functional materials. By-products, which remain after processing in the food industry, such as durum wheat bran, the fermentation beer residues, grape seed, and olive waste extracts, still contain large amounts of proteins, carbohydrates, and phenolic compounds with good antioxidant properties and they may also be attractive sources because of their low cost and the possibility of reducing environmental problems caused by waste disposal.

The results indicated that barley products possess in vitro antioxidant activity in aqueous and ethanolic extracts front the DPPH, superoxide and peroxy radicals. Consequently, barley and its by-products can be considered as valuable sources of bioactive components exhibiting antioxidant properties and biological activity.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the support in the implementation of this research to Euclides Minella of Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA/Trigo, Rio Grande do Sul), Company Megazyme International Ireland, CAPES.

REFERENCES

Amado, L. L.; Garcia, M. L.; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalon, B.; Ferreira, J. L. R.; Yunes, J. S.; Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science Total Environment*, 407, 2115- 2123.

American Association of Cereal Chemists - AACC (1990). *Approved Methods of the AACC*, Eighth ed., Methods 32-07, 44-01, 46-12 and 55-10. St. Paul, MN, USA.

Andersson, A. M.; Armö, E.; Grangeon, E.; Fredriksson, H.; Andersson, R.; Åman, P. (2004). Molecular weight and structure units of (1→3) (1→4) – β -D glucans in dough and bread made from hull-less barley fractions. *Journal of Cereal Science*, 40 (3), 194–204.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995). *Official methods of analysis*. 16 ed. Arlington: AOAC, v. 1.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1957). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry*, 37, 911-917.

Carvalho, K. M.; Gallardo-Williams, M. T.; Benson, R. F.; Martin, D. F. (2003). Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3), 704–709.

Du, L.; Yu, P.; Rossnagel, B. G.; David A. Christensen, D. A.; McKinnon, J. J. (2009). Physicochemical characteristics, hydroxycinnamic acids (ferulic acid, p-coumaric acid) and their ratio, and in situ biodegradability: comparison of genotypic differences among six barley varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 4777 - 4783.

Food and Drug Administration, HHS (2006). *Food labeling: Health claims; soluble*

dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. Final Rule Federal Register, 71, 29248-29250.

Gupta, M.; Mazumdar, U. K.; Gomathi, P.; Kumar, R. S. (2004). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Ervatamia coronaria* Stapf. Leaves. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3 (2), 119-126.

Hilgemann, M.; Lindequist, U.; Scholz, F.; Wurster, M.; Kahlert, H.; Carvalho, L. M.; Nascimento, P. C.; Bohrer, D.; Rosa, M. B. (2010). Electrochemical Assay to Quantify the Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Medicinal Plant Extracts. Electroanalysis, 22 (4), 406 – 412.

Holtekjølen, A. K.; Bævre, A. B.; Rødbotten, M.; Berg, H.; Knutsen, S. H. (2008). Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour. Food Chemistry, 110, 414-421.

Izydorczyk, M. S.; Dexter, J. E. (2008). Barley b-glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products - a Review. Food Research International, 41, 850–868.

Kim, M.J.; Hyun, J.N.; Kim, J.A.; Park, J.C.; Kim, M.Y.; Kim, J.G.; Lee, S.J.; Chun, S.C.; Chung, I.M. (2007). Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content, and antioxidant activity in colored barley germplasm. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 4802-4809.

Lee, N. Y.; Kim, Y. K.; Choi, I.; Cho, S. K.; Hyun, J. N.; Choi, J. S.; Park, K. H.; Kim, K. J.; Lee, M. J. (2010). Biological Activity of Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Barley By-product Extracts. Food Science and Biotechnology, 19(3), 785-791.

Liu, Q.; Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry, 102 (3), 732-737.

McCleary, B. V., Codd, R. (1991). Measurement of (1→3), (1→4)-β-D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 303–312.

Nörnberg, J. L.; Bezerra, A. S.; Carvalho, L. M.; Rosa, M. B.; Ros, S. (2011). Produto concentrado em compostos bioativos a base de cereais, e, ao seu processo de produção. *Revista da Propriedade Industrial* n°. 2137 (PI 1101649-3) de 20 de dezembro (Brasil).

Oktay, M.; Gulcin, I.; Kufrevioglu, O. I. (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36, 263–271.

Qingming, Y.; Xianhui, P.; Weibao, K.; Hong, Y.; Yidan, S.; Li, Z.; Yanan, Z.; Yuling, Y.; Lan, D.; Guoan, L. (2010). Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 118, 84 - 89.

Slavin, J. L. (2008). Position of the American Dietetic Association: health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1716-1731.

Sousa, C. M. M.; Rocha e Silva, H.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; da Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P; B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.

US Environmental Protection Agency (USEPA). Method 3050B - Acid digestion of sediments, sludges, and soils (December 1996). URL (<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>) (Access in 01 March 2012).

Vinson, J. A.; Stella, J. M.; Flanagan, T. J. (1998). Selenium yeast is an effective *in*

vitro and *in vivo* antioxidant and hypolipemic agent in normal hamsters. *Nutrition Research*, 18 (4), 735–742.

Zhao, H.; Dong, J.; Lu, J.; Chen, J.; Li, Y.; Shan, L.; Lin, Y.; Fan, W.; Gu, G. (2006). Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (19), 7277-7286.

Zhao, H.; Fan, W.; Dong, J.; Lu, J.; Chen, J.; Shan, L.; Lin, Y.; Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, 107, 296-304.

-CAPÍTULO 3-

(Conforme normas de publicação da Journal of Food Composition and Analysis)

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF BARLEY EXTRACTS (*Hordeum vulgare* L.) USING *IN VITRO* TECHNIQUES

Abstract

Barley varieties of different localities from Rio Grande do Sul (Brazil), were analyzed by different assessment methodologies of antioxidant activity including DPPH radical, anion superoxide radical and peroxy radical (ANCOMROS). The total phenolic content (TPC) among cultivars was analyzed by Folin Ciocalteu's method. The results showed that all barley samples exhibited antioxidant activity determined by different assays applied. Observed that barley cultivars with high phenolic content quantified by HPLC showed also a higher antioxidant activity by ANCOMROS methodology, whereas low content quantified showed a lower antioxidant activity. The cultivars from 2010 crop that exhibited a higher total phenolic content by Folin-Ciocalteu's method also showed a higher percentage of antioxidant activity on the reduction of DPPH radical, but had no relationship with phenolic compounds quantified by HPLC. Among the techniques used in this study, the ANCOMROS methodology based on the reduction of peroxy radical by antioxidant compounds showed a highest correlation with the quantification of phenolic compounds analyzed by HPLC.

Keywords: Antioxidant activity; barley; crop; different localities; variety.

1 Introduction

Barley is consumed around the world for bakery, brewing, and malted product. Although little barley is used for direct human consumption in Western countries, it remains a dietary staple in some Latin American and African countries.

Barley grains differ considerably from those of other cereals in regard to chemical constitution. Grains containing protein of high biological value are characterized by high levels of dietary fibre, which include the valuable β -glucans and arabinoxylans. They also contain tocotrienols and tocopherols. In recent years, the demand for natural, functional, and healthy foods has tended to increase (Madhujith and Shahidi, 2007).

Several studies on barley phenolic compounds and their antioxidant activities have been reported (Kim et al., 2007; Goupy et al., 1999), and various aqueous solutions of acetone, methanol, and ethanol have also been used to extract the free phenolic compounds from barley (Maillard and Berset, 1995).

However, it is difficult to compare data within the literature, owing to the different antioxidant activity evaluation methods and extraction solvents used by various researchers. Moreover, antioxidant compounds present in barley extracts are complex, and their activities and mechanisms would largely depend on the composition and conditions of the test system. Many authors had stressed the need to perform more than one type of antioxidant activity measurement to evaluate the antioxidant activity of plant (Bonolli et al., 2004; Frankel and Meyer, 2000).

Barley and malt are now gaining renewed interests as ingredients for the production of functional foods due to their concentration of antioxidant compounds. Most previous studies reported the antioxidative properties of barley. Attention was paid above all to the identification of the individual components of the phenolic fraction and to their antioxidant effects (Wong et al., 2006; Qingming et al., 2010).

According to Madhujith and Shahidi (2007), antioxidants are not evenly distributed in the cereal grains and some researchers have reported that p-coumaric acid was present in the lowest amount in the center of the barley kernel and rapidly increased toward the outer layers, such as lignified husk. The content of ferulic acid

was highest in the cell walls of the aleurone layer, rich in arabinoxylans. In plants, phenolic acids are esterified with other smaller molecules of aliphatic alcohols, phenols, and alkaloids.

Generally, alkaline hydrolysis is the method mostly used for extracting esterified or bound phenolics at room temperature (Madhujith and Shahidi, 2009). Alkaline hydrolysis was used in this study to release phenolic acids present in the insoluble bound form in barley.

DPPH radical scavenging activity, peroxy radical scavenging activity (ANCOMROS) and superoxide radical were used to evaluate antioxidant activities of extracts of selected barley cultivars. Of them, the DPPH radical and superoxide radical have been widely used to evaluate the antiradical activities of various samples (Hilgemann et al., 2010; Zhao et al., 2008). Additionally, total phenolic contents were also determined in this study because phenolic compounds were considered to be a major group of compounds that contributed to the antioxidant activity of barley.

The objectives of this study were to assess the antioxidant potential of extracts of selected barley cultivars grown in Brazil and to examine the efficacy of barley extracts “*in vitro*” in percentual of oxidant inhibiting and quantify and identify the phenolic compounds by HPLC-DAD and ESI-MS/MS. The second objective was to reveal the correlations among barley antioxidant activity evaluation indices and content of phenolic compounds. Results from this preliminary study will provide the screening of Brazilian barley varieties with higher antioxidant activity to produce beer and of importance for human health.

2 Material and methods

2.1 Samples. Grains of three barley cultivars, namely, BRS 195, BRS 225, and MN 743 recommended by the National Barley, from Victor Graeff and Passo Fundo, from the trial coordinated by the National Research Center of Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil, in crop year 2008, 2009 and 2010. All cultivars examined were grown under the same climatic and agronomical conditions, in well-drained fertile loam soil under relatively cool temperatures and under full sun light conditions.

2.2 Chemicals and solutions. The standards (+)-catechin (CAT), *p*-coumaric (COU), chrysin (CHRY), fisetin (FIS), flavone (FLA), gallic acid (GAL), kaempferol (KAE), myricetin (MYR), quercetin (QUE), quercitrin (QUER), resveratrol (RES) and rutin (RUT) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Caffeic (CAF) and ferulic (FER) acids were purchased from Fluka (Switzerland). All standards were of analytical grade, with at least 95% purity, and were used without further purification. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV system (Millipore S. A., Molsheim, France). The HPLC grade solvents methanol, acetonitrile and anhydrous ethanol were obtained from Tedia Company (USA). Orthophosphoric acid (85%) and sodium carbonate were purchased from Merck (Germany). Folin-Ciocalteu reagent was obtained from Próton Química (Brazil). Mono and dibasic phosphate from Vetec (Brazil), sodium tetraborate, sodium hydroxide, HEPES, ABAP (2,2'-azobis(2-metilamodinopropano)), DFCH₂-DA (diacetate 2', 7'-dichlorofluorescein), xanthine oxidase (XOD) 25un, hypoxanthine, nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) were obtained from Sigma-Aldrich. Potassium chloride and magnesium chloride were purchased from Isofar® (Rio de Janeiro, Brazil) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) purchased from Nuclear® (Brazil). The stock solutions of standards (1000 mg·L⁻¹) were prepared by dissolving appropriate amount of substances in HPLC grade methanol, and they were stored in Falcon tubes at -30°C until analysis. Working solutions of phenolic compounds were freshly prepared by further dilution of stock solutions in methanol.

2.3 Instrumentation and apparatus. The chromatographic separations were carried out on a Knauer (Berlin, Germany) HPLC system, which consisted of a Smartline Pump 1000 coupled to a Smartline Manager 5000, and a multi-channel UV spectrophotometer detector based on diode array technology, model Smartline UV Detector 2600, equipped with a ChromGate® (Knauer) software, Version 3.3.1. The chromatographic runs were conducted at room temperature (21 ± 2°C) using a reverse-phase Eurospher® 100-5 C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm) (Knauer®) with a Acclaim® 120 C18 guard cartridge (4.3 mm × 10 mm, 5 µm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, USA). Samples were injected with a sample injector equipped with a 20 µL loop. Mass spectrometry experiment was performed on a

Waters Micromass Quattro Micro API instrument (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with an electrospray source. Ultrahigh pure argon (Ar) was used as the collision gas and high purity nitrogen (N₂) as the nebulizing gas.

3 Analytical procedures

3.1 Preparation of crude phenolic extracts. Barley grains were ground in a micro-mill brand Marconi ®, rotating 9 (maximum speed) for 40 seconds, in an integral form, to obtain particle size (<1 mm) suitable for analysis, and stored in polyethylene bags identified to date analysis. The extracts were prepared in ethanolic solution (80 %, v/v) and ultrapure water in concentrations of 12.5 mg/mL, in an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex® Super RK 510H, 30 min) and filtered through cellulose acetate 0.45 µm and stored at -20 °C for subsequent characterization by the methods used to evaluate the antioxidant activity.

3.2 Alkaline hydrolysis of barley extracts. Alkaline hydrolysis was performed by mixing in vortex 2.5 g of the sample with 10 mL of NaOH (1M) in a screw top vial. After added 10 ml of ethanolic solution (80%). The vial was sealed and held at room temperature for 30 minutes in ultrasonic bath. All extracts were filtered in a 0.45 µm cellulose acetate membrane and the filtrate was stored at -20°C until analysis by HPLC-DAD and ESI-MS/MS. The supernatant were used for bound phenolic measurement.

3.3 Total phenolic content (TPC). The total phenolic content of barley extracts in concentration was determined according to Folin-Ciocalteu's spectrophotometric method (Singleton et al., 1999), with some modifications. Briefly, 0.1 mL of extract was mixed with 2.5 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and allowed to react for 5 min. Then, 2 mL of 7.5% Na₂CO₃ solution (w/v) was added. After 1h of reaction at room temperature and in the dark, the absorbance at 740 nm was determined by a spectrophotometer (HP 8453 Diode Array; Hewlett-Packard Co.). The measurement

was compared to a standard curve of a prepared gallic acid (GA) solution, and the total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry barley (mg of GAE/g of db).

3.4 DPPH - Radical scavenging assay. The effect of extracts on DPPH radical was monitored according to the method of Hilgemann et al. (2010) with some modifications. Ethanolic solution (80%) of DPPH radical (1.48 mL; $2.03 \cdot 10^{-4}$ M), was added to the extracts (1.5 mL in concentrations of 12.5 mg/mL), adjusting the final volume to 3.0 mL with ethanol (80%) or water. The mixture was shaken vigorously and left standing at room temperature for 30 min and the absorbance was measured spectrophotometrically at 522 nm. DPPH radical scavenging capacity was expressed in percentage of the depletion of absorbance according to equation: $AA_{DPPH} (\%) = [(C - (S - S_B)) / C] \times 100$, where $AA_{DPPH} (\%)$ is the percentage of antioxidant activity to reduce DPPH radical, S, S_B , C are the absorbances of the sample, the blank sample and the control, respectively.

3.5 Antioxidant competence measured by ROS determination - ANCOMROS. The methodology was based on the determination of reactive oxygen species (ROS) through the indirect detection by the fluorimetric method ($\lambda = 485/520$ nm) using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) as substrate, according Amado et al. (2009) with some modifications.

In a plate containing 96 pools previously divided into two parts 1 (with addition of ultrapure water) and 2 (with ABAP), it was added in triplicate 10 μ L the solvent used in the samples (blank sample and blank solvent), followed by the extracts (10 μ L). After, it was added to reaction buffer (127.5 μ L) in all the pools of the plate. Finally, it was added of ultrapure water (7.5 μ L) in the region 1, and ABAP solution (7.5 μ L; 4 mmol L^{-1}) in region 2. Immediately before the analysis of the plate, the fluorometer was added $DCFH_2$ (10 μ L; 16 mmol L^{-1}) of previously deacetylated. The fluorometer was set to maintain the temperature at 37°C and measure the fluorescence at a wavelength of 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) every 5 minutes for a total range of 30 minutes.

The reaction buffer used in this determination was made of HEPES (30

mmol·L⁻¹), KCl (200 mmol·L⁻¹) and MgCl₂ (1 mmol·L⁻¹). The chemical deacetylation of DCFH₂-DA to compound DCFH₂, was performed of the addition of 2.0 mL NaOH (0.01 mol·L⁻¹) in an ethanolic solution (5 mmol·L⁻¹) DCFH₂ at room temperature and protected from light. After 30 min, was added phosphate buffer (mono and dibasic) (10 ml; 25 mmol L⁻¹; pH 7.4). The solution was stored on ice until it was analyzed. The ability of the sample to reduce peroxy radicals is calculated according to the following expression: $AA_{ROO}(\%) = \{1 - [(F_A - F_{AB}) / (F_S - F_{SB})]\} \times 100$, where $AA_{ROO}(\%)$ is the percentage of antioxidant activity to reduce peroxy radical, F_A , F_{AB} , F_S , and F_{SB} are the fluorescences of the samples with ABAP, the blank sample without ABAP, the solvent with ABAP and the blank of solvent without ABAP, respectively.

3.6 Superoxide anion radical scavenging activity. The superoxide radical scavenging activity of barley extracts was performed following Zhao et al. (2006), based on a reaction system HPX/XOD (hypoxanthine/xanthine oxidase). Briefly, the NBT, EDTA, HPX, and XOD solution were prepared with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), respectively. Each barley extract (100 µL) was added to the reaction solution containing 100 µL of 30 mM EDTA, 100 µL of 3 mM HPX, and 200 µL of 1.42 mM NBT. After the solution had been preincubated at room temperature for 3 min and 100 µL of 0.75 unit/mL XOD was added to the mixture. The volume was brought up to 3 mL with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4). Then, the solution was incubated at room temperature for 40min, and the absorbance was measured at 560 nm. The superoxide radical scavenging activity was calculated by using the formula: $AAO_2^{\cdot-}(\%) = [1 - (S - S_b)/(C - C_b)] \times 100$, where $AAO_2^{\cdot-}(\%)$ is the percentage of antioxidant activity to reduce superoxide radical, S , S_b , C , and C_b are the absorbances of the sample, the blank sample, the control, and the blank control, respectively.

3.7 HPLC-DAD analysis. The phenolic compounds were separated using a gradient elution, using orthophosphoric acid (0.1 %) as solvent A and acetonitrile as solvent B. The elution conditions were: 90-80 % A and 10-20% B (0-5 min); 80-75 % A and 20-25 % B (5-35 min); 75-0 % A and 25-100 % B (35-55 min). The flow rate conditions were: 0.8 ml·min⁻¹ (0-35 min); 0.8-1.0 ml·min⁻¹ (35-55 min). A re-equilibration period of 5 min was used between individual runs. The detection was

performed at 206 nm, 254 nm, 320 nm and 360 nm simultaneously and identification and peak assignment was based on retention times, spectral data in the UV-Vis by comparison with authentic standards and on a spiking of the standard solutions to the extract. The compounds under study were quantified by standard addition method and the calibration curves were constructed by plotting peak area *versus* concentration of standards. Figure 1 shows a chromatogram separation for 14 phenolic compounds.

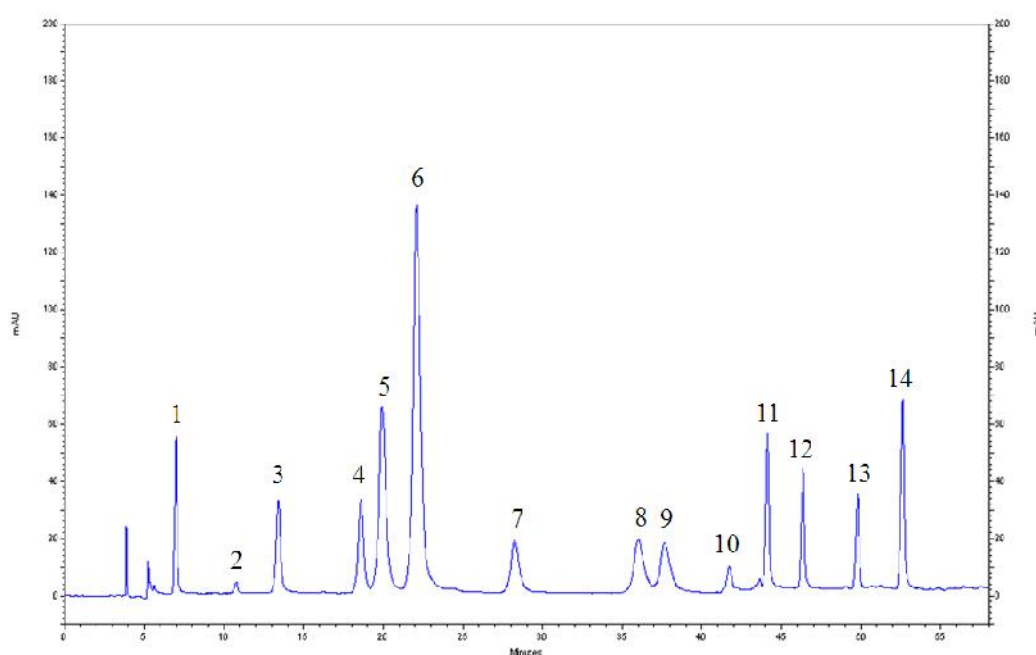


Figure 1. Chromatogram obtained from a standard mixture $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with gradient separation. (1) gallic acid; (2) (+)-catechin; (3) caffeic acid; (4) rutin; (5) *p*-coumaric acid; (6) ferulic acid; (7) quercitrin; (8) myricetin; (9) fisetin; (10) resveratrol; (11) quercetin; (12) kaempferol; (13) chrysin; (14) flavone.

3.8 Identification of phenolics compounds for ESI-MS/MS analysis. The extracts hydrolyzed were filtered before analysis by mass spectrometry with a Waters Micromass Quattro Micro API instrument (Waters Corporation, Milford, MA, USA) with an electrospray source. Ultrahigh pure argon (Ar) was used as the collision gas and high purity nitrogen (N_2) as the nebulizing gas. The optimized mass spectrometry analysis conditions were as follows: capillary voltage of the ion source was optimized for each phenolic antioxidant compounds from 0.5 to 5.0 kV, the

cone was optimized from 10 to 50 V, source temperature at 120 °C and desolvation temperature at 400 °C. For full scan MS analysis, negative ions spectra of the column elute were recorded in the range of m/z 100–700. The collision energy for collision induced dissociation (CID) was between 10 - 50 eV. The flow of infusion, desolvation gas and cone gas were, respectively, of 50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 800 and 100 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The data were analyzed using the MassLynx V4.1 software.

3.9 Statistical analysis. Experimental results were reported as the mean (SD of three determinations for each extract in triplicate). Correlations between various parameters were also investigated.

4 Results and discussion

4.1 Total phenolic content (TPC). The results are expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry barley (mg GAE/g db) and are presented in Table 1. Significant amounts of total phenolics were detected in all barley varieties. The TPC values for barley samples ranged from 0.71 to 1.67 mg GAE/g db. The results were lower than those reported by Zhao et al. (2008) and according with reported by Madhujith and Shahidi (2007) and Maillard et al. (1996). This might be due to the differences of the barley varieties and the concentration and extraction methods used in both studies. For TPC measured, BRS 225 (2010/VG) barley exhibited the highest amount, whereas the lowest was observed in MN 743 (2008/VG) barley. In the harvest of 2008 there was lowest mean value TPC values among cultivars and the highest in 2010.

Table 1. Quantification of phenolic compounds and antioxidant activity by different methodologies in barley cultivars analyzed of three crop years (2008, 2009 and 2010) in two localities of Rio Grande do Sul / Brazil.

Crops	Cultivars by location	Phenolic content (mg of GAE/g)	DPPH activity (%)	Peroxyl activity (%)	p-cumaric acid (mg·kg⁻¹)	Ferulic acid (mg·kg⁻¹)
2008	PASSO FUNDO					
	BRS 195	0.84±0.02	91.47±0.52	79.48±3.73	1320.02±0.07	260.84±0.07
	BRS 225	0.99±0.04	91.53±1.05	73.82±4.16	1130.79±0.02	244.39±0.30
	MN 743	0.82±0.02	92.09±0.15	69.03±0.86	985.19±0.09	177.31±0.10
	VICTOR GRAEFF					
	BRS 195	0.87±0.06	91.05±2.40	75.57±2.43	854.13±0.14	139.75±0.18
2009	PASSO FUNDO					
	BRS 195	1.15±0.04	86.85±1.11	75.76±0.89	609.85±2.21	182.72±0.38
	BRS 225	1.38±0.02	89.81±1.46	66.63±3.84	373.91±2.24	336.13±0.03
	MN 743	0.98±0.03	88.62±0.89	63.36±3.30	512.46±2.22	222.80±0.06
	VICTOR GRAEFF					
	BRS 195	1.40±0.05	86.62±0.47	66.10±0.32	898.70±0.06	255.92±0.20
2010	PASSO FUNDO					
	BRS 195	1.32±0.13	92.75±0.69	67.26±1.78	484.65±0.13	316.54±0.15
	BRS 225	1.26±0.02	91.51±0.41	64.91±1.77	378.32±2.25	320.37±0.01
	MN 743	1.12±0.06	96.47±0.26	55.61±0.83	147.12±2.42	201.42±0.02
	VICTOR GRAEFF					
	BRS 195	1.56±0.11	91.92±3.41	57.81±0.10	482.36±0.04	314.62±0.07
BRS 225	1.67±0.16	92.47±0.96	55.47±0.61	631.24±0.11	319.30±0.07	
MN 743	1.47±0.09	92.79±1.84	55.11±1.25	530.43±0.10	295.76±0.04	

*Values are in the Mean ± S.D., n = 3 for each experiment.

4.2 DPPH - Radical scavenging assay. The relatively stable organic radical DPPH has been used widely for the determination of antioxidant activity of pure antioxidant compounds as well as different cereal extracts (Goupy et al, 1999; Yu and Zhou, 2004). For evaluation of antioxidant activity of barley, different barley varieties were measured and compared with their DPPH radical scavenging activities. Results are expressed as percentage of antioxidant activity and are shown in Table 1. All barley varieties exhibited strong DPPH radical scavenging activity at the test concentration. The values of DPPH radical scavenging activity for barley samples ranged from 86.62 ± 0.47 to 96.47 ± 0.26 . In the harvest of 2009 there was lowest mean value antioxidant activity percentage (% AA) among cultivars and the highest in 2010. The significant differences in DPPH radical scavenging activity for different crop years suggested that variety and environmental factors might have significant influences on the antioxidant activity. This finding also was supported by the observation that heritability is a measure of the proportion of variation in a trait due to genotype, relative to overall variation, which includes environmental effects (Fox et al., 2007).

4.3 Antioxidant competence measured by ROS determination - ANCOMROS. The present study introduced a new methodology to measure antioxidant capacity through ROS concentration in barley extracts. The employment of fluorimeter with plate reader allows the determination of several samples quickly. Taking into account that samples (10 μ l) are measured in triplicate, three without ABAP and three with ABAP, a total of 60 μ l are enough to perform the assay. Considering the use of 3 blanks without ABAP plus more three with ABAP, a 96-well plate allows for determining 15 samples (in triplicate) in 30 min. Results are expressed as percentage of antioxidant activity and are shown in Table 1. All barley varieties exhibited strong antioxidant activity at the test concentration. The values for barley samples ranged from 55.11 ± 1.25 to 79.48 ± 3.73 . In the harvest of 2010 there was lowest mean value antioxidant activity percentage (% AA) among cultivars and the highest in 2008. In our study we observed that some barley cultivars with high content of ferulic and p-cumaric acids quantified by HPLC also showed a higher antioxidant activity by ANCOMROS, and the lowest level of these acids measured

showed a lower antioxidant activity by this method. This correlation was well over observed among cultivars of the municipality from PF (Figure 3), whereas in VG, cultivars of 2009 did not show the same correlation as those of 2008 and 2010. However, between the techniques used in our study, ANCOMROS showed the highest correlation with quantification by HPLC (Table 2). This result is in accordance with ZHAO et al. (2008) that reported that generally, barley with high amount of phenolics also showed high antioxidant activity. The lowest antioxidant activity of the barley extracts observed with peroxy radical indicates a higher reactivity when compared to their DPPH radical.

Table 2. Ranking and correlation between varieties of barley and crops analyzed by different methodologies based in mean values of total content from ferulic and p-cumaric acids quantified by HPLC.

CROPS AND LOCATION		
Methodologies	Passo Fundo	Victor Graeff
	2008	2008
TPC DPPH ANCOMROS	MN743<BRS195<BRS225 BRS195<BRS225<MN743 MN743<BRS225<BRS195	MN743<BRS225<BRS195 BRS195<MN743<BRS225 MN743<BRS225<BRS195
	2009	2009
TPC DPPH ANCOMROS	MN743<BRS195<BRS225 BRS195<MN743<BRS225 MN743<BRS225<BRS195	MN743<BRS195<BRS225 BRS195<BRS225<MN743 BRS225<BRS195<MN743
	2010	2010
TPC DPPH ANCOMROS	MN743<BRS225<BRS195 BRS225<BRS195<MN743 MN743<BRS225<BRS195	MN743<BRS195<BRS225 BRS195<BRS225<MN743 MN743<BRS225<BRS195

*Legend: (TPC) - Total phenolic content; (DPPH) - DPPH - Radical scavenging assay and (ANCOMROS) - Antioxidant competence measured by ROS determination.

4.4 Superoxide anion radical scavenging activity. Given the methodology of the superoxide anion radical, ethanolic extract (80%, v/v) of barley cultivars did not show a satisfactory result, demonstrating pro-oxidant activity against this radical. This observation was also observed by Zhao et al. (2006), who reported that some phenolic compounds become pro-oxidants in a certain concentration range. These authors showed a pro-oxidant potential of ethanolic extracts of Chinese barley cultivars attributed to low concentration of p-coumaric and vanillic. This result can be explained by the complexity of the extracts of barley which is a mixture of different compounds with different polarities as well as antioxidant properties and pro-oxidants.

4.5 HPLC analysis. The analysis by HPLC-DAD revealed the presence of ferulic and p-coumaric acids identified and quantified in ethanolic extract after alkaline hydrolysis from barley variety. Alkaline hydrolysis is the method mostly used for extracting esterified or bound phenolics at room temperature (Madhujith and Shahidi, 2009). Alkaline hydrolysis was used in this study to release phenolic acids present in the insoluble bound form in barley. Among fourteen analyzed antioxidants were identified in the extract of barley the ferulic and p-coumaric acids. These compounds were quantified by standard addition and confirmed by UV-Vis spectrum and comparing with a reference standard. An example of HPLC chromatogram extract of barley is shown in Figure 2. BRS 195 (2008/PF) barley exhibited the highest content phenolic compounds determined by HPLC and antioxidant activity measured by ANCOMROS. The content of individual phenolic compounds identified is summarized in Table 1. The results of studies indicated that p-coumaric acid was the major free phenolic compound that existed in barley under our experimental conditions in the Brazilian genotypes during the three years of cultivation. The correlation between the methods of HPLC and ANCOMROS can be seen in Figure 3.

Ferulic and p-coumaric acids were confirmed by ESI (-)-MS in all the cultivars analysed. The ionization of the phenolic compounds in negative mode showed the highest sensitivity and selectivity and therefore mass spectra and the fragment patterns were obtained in this way. Analyze by ESI (-)-MS identified p-coumaric acid (m/z 301) as major compound followed by ferulic acid also identified in samples being

the most abundant peak (m/z 134) formed by elimination of carbon dioxide and one methyl group.

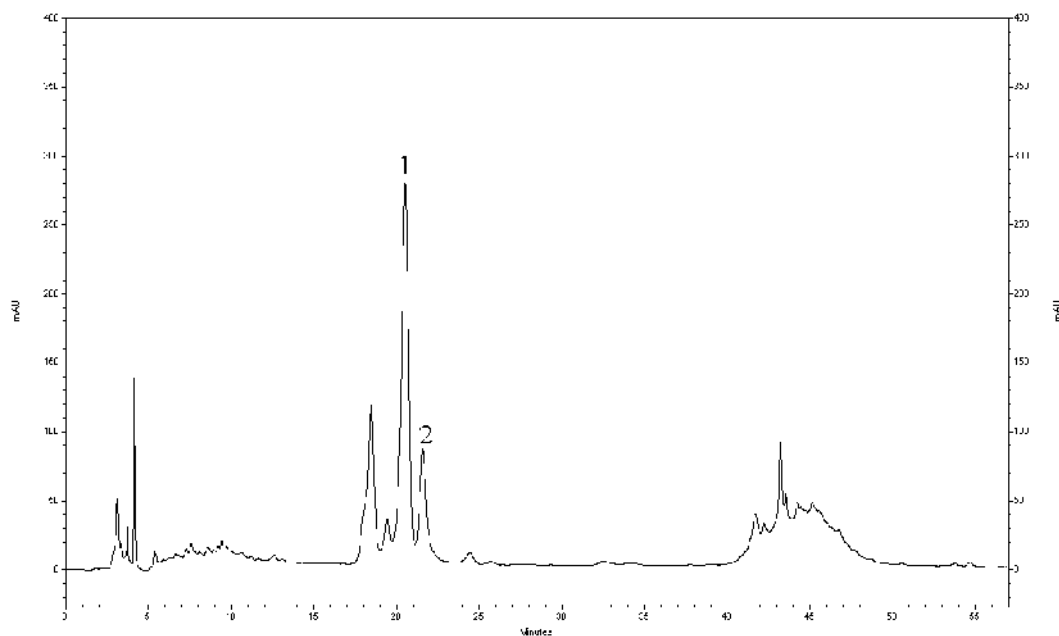


Figure 2. Chromatogram ($\lambda=320\text{nm}$) of barley extract after alkaline hydrolysis. (1) p-coumaric acid; (2) ferulic acid.

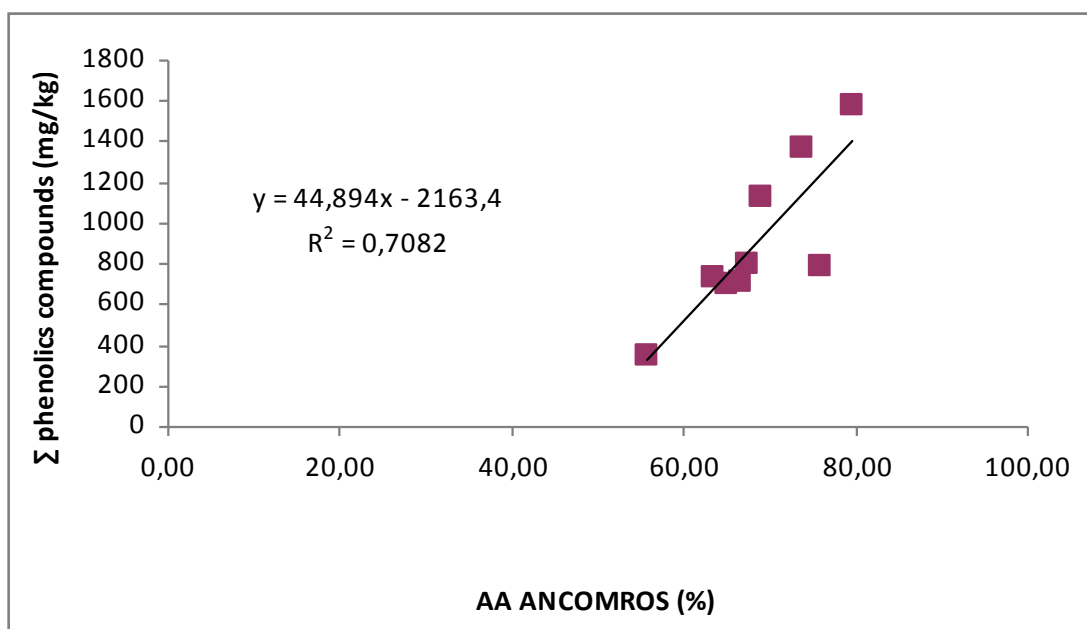


Figure 3. Correlation between antioxidant activity by ANCOMROS and content medium of ferulic and p-coumaric acids quantified by HPLC of three crops from Passo Fundo.

5 Conclusions

In conclusion, the present study determined antioxidant activities and total phenolic contents of barley varieties from Brazil. Results showed that barley variety had influences on both the antioxidant activity and the TPC. The 2008 crop showed a higher total phenolic content quantified by HPLC and lowest in 2010. This result was related to a higher or lower average percentage of antioxidant activity, respectively, measured by the method ANCOMROS in these years. This characteristic was not observed among the other methodologies used in the study.

Our research also provided important information on the different methodologies used in the quantification of phenolic compounds and its correlation with their content. Results from this preliminary study will provide the screening of Brazilian barley varieties with higher antioxidant activity to produce beer and of importance for human health.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the support in the implementation of this research to Euclides Minella of Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA/Trigo, Rio Grande do Sul), CAPES.

REFERENCES

Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., Monserrat, J. M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115 – 2123.

Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M. F., 2004. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare L.*) flour evaluation of extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic

chromatography and spectrophotometry. J. Chromatogr. A.1057, 1-12.

Fox, G. P., Osborne, B., Bowman, J., Kelly, A., Cakir, M., Poulsen, D., Inkerman, A., Henry, R., 2007. Measurement of genetic and environmental variation in barley (*Hordeum vulgare*) grain hardness. J. Cereal Sci. 46, 82–92.

Frankel, E. N., Meyer, A. S., 2000. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J. Sci. Food Agric. 80, 1925-1941.

Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, J., 1999. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum Vulgare*) and malt extracts of isolated phenolic compounds. J. Sci. Food Agric. 79, 1625-1634.

Hilgemann, M., Scholz, F., Kahlert, H., de Carvalho, L., da Rosa, M., Lindequist, U., Wurster, M., do Nascimento, P., Bohrer, D., 2010. Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts. Electroanalysis. 22, 406 – 412.

Kim, M. J., Hyun, J. N., Kim, J. A., Park, J. C., Kim, M. Y., Kim, J. G., Lee, S. J., Chun, S. C., Chung, I. M., 2007. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. J. Agric. Food Chem. 55, 4802-4809.

Madhujith, T., Shahidi, F. J., 2007. Antioxidative and Antiproliferative Properties of Selected Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. Agric. Food Chem. 55, 5018-5024.

Madhujith, T., Shahidi, F., 2009. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. Food Chem. 117, 615–620.

Maillard, M. N., Berset, C., 1995. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1789-1793.

Maillard, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., Berset, C., 1996. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 29, 238–244.

Qingming, Y., Xianhui, P., Weibao, K., Hong, Y., Yidan, S., Li, Z., Yanan, Z., Yuling, Y., Lan, D., Guoan, L., 2010. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare L.*) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chem.* 118, 84–89.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.

Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99, 775-783.

Yu, L., Zhou, K., 2004. Antioxidant properties of bran extracts from 'Platte' wheat grown at different locations. *Food Chem.* 90, 311–316.

Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G., 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare L.*). *J. Agric. Food Chem.* 54 (19), 7277-7286.

Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W., 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.* 107, 296–304.

-CAPÍTULO 4-

(Conforme normas de publicação da Journal of Cereal Science)

EFFECTS OF GENOTYPE AND ENVIRONMENT ON β -GLUCAN AND DIETARY FIBRE CONTENTS IN WHOLE GRAIN OF BARLEY GROWN IN BRAZIL

Abstract

In this study, the effects of cultivar and environment on β -glucan and dietary fibre (DF) contents and various quality characteristics of whole grains of barley grown in Brazil were investigated. There were significant differences among the barley genotypes and different locations and crop years in terms of β -glucan, total dietary fibre (TDF), soluble dietary fibre (SDF) and insoluble dietary fibre (IDF) content ($p < 0.05$). These results indicated that environmental and genetic factors are involved in the total β -glucan content and dietary fibre of barley.

Keywords: Environment; fibre; genotype; health.

1 Introduction

The search for natural products containing bioactive compounds, able to function in metabolism and human physiology, promoting beneficial health effects, which may delay the establishment of chronic degenerative diseases and improve the quality and life expectancy of people, has been studied in the present day.

Cereals play an important role in nutrition and human health. In addition to the nutritional value, some components of the grain, can also provide health benefits, may play a potentially beneficial in reducing the risk of degenerative chronic disease. Barley is a cereal that currently has been the focus of research demonstrating the functional importance of their nutritional components (Izydorczyk and Dexter, 2008).

Recent publications surrounding the growing incidence of various chronic diseases and obesity, demonstrated link between the intake of dietary fibre (DF) and various health benefits (Önning, 2007; Slavin, 2007).

The interest in barley as a food grain is reviving due to the presence of constituents in barley known to prevent and to alleviate certain diseases. Barley grain is an excellent source of soluble and insoluble dietary fibre and other bioactive constituents, such as vitamin E (including tocotrienols), B-complex vitamins, minerals, and phenolic compounds (Madhujith et al., 2006; Slavin et al., 2000). β -glucans, the major fibre constituents of barley, have been implicated in lowering plasma cholesterol, improving lipid metabolism, and reducing glycaemic index (Behall et al., 2004).

Barley is arguably the most widely adapted cereal grain species with production at higher latitudes and altitudes and farther into deserts than any other cereal crop (Baik & Ullrich, 2008). Genetic diversity provides an ample opportunity to identify and breed barley varieties for specific end uses. However, it may be a challenge for processors and end users when there are few guidelines for choosing barley grain suitable for various purposes (Yalçin et al., 2007).

Starch, dietary fibre and protein are the main components of barley grain. Both genotypic and environmental factors, affects its chemical composition (Aman and Newman, 1986). Total dietary fibre (TDF) consist of insoluble and soluble fractions, both of which are resistant to digestion by the alimentary enzymes of humans. The insoluble fraction in cereal grain contains a large proportion of cellulose and has beneficial effects in the gastrointestinal tract (Jenkins et al., 1985). The soluble fractions contain mostly pectin, arabinoxylan and β -glucan. Barley contains high levels of soluble dietary fibre, particularly mixed linkage (1,3)-(1,4)- β -D-glucans (β -glucan).

Barley is unique among cereals, containing high concentrations of β -glucan, which is known to have a cholesterol-lowering effect (McIntosh et al., 1991), regulating blood glucose level and insulin response in diabetics (Cavallero et al., 2002) and even reducing cancer risk (Jacobs et al., 1998).

Because of the importance of fibre and β -glucan for health, and aiming at increasing inclusion of grain in food so as to enjoy all the benefits provided by their

components and malting, the aim of this study was to determine general quality characteristics of whole grain of barley advanced lines grown in Brazil and to determine the effects of genotype and growing location on β -glucan and dietary fibre contents.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Barley cultivars, designated BRS 225, BRS 195 and MN 743, crop year 2008 and 2009, with three replications in field trial coordinated by the Research Center of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Trigo / Passo Fundo) were used in this research. Whole grains of barley were grown in experimental fields in two different locations (Victor Graeff and Passo Fundo) in southern Brazil. The experiments which led the seed samples were sown in the first half of June. The crop was harvested in the last week of October in Victor Graeff and second week of November in Passo Fundo, in the respective years.

Because of absence of a weather station in Victor Graeff (VG), it was considered in this study meteorological data from Ibirubá, a locality which is 43.6 km from VG. The insolation data were not registered in this region.

2.2 Tests on barley samples

The barley samples were analyzed for moisture, protein ($N \times 6.25$) by using AACC Methods Nos. 44-01, 46-12 and 55-10, respectively (American Association of Cereal Chemists, 1990).

For the β -glucan analysis an enzymic method, Megazyme β -glucan and Glucose Assay Kits were used (Megazyme International, Ireland Ltd.). β -Glucan contents were assessed using the McCleary Enzymic Method for barley (McCleary and Codd, 1991). The principle of the method is depolymerization of β -glucan with endo-(1,3)-(1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase (lichenase) to oligosaccharides,

hydrolysis of the oligosaccharides to glucose with purified β -D-glucosidase and determination of glucose using a glucose oxidase-peroxidase method. Total dietary fibre (TDF) contents and fractions of barley samples were determined by using AACC Standard Method No. 32-07 (AACC, 1990). Duplicate samples of milled barleys were applied to sequential enzymatic digestion by using heat stable α -amylase (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark), amyloglucosidase and protease (Sigma, St. Louis, MO, USA) to remove starch and protein. For TDF, enzyme digestate was treated with ethyl alcohol to precipitate soluble dietary fibre (SDF) before filtering, and the TDF residue was washed with ethyl alcohol and acetone, and then dried and weighed. TDF residue values were corrected for protein, ash and blank. The content of soluble dietary fibre (SDF) was determined by observing the difference between TDF and IDF (insoluble dietary fibre).

2.3 Statistical analysis

The data were statistically evaluated by the one-way analysis of variance procedure using the System for Analysis and Separation Averages in Agricultural Experiment (SASM-Agri - version 4) and differences between means were located using Scott-Knott's test (Canteri et al., 2001). When significant differences were found, the Least Significant Difference (LSD) test was used to determine the differences among mean values.

3 Results and discussion

Regarding climate parameters (temperature compensated, which was measured at 12 a.m.; rainfall and insolation) was used average value observed during the planting and harvesting of barley in each municipality (National Institute of Meteorology, 2012), and compared with values obtained from total dietary fibre and fractions. The results of β -glucan, total dietary fibre (TDF) contents and fractions of the whole barley grains grown in Passo Fundo (PF) and Victor Graeff (VG) are presented in Tables 1 and 2.

Barley grain is notable for a high content of β -glucans that can range from 2.5% to 11.3%. The level of β -glucans in oats (2.2–7.8%), rye (1.2–2.0%), and wheat (0.4–1.4%) may also vary substantially, but it is generally lower than in barley (Izydorczyk and Dexter, 2008; Andersson et al., 2004).

According to Izydorczyk and Dexter (2008) and Andersson et al. (2004), the content of β -glucans in barley is influenced both by genetic and environmental factors and by their interaction. With respect to environmental factors, in our study we observed that in PF the average of β -glucan content was higher in 2008 with a higher mean air temperature (Figure 1) and intense sunlight when compared to 2009 (Figure 2). As reported by Ehrenbergerová et al. (2008), higher temperatures during grain filling can provide increased β -glucans content in barley grains. In Victor Graeff the same behavior was observed among cultivars regarding the mean temperature air (Figure 3). Insolation data was not available for this region and therefore it was not possible to correlate this result with the percentage of β -glucans.

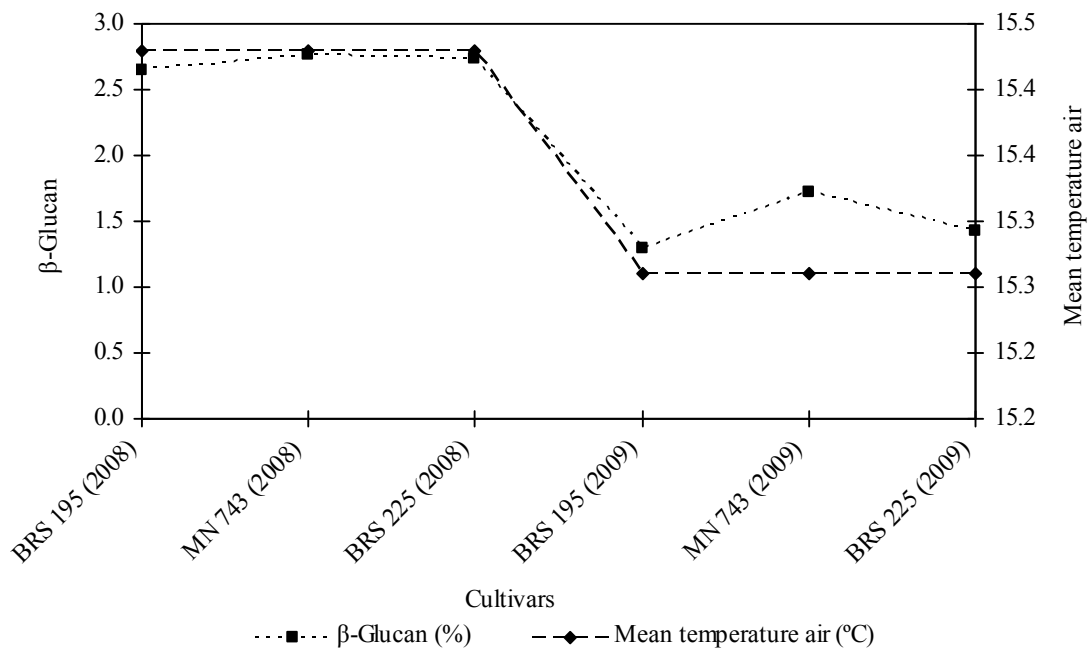


Figure 1. Relation between β -glucan content (%) and mean temperature (°C) in Passo Fundo.

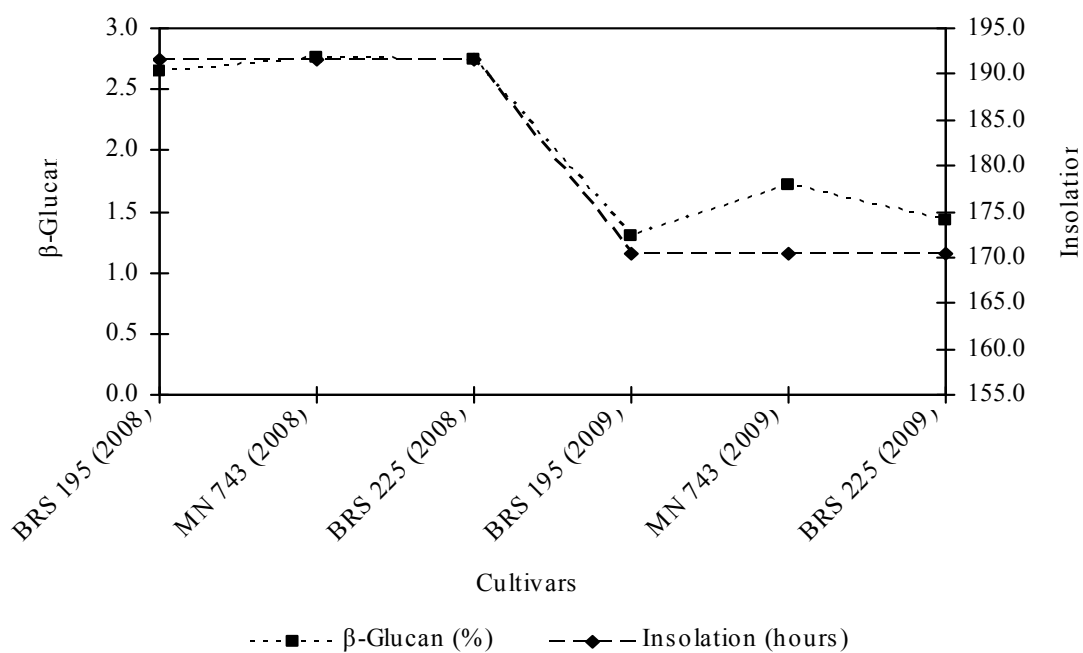


Figure 2. Relation between β -glucan content (%) and insolation (hours) in Passo Fundo.

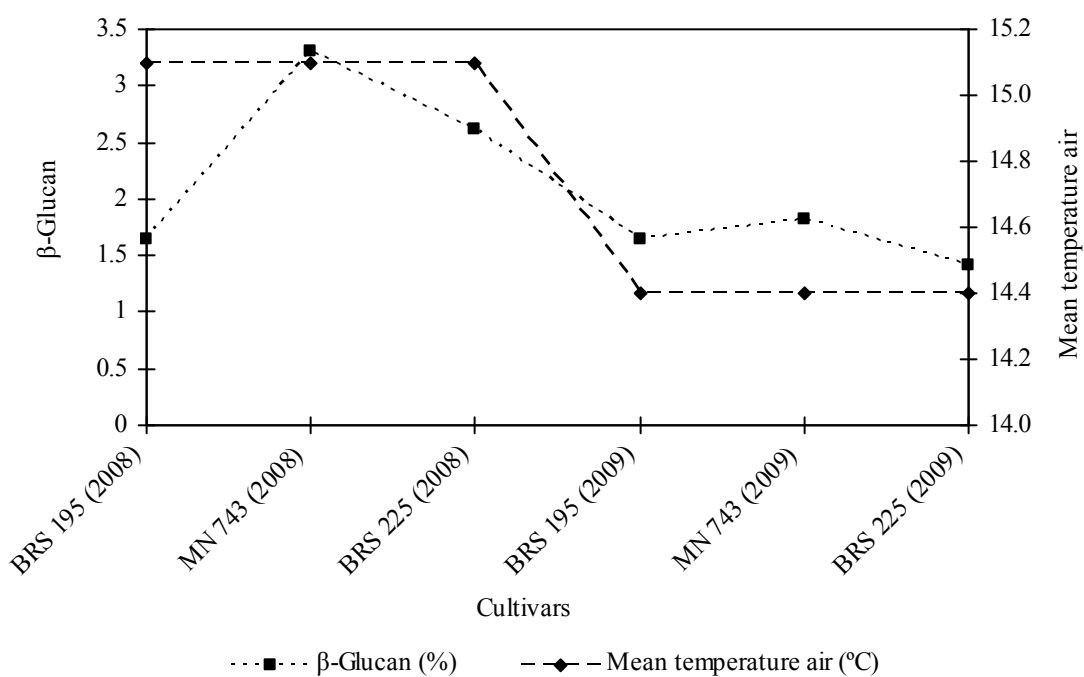


Figure 3. Relation between β -glucan content (%) and mean temperature (°C) in Victor Graeff.

With respect to rainfall, it was observed that this environmental factor

influenced negatively β -glucan content, as shown in Figures 4 and 5 in Passo Fundo and Victor Graeff, with the exception only of BRS 195 (2009) in VG which had increase results on this parameter. These results corroborates with the findings by Aastrup (1979) who suggested that rain degrades β -glucans, lower synthesis of β -glucans, modifies of the β -glucans to give polymers inaccessible to the β -glucanase and leads to leaching of the glucose, a precursor of β -glucans, from the flag leaf and awns.

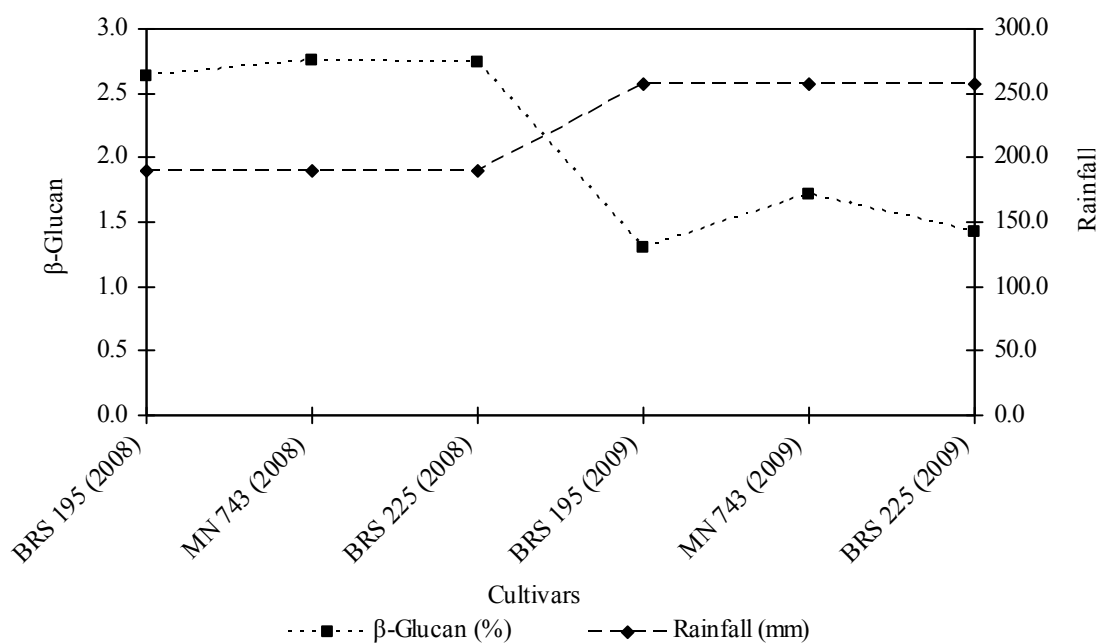


Figure 4. Relation between β -glucan content and Rainfall (mm) in Passo Fundo.

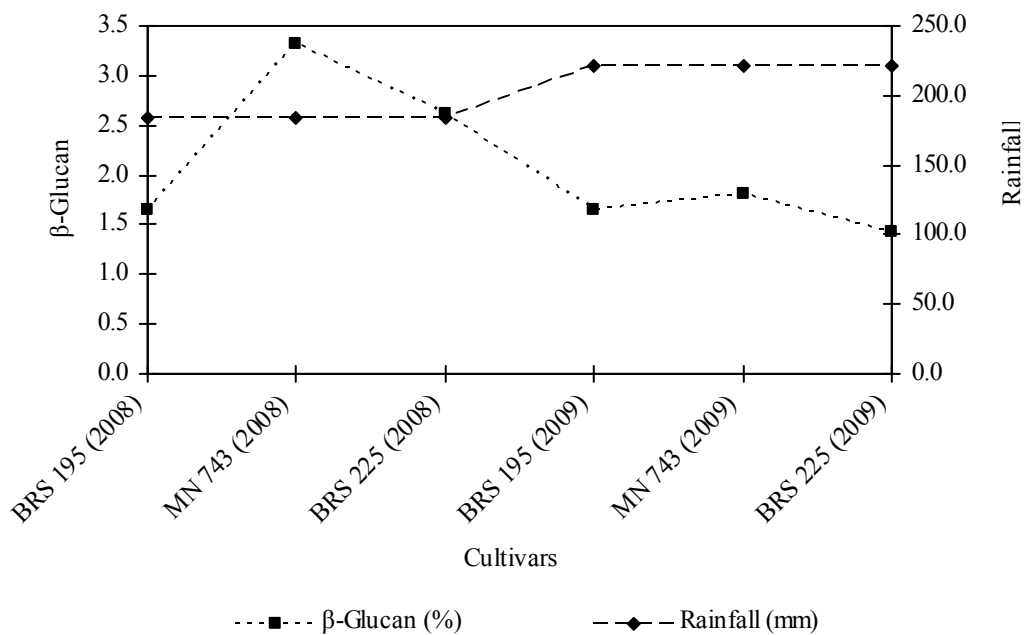


Figure 5. Relation between β -glucan content (%) and rainfall (mm) in Victor Graeff.

Regarding the content of soluble dietary fibre (SDF) in VG the highest value was found for cultivar BRS 195 in crop year 2008 and 2009, and the lowest value in samples BRS 225 (2009) and MN 743 (2008) ($p < 0.05$, Table 2). In PF, the highest SDF content was detected in cultivar BRS 195 (2008) and the lowest was detected in cultivars BRS 225 (2009) and BRS 195 (2009) ($p < 0.05$, Table 1).

The content of soluble fibre in PF, showed a relationship with the content of β -glucans, and it was observed an increase in its content in the crop of 2008, which showed higher mean temperature and insolation during the planting and harvesting of grain and lower rainfall. In VG it was observed the same characteristic.

Differences in TDF values detected only in PF, with the highest value in cultivars, MN 743 (2009), BRS 225 (2009) and BRS 225 (2008), while the barley lines BRS 195 (2009), BRS 195 (2008) and MN 743 (2008) had the lowest TDF value (Table 1). In VG, no statistically significant difference was observed among the cultivars analyzed.

The insoluble dietary fibre (IDF) content was observed in VG values statistically higher in MN 743 PF, crop year 2008 and BRS 225 VG, crop year 2009

between the cultivars studied (Table 2), and in PF with the highest value in cultivars MN 743 (2009), BRS 225 (2009) and BRS 225 (2008) (Table 1). The same cultivars from PF also showed a higher content of TDF statistically significant. The content of TDF maintained relationship with the content of insoluble dietary fibre (IDF), and an increase in its content in the crop of 2009, which showed higher rainfall and lower insolation during the planting and harvesting of grains.

4. Conclusions

In the present study, β -glucan and TDF analyses of various advanced Brazilian whole barley grains grown in two locations indicated that both environment and genetic factors have influence on the content of these.

The study also revealed the information on β -glucans and TDF contents and other quality characteristics of barley grains grown in Brazil and showed how climatic factors can positively or negatively interfere in the content of total dietary fibre and β -glucans, interfering in the final quality of the barley grain. Substantial variation was demonstrated in the contents of fibre components of barley cultivars grown in different years on the same site.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support in the implementation of this research to Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA/Trigo, Rio Grande do Sul), Company Megazyme International Ireland Ltda, CAPES.

Table 1. β -Glucan and total dietary fibre contents of barley samples grown in different crop years.

Location	Passo Fundo			
	β -Glucan (%) ^A	Total dietary fibre (%) ^A	Soluble fibre (%) ^A	Insoluble fibre (%) ^A
2008				
BRS 195	2.64 ^a	24.91 ^b	7.03 ^a	17.87 ^b
BRS 225	2.74 ^a	27.42 ^a	4.82 ^c	22.60 ^a
MN 743	2.76 ^a	25.47 ^b	5.83 ^b	19.64 ^b
Mean value	2.71	25.93	5.89	20.04
Std. dev.	0.06	1.32	1.11	2.39
2009				
BRS 195	1.30 ^b	22.72 ^b	4.25 ^d	18.47 ^b
BRS 225	1.43 ^b	26.37 ^a	3.73 ^d	22.64 ^a
MN 743	1.72 ^b	28.85 ^a	5.73 ^b	23.12 ^a
Mean value	1.48	25.98	4.57	21.41
Std. dev.	0.22	3.08	1.04	2.56

Means values with the same letter within a column are not significantly different by least significant differences (LSD) analysis.

^A Dry weight basis.

Table 2. β -Glucan and total dietary fibre contents of barley samples grown in different crop years.

Location	Victor Graeff			
	β -Glucan (%) ^A	Total dietary fibre (%) ^A	Soluble fibre (%) ^A	Insoluble fibre (%) ^A
2008				
BRS 195	1.65 ^d	24.05 ^a	7.13 ^a	16.92 ^b
BRS 225	2.61 ^b	23.70 ^a	6.36 ^b	17.34 ^b
MN 743	3.31 ^a	25.52 ^a	4.05 ^d	21.47 ^a
Mean value	2.52	24.42	5.85	18.58
Std. dev.	0.83	0.97	1.60	2.51
2009				
BRS 195	1.64 ^d	25.13 ^a	7.50 ^a	17.64 ^b
BRS 225	1.42 ^e	25.63 ^a	4.54 ^d	21.10 ^a
MN 743	1.82 ^c	22.68 ^a	5.34 ^c	17.33 ^b
Mean value	1.63	24.48	5.79	18.69
Std. dev.	0.20	1.58	1.53	2.09

Means values with the same letter within a column are not significantly different by least significant differences (LSD) analysis.

^A Dry weight basis.

References

- Aman, P., & Newman, C. W., 1986. Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, USA. *Journal of Cereal Science* 4, 133–141.
- American Association of Cereal Chemists, 1990. *Approved Methods of the AACCC*, eighth ed., Methods 32-07, 44-01, 46-12 and 55-10. St. Paul, MN, USA.
- Andersson, A. M.; Armö, E.; Grangeon, E.; Fredriksson, H.; Andersson, R.; Åman, P., 2004. Molecular weight and structure units of (1→3) (1→4) – β -D glucans in dough and bread made from hull-less barley fractions. *Journal of Cereal Science* 40 (3), 194–204.
- Aastrup, S., 1979. The effect of rain on β -glucan content in barley grains. *Carlsberg Research Communications* 44, 381-393.
- Baik, B. K., & Ullrich, S. E., 2008. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48, 233-242.
- Behall, K. M., Scholfield, D. J., Hallfrisch, J., 2004. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1185–1193.
- Canteri, M. G., Althaus, R. A., Virgens Filho, J. S., Giglioti, E. A., Godoy, C. V., 2001. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação* 1 (2), 18-24.
- Cavallero, A., Empilli, S., Brighenti, F., Stanca, A. M., 2002. High (1→3, 1→4)- β -glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. *Journal of Cereal Science* 36, 59–66.
- Ehrenbergerová, J.; Belcredi, N. B.; Psota, V.; Hrstková, P.; Cerkal, R.; Newman, C. W., 2008. Changes caused by genotype and environmental conditions in beta-glucan content of spring barley for dietetically beneficial human nutrition. *Plant foods for human nutrition* 63 (3), 111-117.
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Agrometeorologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=agrometeorologia/boletinsAgroclimatologicos>>. Acesso em: 02 nov. 2012.
- Izydorczyk, M. S., Dexter, J. E., 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Research International* 41, 850-868.
- Jacobs, D. R., Jr., Marquart, L., Slavin, J., Kushi, L. H., 1998. Wholegrain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutrition and Cancer* 30 (2), 85–96.

- Jenkins, D. J., Jenkins, A. L., Wolever, T. M. S., Rao, A. V., Thompson, L. V., 1985. Fiber and starchy foods: gut function and implications in disease. *American Journal of Gastroenterology* 81, 920–930.
- McCleary, B. V., Codd, R., 1991. Measurement of (1→3), (1→4)- β -D-glucan in barley and oats: a streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 55, 303–312.
- McCleary, B. V., Glennie-Holmes, M., 1985. Enzymic quantification of (1→3), (1→4)- β -D-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing* 91, 285–295.
- McIntosh, G. H., Whyte, J., McArthur, R., Nestel, P. J., 1991. Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition* 53 (5), 1205–1209.
- Madhujith, T., Izydorczyk, M. S., Shahidi, F., 2006. Antioxidant properties of pearled barley fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (9), 3283–3289.
- Önning, G., 2007. Carbohydrates and the risk of cardiovascular disease. In C. G. Biliaderis & M. S. Izydorczyk (Eds.), *Functional food carbohydrates*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 291–319.
- Slavin, J., Marquart, L., Jacobs, D., 2000. Consumption of whole-grain foods and decreased risk of cancer: proposed mechanisms. *Cereal Foods World* 45 (1), 54–58.
- Slavin, J., 2007. Dietary carbohydrates and risk of cancer. In C. G. Biliaderis & M. S. Izydorczyk (Eds.), *Functional food carbohydrates*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 371–385.
- Yalçın, E., Celik, S., Akar, T., Sayim, I., Köksel, H., 2007. Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. *Food Chemistry* 101, 171–176.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ Os resultados mostraram que existe uma grande variabilidade com relação aos teores de compostos bioativos (fibra alimentar total e frações, β -glicanas, minerais, selênio e compostos fenólicos) entre as cultivares avaliadas.

✓ O extrato seco elaborado apresentou um elevado conteúdo de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu na forma de extrato aquoso em relação ao extrato de cevada padrão e um aumento constante da atividade antioxidante nesse solvente pelas metodologias de DPPH, superóxido e ANCOMROS, conforme o aumento da concentração. A razão 1:1 (FS:FI), diferencia o mesmo dos produtos com fibras comercialmente disponíveis. A metodologia de produção mostrou-se simples, sem toxicidade e disponível para reprodução comercial.

✓ É viável a inclusão do método de obtenção do extrato seco para alguns subprodutos agrícolas que são excelentes fontes de antioxidantes naturais e/ou compostos funcionais, tendo em vista o baixo custo e redução dos problemas ambientais causados por resíduos agroindustriais. Além disso, o resíduo resultante do processamento do extrato seco pode ser direcionado para a alimentação animal ou como fonte de fibra insolúvel.

✓ Os métodos *in vitro* baseados na geração de diferentes radicais livres, permitiram classificar as cultivares quanto a atividade antirradicalar, porém, frente ao radical superóxido, o extrato etanólico apresentou atividade pro-oxidante.

✓ Não foi observada correlação positiva entre a atividade antioxidante pelas metodologias do radical DPPH e superóxido e a quantificação de fenólicos totais, possivelmente pelo fato da metodologia de Folin-Ciocalteu não se tratar de um método de determinação da atividade antioxidante, mas sim da quantificação do conteúdo de fenólicos ou ainda por estar reagindo com proteínas presentes na amostra. No entanto, foi observado que a metodologia de ANCOMROS foi a técnica que manteve uma correlação mais próxima com a quantificação por HPLC e Folin, ao contrário das anteriores.

✓ Observou-se que os parâmetros climáticos (temperatura média, insolação e precipitação pluvial) podem exercer influência positiva ou negativa na quantificação de FAT, FS e FI e de β -glicanas nas cultivares de cevada. Na safra onde se observou uma maior temperatura média do ar e insolação, houve elevação dos teores de fibra solúvel e β -glicanas nas cultivares, enquanto que, uma maior precipitação pluvial propiciou a redução nesses teores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3b, 5a, 6b-triol-induced toxicity in Chinese hamster ovary cell in vitro. **Nutrition Research**, v. 19, n. 5, p. 749-760, 1999.

AKRAMIENĖ, D. et al. Effects of b-glucans on the immune system. **Medicina**, v. 43, n. 8, p. 597-606, 2007.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade *antioxidante in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115-2123, 2009.

ANATOMIA VEGETAL - Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Disponível em: <<http://www.anatomiavegetal.ib.ufu.br>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

ANDERSON, J. W. et al. Long-term cholesterol-lowering effects of psyllium as an adjunct to diet therapy in the treatment of hypercholesterolemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1433-1438, 2000.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 498-502, 2007.

ARABBI, P. R. Alimentos funcionais - Aspectos gerais. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 21, p. 87-102, 2001.

ARGENTON, A. (2010). Conceitos fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC). Disponível em: <www.crq4.org.br>. Acesso em: 01 out. 2010.

ARTISS, J. D. et al. The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and

selected blood parameters in rats. **Metabolism**, v. 55, n. 2, p. 195-202, 2006.

BEHALL, K. M.; SCHOLFIELD, D. J.; HALLFRISCH, J. Whole-grain diets reduce blood pressure in mildly hypercholesterolemic men and women. **Journal of American Dietetic Association**, v.106, n.9, p.1445-1449, 2006.

BEZERRA, A. S. **Caracterização de compostos antioxidantes em grãos de diferentes cultivares de cevada (*Hordeum vulgare* L.)**. 2009.108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

BOROWSKI, D. Z. **Efeito do genótipo, ambiente e suas interações em características agronômicas e de qualidade em cevada cervejeira no sul do Brasil**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L.; MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds; effects on faecal weight, and protein and fat excretion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 63, n. 1, p. 63-68, 1993.

BRAVO, L.; ABIA, R.; SAURA-CALIXTO, F. Polyphenols dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1481-1487, 1994.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317-33, 1998.

BRENNAN, C. S. Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 6, p. 560–570, 2005.

BROWN, L. et al. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 1, p. 30–42, 1999.

CASTELLUCIO, C. et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants, **Nutrition Reviews**, v. 368, n. 1, p. 188-192, 1995.

CASTELLUCIO, C. et al. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. **The Biochemical Journal**, v. 316, n. 2, p. 691-694, 1996.

CHEN, Y. F.; TSAI, H. Y.; WU, T. S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Medica**, v. 61, n. 1, p. 2-8, 1995.

CHEN J.; SEVIOUR R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.

CHEN J.; RAYMOND, K. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. **Vascular Health Risk Management**, v. 4, n. 6, p. 1265-1272, 2008.

CHIANG, H.C.; LO, Y. J.; LU, F. J. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 8, n. 1, p. 61-71, 1994.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 452p.

CORDAIN, L. Cereal grains: humanity's double-edged sword. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 84, p. 19-73, 1999.

DEW, T. P.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6510-6515, 2005.

DIMBERG, L. H. et al. Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment. I: Phenolic compounds. **Journal of Cereal Science**, v. 24, n. 3, p. 263-272, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Embrapa Trigo. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/cevada/index.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

ESMAILZADEH, A.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Whole-grain consumption and the metabolic syndrome: a favorable association in Tehranian adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 353-362, 2005.

ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2012.

FOOD-INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê: fibras alimentares**, n. 3 - maio/junho, 2008. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 01 out. 2009.

FOOD-INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê: antioxidantes**, n. 6 - dezembro 2008/janeiro, 2009. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 01 out. 2009.

FUJITA, A. H.; FIGUEROA, M. O. R. Composição centesimal e teor de β -glicanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 116-120, 2003.

FUJITA, A. et al. Ferulic acid prevents pathological and functional abnormalities of the kidney in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2008.

FUKE, G. **Uso de grãos de cevada: caracterização bromatológica de cultivares e resposta biológica de ratos em crescimento**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

GOTOH, N.; NIKI, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1115, n. 3, p. 201-207, 1992.

GRAMENE. Disponível em: <http://www.gramene.org/species/hordeum/barley_intro.html>. Acesso em: 14 ago. 2012.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

HALL III, C. A.; CUPPETT, S. L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L. (Editors) **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. Illinois: AOCS PRESS, p.141-172, 1997.

HALLFRISCH, J.; BEHALL, K. M. Physiological responses of men and women to

barley and oat extracts (nu-trimX). I. Breath hydrogen, methane, and gastrointestinal symptoms. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 76-79, 2003.

HILGEMANN, M.; et al. Electrochemical Assay to Quantify the Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Medicinal Plant Extracts. **Electroanalysis**, v. 22, n. 4, p. 406-412, 2010.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/markets/life-science/protein-sciences/proteomics/lp-80196.html>>. Acesso em: 01 nov. 2012.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolics compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.10, p.395-462, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. **International Journal of Food Science & Technology**, vol.36, p. 703-725, 2001.

KHOURY, D. E. L. et al. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, Article ID 851362, 28 pages, 2012. doi:10.1155/2012/851362

KIAN, C. O.; HOON-ENG, K. Biological effects of myricetin (Review Article). **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n.2, p. 121-126,1997.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 69-75, 2002.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E. de A.; LIMA, D. E. da S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

LIU, S. et al. Is intake of breakfast cereals related to total and cause-specific mortality in men? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 3, p. 594-599, 2003.

LONGHINI, R. **Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas**. 2006. 173 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LUCERI, C. et al. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. **The British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 458-463, 2007.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11ª ed. São Paulo: Roca, 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Revisión: Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; PROVAN, G. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 323-330, 2002.

MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hamamelitannin as a new potent active oxygen scavenger. **Phytochemistry**, v. 37, n. 2, p. 337-343, 1994.

MAYER, E. T. et al. Caracterização nutricional de grãos integrais e descascados de cultivares de cevada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1635-1640, 2007.

MCKEOWN, N. M. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the framingham off spring cohort. **Diabetes Care**, v. 27, n. 2, p. 538-546, 2004.

MOREIRA, A. V.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOREL, I. et al. Involvement of phenoxyl radical intermediates in lipid anti-oxidant action of myricetin in iron-treated rat hepatocyte culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 9, p. 1399-1404, 1998.

NAGAO, T. et al. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p.122–9, 2005.

NAKAYAMA, T. Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. **Cancer Research**, v. 54, n. 7, p. 1991-1993, 1994.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, n. 5, p. 541-552, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Recommended Dietary Allowances: 10th Edition*. Washington, DC: The National Academies Press, 1989.

NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669-4674, 2004.

OLIVEIRA, T. T. et al. Flavonóides e aterosclerose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 49-54, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. **Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos**. 2007. 244 f. Tesis (Doctoral) - Universidad Autónoma de Madrid, 2007.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**: Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

QI, L. et al. Whole-grain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 2, p. 207–211, 2006.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 6, n. 3, p. 315-320, 2003.

RUSSOA, R. O.; SÁNCHEZ, M. S. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. **Revista Costarricense de Cardiología**, v. 8, n. 1, p. 13-18, 2006.

SAHYOUN, N. R. et al. Whole-grain intake is inversely associated with the metabolic syndrome and mortality in older adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 1, p. 124–131, 2006.

SALAMEH, D. et al. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Analytical Methods**. Disponível em: <http://oatao.univ-toulouse.fr/1596/1/Salameh_1596.pdf>. Acesso em: 31 out. 2012.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, n. 2, p. 270-276, 1998.

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

SLAVIN, J. L. Dietary fiber and body weight. **Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 411-418, 2005.

SUZUKI, A. et al. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v. 15, n. 4, p. 351-357, 2002.

SVILAAS, A. et al. Intakes of antioxidants in coffee, and vegetables are correlated with plasma carotenoid in humans. **Journal of Nutrition**, v. 3, n. 134, p. 562-567, 2004.

THE BARLEY GRAIN. Disponível em: <<http://www.crc.dk/flab/the.htm>>. Acesso em: 10 out. 2012.

TIJBURG, L. B. M. et al. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 771-785, 1997.

UCHIDA, M. et al. Antioxidative effect of sesamol and related compounds on lipid peroxidation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 623-626, 1996.

UNIVERSITY COLLEGE LONDON (2010). Disponível em:

<http://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/mass_spectrometry/metabolomics/hplc>. Acesso em: 01 nov. 2012.

VELIOGLU, Y. S. et al.. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n. 10, p.4113-4117. 1998.

VICENZO, R. (2007). Tópicos avançados em alimentos II – Bebidas. Disponível em:<http://www.sinpro-rs.org.br/paginasPessoais/layout2/%5Carquivos%5CProf_394%5CAPOSTILA%20TECNOLOGIA%20DE%20ALIMENTOS_NUTRI%3%87AO.pdf>. Acesso em: 26 set. 2012.

WU, L. C. et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Red Pitaya. **Food Chemistry**. v. 95, n. 2, p. 319-327, 2005.

XUE, Q. et al. Influence of the hullness, waxy starch and short-awn genes on the composition of barleys. **Journal of Cereal Science**, v. 26, n. 2, p. 2251-2257, 1997.

YALÇIN, E. et al. Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barley grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p.171-176, 2007.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n.1, p. 381-406, 2001.

ZHAO, H., et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, v. 19, p. 7277-7286, 2006.

ZIMMERMANN, A. **Potencial antioxidante de extrato de cevada em ratos submetidos à dieta hiperlipídica**. 2010. 71 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

5 ANEXOS

-ANEXO 1-

TERMO DE DEPÓSITO DA PATENTE E DOCUMENTOS NIT

Depósito de Pedido de Patente

< Use o formulário do INPI >



00022103841970



DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 Desejando ser o(a) e concedido de um privilégio de natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

11 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 12 Qualificação: INSTITUTO FÍSICA DE SÃO CARLOS
 13 CNPJ/CPF: 04.541.762/0001-05
 14 Endereço completo: Av. René Freire, 1000 - CIDADE UNIVERSITÁRIA - Prof. Nogueira da Rocha
 15 CEP: 13506-900 16 Telefone: 5032208887 17 Fax:
 18 E-mail: fca@fca.usp.br continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição
 Escreva, obrigatoriamente, com relação a Natureza escolhida: INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(34):
 PROCESSO COMPUTACIONAL EM COMPUTADOR ELETIVOS A BASE DE CERQUEJAS, S. 25. 363
 PROCESSO DE PROTEÇÃO continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido nº _____ (letra de abertura: _____)

5. Prioridade: nacional estrangeira
 O depósito de referência é(á) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):
 Assina igual ao(a) mesmo(a) inventor(a) não divulgação de dados pessoais

61 Nome: CARLOS JOSUEBERGOS
 62 Qualificação: Professor adjunto Titular em Física 63 CPF: 242521020/68
 64 Endereço completo: Rua S. 132 BARROCO, CIDADE UNIVERSITÁRIA
 65 CEP: 13511-000 66 Telefone: (50) 32262157 67 Fax:
 68 E-mail: g1membr@fca.usp.br continua em folha anexa

INPI Formulário 1/01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

INPI - 25/04/2011 10:51:33
 No. INPI - 22.12.2011
 14

CAMPO 6 (continuação dos dados dos inventores)

1 - NOME: ALINE SOBREIRA BEZERRA **CPF:** 068.660.837-29

QUALIFICAÇÃO: aluna doutorado

ENDEREÇO: Rua Engenheiro Rogério Tochetto, 435

BAIRRO: Nossa Senhora de Lourdes **CPF:** 97060-250 **CIDADE:** SANTA MARIA/RS

TELEFONES(S): (55) 3221 2222 (55) 8411-7694

E-MAIL: alinecelo@hotmail.com

2 - NOME: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO **CPF:** 741.724.500-59

QUALIFICAÇÃO: Professor Universitário

ENDEREÇO: Cel. Anibal Garcia Barão **BAIRRO:** Nossa Senhora de Lourdes

CIDADE: SANTA MARIA/RS

CEP: 97050-140 **TELEFONES(S):** comercial 3220 8870

E-MAIL: lemcarvalho@gmail.com

3 - NOME: MARCELO BARCELLOS DA ROSA **CPF:** 120.686.618-70

QUALIFICAÇÃO: Professor Universitário

ENDEREÇO: TRAV. MENDES NUNES, 77 **BAIRRO:** Bom Fim **CEP:** 97.010.340

CIDADE: SANTA MARIA/RS

TELEFONES(S): comercial 3220 8448 3220 8870

E-MAIL: marcelabdsrosa@gmail.com

4 - NOME: SIMONI DA ROS **CPF:** 018.477.130-76

QUALIFICAÇÃO: ALUNA GRADUAÇÃO

ENDEREÇO: TRAV. MENDES NUNES, 77 **BAIRRO:** Bom Fim **CEP:** 97.010.340

CIDADE: SANTA MARIA/RS

TELEFONES(S): comercial 3220 8448 3220 8870

E-MAIL: simoniacros@yahoo.com.br

Formulários NIT



Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria
Gabinete do Reitor
Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia



FASE 1 – DESCRIÇÃO DO INVENTO E AVALIAÇÃO DA ANTERIORIDADE

Inventores			
Nome(s)	Unidade(s)	E-mail(s)	Possui vínculo empregatício com a UFSM? (sim ou não)
Nome e e-mail da pessoa que submeteu a tecnologia ao NIT/UFSM (responsável):			
Data de entrega no NIT: ____ de ____ de 2010			
Campos a ser preenchido exclusivamente pelo NIT/UFSM			
Codigo:			
Número do Processo:			



Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria
Gabinete do Reitor
Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia



Para informações sobre o submissão de tecnologias ao NIT/UFSM, por favor, digite no site www.nit.ufsm.br

Todos os campos devem ser preenchidos.

Número de inscrição do etapas FASE 1: Insula FASE1, submissão de tecnologia patentável e não-patentável, CODA, 2010/2010.

As inscrições são FUNDADAS ao NIT/UFSM através do link eletrônico nit.ufsm.br ou mediante inscrição com o presente formulário, desde que todas as informações fôrsem devidamente preenchidas e os documentos são enviados, assim como todas as informações e apêndices.

1 - INVENTO		
1.1 Área de Invenção:	<input type="checkbox"/> Física	<input type="checkbox"/> Medicina
	<input type="checkbox"/> Engenharia	<input type="checkbox"/> Biologia
	<input type="checkbox"/> Química	<input type="checkbox"/> Farmácia
1.2 Linha(s) de pesquisa do(s) inventor (s):		
1.3 Venen(s) tecnológica(s): <input type="checkbox"/> Biotecnologia <input type="checkbox"/> Nanotecnologia <input type="checkbox"/> Nenhuma das anteriores		
1.4 Título Proposto para a Invenção:		
1.5 - Descreva DETALHADAMENTE o invento, incluir materiais e métodos, exemplos de concepção de tecnologia, incluir patentes (se não é patente), abstrato, frase geral e descrição, detalhada(s) para a sua compreensão (em português). Se você tem outros documentos relacionados relacionados à invenção, favor anexar.		
1.6 - De forma geral, qual é o PROBLEMA, resolvido pelo invento (em português)?		
1.7 - Qual a principal APLICAÇÃO da tecnologia? Liste eventuais produtos, mas sempre que a finalidade da presente invenção?		



Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria
Gabinete do Reitor
Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia



2 - BUSCA DE ANTERIORIDADE
Como pré-requisito para a submissão de uma invenção para o NIT/UFSM, o proponente deve realizar a busca de anterioridade, envolvendo o(s) inventor(es), seus, titulares de empresas que qualquer outro tipo de publicação e patentes. Faça todas as combinações possíveis de palavras-chaves. Utilize-se de outras palavras-chaves que melhor represente o DIFERENCIAL de sua tecnologia. A busca de patentes deverá ser realizada no menos nos bancos Derwent, Espiritani e USPTO no site eletrônico do NIT/UFSM, excetuando aquelas com informações de caráter acadêmico, estas bases de dados: http://www.nit.ufsm.br
Caso o proponente não tenha familiaridade com busca de anterioridade em base de dados aberta, uma reunião com os profissionais que atuam no NIT/UFSM através do e-mail eletrônico nit@nit.ufsm.br .
O objetivo principal da busca de anterioridade é o que seja que a tecnologia proposta cumpra os requisitos de PATENTIBILIDADE (novidade absoluta e atividade inventiva). Além disso, a busca propiciará o conhecimento do Estado da Técnica (tecnologias existentes) e, portanto, poderá ser possível apontar o DIFERENCIAL de sua tecnologia. Aponte, ainda, que seja inovadoridade para a criação de um produto de patenteável.
Para maiores informações, visite o site do NIT/UFSM: www.nit.ufsm.br
2.1 - Liste as palavras-chaves que foram empregadas na busca de anterioridade (em português) e/ou em inglês e outros de classificação ou classificações internacionais relativas à tecnologia. São Práticas são outras palavras gerais, genéricas, não são aquelas que estejam relacionadas com as características essenciais de invenção.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Aline Sobreira Bezerra, filha de Roberto Carlos Sobreira e Maria Betânia de Lima Sobreira, nascida em 01 de fevereiro de 1977, no Rio de Janeiro - RJ. Estudou no Colégio Nossa Senhora do Rosário (Rio de Janeiro - RJ) onde concluiu o ensino médio em 1993. Em 1994 ingressou no curso de graduação em Nutrição da Universidade Federal do estado do Rio de Janeiro (UNI-RIO – Rio de Janeiro). Formou-se Nutricionista em julho de 1998. Em 1999 ingressou no curso de Especialização em Nutrição Clínica pela Universidade Federal Fluminense (UFF), tornando-se especialista neste mesmo ano. Em 2003 foi convocada para atuar como nutricionista na Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, mediante aprovação em concurso público. Em 2004 se especializou em Terapia Nutricional Enteral e Parenteral pela Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. Em março de 2007 ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob orientação do Prof. Dr. José Laerte Nörnberg, obtendo o título de mestre em janeiro de 2009. Ainda no ano de 2009, sob orientação do Prof. Dr. José Laerte Nörnberg ingressou no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como bolsista CAPES-Demanda Social. Em 2012 foi selecionada no Programa Especial de Graduação de Formação de Professores para a Educação Profissional. Atualmente é Professora Substituta no Instituto Federal Farroupilha – Campus Júlio de Castilhos, onde atua desde março de 2012 na área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, ministrando disciplinas correlatas aos cursos Técnico em Alimentos Subsequente e Agropecuária Integrado. Foi submetida à banca de defesa de Tese em dezembro de 2012.