

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

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS  
ANTIOXIDANTES EM GRÃOS DE DIFERENTES  
CULTIVARES DE CEVADA (*Hordeum vulgare L.*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aline Sobreira Bezerra**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM  
GRÃOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE CEVADA  
(*Hordeum vulgare L.*)**

por

**Aline Sobreira Bezerra**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa 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  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

**Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Bezerra, Aline Sobreira**

**B574c**

Caracterização de compostos antioxidantes em grãos de diferentes cultivares de cevada (*Hordeum vulgare* L.) / por Aline Sobreira Bezerra ; orientador José Laerte Nörnberg ; co-orient. Leandro Machado de Carvalho, Luisa Helena R. Kecktheuer. - Santa Maria, 2009.

108 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2009.

1. Tecnologia de alimentos 2. Cevada 3. *Hordeum vulgare* L. 4. Compostos polifenólicos 5. Folin-Ciocalteu 6. HPLC I. Nörnberg, Jose Laerte, orient. II. Carvalho, Leandro Machado de, co-orient. III. Hecktheuer, Luisa Helena Rycheki, co-orient. IV. Título

CDU: 664.147

**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 Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM GRÃOS  
DE DIFERENTES CULTIVARES DE CEVADA (*Hordeum vulgare L.*)**

elaborada por  
**Aline Sobreira Bezerra**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Comissão Examinadora:**

---

**José Laerte Nörnberg, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)**

---

**Luisa Helena R. Hecktheuer, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, 29 de janeiro de 2009.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar ao meu lado em todas as horas, amigo fiel e que me garantiu essa vitória renovando a cada dia as minhas forças! Obrigada Senhor!

Ao meu querido marido Marcelo, pela força, companheirismo, ajuda e paciência. Obrigada por ter compreendido e permitido as muitas vezes em que dediquei grande parte do tempo que era seu nessa pesquisa! Eu te amo muito!

Aos meus pequeninos Mariana e Daniel. Mamãe ama muito vocês! Quando vocês crescerem irão compreender todo o esforço da mamãe pela realização deste sonho.

Ao cunhado Nelson Soares pela ajuda com os gráficos.

A todos os meus familiares e amigos que contribuíram muito com orações e palavras de conforto e ânimo! Obrigada a todos!

Ao meu mestre e orientador, Prof. Dr. José Laerte Nörnberg, pela dedicação, paciência e confiança em meu trabalho.

Ao meu mestre e co-orientador, Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela grande ajuda, confiança e estímulo para que esse trabalho acontecesse.

A minha mestre e co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Luisa Helena R. Hecktheuer, pela confiança e ajuda sempre que era necessário.

As grandes amigas da Química Adriana Bergravv, Carine Allebrandt, Fernanda Lima e Larissa Sabo. Vocês são muito especiais e sem vocês esse trabalho não teria acontecido! Obrigada por tudo!

A todos os colegas do curso de pós-graduação em especial a Milena Bagetti, Tiffany Hautrive, Eduardo Brum e a Jaqueline Ritter. Vocês contribuíram muito para o início desse projeto!

Aos professores do curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, por cada aprendizado e ajuda. Seus sábios conhecimentos transmitidos não serão jamais esquecidos. Muito obrigada!

A secretária do curso Lia, ao funcionário Carlos e ao Sr. Luiz Marchiotti, pelos serviços prestados.

À todos minha gratidão e carinho!

**“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel”.**

**(Is 41:10)**

**“E tudo o que pedirdes na oração,crendo, o recebereis”.**

**(Mt 21.22)**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria-RS/Brasil

### **CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM GRÃOS DE DIFERENTES CULTIVARES DE CEVADA (*Hordeum vulgare L.*)**

Autora: Aline Sobreira Bezerra

Orientador: José Laerte Nörnberg

Data e Local: Santa Maria, 29 de Janeiro de 2009.

Os antioxidantes são compostos conhecidos por reagirem com radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio, de forma a inativá-los, prevenindo os danos oxidativos. Muitos estudos têm apontado para o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes como o causador de muitas patologias, e devido à grande importância dada a este tema, existe uma forte demanda de estudos envolvendo a identificação e quantificação dos compostos com atividade antioxidante. O objetivo deste trabalho foi então quantificar e identificar os compostos polifenólicos de grãos integrais de cultivares brasileiras de cevada, cultivadas no município de Ibiaçá/RS, no ano agrícola de 2005 e 2006, provenientes do Centro de Pesquisa da Embrapa/Trigo, Passo Fundo/RS, e avaliar as condições climáticas (temperatura média, índice pluviométrico e insolação) entre a época de plantio e colheita da cevada na quantificação dos fenólicos totais entre as diferentes safras. As amostras foram caracterizadas quimicamente com relação à presença de polifenóis, empregando-se o método de separação baseado no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com detecção UV-VIS a 254nm. Foram identificados os compostos fenólicos rutina, ácido caféico, ácido ferúlico, quercitrina e miricetina, sendo a rutina e o ácido caféico os mais abundantes entre as cultivares. Paralelamente foi realizada uma quantificação dos fenólicos totais pela técnica de Folin-Ciocalteu, visando uma comparação com a técnica cromatográfica. As técnicas mostraram-se satisfatórias para os objetivos de quantificação e identificação na diferenciação das amostras de cevada analisadas. Observou-se a diferenciação química das variedades de cevada com relação aos compostos polifenólicos identificados e quantificados e entre variedades de diferentes anos de cultivo. Na avaliação dos fatores climáticos, foi observado que uma menor temperatura média, um maior índice pluviométrico e uma menor insolação recebida pela cevada entre as épocas de plantio e colheita, refletiram em um aumento dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e na quantificação do flavonóide rutina por HPLC.

**Palavras-chave:** compostos polifenólicos, Folin-Ciocalteu, *Hordeum vulgare L.*, HPLC.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Pos-Graduate Course of Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANTS COMPOUNDS IN GRAINS OF DIFFERENT BARLEY CULTIVARS (*Hordeum vulgare L.*)

Author: Aline Sobreira Bezerra  
Adviser: José Laerte Nörnberg  
Date and Place: Santa Maria, January, 29, 2009.

Antioxidants are compounds known as free radicals react with and/or reactive oxygen species in order to idle them, preventing the oxidative damage. Many studies have pointed to the imbalance between oxidants and antioxidants as the cause of many diseases and because of the great importance given to this issue, there is a strong demand for studies involving the identification and quantification of compounds with antioxidant activity. This work was then identify and quantify the polyphenolic compounds full of grains of Brazilian cultivars of barley, grown in the municipality of Ibiaçá/RS, in the agricultural year of 2005 and 2006, from the Research Center of Embrapa/Wheat, Passo Fundo/RS and assess the weather conditions (average temperature, precipitation index and insolation) between the time of planting and harvesting barley in the quantification of phenolic compounds between the different seasons. The samples were characterized chemically related to the presence of polyphenols, using the method of separation based on the system of high performance liquid chromatography in reversed phase (RP-HPLC) with UV-VIS detection to 254 nm. We identified the phenolic compounds rutin, caffeic acid, ferulic acid, quercitrin and myricetin, with rutin and caffeic acid the most abundant among cultivars. Alongside was a quantification of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu technique of aiming at a comparison with the chromatographic technique. The techniques have proved satisfactory for the purposes of identification and quantification of differentiation in barley samples analyzed. There was a chemical differentiation of the varieties of barley in relation to polyphenolic compounds identified and quantified and between varieties of different years of cultivation. In the assessment of climatic factors, it was observed that a lower average temperature, a higher rainfall and less sunshine received by barley between planting and harvest seasons, reflected in an increase of total phenols using the Folin-Ciocalteu and quantification of HPLC flavonoid rutin.

**Key words:** polyphenolic compounds, Folin-Ciocalteu, *Hordeum vulgare L.*, HPLC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1-</b> Estrutura do grão de cevada .....	16
<b>FIGURA 2-</b> Estrutura básica e tipo de flavonóides .....	20
<b>FIGURA 3-</b> Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol .....	21
<b>FIGURA 4-</b> Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos .....	22
<b>FIGURA 5-</b> Estrutura química da rutina .....	27
<b>FIGURA 6-</b> Estrutura química do ácido caféico .....	28
<b>FIGURA 7-</b> Estrutura química do ácido ferúlico .....	29
<b>FIGURA 8-</b> Estrutura química da miricetina .....	30
<b>FIGURA 9-</b> Estrutura química da quercitrina .....	31

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO 1</b> – Manual de publicação da Revista Química Nova.....	89
<b>ANEXO 2</b> – Manual de publicação do Journal of Chromatography Science.....	96
<b>ANEXO 3</b> – Manual de publicação da Revista Ciência Rural.....	102

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1 Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)</b> .....	14
2.1.1 Origem da cevada.....	14
2.1.2 Produção e consumo.....	14
2.1.3 Composição química e anatomia do grão.....	15
<b>2.2 Estrutura química dos compostos fenólicos e efeitos desempenhados</b> .....	17
<b>2.3 Classificação dos compostos fenólicos</b> .....	18
2.3.1 Flavonóides.....	18
2.3.2 Taninos.....	20
2.3.3 Ácidos fenólicos.....	21
<b>2.4 Radicais livres e estresse oxidativo</b> .....	23
<b>2.5 Compostos fenólicos em cevada</b> .....	25
2.5.1 Rutina.....	26
2.5.2 Ácido Caféico.....	27
2.5.3 Ácido Ferúlico.....	28
2.5.4 Miricetina.....	29
2.5.5 Quercitrina.....	30
<b>2.6. Métodos analíticos utilizados para a determinação de compostos fenólicos</b> .....	31
2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	31
2.6.2 Método de Folin-Ciocalteu.....	32
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	34
ARTIGO 1.....	35
ARTIGO 2.....	48
ARTIGO 3.....	60
<b>4 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	76
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa por produtos naturais que apresentem propriedades antioxidantes, associadas às propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, vem sendo investigada mais atentamente nos últimos 15 anos. Esse fato não se restringe à área alimentícia sob o ponto de vista tecnológico, mas também na procura por alimentos com elevado potencial antioxidante.

A investigação e comprovação desta propriedade de forma efetiva conferem a estes produtos o título de “alimento funcional”, podendo exercer seu poder sobre diversos constituintes biológicos. Na saúde humana, o aumento no consumo desses compostos fenólicos tem sido correlacionado com a redução do risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (BONOLI et al., 2004).

Na indústria de alimentos a aplicação dos mesmos é extremamente importante na proteção de seus constituintes, principalmente de óleos e gorduras, de modo a se evitar sabores e odores indesejáveis, mantendo de maneira efetiva a palatabilidade, aceitabilidade e o valor nutricional dos produtos alimentícios, retardando a deterioração, rancidez e descoloração decorrente da auto-oxidação (POURCHET-CAMPOS, 1990).

Atualmente, alguns estudos têm identificado potentes antioxidantes em grãos de cereais (HERNÁNDES-BORGES et al., 2005) e algumas formas já foram encontradas em grãos de cevada (SHAHIDI; NACZK, 1995), em parte com estrutura fenólica, enfatizando o papel antioxidante da mesma.

Sendo assim, muitos compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes, e muitos estudos têm sido realizados na determinação de sua ação antioxidante (MANCINI-FILHO et al., 1998).

Os principais compostos fenólicos presentes nos cereais são os flavonóides e os ácidos fenólicos. O conteúdo de polifenóis em cereais é menor que 1% da matéria seca, exceto para a variedade de sorgo (*Sorghum bicolor*) que alcançam conteúdos superiores a 10%. A farinha de arroz contém 85,6 mg de ácidos fenólicos/100g do produto, sendo este conteúdo similar ao contido nas farinhas de trigo e aveia, respectivamente. Tanto na farinha de trigo como na de aveia, destaca-se o

ácido ferúlico como o principal componente fenólico (RAMÍREZ, 2005). Na farinha de cevada, o conteúdo de ácidos fenólicos tem alcançado valores de 60,4-134,6 mg/100g (HOLTEKJØLEN; KINITZ; KNUTSEN, 2006) e de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu de 75-156,0 mg/100g do produto (BEZERRA et al., 2008).

Informações a respeito do estudo da caracterização química de compostos antioxidantes entre cultivares Brasileiras de cevada são escassos e de grande importância em virtude do uso em larga escala desse grão pela indústria alimentícia.

Dessa forma, os objetivos desta pesquisa foram caracterizar diferentes cultivares de cevada por meio da identificação e quantificação dos compostos polifenólicos bioativos presentes com características antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e pelo método de Folin-Ciocalteu, a fim de se quantificar os fenóis totais nas amostras, visando à comparação com o conteúdo de polifenólicos quantificados por HPLC. Os fatores climáticos: insolação, índice pluviométrico e temperatura média foram considerados para se verificar diferenças quantitativas de polifenólicos entre grãos de diferentes anos de cultivo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cevada (*Hordeum vulgare* L.)**

#### **2.1.1 Origem da cevada**

Fragmentos de grãos de cevada datam de aproximadamente 7.900 AC, foram encontrados no Irã. No entanto, em 1979, um artigo publicado localizou suas origens em torno de 10.000 anos antes dessa data (KENDALL, 1994).

Relatos bíblicos mostram que a cevada era o cereal mais cultivado naquele período, sendo o principal alimento dos pobres, devido ao valor comercial menor do que o do trigo. A importância da cevada como alimento começou a declinar no século XVI, quando os fazendeiros do Oriente Médio começaram a cultivar mais o trigo como alimento, devido às melhores variedades que se tornaram disponíveis (MUCHERONI, 2006).

Foi então um dos cereais mais precocemente familiarizados, e seu uso como alimento para pessoas e animais foi na China e Europa em torno de 2.800 AC Atualmente a Rússia é seu maior produtor seguido pela França, Canadá e Reino Unido (STEPHEN; EISENDRATH, 1986).

#### **2.1.2 Produção e consumo**

A cevada é uma gramínea cerealífera típica de clima frio, pertencente à família Gramineae, subfamília Festucoideae, da tribo Triticeae e gênero *Hordeum* (KENDALL, 1994). Representa o cultivo de mais ampla distribuição, sendo adaptada a várias condições de crescimento e cultivada em todo o mundo (SIMONI; MENA, 2006).

Cultura milenar e muito difundida no passado, classificada hoje em dia como o quarto cereal mais cultivado no mundo, a cevada é basicamente utilizada pela indústria cervejeira e na alimentação animal, e tem sido muito consumida em países como Rússia, Canadá, Estados Unidos da América e outros países como um “alimento funcional”, rico em fibra alimentar, constituído principalmente por fibra solúvel, da qual as  $\beta$ -glucanas são os constituintes principais, estando associadas à redução do risco de doenças cardíacas (BINNECK et al., 2002).

No Brasil, o seu cultivo ocupa uma área superior a 120.000 hectares, sendo distribuída nos planaltos do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, em escala comercial desde 1930, mostrando assim, uma significativa importância econômica. A área cultivada nos últimos anos cresceu substancialmente, passando de 57.018 hectares em 1992 para 137.664 em 2000, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor, contribuindo em 1998, com 70,6% da produção, seguido pelo Paraná e Santa Catarina com 27,4% e 2,0%, respectivamente (MINELA, 2006).

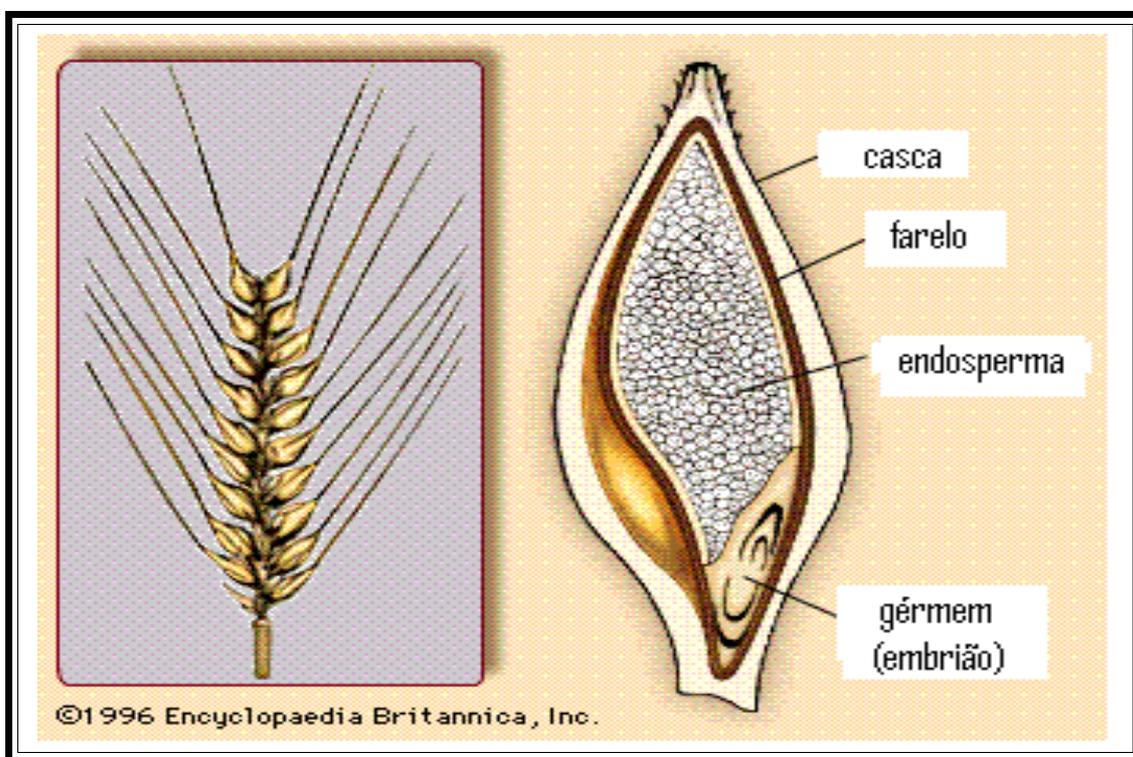
Além disso, é o cereal que melhor se adapta a temperaturas extremas e frequentemente cresce em terras expostas a luz, bem escoadas e porosas e toleram melhor um solo com pH acima de 6,0, pois o baixo pH retarda o crescimento de sua raiz (STEPHEN; EISENDRATH, 1986). O grão pode ser plantado no solo sem arar, por esta razão pode ser cultivado em lotes minúsculos, em áreas inacessíveis aos animais de tração, podendo se desenvolver em áreas demasiadamente secas para o trigo (MUCHERONI, 2006).

### **2.1.3 Composição química e anatomia do grão**

O grão de cevada (figura 1) é constituído por casca, farelo, endosperma e embrião. A casca é formada pela palha, que é eliminada no beneficiamento e pela membrana externa (farelo), que fica aderida ao grão. 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).

A casca tem a função de proteção, contém fibras, antioxidantes, minerais e vitaminas do complexo B. A cevada difere de outros grãos, pela fibra estar

distribuída em todo o grão e não apenas na camada externa (YALÇIN et al., 2007). Assim, quando a casca, ou a camada externa é removida, apenas parte da fibra é removida (OSCARSSON et al., 1996; XUE et al., 1997). 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). Desta forma, um produto processado a partir da camada externa do grão de cevada, como o farelo, pode ser nutricionalmente atraente com relação aos teores de fibra alimentar e de antioxidantes.



**FIGURA 1-** Estrutura do grão de cevada (fonte: [www.google.com.br/figuras](http://www.google.com.br/figuras)).

Os principais componentes do grão de cevada são: o amido, a proteína e a fibra alimentar, e os componentes minoritários são os lipídeos, minerais e vitaminas. Esses grupos, por sua vez, sofrem variações químicas por fatores genéticos e ambientais (MOLINA-CANO et al., 1995; YALÇIN et al., 2007). Segundo Mayer et al. (2007), grãos integrais e descascados de cultivares de cevada apresentam variações quanto à composição de nutrientes devido à variabilidade genética entre cultivares.

## 2.2 Estrutura química dos compostos fenólicos e efeitos desempenhados

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Baseado em sua estrutura química, os polifenóis podem ser divididos em pelo menos dez diferentes classes, sendo que as principais são os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos e derivados (RAMALHO; JORGE, 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).

Entre suas funcionalidades mais interessantes está à 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 (YANG et al., 2001).

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, anti-microbiana e anti-carcinogênica (ABE, 2007).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos contribui significativamente para a saúde humana (MUÑOZ et al., 2007). Além das propriedades citadas anteriormente, estudos relatam também que os polifenóis, em especial a classe dos flavonóides, exibem atividade antiviral, principalmente contra vírus envelopados, além de agirem melhorando a permeabilidade capilar, podendo auxiliar no tratamento de alguns distúrbios circulatórios.

Os flavonóides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, podendo atuar em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Essa atividade antioxidante é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante do ferro, atividade seqüestrante de radicais livres, inibição de enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase (SIMÕES et al., 2003).

Os flavonóides com grupamentos hidroxila no anel B são eficientes inibidores da glicação do colágeno, uma das vias que podem desencadear processos ateromatosos, por haver liberação de radicais livres devido à oxidação de moléculas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (LIMA; OLIVEIRA; NAGEM, 2003).

Estudos demonstram também que os compostos fenólicos possuem atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência em humanos, herpes simples e poliomielite. Cita-se ainda que, flavonóides podem induzir um aumento do crescimento celular, diminuindo a peroxidação dos lipídeos em níveis de membrana. Além disso, podem também inibir a proliferação celular, sendo úteis na inibição de proliferações tumorais ((LIMA; OLIVEIRA; NAGEM, 2003). Estima-se que o valor médio diário do consumo humano seja em torno de 30 mg/dia de flavonóides na dieta, sendo os flavonóis os predominantes. A sua excreção ocorre principalmente pela urina, dada a sua solubilidade em água (MARTINÉZ-FLORES et al., 2002).

## **2.3 Classificação dos compostos fenólicos**

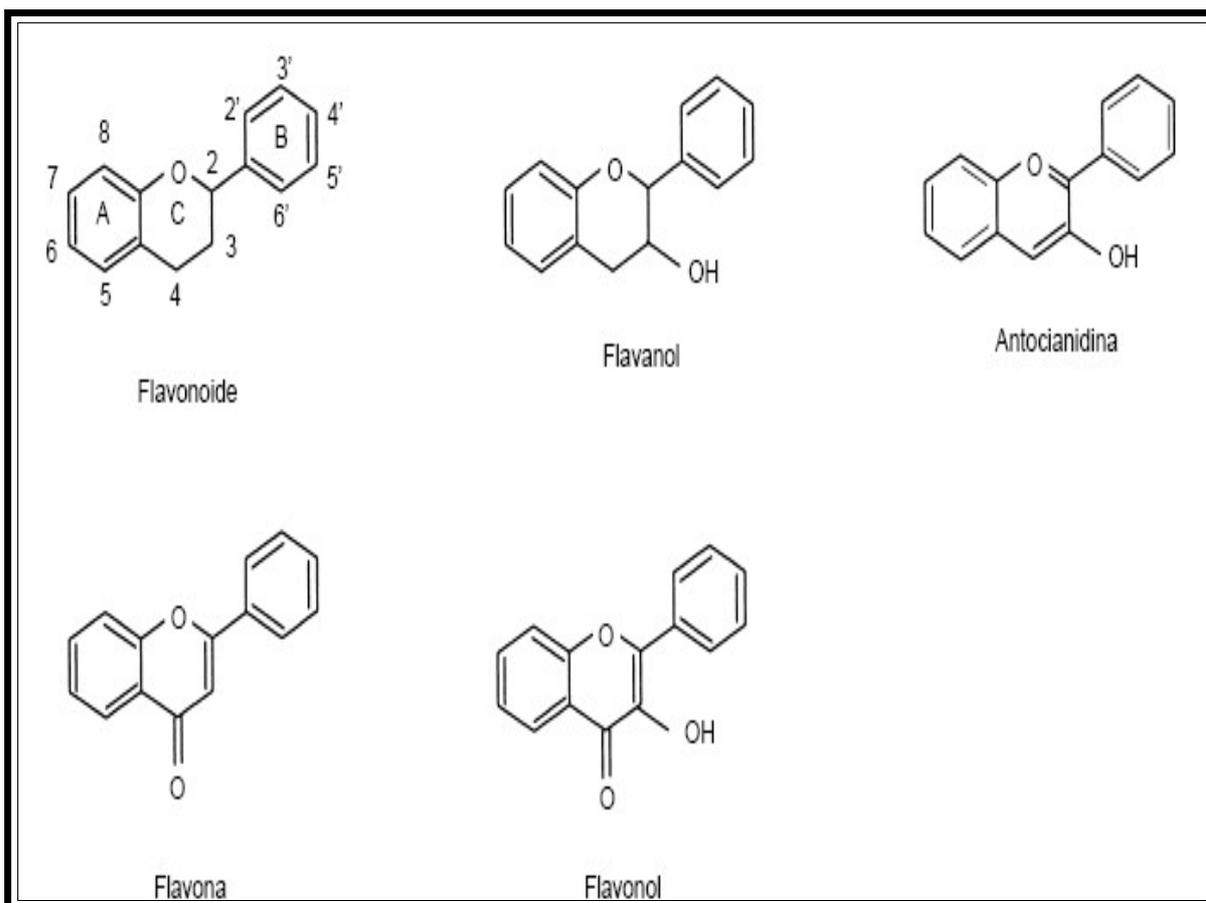
### **2.3.1 Flavonóides**

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, e encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes de plantas na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono, organizados na configuração  $C_6-C_3-C_6$  (ANGELO; JORGE, 2007).

A atividade dos flavonóides como antioxidantes depende da propriedade redox de seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química (BORS et al., 1990). Esta estrutura básica permite uma magnitude de padrões de substituições e variações no anel C.

Essas variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (HOLLMAN; KATAN, 1999). Na figura 2, encontra-se a estrutura básica e alguns tipos de flavonóides.

Estudos utilizando sistema modelo de produtos alimentícios têm demonstrado eficiência de compostos flavonóides como antioxidantes. A quercetina, ramnetina, canferol, rutina e quercitrina têm sido reconhecidos como os mais efetivos antioxidantes dentre os flavonóides. A quercetina apresentou efetiva inibição da oxidação catalisada por cobre em gordura suína e em produtos lácteos desidratados. O composto identificado como 2''(3'')-O-glicosilisetexina, um C-glicosil flavonóide, que foi isolado de folhas verdes da cevada. Este composto apresentou atividade antioxidante quase equivalente ao  $\alpha$ -tocoferol (MELO; GUERRA, 2002).



**FIGURA 2-** Estrutura básica e tipo de flavonóides (**fonte:** MARTÍNÉZ-FLORES et al., 2002).

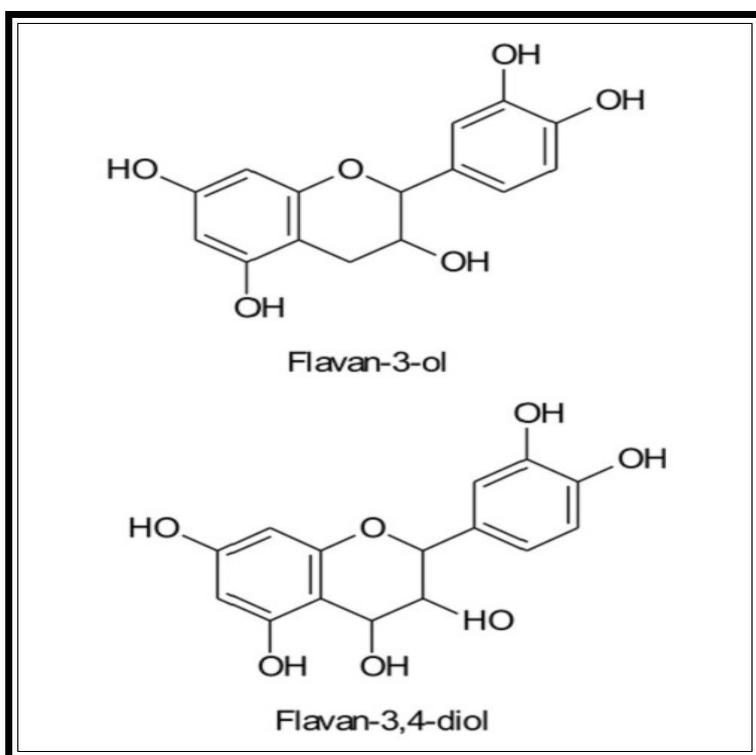
### 2.3.2 Taninos

Os taninos possuem o peso molecular relativamente alto, constituem uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (figura 3). As proantocianidinas, assim denominadas, provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades

flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (OSZMIANSKI et al., 2007).

Os taninos podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas, inclusive as proteínas salivares, sendo esta a razão de sua característica adstringente ao paladar. Um composto de especial interesse no que diz respeito à capacidade antioxidante é o ácido tânico (AT), que demonstrou possuir efeito em reações oxidativas mediadas por íons metálicos (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999).



**FIGURA 3-** Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (**fonte:** ANGELO; JORGE, 2007).

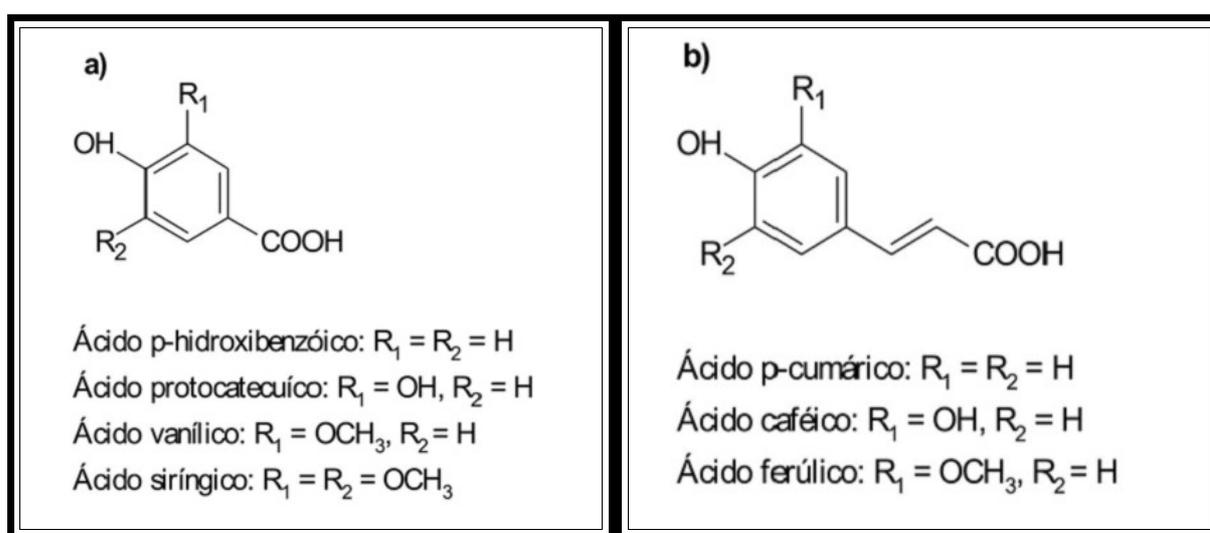
### 2.3.3 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxi-benzóico, *o*-hidroxi-benzóico, gentísico, protocatéuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006) enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico, sendo os mais comuns (BRAVO, 1998). Nas plantas usualmente ocorrem na forma de ésteres os quais podem ser ambos solúveis (acumulando-se em vacúolos) ou insolúveis (componentes da parede celular) (MAAS; GALLETTA, 1991).

Os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatéuico, siríngico e vanílico (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (MANCINI-FILHO et al., 2003).

Os representantes mais importantes dos ácidos hidroxicinâmicos em cevada são o ácido caféico (AC) e o ácido ferúlico (AF) estando também presentes no café, grãos de cereais e em diversas frutas.



**FIGURA 4-** Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b) (fonte: ANGELO; JORGE, 2007).

## 2.4 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são classificados como moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados. (HALLIWELL, 1994; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia vida curta e quimicamente muito reativas. A presença dos mesmos é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por exemplo, superóxido dismutase), ou são provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides. Quando ocorre limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são as substâncias capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que os mesmos ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007)

Estes podem ser então classificados como substâncias que quando presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais então formados a partir deles não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis que podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Os mesmos podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio o  $O_2$  apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o  $-OH$  mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O  $H_2O_2$  não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A formação de radicais livres in vivo ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, tais como medicamentos, dieta, fumo, radiações gama e ultravioleta, entre outros. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecidos adiposo, vascular e cerebral. O efeito deletério do estresse oxidativo, no entanto, varia consideravelmente de um ser vivo para outro, de acordo com a idade, estado fisiológico e dieta (VANCINI, 2005).

Hábitos de vida inapropriados tais como, fumo, álcool, dieta inadequada, condições ambientais impróprias como a exposição à radiação não ionizante UV e ondas curtas, poluição, alta umidade relativa e temperatura alta, estados psicológicos associados a um elevado estresse emocional, envelhecimento, e o exercício físico exaustivo, também estão associados ao estresse oxidativo (VANCINI, 2005).

## **2.5 Compostos fenólicos em cevada**

A identificação e quantificação dos níveis de compostos fenólicos em cevada é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica para posterior estímulo ao consumo desse cereal, bem como sua utilização com fins farmacológicos e a nível industrial. A capacidade redutora dos compostos presentes pode ser uma das propriedades utilizadas para nortear a quantificação inicial, porém, a presença de carboidratos e outros interferentes, requer metodologias confiáveis para tais avaliações. Para esse estudo o método analítico baseado na cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa com detecção UV-Vis a 254nm foi utilizado na detecção dos compostos fenólicos em grãos de cevada e o método de Folin-Ciocalteu na quantificação dos fenólicos totais presentes, visando uma comparação frente ao método anterior na quantificação dos fenólicos identificados.

Essas metodologias são utilizadas na quantificação e identificação dos compostos fenólicos presentes em diferentes alimentos, como mostra a tabela 1.

**TABELA 1-** Conteúdo de polifenóis em diferentes alimentos. (Dados expressos em mg/100g do produto).

Produtos	Flavonóides						FT		
	AF	FLAVONÓIS	CATEQ	PROCIAN	FLAVANO	FLAVONAS	ANTO	HPLC	FC
<b>Vegetais</b>									
batata	14							14	28,5
tomate	8	0,5						8	37
alface	8	1						9	23
cebola		35						35	90
<b>Frutas</b>									
maçã	5,5	3,5	10,5	100				119,5	220
cereja	74	2	6	70			400	552	552
<b>Outros alimentos</b>									
trigo	500							500	500
chocolate			80					510	840
cevada	1-8	1-42						2-45	75-156
<b>Bebidas</b>									
suco de laranja					22			22	75
vinho tinto	9,6	1,6	27,2	36			3,2	77,6	180
café	75							75	89,5
chá preto		4	65					69	100

**Legenda:** AF (ácidos fenólicos), CATEQ (catequinas), PROCIAN (prociandinas), FLAVANO (flavanonas), ANTO (antocianidinas), FT (fenólicos totais), HPLC (quantificação por cromatografia líquida), FC (quantificação por Folin-Ciocalteu). **Fonte:** Adaptado de RAMÍREZ, 2005.

### 2.5.1 Rutina

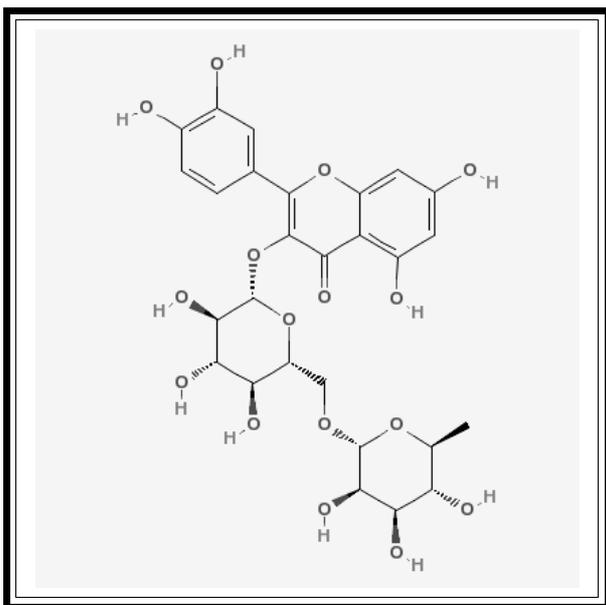
A rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina - figura 5) é um composto fenólico pertencente, a classe dos flavonóis, sendo tradicionalmente empregada como potente antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, e também na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta (BRUNETON, 1991; GUARDIA et al., 2001).

Recentemente, a permeabilidade cutânea da rutina foi estudada *in vitro* em células de difusão vertical, empregando como modelo alternativo de biomembrana a muda de pele de *Crotalus durissus*. Neste estudo, a rutina foi veiculada em um sistema emulsionado e, partindo-se dos resultados, o flavonóide não apresentou tendência para a absorção cutânea em um período de 52 horas de experimento. Portanto, foi possível interpretar que a atividade do flavonóide é exercida na superfície ou nas camadas superficiais da pele, atuando topicamente, ação essa desejada para os filtros solares químicos. Esse perfil de comportamento da rutina quanto à ação tópica também foi observado para sua aglicona (BABY, 2007; BABY et al., 2008).

A suplementação nutricional com rutina tem demonstrado também um importante papel na prevenção da aterosclerose, segundo um estudo conduzido por Rodrigues et al. (2003), pois induziu a 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.

Neste estudo, foi possível demonstrar que os efeitos benéficos da rutina, com elevação do colesterol-HDL e diminuição dos fatores de risco para a aterosclerose e doença cardiovascular (DCV), estão associados à elevação na atividade da enzima antioxidante superóxido-dismutase. Foi evidente a atuação da rutina como ativadora desta importante enzima antioxidante.

A rutina tem sido considerada também um antilipoperoxidante, pois pode neutralizar radicais hidroxil e superóxido (METODIEWA; KOCHMAN; KAROLCZAK, 1997). Segundo relataram Cotelle et al. (1992), comparando o efeito do  $\alpha$ -tocoferol, do ácido ascórbico e da rutina no processo de peroxidação, a rutina é o mais potente inibidor de radicais livres.



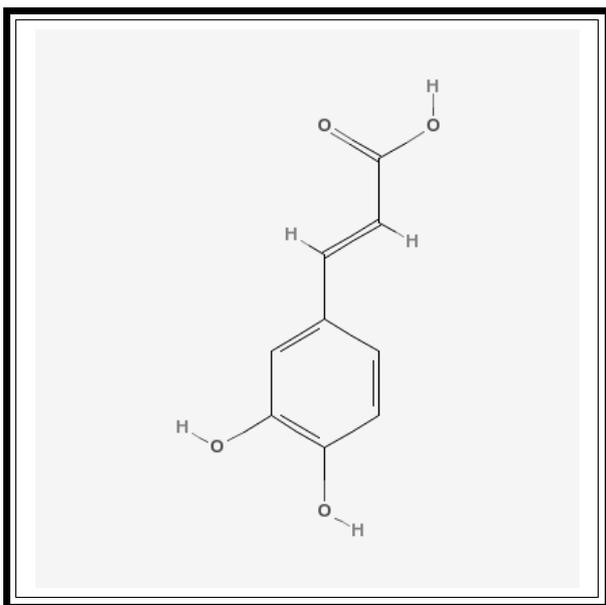
**FIGURA 5-** Estrutura química da rutina (**fonte:** PubChem Publi Chemical Database).

### 2.5.2 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 (figura 6) 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).

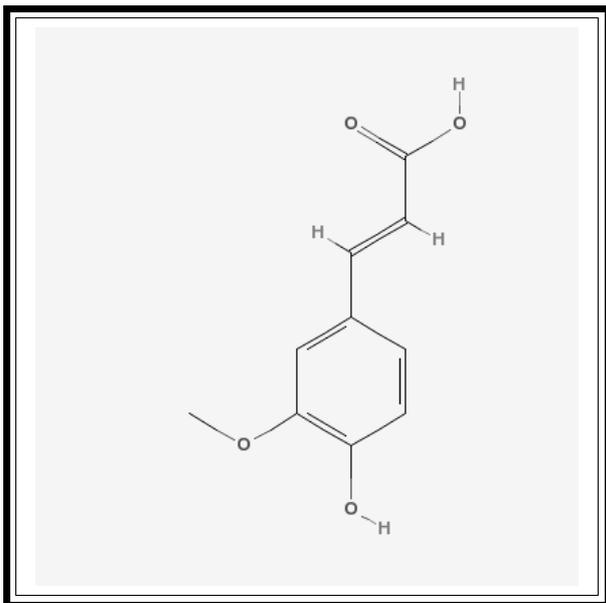


**FIGURA 6-** Estrutura química do ácido caféico (**fonte:** PubChem Publi Chemical Database).

### 2.5.3 Ácido Ferúlico

O ácido ferúlico (AF) é um polifenol natural pertencente à classe dos ácidos hidrocixinâmicos, extraído de grãos de alguns cereais como o arroz e a cevada o qual exerce efeito antioxidante, hipotensivo e anti-inflamatório de acordo com alguns estudos publicados na literatura (YAGI; OHISHI, 1979; HIRABAYASHI et al., 1995; UCHIDA et al., 1996; SUZUKI et al., 2002).

Segundo Fujita et al. (2008) o ácido ferúlico (figura 7) pode exercer também um efeito benéfico na prevenção da neuropatia diabética em ratos, efeito esse muito mais exacerbado quando comparado ao do  $\alpha$ -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.



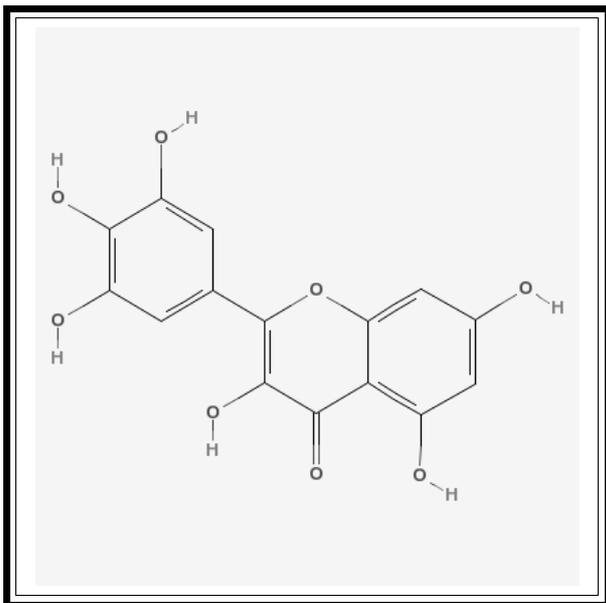
**FIGURA 7-** Estrutura química do ácido ferúlico (**fonte:** PubChem Publi Chemical Database).

#### 2.5.4 Miricetina

A miricetina (5,7,3',4',5'-penta-OH - figura 8) é um flavonóide pertencente à classe dos flavonóis, sendo encontrado em frutas, vegetais, ervas, bem como em outras plantas e apresenta um caráter antioxidante mais efetivo que a quercitina, vitamina C e vitamina E (SOUSA; SILVA, 2005). É comumente encontrada na forma de glicosídeos, tal como miricetina.

In vitro, estudos sugerem que miricetina em altas concentrações, pode modificar o LDL-colesterol, bem como aumentar os leucócitos sanguíneos. O consumo de altas concentrações em ratos, segundo Knekt et al. (2002), foi correlacionado com baixos níveis de câncer de próstata.

Um estudo conduzido durante oito anos por Nöthlings et al. (2007), verificou que três flavonóis dentre eles o canferol, quercitina e miricetina reduziram o risco de câncer pancreático em 23%.

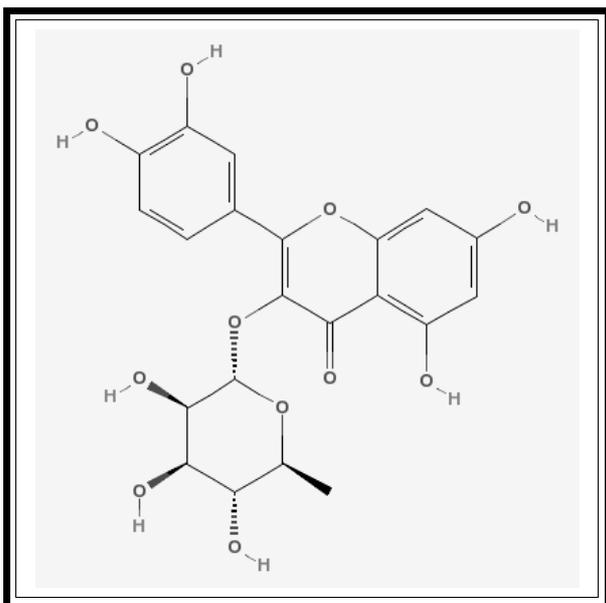


**FIGURA 8-** Estrutura química da miricetina (**fonte:** PubChem Publi Chemical Database).

### 2.5.5 Quercitrina

A quercitrina (3-O-ram-quercetina - figura 7) é um flavonóide pertencente à classe dos flavonóis, a qual segundo Meyre-Silva et al. (2001), apresenta potente atividade analgésica frente ao teste do ácido acético, sendo esta ação dose dependente.

Estudos têm mostrado também sua ação como anti-inflamatório (FERMIN et al., 1996), hipotensivo (NOVOA et al., 1985) e antiviral contra o vírus do herpes (MUSCI; GYULAI; BELADI, 1992).



**FIGURA 9-** Estrutura química da quercitrina (**fonte:** PubChem Publi Chemical Database).

## 2.6 Métodos analíticos utilizados para a determinação de compostos fenólicos

### 2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI et al., 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (abreviatura em inglês HPLC) usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contêm partículas muito finas capazes de proporcionar separações muito eficientes (HARRIS, 2005).

Os dispositivos de HPLC consistem em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para controlar o sistema e apresentar os resultados.

Sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto que a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI et al., 2002).

Detectores de ultravioleta que usam célula de fluxo são os mais utilizados em HPLC, pois muitos solutos absorvem radiação ultravioleta. A maioria dos instrumentos possui lâmpada de deutério, xenônio ou tungstênio e um monocromador, de modo que possibilita a escolha de um ou mais comprimentos de onda, no ultravioleta ou no visível, mais adequado para o analito em questão.

Em grãos, essa técnica de separação tem sido utilizada com o propósito de se quantificar polifenóis em cultivares de café (MENDONÇA et al., 2007; VIGNOLI; BASSOLI, 2007), na identificação de polifenóis em cevada e cerveja (WHITTLE et al., 1999), na determinação de antioxidantes no trigo sarraceno (DANILA et al., 2007) entre outros.

### **2.6.2 Método de Folin-Ciocalteu**

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (HOU et al., 2003; NACZK; SHAHIDI, 2004; BONOLI et al., 2004; OMONI; ALUKO, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005; SOUSA et al., 2007;).

Atualmente esse método tem sido utilizado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra o que aparentemente pode não estar refletido na sua característica de “ensaio de fenóis total”. Porém, um crescente número de publicações está aplicando o ensaio de fenóis total e um ensaio baseado na transferência de elétrons (exemplos: TEAC, FRAP, etc.) encontrando entre estes excelentes correlações lineares entre o perfil de fenóis total e a atividade antioxidante. Esta correlação está presente devido à similaridade química presente entre estes ensaios (TOMEI; SALVADOR, 2007).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente possuam natureza fenólica (IKAWA et al., 2003; NACZK; SHAHIDI, 2004; SOUSA et al., 2007). Conseqüentemente, essa reação não é específica para taninos. Uma forma de contornar essa falta de especificidade é retirando os taninos do meio mediante adsorção com substratos protéicos (VERZA et al., 2007).

### **3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## ARTIGO 1

(Configuração conforme normas da Revista Química Nova - Anexo 1)

### **Otimização na determinação de compostos polifenólicos em grãos de cevada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV**

Optimization of the determination polyphenolic compounds in grains of barley by high performance liquid chromatography with UV detection

#### **Resumo**

**Objetivo:** Este estudo teve como objetivo a determinação dos compostos polifenólicos presentes em grãos de cevada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com detecção UV, a partir da otimização das condições experimentais. **Metodologia:** Foi utilizada a cultivar de cevada MN 743 ano 2006. Determinadas concentrações de farinha de cevada foram misturadas em diferentes solventes para comparação das extrações. **Resultados:** O método de extração ultra-sônico durante 30 minutos utilizando solvente hidroetanólico e etanólico provou ser o mais adequado e eficiente. O polifenólicos encontrados foram: rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e quercitrina. **Conclusão:** O método cromatográfico é um passo fundamental na classificação das variedades de cevada Brasileira.

**Palavras-chave:** antioxidantes, *Hordeum vulgare* L., HPLC.

## Abstract

**Objective:** This study aimed at determining the polyphenolic compounds present in barley grains by high performance liquid chromatography in reversed phase (RP-HPLC) with UV detection, from optimization of experimental conditions.

**Methodology:** We used to grow barley NM 743 year 2006. Certain concentrations of barley meal were mixed in different solvents to compare the extractions.

**Results:** The method of ultrasonic extraction for 30 minutes using hydroethanolic and ethanol solvent proved to be the most appropriate and efficient. The polyphenolic were: rutin, caffeic acid, ferulic acid and quercitrin. **Conclusion:** The chromatographic method is a crucial step in the classification of Brazilian varieties of barley.

**Key words:** antioxidants, *Hordeum vulgare* L., HPLC.

## INTRODUÇÃO

Os grãos de cereais contribuem com quantidades significativas de energia, proteína, minerais e vitaminas na dieta humana, e representam a maioria dos alimentos consumidos e contribuem para a saúde e nutrição humana.

Os cereais de importância primária econômica incluem o trigo, milho, arroz, cevada, aveia, sorgo e centeio. Estudos recentes têm mostrado que os mesmos contêm uma larga variedade de substâncias biologicamente ativas, incluindo antioxidantes, fibra alimentar, fitosteróis e lignanas <sup>1</sup>.

A cevada é considerada uma cultura milenar e foi muito difundida no passado, sendo classificada como o quarto cereal mais cultivado no mundo. É basicamente utilizada pela indústria cervejeira e na alimentação animal, e tem sido muito consumida em países como Rússia, Canadá, Estados Unidos da América e outros países como um “alimento funcional”, rico em fibra alimentar, constituído principalmente por fibra solúvel, da qual as  $\beta$ -glucanas são os constituintes principais, estando associadas à redução do risco de doenças cardíacas <sup>2</sup>.

Atualmente, muitos compostos fenólicos têm sido identificados e quantificados em variedades de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e alguns já foram isolados <sup>3</sup>. Dentre eles pode-se citar os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, como formas livres e como ésteres glicosídicos. O ácido trans-ferúlico tem sido o composto encontrado em maior quantidade, seguido dos ácidos p-cumarínico e vanílico, também identificados <sup>4,5</sup>.

Esses compostos estão principalmente presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão. Já os ésteres de glicosídeos foram detectados na casca, tegumento da semente e nas células da aleurona <sup>6</sup>.

Para quantificar e identificar os flavonóides tem sido usado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência <sup>7,8</sup> (HPLC), os quais podem ser analisados em fase reversa utilizando um detector UV ajustado em um determinado comprimento de onda.

Esse estudo teve por objetivo determinar os compostos fenólicos presentes em grãos da cultivar de cevada MN 743 por HPLC, decorrente de uma otimização das condições experimentais, visando o melhor solvente, concentração do extrato e o melhor processo extrativo para a análise. O método validado será utilizado no decorrer do estudo para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em

grãos de cevada recomendadas para cultivo no Brasil, utilizando os métodos analíticos de Folin-Ciocalteu e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com detecção UV-Vis, visando à comparação entre essas metodologias.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Grãos de cevada**

Utilizou-se na otimização do método, a cultivar de cevada MN 743 do ano de 2006. A partir da metodologia validada, visando à quantificação e identificação dos polifenólicos, foram utilizadas as cultivares MN 743 de 2005 e 2006 e BRS Lagoa de 2005 e 2006. As amostras foram fornecidas pelo Centro de Pesquisa da Embrapa/Trigo de Passo Fundo e cultivadas no município de Ibiaçá/Rio Grande do Sul.

### **Preparo da amostra**

Foram pesados 1,0 g, 2,5 g e 3,0 g de farinha de cevada integral para se verificar qual seria a melhor concentração do extrato, sendo os grãos previamente secos em estufa a 55° C e moídos em micro-moinho a 27.000 rpm, a fim de se obter tamanho de partículas (<1mm) apropriadas.

A farinha de cevada foi misturada em água, etanol, etanol-água (50:50, 80:20, 95:5 v/v), metanol, metanol-água (50:50, 80:20, 95:5 v/v), hexano (5 mL) e acetona (5 mL). A otimização das condições experimentais (tabela 1) foi realizada visando identificar qual seria a melhor solução extratora e o melhor processo extrativo. As soluções foram levadas ao banho ultra-sônico, à temperatura ambiente (25°C ± 1), pelos tempos 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos. Sob maceração, a amostra permaneceu por 5, 7, 10 e 14 dias. Sob refluxo por 1 hora em temperatura de 80° C

e sob agitação mecânica por 60, 120, 360 e 1440 minutos. Após esses procedimentos, as soluções foram filtradas em papel filtro para a remoção do resíduo. As amostras que foram misturadas em hexano e em acetona, após a filtração, foram evaporadas e redissolvidas em metanol. Após esses procedimentos os extratos foram filtrados em membranas de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e posteriormente foram analisados por HPLC (figura 1).

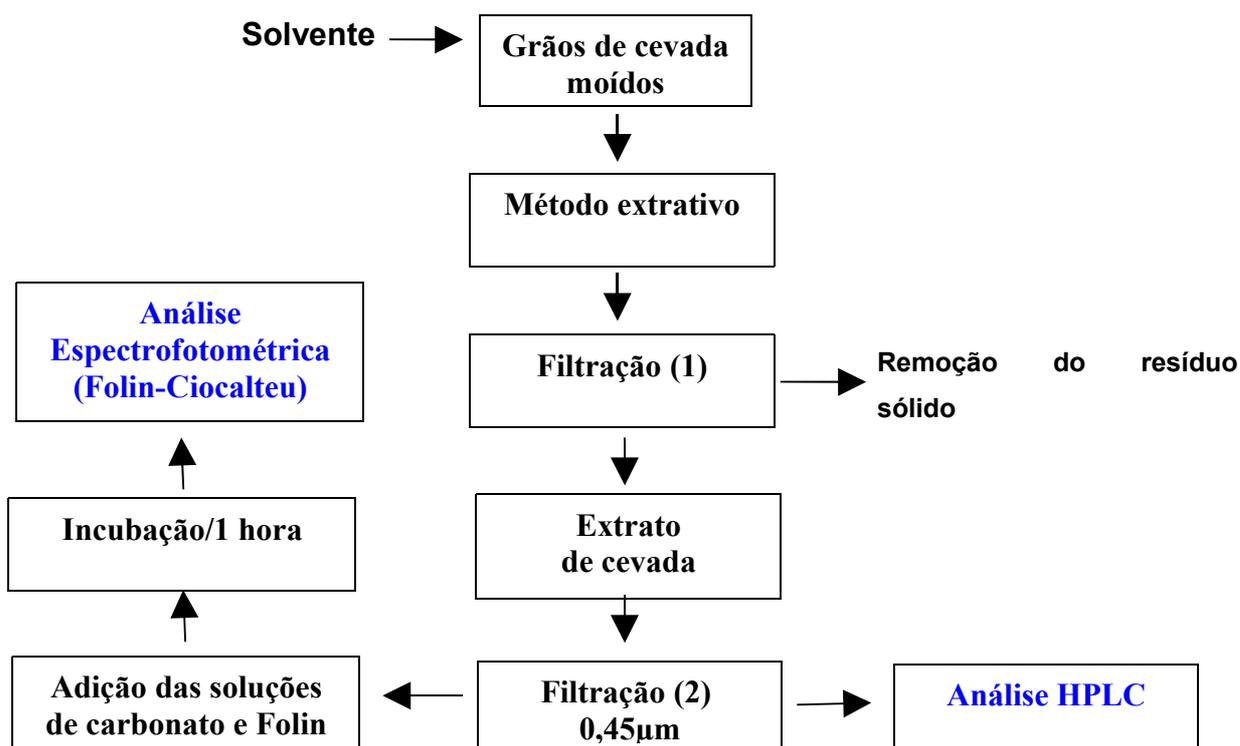


FIGURA 1- Esquema de operação e processo analítico empregado no estudo.

## Reagentes

Acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Vetec®) foi usado no preparo da fase móvel. A água usada nas análises cromatográficas foi a Milli-Q. Etanol, metanol grau analítico (Vetec®), hexano e acetona, foram usados no preparo dos extratos. Rutina, ácido ferúlico, ácido caféico, miricetina e quercetrina dihidratada (Sigma®), em soluções contendo 5,0, 10,0, 15,0 mg/L em metanol foram utilizados como padrões externos.

Foram também utilizados o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) e padrão de ácido gálico (Sigma®).

**TABELA 1-** Otimização das condições experimentais dos métodos de extração utilizados na análise de compostos fenólicos em cevada.

<b>Método de extração</b>	<b>Solvente usado</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de extração</b>
<b>Sonicação</b>	Etanol, metanol, água, hexano, acetona e combinações de água:etanol e água:metanol	25° C	15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 minutos
<b>Maceração</b>	Etanol, metanol, água, hexano, acetona e combinações de água:etanol e água:metanol	25° C	5, 7, 10, 14 dias
<b>Sob refluxo</b>	Etanol, metanol, água, hexano, acetona e combinações de água:etanol e água:metanol	80° C	1 hora
<b>Agitação mecânica</b>	Etanol	25° C	60, 120, 360, 1440 minutos

### **Cromatógrafo líquido e condições experimentais**

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo Dionex, acoplado com detector UV – Vis (UVD 170U). O software Chromeleon, versão 6.70, foi usado para registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. A separação dos flavonóides foi executada usando uma coluna C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm). Os solventes foram desgazeificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique). A cromatografia foi realizada à temperatura de 25°C ±1°C. A eluição foi realizada com acetonitrila 30%: água 70%, pH ajustado em 4,0 ± 0,5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, em vazão de 0,5 mL/min. Alíquotas de 20 µL das amostras foram injetadas em duplicata com seringa Hamilton de 1 mL e a detecção dos picos foi registrada a 254 nm. O tempo de análise foi de 40 minutos.

## Determinação espectrofotométrica dos fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato hidroetanólico das espécies estudadas foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações<sup>10</sup>. As medidas de absorção foram realizadas por meio de espectroscopia na região do visível utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard (HP) UV-VIS com arranjo de diodos.

O extrato de cevada (100 µL) foi transferido quantitativamente para um tubo de ensaio no qual foi adicionado 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%). Após 1 h, a absorbância das amostras foi medida a 740 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" etanol: água (80%, v/v) e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,075, 0,15, 0,3, 0,6, 0,9 mg/mL) e expressa como mg de ácido gálico por g de cevada (mg AG/g). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $C = 1,7833A + 0,0523$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico,  $A$  é a absorbância a 740 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9999$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

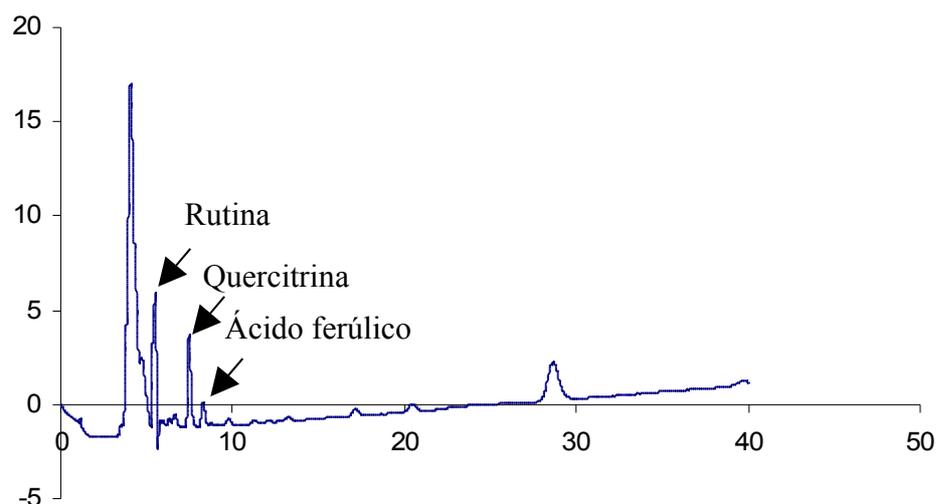
Com relação à concentração do extrato, observou-se que extratos mais concentrados obtiveram picos cromatográficos mal resolvidos e os polifenóis coeluíram durante a análise. O extrato de cevada a 12,5% (m/v) mostrou-se o mais adequado durante a otimização. Quanto aos solventes, observou-se uma maior extração dos compostos fenólicos nos solventes metanol e etanol, principalmente da rutina. Os solventes hexano e acetona não se mostraram adequados na extração dos fenólicos em cevada. Observou-se também que a água, quando associada ao

metanol ou etanol, aumentou significativamente a extração do flavonóide rutina, evidenciando também uma separação do ácido caféico.

Dos métodos extrativos, o banho ultra-sônico (30 minutos), à temperatura ambiente, foi o que apresentou os melhores perfis cromatográficos com relação aos demais métodos. A exposição do extrato a altas temperaturas e o exaustivo processo extrativo pode ter ocasionado uma possível oxidação dos compostos fenólicos no extrato de cevada dos outros métodos de extração avaliados.

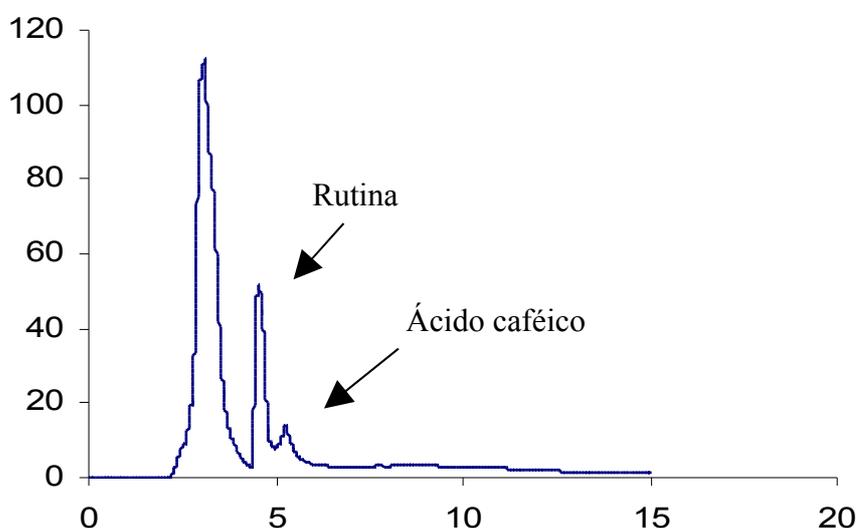
Durante todo o processo, observou-se que os extratos hidroetanólico (80%, v/v) e etanólico (100%) foram os que apresentaram os melhores resultados quando comparados aos outros solventes utilizados, e que a sonicação, no tempo de 30 min, foi o processo extrativo que demonstrou os melhores perfis cromatográficos.

Em extrato etanólico 100%, foram identificados e quantificados os compostos polifenólicos rutina (81,70 mg/kg), seguida da quercitrina (28,10 mg/kg) e do ácido ferúlico (11,30 mg/kg), com tempos de retenção de 5,49 minutos, 7,46 minutos e 8,27 minutos, respectivamente. Na figura 2 pode-se observar o perfil cromatográfico característico da cultivar de cevada MN 743 de 2006 em um extrato etanólico sonicado por 30 minutos.



**FIGURA 2-** Cromatograma típico de um extrato etanólico (100%) da cultivar MN 743 ano 2006 a 20% (m/v). Condições cromatográficas: coluna de separação C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm), temperatura de análise 25°C ±1°C, fase móvel: acetonitrila 30%: água 70%, pH 4,0 ± 0,5 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), vazão 0,5 ml min<sup>-1</sup>, detecção: UV em 254 nm.

Na análise cromatográfica do extrato hidroetanólico, foi identificada e quantificada a rutina (101,93 mg/kg) como um dos principais compostos polifenólicos da cultivar MN 743 de 2006, seguida do ácido caféico (50,54 mg/kg) com tempo de retenção médio de 4,57 minutos para a rutina e 5,24 minutos para o ácido caféico (figura 3). Não foram identificados nesse extrato o ácido ferúlico, comumente encontrado em estudos com cevada <sup>6,9</sup> e a quercitrina, ambos identificados e quantificados no extrato etanólico de cevada.



**FIGURA 3-** Cromatograma típico do extrato hidroetanólico (80%, v/v) da cultivar MN 743 ano 2006 a 12,5% (m/v). Condições cromatográficas: coluna de separação C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm), temperatura de análise 25°C ±1°C, fase móvel: acetonitrila 30%: água 70%, pH 4,0 ± 0,5 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), vazão 0,5 ml min<sup>-1</sup>, detecção: UV em 254 nm.

Diante desses resultados, extratos elaborados com 12,5% (m/v) de farinha de cevada em extrato hidroetanólico (80%, v/v) das cultivares MN 743 e BRS Lagoa de 2005 e BRS Lagoa de 2006, identificaram e quantificaram os compostos fenólicos rutina e ácido caféico em concentrações que variaram de 48,67 a 334,52 mg/kg de rutina, 3,11 a 50,54 mg/kg de ácido caféico. O ácido ferúlico foi identificado e quantificado somente no extrato hidroetanólico da cultivar BRS Lagoa de 2006 em uma concentração de 0,77 mg/kg. Os fenólicos totais, realizado pelo método de

Folin-Ciocalteu, apresentaram conteúdos de 982,08 a 1564,37mg/kg (mg de ácido gálico por kg de cevada), conforme resultados observados na tabela 2.

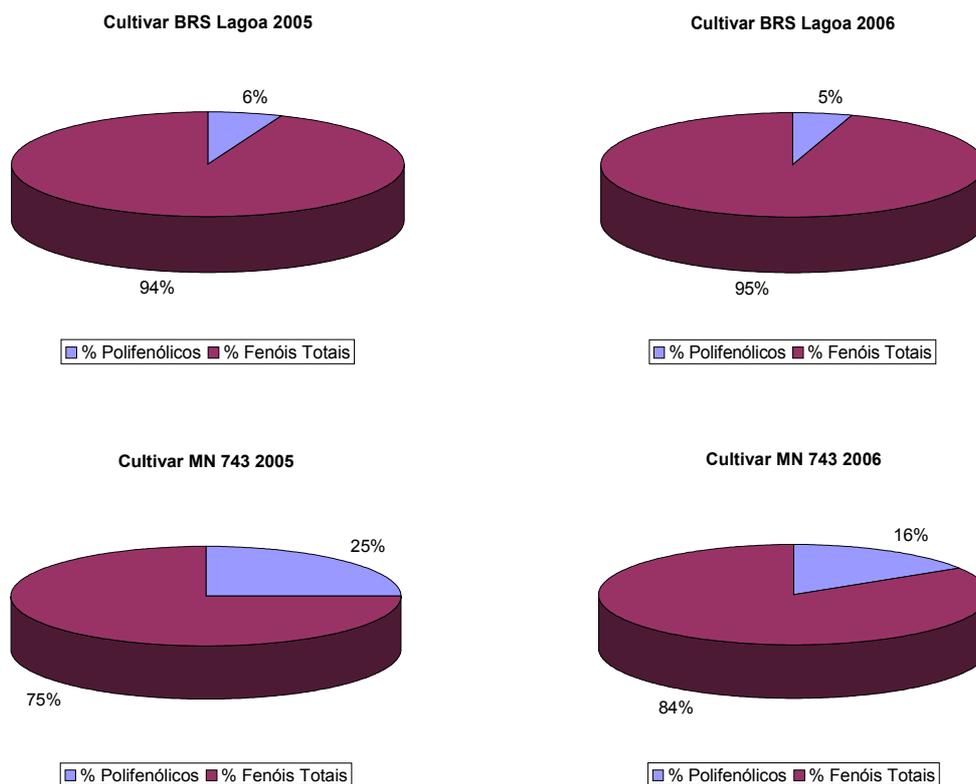
A análise percentual dos fenólicos totais quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e compostos fenólicos quantificados por HPLC, variou em concentração entre o ano de cultivo e entre as espécies. Entre as cultivares BRS Lagoa e MN 743 de 2005, o percentual dos polifenólicos identificados (rutina e ácido caféico) foi de 6% (90,88 mg/kg) e 25% (360,59%) entre os fenóis totais quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. Já nas cultivares BRS Lagoa e MN 743 de 2006, o conteúdo encontrado foi de 5% (52,55 mg/kg) e 16% (152,47 mg/kg) dos compostos rutina, ácido caféico e ácido ferúlico. Conforme observado na figura 4, os compostos fenólicos diferiram em quantidades entre as cultivares de diferentes safras, diferenciando assim as espécies. A comparação das duas metodologias (HPLC e Folin-Ciocalteu) permitiu então a diferenciação das cultivares da mesma espécie e de diferentes anos de cultivo.

Cabe ressaltar que o conteúdo de polifenólicos em relação aos fenóis totais entre as cultivares teria seu conteúdo modificado tendo em vista a identificação de outros compostos que porventura não foram detectados e quantificados pela metodologia de detecção estudada e/ou pelo método extrativo. Compostos fenólicos são instáveis e facilmente oxidáveis. Os derivados do ácido cinâmico podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV<sup>11</sup>.

**TABELA 2-** Compostos fenólicos (CF) detectados e quantificados nas cultivares de cevada por RP-HPLC e por Folin-Ciocalteu (espectrofotometria) em extrato hidroetanólico de cevada (80%, v/v).

Cultivares	Quantificação por espectrofotometria (mg/kg)	Rutina (mg/kg)	Ácido Caféico (mg/kg)	Ácido Ferúlico (mg/kg)	Σ CF por HPLC (mg/kg)
<b>BRS LAGOA (2005)</b>	1564,37	76,35	14,57	nd*	90,88
<b>MN 743 (2005)</b>	1427,38	334,52	26,07	nd	360,59
<b>BRS LAGOA (2006)</b>	1025,28	48,67	3,11	0,77	52,55
<b>MN 743 (2006)</b>	982,08	101,93	50,54	nd	152,47

**Legenda:** Σ CF (somatório dos compostos fenólicos rutina, ácido caféico e ácido ferúlico quantificados por HPLC).



**FIGURA 4-** Percentuais de compostos fenólicos identificados (rutina, ácido caféico, ácido ferúlico) por HPLC e quantificados por Folin-Ciocalteu entre as cultivares MN 743 e BRS Lagoa dos anos de 2005 e 2006.

## CONCLUSÃO

O método analítico de RP-HPLC consistiu um sistema eficiente para a separação de compostos fenólicos em extrato de cevada. O método de extração ultra-sônico e os solventes etanólico e hidroetanólico, ambos aplicados neste estudo, mostraram-se adequados e eficientes para a análise do extrato de cevada. No extrato etanólico foram identificados os polifenóis rutina, ácido ferúlico e quercitrina (MN 743 2006) e no extrato hidroetanólico rutina, ácido caféico e ácido ferúlico (BRS Lagoa 2006) em diferentes concentrações entre as cultivares, sendo a rutina o composto fenólico mais quantificado.

O solvente hidroetanólico (80%, v/v) foi o escolhido na avaliação das variedades de cevada pela maior extração de polifenólicos e pela sua baixa toxicidade diante dos demais solventes. Os polifenólicos rutina, ácido caféico e ácido

ferúlico foram os compostos identificados por HPLC, e quantificados em maior concentração na MN 743 de 2005 totalizando 360,59 mg/kg de cevada.

Pelo método de Folin-Ciocalteu o maior conteúdo de fenólicos foi detectado na BRS Lagoa de 2005 totalizando 1564,37 mg/kg de cevada.

A HPLC e o método de Folin-Ciocalteu, mostraram-se adequados na diferenciação das cultivares da mesma espécie e de diferentes safras em grãos de diferentes variedades de cevada Brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zielinski, H.; Kozłowska, H.; Lewczuk, B. Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n. 3, p.159-169, 2001.
2. Binneck, E., et al. Padrões eletroforéticos de hordeínas e izoenzimas para identificação de cultivares de cevada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 312-321, 2002.
3. Dvorakova, M., et al. **Journal of Chromatography A** (2007), doi:10.1016/j.chroma.2007.10.080.
4. Mcmurrough, I., et al. Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 50, n. 2, p. 67–76, 1992.
5. Shahidi, F., Naczki, M. Phenolics in food and nutraceuticals. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Ed. CRC Press, 2003, 576p.
6. Goupy, P., et al. Antioxidant composition and activity of barley *Hordeum vulgare* and malt extracts and isolated phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p.1625-1634, 1999.
7. United States Pharmacopeia – **The National Formulary** – 25<sup>th</sup> edition, NF 20, S2, Rochville, 2002, CD-ROM.

8. Sticher, O. Quality of Ginkgo preparations. **Planta Medica**, v. 59, n.1 p. 2-11, 1993.
9. Ferreres, F., et al. **Journal of Chromatography A** (2008), doi:10.1016/j.chroma.2007.12.070.
10. Souza, C.M.M., et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
11. Carvalho, J. C. T.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. cap. 20, p.519-535.

## ARTIGO 2

(Configuração conforme normas do Journal of Chromatography Science - Anexo 2).

### **Compostos polifenólicos em extratos hidroetanólicos de cultivares de cevada Brasileira**

Polyphenolic compounds in the extracts hydroethanolics of Brazilian barley cultivars

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi de identificar e quantificar compostos polifenólicos em extratos hidroetanólicos de grãos de diferentes variedades de cevada brasileira pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-VIS e também, quantificar em paralelo, os fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos identificados foram a rutina, o ácido caféico, o ácido ferúlico e a miricetina, com concentrações variando entre 26,41-420,50, 3,61-74,04, 0,48-7,78 e 0,20-5,86, expressos em mg/kg, respectivamente. O conteúdo de fenóis totais variou de 752,50-1564,37mg/kg entre as diferentes variedades. Os métodos utilizados permitiram uma diferenciação química das cultivares com relação à presença de compostos polifenólicos.

**Palavras- chave:** antioxidantes, Folin-Ciocalteu, *Hordeum vulgare L.*, HPLC.

**Abstract**

This study aimed to identify and quantify polyphenolic compounds in hydroethanolic extracts of grains of different Brazilian varieties of barley by the system of high performance liquid chromatography (HPLC) with UV-VIS detection and also to quantify in parallel, the total phenols by the method Folin-Ciocalteu. The phenolic compounds identified were the rutin, the caffeic acid, ferulic acid and the myricetin, with concentrations ranging from 26,41-420,50, 3,61-74,04, 0,48-7,78 and 0,20-5.86, expressed as mg/kg, respectively. The content of total phenols ranged from 752,50-1564,37 mg/kg among different varieties. The methods used have a chemical differentiation of cultivars with respect to the presence of polyphenolic compounds.

**Key words:** antioxidants, Folin-Ciocalteu, *Hordeum vulgare L.*, HPLC.

## Introdução

A cevada é uma gramínea amplamente distribuída e cultivada com fins alimentícios, sendo um cereal de grande importância econômica e por esta razão, a mesma tem sido alvo de estudos sob diferentes pontos.

Atualmente, a análise do conteúdo de fenólicos (flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos) tem sido descritas em pesquisas com cevada e malte, com relação à atividade antioxidante dos mesmos. O ácido ferúlico e o p-cumárico têm sido identificados como os mais encontrados nas diferentes variedades [5].

Esses constituintes têm sido considerados como a mais importante fonte de antioxidantes em cereais, existindo tanto na forma livre como também na forma conjugada. A maioria dos fenólicos livres encontrados em cevada são flavonóis, ao passo que dos fenólicos conjugados são principalmente os ácidos fenólicos [1,7].

Muitas propriedades têm sido associadas com a presença de compostos fenólicos em plantas, as quais são essenciais para o desenvolvimento da planta e por atuarem como importante mecanismo de defesa. Esses compostos presentes em uma dieta normal podem ser benéficos para a saúde humana por reduzir a incidência de câncer e doenças cardiovasculares [2,6]. Eles podem também ser empregados em alimentos processados como antioxidantes naturais de maneira a prevenir a peroxidação lipídica, considerada uma das causas de deterioração de alimentos [3-4].

Os alimentos que contêm altas concentrações de substâncias prooxidantes (como metais de transição, proteína heme) e grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, são facilmente atacados pelos radicais livres e sofrem oxidação, a qual pode causar rancidez, diminuindo a aceitabilidade e reduzindo o valor nutricional do alimento. Por esse motivo, para prevenir ou retardar a oxidação lipídica, antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) são geralmente empregados pela indústria de alimentos como conservadores. A substituição dos antioxidantes sintéticos por extratos de plantas como fonte de antioxidantes naturais é uma preocupação para a saúde pública e objeto de vários projetos de pesquisa [3-4].

Dessa forma e considerando a importância dos compostos polifenólicos como antioxidantes naturais, o presente trabalho teve como objetivo a sua determinação

pelos métodos de Folin-Ciocalteu e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com detecção UV-VIS em extrato hidroetanólico de cultivares de cevada recomendadas para cultivo no Brasil.

## **Experimento**

### **Material utilizado**

Nesse estudo foram utilizados grãos integrais de cevada, recomendadas pela Comissão Nacional de Cevada, provenientes do Centro de Pesquisas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Passo Fundo, do ano agrícola de 2005, cultivadas no Município de Ibiaçá/ Rio Grande do Sul (RS). As cultivares analisadas foram: Embrapa 128, MN 716, PFC 99199, BRS Marciana, BRS Lagoa, BRS Mariana, BRS 225, BRS 195, MN 743, PFC 200048, Embrapa 127, MN 698, BRS Borema, MN 721, MN 610 e PFC 2001052.

A região de plantio localiza-se a uma latitude de 28°03'25" e a uma longitude 51°51'17" oeste, estando a uma altitude de 620m. A semeadura foi realizada, mecanicamente sob plantio direto, em Latossolo Vermelho distrófico, no mês de junho e a colheita em outubro de 2005. A adubação foi realizada de acordo com a análise química do solo, utilizando-se 250 kg de adubo da fórmula 5-25-20 de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio). O controle de pragas e doenças foi realizado sempre que necessário. A colheita foi mecanizada e, os grãos foram submetidos à secagem para redução do teor de umidade em torno de 13% e, em seguida, foi realizada a limpeza para remoção de impurezas.

### **Preparação da amostra e extração dos compostos polifenólicos em cevada**

Os grãos previamente secos a 55° C foram triturados em micro-moinho a 27.000 rpm, a fim de se reduzir o tamanho de partículas (<1mm). Logo após este

processamento, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, sob congelamento até o processamento extrativo.

Os extratos foram preparados em uma concentração de 12,5% (m/v) de farinha de cevada misturada em uma solução hidroetanólica (80%, v/v). Esta condição experimental, previamente validada pelos autores [8], mostrou que o solvente extrator hidroetanólico (80%, v/v) e o extrato a 12,5% (m/v), teve um significativo impacto na extração de polifenólicos em cevada, bem como uma baixa toxicidade, sendo assim utilizado nesse estudo.

A mistura foi então sonicada durante 30 minutos à temperatura ambiente, filtrada em filtro de papel 12,5 mm e em filtro de acetato de celulose 0,45 µm. Os extratos foram mantidos a 5° C até o momento da análise.

### **Validação do método**

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos em cevada foi realizada após a validação de um método que possibilitasse a determinação simultânea de oito compostos polifenólicos (rutina, ácido caféico, quercitrina, ácido ferúlico, miricetina, resveratrol, quercetina e canferol) por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC).

A otimização das condições experimentais para a análise cromatográfica foi realizada em coluna C-18 e detecção UV em 254 nm. Nas condições experimentais testaram-se diversas proporções dos eluentes acetonitrila, água e metanol, vazão da fase móvel (de 1,0 mL/min até 0,5 mL/min) e o pH (de 2,0-7,0).

Durante o processo de validação, verificou-se que a combinação de 70% de água e 30% de acetonitrila com pH ajustado em 4,0 e vazão de 0,5 mL/min, foi a que resultou na melhor resolução dos picos cromatográficos e evitou a coeluição dos picos dos compostos fenólicos mais polares.

Os tempos de retenção obtidos foram de 4,45 min para a rutina; 5,16 min para o ácido caféico; 5,97 min para a quercitrina; 7,30 min para o ácido ferúlico; 9,25 min para miricetina; 12,86 min para resveratrol; 16,82 min para quercetina e 32,78 min para canferol. Os limites de detecção e quantificação (em mg/L) foram: rutina: 0,2909 e 0,9698; ácido caféico: 0,1938 e 0,6458; quercitrina: 0,2057 e 0,6856; ácido

ferúlico: 0,2695 e 0,8983; miricetina: 0,1851 e 0,6169; resveratrol: 0,7151 e 2,3837; quercetina: 0,1522 e 0,5073; canferol: 0,2406 e 0,8020, respectivamente.

O método apresentou repetibilidade superior a 92% e uma taxa de recuperação de 85,7-107,1%. O tempo de análise aceitável do ponto de vista analítico para a identificação de todos os flavonóides analisados foi de 40 minutos.

### **Cromatógrafo líquido e condições experimentais**

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo Dionex, acoplado com detector UV – VIS (UVD 170U). O software Chromeleon, versão 6.70, foi usado para registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. A separação dos flavonóides foi executada usando uma coluna C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm). Os solventes foram desgazeificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique). A cromatografia foi realizada à temperatura de 25°C ±1°C. A eluição foi realizada com acetonitrila 30%: água 70%, pH ajustado em 4,0 ± 0,5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, em vazão de 0,5 mL/min. Alíquotas de 20 µL das amostras foram injetadas em duplicata com seringa Hamilton de 1 mL. O tempo de análise foi otimizado em 15 minutos, em virtude da identificação dos compostos fenólicos de interesse durante esse tempo.

Na identificação dos compostos fenólicos, adicionou-se ao extrato de cevada uma mistura dos padrões em uma concentração de 20 mg/L, sendo cada composto então identificado a partir da correlação do seu tempo de retenção com o do padrão adicionado.

Para a quantificação dos teores dos compostos fenólicos por RP-HPLC, utilizaram-se as áreas dos picos dos compostos detectados a 254 nm, com as áreas dos picos dos padrões injetados em três diferentes concentrações (5,0, 10,0 e 15,0 mg/L).

## Determinação espectrofotométrica dos fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato hidroetanólico das espécies estudadas foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações [9]. As medidas de absorção foram realizadas por meio de espectroscopia na região do visível utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard (HP) UV-VIS com arranjo de diodos.

O extrato de cevada (100 µL) foi transferido quantitativamente para um tubo de ensaio no qual foi adicionado 2,5 mL do reagente de Folin diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%). Após 1 h, a absorbância das amostras foi medida a 740 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" etanol: água (80%, v/v) e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,075, 0,15, 0,3, 0,6, 0,9 mg/mL) e expressa como mg de ácido gálico por g de cevada (mg AG/g). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $C = 1,7833A + 0,0523$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico,  $A$  é a absorbância a 740 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9999$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## Resultados e discussão

A partir dos tempos de retenção quando comparados com os cromatogramas dos padrões comerciais, foram identificados os seguintes compostos: a) flavonóis: rutina e miricetina; b) ácidos hidroxicinâmicos: caféico e ferúlico. A ordem de eluição foi: rutina < ácido caféico < ácido ferúlico < miricetina.

Entre as cultivares, observou-se que a quantidade de rutina variou de 10,76 mg/kg na cultivar BRS Borema a 420,50 mg/kg na cultivar Embrapa 128. A concentração de ácido caféico variou de 3,62 mg/kg na cultivar MN 610 a 74,04 mg/kg na cultivar MN 721. Já o conteúdo de ácido ferúlico variou de 0,48 mg/kg na

cultivar MN 610 a 7,78 mg/kg na cultivar BRS Mariana e de miricetina entre 0,21 mg/kg na cultivar MN 721 a 5,86 mg/kg na cultivar BRS 225 (tabela 1).

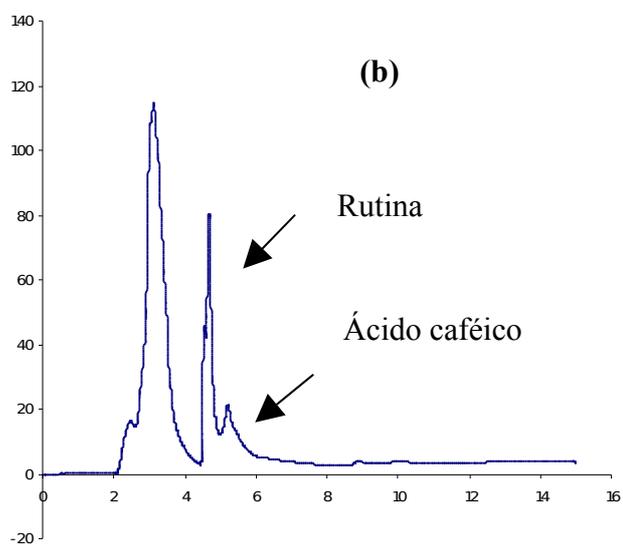
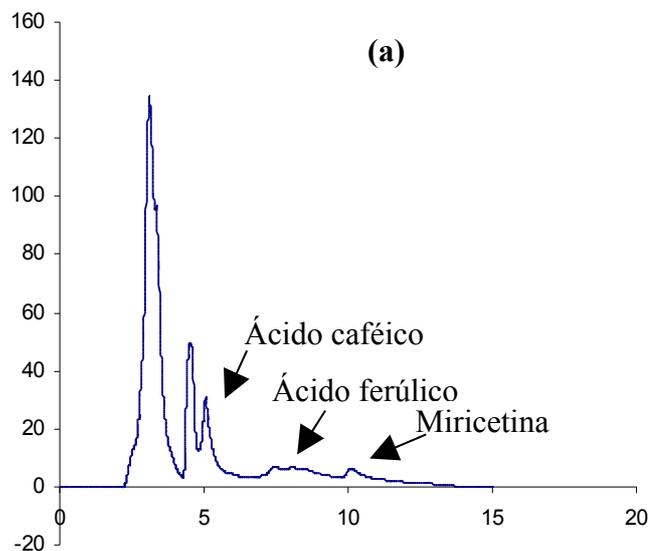
**TABELA 1-** Relação dos compostos fenólicos quantificados e identificados em extrato hidroetanólico de cevada safra 2005 pelos métodos de Folin-Ciocalteu e HPLC (\*nd: composto não detectado).

Cultivar	FT (mg/kg)	RUT (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	MIR (mg/kg)	Σ POLIFEN (mg/kg)
<b>BRS 195</b>	1483,16	26,41	35,59	nd*	nd	61,84
<b>BRS Lagoa</b>	1564,37	76,35	14,57	nd	nd	90,88
<b>BRS Borema</b>	752,50	10,76	51,84	nd	nd	62,53
<b>BRS Mariana</b>	1396,75	78,89	nd	7,78	nd	86,59
<b>BRS Marciana</b>	1019,03	14,69	56,33	5,18	1,91	78,16
<b>BRS 225</b>	1008,26	33,41	4,27	5,72	5,86	49,10
<b>MN 721</b>	1156,00	89,12	74,04	5,34	0,21	168,71
<b>MN 716</b>	1186,45	193,98	29,46	nd	nd	223,44
<b>MN 743</b>	1427,38	334,52	26,07	nd	nd	360,59
<b>MN 698</b>	1137,83	120,59	47,98	2,58	1,47	171,12
<b>MN 610</b>	1084,19	80,00	3,62	0,48	4,74	88,84
<b>PFC 200048</b>	908,13	nd	25,26	0,78	2,33	28,37
<b>PFC 99199</b>	936,24	nd	36,88	nd	nd	36,88
<b>PFC 2001052</b>	1337,55	419,00	37,72	nd	nd	456,72
<b>Embrapa 127</b>	1072,19	12,48	38,50	nd	nd	50,98
<b>Embrapa 128</b>	1121,80	420,50	14,64	nd	nd	435,14

**Legenda:** FT (fenólicos totais quantificados por Folin-Ciocalteu); RUT (rutina); AC (ácido caféico); AF (ácido ferúlico); MIR (miricetina); Σ POLIFEN (somatório dos polifenólicos rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina quantificados por HPLC).

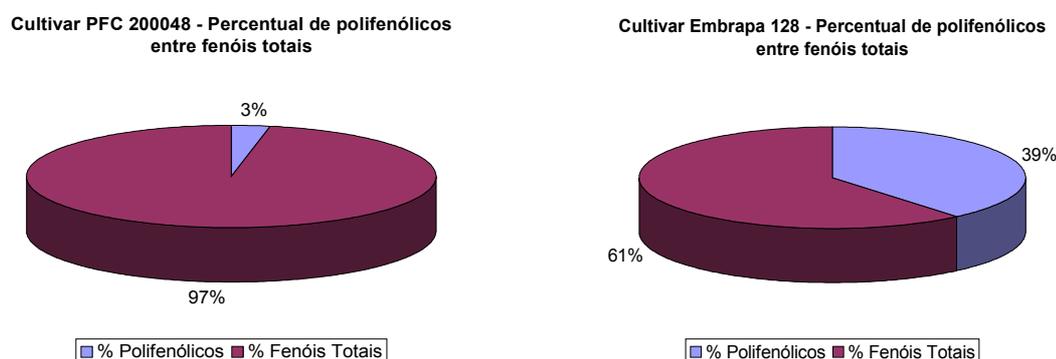
Na quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, foi observado um menor teor na cultivar BRS Borema de 752,50 mg/kg (0,75 mg/g) e um maior teor na MN 743 de 1564,37 mg/kg (1,56 mg/g). Esses resultados estão de acordo com o encontrado em variedades de cevada e malte, registrado em 0,93 a 1,14 mg/g [10], mostrando assim uma correlação positiva com o conteúdo encontrado.

Com relação ao conteúdo de polifenólicos quantificados por HPLC, a cultivar PFC 200048 apresentou o menor conteúdo (28,37 mg/kg - 3%) em relação às demais cultivares. Em contrapartida na Embrapa 128 esse percentual atingiu 39% (435,14 mg/kg) de polifenóis. Na figura 1 observa-se o cromatograma típico dessas cultivares.



**Figura 1** Cromatograma típico do extrato hidroetanólico (80%, v/v) de cevada (12,5%, m/v). Condições cromatográficas: coluna de separação C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm), temperatura de análise 25°C ± 1°C, fase móvel: acetonitrila 30%: água 70%, pH 4,0 ± 0,5 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), vazão 0,5 ml min<sup>-1</sup>, detecção: UV em 254 nm. (a) Cultivar PFC 200048 (b) Cultivar Embrapa 128.

O conteúdo de polifenólicos em relação aos fenóis totais (figura 2) entre as cultivares teria seu conteúdo modificado tendo em vista a identificação de outros compostos que porventura não foram detectados e quantificados pela metodologia de detecção estudada e/ou pelo método extrativo. Compostos fenólicos são instáveis e facilmente oxidáveis. Os derivados do ácido cinâmico podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV [11].



**Figura 2** Teores em percentual dos polifenólicos rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina quantificados por HPLC e fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu nas cultivares PFC 200048 e Embrapa 128.

## Conclusão

O método de HPLC utilizado no estudo dos compostos fenólicos contidos em grãos de cultivares de cevada permitiu a identificação dos polifenólicos rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina em concentrações que variaram de 28,37 a 456,72 mg de polifenólicos/kg de cevada, sendo as cultivares PFC 200048 e PFC 2001052 as que exibiram valores extremos quantificados por HPLC. A rutina foi o composto fenólico identificado e quantificado em maior quantidade por HPLC, com exceção das cultivares BRS 195, BRS Borema, BRS Marciana, PFC 200048, PFC 99199 e Embrapa 127, as quais exibiram uma maior concentração do ácido caféico.

O método de Folin-Ciocalteu quantificou os fenóis totais entre as cultivares com valores entre 752,50 a 1564,37 mg de ácido gálico/kg de cevada, sendo as

cultivares BRS Borema e BRS Lagoa as variedades que quantificaram valores extremos de fenóis totais de 752,50 e 1564,37 mg/kg de cevada, respectivamente.

A partir da metodologia aplicada, pode-se proceder a diferenciação química entre as espécies avaliadas. No entanto, sugere-se a utilização de outras metodologias de detecção e extração visando à identificação de outros compostos que porventura não foram detectados.

### Referências Bibliográficas

[1] V. Exarchou, et al. Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plants extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49 (1):2-8 (2001).

[2] E. R Salka, et al. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:159-174 (2000).

[3] N. Alligiannis, et al. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *J. Agric. Food Chem.* 51:7308-7312 (2003).

[4] L. Pizzale, et al. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onitus* and *O. Indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.* 82:1645-1651(2002).

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

[6] H. Nishino, et al. Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology.* 69 (1): 38-40 (2005).

[7] M. Dvorakova, et al. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, in press.

**[8]** A. S. Bezerra; J. L. Nörnberg; L. M. de Carvalho; M. B. da Rosa; A. Berggrav; L. S. Muller. Determinação de compostos polifenólicos em extratos de cevada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV. In: *Congresso Latino Americano de Cromatografia (COLACRO)*, 2008, Florianópolis. Anais...Florianópolis: COLACRO, 2008. 1 CD-ROM.

**[9]** C.M.M. Souza, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, 30 (2): 351-355 (2007).

**[10]** M. N. Maillard, et al. Antioxidant Activity of Barley and malt: Relationship with Phenolic Content. *Lebensm.-Wiss. U-Techonol.* 29 (3):238-244 (1996).

**[11]** J. C. T. Carvalho; G. Gosmann; E. P. Schenkel. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. cap. 20, p.519-535.

### **ARTIGO 3**

(Configuração conforme normas da Revista Ciência Rural - Anexo 3).

#### **Avaliação de fatores climáticos na concentração de polifenólicos em grãos de cevada**

Assessment of climatic factors in the concentration of polyphenolic in grain of barley

#### **Resumo:**

Este trabalho teve como objetivo quantificar os compostos fenólicos em extrato hidroetanólico de grãos de duas cultivares de cevada (BRS Lagoa e MN 743) em dois anos consecutivos de cultivo (2005 e 2006), avaliando a influência dos fatores climáticos nesse conteúdo. Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e os teores de rutina e ácidos caféico e ferúlico por HPLC em fase reversa. Os resultados mostraram que o conteúdo de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu variou de 0,98 a 1,56 mg/g de cevada e que fatores climáticos durante o período de plantio e colheita influenciaram no conteúdo dos polifenóis. Os compostos fenólicos identificados nessas cultivares foram a rutina que variou de 48,67 a 334,52 mg/kg entre as cultivares, o ácido caféico variando de 3,11 a 50,54 mg/kg e o ácido ferúlico, quantificado somente na BRS Lagoa (2006) em uma concentração de 0,77 mg/kg. A avaliação dos fatores climáticos no conteúdo de compostos fenólicos em cevada é de grande interesse visando sua importância nutricional e recomendação de cultivares com conteúdos expressivos de compostos bioativos.

**Palavras-chave:** condições climáticas, Folin-Ciocalteu, HPLC.

**Abstract:**

This study aimed to quantify the phenolic compounds in hydroethanolic extract of grains of two cultivars of barley (BRS Lagoa and NM 743) in two consecutive years of cultivation (2005 and 2006), assessing the influence of climatic factors such content. The total phenolic compounds were quantified using the Folin-Ciocalteu and the content of rutin and caffeic acid and ferulic reverse-phase HPLC. The results showed that the content of total phenols using the Folin-Ciocalteu ranged from 0.98 to 1.56 mg/g for barley and that climatic factors during the planting and harvesting influenced the content of polyphenols. The phenolic compounds identified in these cultivars were rutin that ranged from 48.67 to 334.52 mg/kg among cultivars, the caffeic acid ranging from 3.11 to 50.54 mg/kg and ferulic acid, measured only in BRS Lagoa (2006) in a concentration of 0.77 mg/kg. The assessment of the climatic factors in the content of phenolic compounds in barley is of great interest seeking their nutritional importance and recommendations of cultivars with expressive content of bioactive compounds.

**Key words:** weather conditions, Folin-Ciocalteu, HPLC.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, evidências indicam os radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis por doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares, entre outros. Todavia, estudos demonstram que o consumo de substâncias antioxidantes naturais na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos gerados por esses compostos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Das diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Estes se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NASCK; SHAHIDI, 2004).

A inibição da peroxidação lipídica e a lipooxigenase desempenhadas por esses compostos, tem um papel importante na neutralização ou no seqüestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

Em grãos de cevada têm sido identificados derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, como o ácido *trans*-ferúlico, encontrado em maior quantidade no grão, seguido dos ácidos *p*-cumarínico e vanílico (MC MURROUGH et al., 1992; SHAHIDI; NACZK, 2003). Os mesmos são conhecidos por atuarem como antioxidantes primários na recepção de radicais livres e interrompendo a reação em cadeia e encontram-se presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão (GOUPY et al., 1999).

Em pesquisas recentes, foram identificados e quantificados em diferentes cultivares de cevada brasileira os compostos polifenólicos rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e quercitrina (BEZERRA et al., 2008) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Conforme reportado por HIRABAYASHI et al. (1995); CHEN et al.

(1995); KNEKT et al. (2002) e RODRIGUES et al. (2003), estes compostos têm exercido efeito cardioprotetor, hipolipídico, hipotensivo, antiviral e anti-inflamatório.

Dessa forma, como parte do estudo sobre a identificação e quantificação dos compostos polifenólicos em cevada e considerando a importância desses compostos como antioxidantes naturais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das condições climáticas (temperatura média anual, índice pluviométrico e insolação) entre as épocas de plantio e colheita na quantificação dos polifenóis pelos métodos de Folin-Ciocalteu e HPLC em extrato hidroetanólico de duas variedades de cevada cultivadas nos anos agrícolas de 2005 e 2006, recomendadas para cultivo no Brasil: MN 743 e BRS Lagoa,

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados grãos integrais de cevada (BRS Lagoa e MN 743) provenientes do Centro de Pesquisas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Passo Fundo, do ano agrícola de 2005 e 2006, cultivadas no Município de Ibiaçá/ Rio Grande do Sul (RS).

A região localiza-se a uma latitude de 28°03'25" e a uma longitude 51°51'17" oeste, estando a uma altitude de 620m. A semeadura foi realizada, mecanicamente sob plantio direto, em Latossolo Vermelho distrófico, no mês de junho e a colheita em outubro. A adubação foi realizada de acordo com a análise química do solo, utilizando-se 250 kg de adubo da fórmula 5-25-20 de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio). O controle de pragas e doenças foi realizado sempre que necessário. A colheita foi mecanizada e, os grãos foram submetidos à secagem em estufa com ventilação a 55° C, para redução do teor de umidade em torno de 13% e, em seguida, foi realizada a limpeza para remoção de impurezas.

Os grãos, previamente secos, foram triturados em micro-moinho a 27.000 rpm, a fim de se obter tamanho de partículas (<1mm) apropriadas para as análises. Logo após este procedimento, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, sob congelamento até o processo extrativo.

Para o preparo dos extratos foram utilizados como solvente água destilada e etanol 95% grau analítico. Acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) (Vetec®) foi usada no preparo da

fase móvel. A água usada nas análises cromatográficas foi água Milli-Q. Rutina, ácido ferúlico, ácido caféico, miricetina e quercitrina dihidratada (Sigma®), em soluções contendo 5,0, 10,0, 15,0 mg/L em metanol foram utilizados como padrões externos. O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck e o ácido gálico da Vetec®.

Os extratos foram preparados em concentrações de 12,5% (m/v) de farinha de cevada misturada em uma solução hidroetanólica (80%, v/v). A mistura foi sonicada durante 30 minutos à temperatura ambiente, filtrada em filtro de papel 12,5mm e em filtro de acetato de celulose 0,45µm. Os extratos foram mantidos a 5°C até o momento da análise. Esta condição experimental foi previamente validada (BEZERRA et al., 2008).

A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo SOUSA et al. (2007), com modificações. As medidas de absorção foram realizadas por meio de espectroscopia na região do visível utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard (HP) UV-Vis com arranjo de diodos. O extrato de cevada (100 µL) foi transferido quantitativamente para um tubo de ensaio no qual foi adicionado 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos foram adicionados 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%). Após 1 h, a absorbância das amostras foi medida a 740 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" etanol: água (80%, v/v) e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,075, 0,15, 0,3, 0,6, 0,9 mg/mL) e expressa como mg de ácido gálico (AG) por grama de cevada. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $C = 1,7833A + 0,0523$ , onde  $C$  é a concentração do ácido gálico,  $A$  é a absorbância a 740 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9999$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As análises de identificação e quantificação foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo Dionex, acoplado com detector UV-Vis (UVD 170U). O software Chromeleon, versão 1997, foi usado para registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. A separação dos flavonóides foi executada usando uma coluna C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm). Os solventes foram desgazeificados em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique). A cromatografia foi realizada à

temperatura de 25°C ±1°C. A eluição foi realizada com acetonitrila 30%: água 70%, pH ajustado em 4,0 ± 0,5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, num fluxo de 0,5 mL/min. Alíquotas de 20 µL das amostras foram injetadas com seringa Hamilton de 1 mL e a detecção dos picos foi registrada em 254 nm. O tempo de análise foi otimizado em 15 minutos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas cultivares analisadas, o menor teor de fenóis totais (FT) foi registrado no extrato hidroetanólico (hidroEtOH) da cultivar MN 743 de 2006 (982,08 mg/kg de cevada) e o maior teor, no extrato hidroEtOH da cultivar BRS Lagoa 2005 (1564,37 mg/kg de cevada). Com relação aos polifenólicos pode-se identificar e quantificar por HPLC os seguintes compostos nesta ordem de eluição: rutina < ácido caféico < ácido ferúlico (tabela 1).

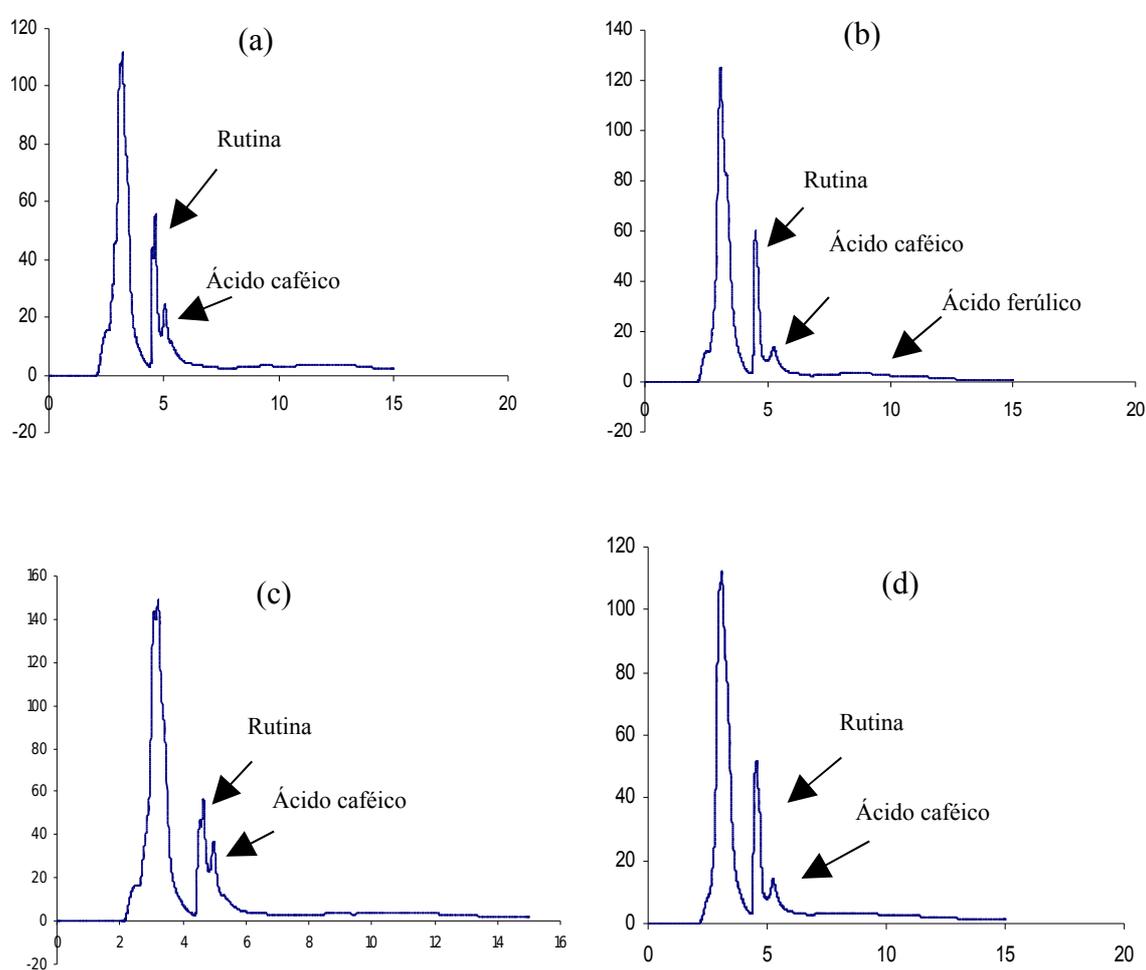
**TABELA 1-** Fenólicos totais expressos em mg de ácido gálico por kg de cevada e polifenólicos identificados expressos em mg por kg de cevada (\*nd:não detectado).

Cultivares	FT (mg/kg)	RUT (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)
<b>BRS LAGOA (2005)</b>	1564,37	76,35	14,57	nd*
<b>BRS LAGOA (2006)</b>	1025,28	48,67	3,11	0,77
<b>MN 743 (2005)</b>	1427,38	334,52	26,07	nd
<b>MN 743 (2006)</b>	982,08	101,93	50,54	nd

**Legenda:** FT (fenóis totais quatificados por Folin-Ciocalteu), RUT (rutina), AC (ácido caféico), AF (ácido ferúlico).

O maior teor de rutina foi registrado na cultivar MN 743 do ano de 2005 em uma concentração de 334,52 mg/kg de cevada, sendo o menor teor registrado na cultivar BRS Lagoa de 2006 com 48,67 mg/kg de cevada. O ácido caféico foi quantificado em maior quantidade na cultivar MN 743 de 2006 com 50,54 mg/kg e o menor teor registrado na cultivar BRS Lagoa de 2006 com 3,11 mg/kg. Já o ácido

ferúlico foi quantificado somente na cultivar BRS Lagoa (2006) em uma concentração de 0,77 mg/kg. De acordo com CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL (2004), os compostos fenólicos são instáveis e facilmente oxidáveis e podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV. Esse fato pode explicar a razão da não detecção e da baixa quantificação do ácido ferúlico nas cultivares, tendo em vista que, este seria o composto encontrado em maior quantidade em grãos de cevada (MAILLARD et al., 1996).



**Figura 1-** Cromatograma típico do extrato hidroetanólico (80%, v/v) de cevada (12,5%, m/v). Condições cromatográficas: coluna de separação C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 µm), temperatura de análise 25°C ±1°C, fase móvel: acetonitrila 30%: água 70%, pH 4,0 ± 0,5 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), vazão 0,5 ml min<sup>-1</sup>, detecção: UV em 254 nm. (a) Cultivar BRS Lagoa 2005 (b) Cultivar BRS Lagoa 2006 (c) Cultivar MN 743 2005 (d) Cultivar MN 743 2006.

Os dados disponibilizados pela EMBRAPA/TRIGO (2008) de Passo Fundo/RS (tabela 2), mostram que nos anos de 2005 e 2006, a insolação em horas durante a época do plantio e colheita da cevada (junho a outubro) foi de 839 horas em 2005 e de 982,6 horas em 2006. A precipitação pluvial foi de 1029,7 mm em 2005 e 655,3 mm em 2006 e a temperatura média de 14,58° C em 2005 e de 15,48° C em 2006.

**TABELA 2-** Temperatura media anual, precipitação pluvial e insolação nos anos de 2005 e 2006.

Ano	Temperatura média (°C)		Precipitação pluvial (mm)		Insolação (horas)	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006
<b>Meses</b>						
<b>Junho</b>	15,6	14,3	273,1	167,5	130,2	169,6
<b>Julho</b>	11,9	14,6	83,7	147,9	216,4	181,4
<b>Agosto</b>	14,9	14	135,4	132,2	187,1	209,4
<b>Setembro</b>	12,6	14,8	152,7	112,8	142,6	192,6
<b>Outubro</b>	17,9	19,7	384,8	94,9	162,7	229,6
<b>Total</b>			<b>1029,7</b>	<b>655,3</b>	<b>839</b>	<b>982,6</b>
<b>Média</b>	<b>14,58</b>	<b>15,48</b>				

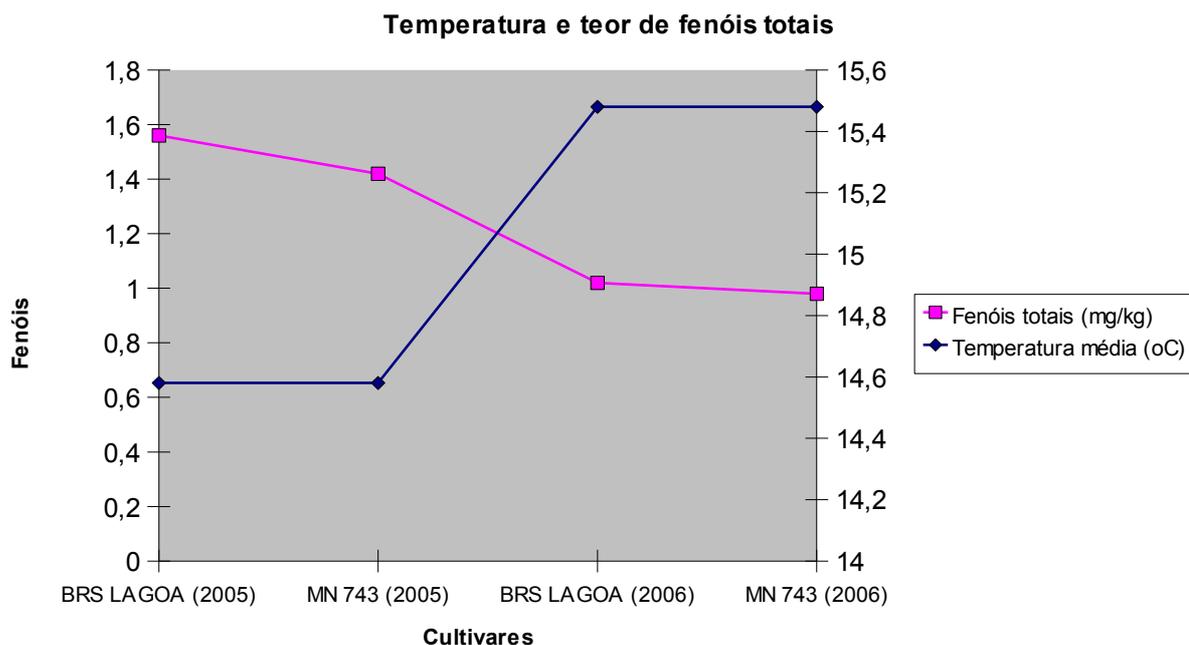
Fonte: EMBRAPA/TRIGO, Passo Fundo, Rio Grande do Sul.

Com relação à variação química de plantas da mesma espécie, parâmetros como clima, radiação solar, nutrição mineral, entre outros, podem interferir no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários como os flavonóides e ácidos fenólicos, conforme reportado por SANTOS & BLATT (1998).

As baixas temperaturas têm influências significantes nos níveis de metabólitos secundários e uma correlação positiva tem sido relatada entre a intensidade e a duração do frio imposto à mudas de milho (*Zea mays*) e a abundância de antocianinas e mRNA (CHRISTIE et al., 1994). A cevada é uma gramínea cerealífera típica de clima frio (KENDALL, 1994), que se adapta bem em temperaturas extremas (STEPHEN & EISENDRATH, 1986) e de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, apresentou uma maior concentração de fenóis totais entre variedades de cevada cultivadas em temperatura média em torno de 14,58° C (figura 2).

As plantas frequentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura, devido ao processo de adaptação da espécie ao seu habitat. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a

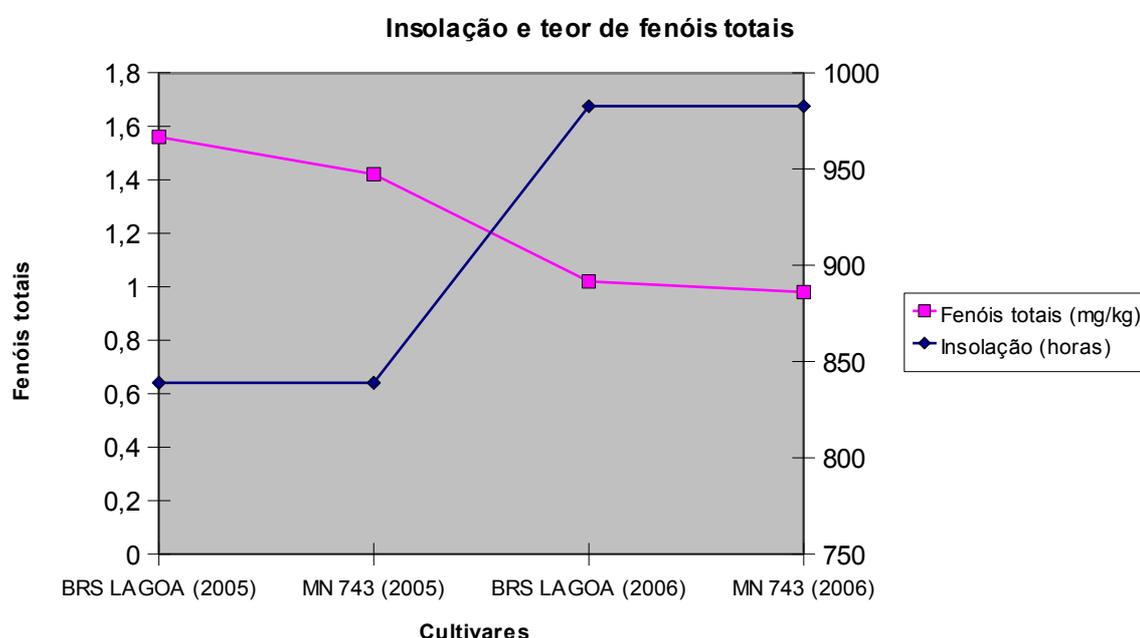
produção de metabólitos secundários. No entanto, pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).



**FIGURA 2-** Temperatura e teor de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu entre as variedades de cevada.

Com relação à radiação ultravioleta, existe uma correlação positiva bem, estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos (WATERMAN & MOLE, 1994), tais como taninos (DUSTIN & COOPER-DRIVER, 1992; DUDT & SHURE, 1994), antocianinas (PARÉ & TUMLINSON, 1997; GRACE et al., 1998; JEONG et al., 2004), flavonóides (MARKHAM et al., 1998; CUADRA et al., 1997; TATTINI et al., 2004), e isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (WATERMAN & MOLE, 1994; ÅLENIUS et al., 1995; GRACE & LOGAN, 2000). Esse fato, no entanto, não se aplica aos taninos e compostos fenólicos simples, os quais

têm absorção máxima em comprimentos de onda consideravelmente mais curtos que os da UV-B, conforme reportado por WATERMAN & MOLE (1994). Nas variedades de cevada, avaliadas no presente trabalho, uma maior insolação (982,6 horas) recebida pela planta durante os períodos de plantio e colheita, refletiu em uma menor concentração de fenóis totais, enquanto que uma menor insolação (839 horas) exibiu uma maior concentração de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu entre as variedades. (figura 3).

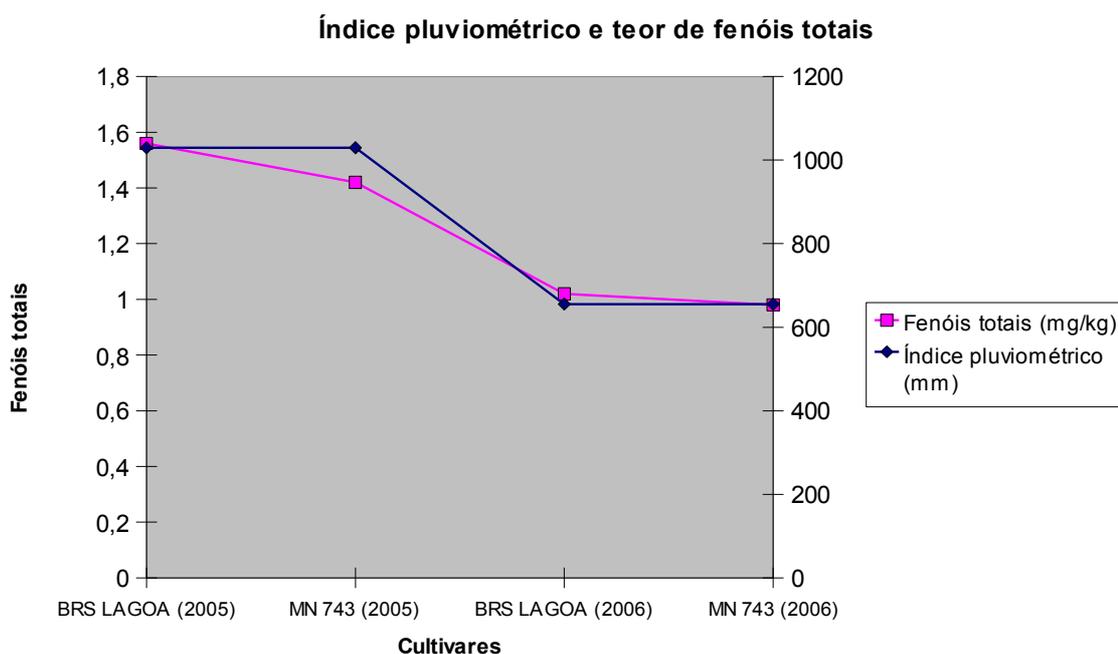


**FIGURA 3-** Insolação e teor de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu entre as variedades de cevada.

Os efeitos da chuva na vegetação também devem ser considerados visto que, conforme observado em estudos com *Hypericum perforatum*, houve um aumento significativo na concentração de flavonóides, hipericinas e ácido clorogênico nas flores sob condições de estresse hídrico; porém, com um decréscimo na concentração de hiperforinas (GRAY et al., 2003).

O estresse hídrico frequentemente tem consequências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que

estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários (GERSHENZON, 1984), como glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos (BLUA et al., 1988), alguns terpenóides (LOKAR et al., 1987), antocianinas (JUNG et al., 2004) alcalóides (HÖFT et al., 1993; BRISKE & CAMP, 1982). Com relação aos metabólitos fenólicos, estudos realizados apresentam resultados conflitantes e parece não ser possível estabelecer uma correlação clara entre sua concentração e estresse osmótico (GOBBO-NETO & NETO, 2007). Nesse trabalho, foi observado que no ano de maior índice pluviométrico, houve uma maior concentração de rutina (334,52 e 76,35 mg/kg) entre as cultivares MN 743 e BRS Lagoa e de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu (1427,38 e 1564,37 mg/kg) (figura 4).



**FIGURA 4-** Índice pluviométrico e teor de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu entre as variedades de cevada.

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados descritos pela literatura e os observados nesse trabalho, conclui-se que, uma menor incidência solar, maior índice pluviométrico e uma menor temperatura média, observados entre as épocas de plantio e colheita da cevada do ano de 2005, foram considerados fatores favoráveis no aumento do conteúdo de fenóis totais quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e do composto fenólico rutina nas cultivares de cevada de diferentes safras agrícolas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte técnico e material recebido nas análises pela equipe do Laboratório de Análises Químicas (Lachem) do Departamento de Química Analítica da Universidade Federal de Santa Maria/RS, em especial ao Professor Leandro Machado de Carvalho e sua equipe e a Embrapa/Trigo de Passo Fundo pela amostras de cevada.

## REFERÊNCIAS

ÅLENIUS, C. M.; VOGELMANN, T. C.; BORNMAN, J. F. A three-dimensional representation of the relationship between penetration of u.v.-B radiation and UV.-screening pigments in leaves of *Brassica napus*. **New Phytol.**, v. 131, n. 3, p. 297-302, **1995**. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03065.x.

BEZERRA, A. S. et al. Determinação de compostos polifenólicos em extratos de cevada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CROMATOLOGRAFIA, **2008**, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COLACRO, 2008. 1 CD-ROM.

BLUA, M. J.; HANSCOM, III Z.; COLLIER, B. D. Glucocapparin variability among four populations of *Isomeris arborea* Nutt. **J. Chem. Ecol.**, v. 14, n. 2, p. 623-633, **1988**.

BRISKE, D. D.; CAMP, B. J. Water stress increases alkaloid concentrations in thread leaf groundsel (*Senecio longilobus*). **Weed Sci.**, v. 30, n. 1, p. 106-108, **1982**.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, **2004**. cap. 20, p.519-535.

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**.

CHRISTIE, P. J.; ALFENITO, M. R.; WALBOT, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways - enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, v. 194, n. 4, p. 541-549, **1994**. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/v5p3r7w027q60678/fulltext.pdf?page=1>>. Acesso em: 12/01/09. doi: 10.1007/BF00714468.

CUADRA, P.; HARBORNE, J. B.; WATERMAN, P. G. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1377-1383, **1997**. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00183-0.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, **2004**.

DUDT, J. F.; SHURE, D. J. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. **Ecology**, v. 75, n. 1, p. 86-98, **1994**.

DUSTIN, C. D.; COOPER-DRIVER, G. A. Changes in phenolic production in the hay-scented fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 20, n. 2, p. 99-106, **1992**.

EMBRAPA/TRIGO, Passo Fundo, Rio Grande do Sul. Disponível em: <[www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/agromet.php](http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/app/principal/agromet.php)>. Acesso em: 10 de nov. 2008.

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: TIMMERMANN, B. N.; STEELINK, C.; LOEWUS, F. A. (Eds.)

**Phytochemical adaptations to stress: recent advances in phytochemistry.** New York: Plenum Press, p. 273–320, **1984**.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, **2007**. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000200026&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000200026&script=sci_arttext&lng=pt)> Acesso em: 12/12/2008. doi: 10.1590/S0100-40422007000200026.

GOUPY, P. et al. Antioxidant composition and activity of barley *Hordeum vulgare* and malt extracts and isolated phenolic compounds. **J Sci Food Agric**, v. 79, n. 12, p.1625-1634, **1999**.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A.; ADAMS III, W. W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant Cell Environ.** V. 21, n. 5, p. 513-521, **1998**. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119116265/PDFSTART>. Acesso em: 12/01/09. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00282.x.

GRAY, D. E.; PALLARDY, S. G.; GARRET, H. E.; ROTTINGHAUS, G. E.; **Planta Med.** **2003**, 69, 1024.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J-Nat-Prod.**, v. 59, n. 2, p. 205-15, **1996**. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np960040%2B>. Acesso em: 02/12/2008. doi: DOI: 10.1021/np960040.

HIRABAYASHI, T. , et al. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo, **Planta Med**, v. 61, n. 3 , p. 221–226, **1995**.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (*Apocynaceae*) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v. 107, n. 2, p. 160-169, **1996**.

JEONG, S. T. et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Sci.**, v. 167, n. 2, p. 247-252, **2004**. doi:10.1016/j.plantsci.2004.03.021.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Sci.**, v. 166, n. 2, p. 459-466, **2004**.

KENDALL, N. T. Barley and Malt. In: **Handbook of Brewing**. Food Science and Technology. Ed. by William A. Hardwick. Marcel Dekker, Inc., p. 109-132, **1994**.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am J Clin Nutr.**, v. 76, n. 3, p. 560-568, **2002**.

LOKAR, L. C. et al. Variation in terpene composition of *Artemisia alba* in relation to environmental conditions, **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 15, n. 3, p. 327-333, **1987**. doi:10.1016/0305-1978(87)90007-X.

MAILLARD, M. N. et al. Antioxidant activity of barley and alt: relationship with phenolic content. **Lebensm.-Wiss. U-Techonol**, v. 29, n. 3, p. 238-244, 1996.

MARKHAM, K. R.; et al. Possible protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p.1913-1919, **1998**. doi:10.1016/S0031-9422(98)00438-5.

MCMURROUGH, I., et al. Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 50, n. 2, p. 67-76, **1992**.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatog. A**, v. 1054, n.1-2, p. 95-111, **2004**. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.059.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. De Novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in Cotton plants. **Plant Physiol.**, v. 114, n. 4, p. 1161-1167, **1997**.

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

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Rev. bras. Bot.**, v. 21, n. 2, p. 135-140, **1998**. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84041998000200004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84041998000200004&script=sci_arttext)> Acesso em: 11/09/08. doi: 10.1590/S0100-84041998000200004.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Ed. CRC Press, **2003**, 576p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, **2002**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v15n1/a08v15n1.pdf>. Acesso em: 01/12/2008. ISSN 1415-5273.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, 351-355, **2007**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf> Acesso em: 02/10/2008. doi: 10.1590/S0100-40422007000200021.

STEPHEN, R. M.; EISENDRATH, B. Technical paper - Understanding cereal crops I wheat, oats, barley and rye (1986.) Disponível em: <<http://sleekfreak.ath.cx:81/3wdev/VITAHTML/SUBLEV/PO1/CEREALS1.HTM>>. Acesso em: 01 de out. 2007.

TATTINI, M. et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytol.**, v.163, n. 3, p. 547-561, **2004**.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**, 1<sup>st</sup> ed., Blackwell Scientific Publications: Oxford, **1994**, cap. 3.

## 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Durante o estudo de caracterização de compostos fenólicos em grãos de diferentes cultivares de cevada, foram identificados e quantificados por HPLC os compostos fenólicos rutina, seguida do ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina. Esses compostos foram detectados no extrato hidroetanólico (80%, v/v) de farinha de cevada a 12,5% (m/v) pelo método extrativo ultra-sônico durante 30 minutos de extração à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Esse solvente foi o mais adequado em virtude de uma maior extração dos fenólicos e pela melhor resolução dos picos cromatográficos.

As cultivares que exibiram a maior quantidade de compostos fenólicos identificados por HPLC foram a Embrapa 128 e PFC 2001048, cujo somatório dos fenólicos rutina e ácido caféico foi quantificado em 435,14 e 456,72 mg/kg, respectivamente. O maior conteúdo de rutina foi detectado na cultivar Embrapa 128 (420,50 mg/kg), de ácido caféico na MN 721 (74,04 mg/kg), de ácido ferúlico na BRS Mariana (7,78 mg/kg) e de miricetina na BRS 225 (5,86 mg/kg).

Os fenóis totais quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu exibiram seus maiores valores nas cultivares BRS Lagoa (1564,37 mg/kg) e MN 743 (1427,38 mg/kg) do ano de 2005. Nesses valores podem estar presentes outros compostos que porventura não foram detectados pelo método extrativo e solvente escolhido durante as análises.

Já na avaliação dos fatores climáticos (temperatura média, índice pluviométrico e insolação) entre as épocas de plantio e colheita das cultivares MN 743 e BRS Lagoa dos anos de 2005 e 2006, pode-se observar que o conteúdo de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu e do flavonóide rutina identificado e quantificado por HPLC foi maior entre as variedades cultivadas no ano de 2005, cuja temperatura média entre o plantio e colheita foi mais baixa, cujo índice pluviométrico foi mais elevado e cuja insolação recebida pela planta foi menor que a observada no ano de 2006. Através desses dados, pode-se concluir que o conteúdo de fenóis totais quantificados por Folin-Ciocalteu e do teor de rutina em cultivares de cevada é influenciado pelos fatores temperatura média, índice pluviométrico e insolação.

Dessa forma, a análise cromatográfica e espectrofotométrica, ambas aplicadas nesse estudo de caracterização de grãos de cultivares de cevada Brasileira foram importantes na identificação de variedades com elevada quantidade de compostos fenólicos, conforme mostra a tabela 2. Esses compostos são importantes para a saúde humana e para a indústria alimentícia, conforme estudos reportados, tendo em vista suas ações como antioxidantes, anticancerígenos, cardioprotetores, antiviral, entre outras.

**TABELA 2-** Conteúdo de polifenóis em grãos de diferentes variedades de cevada ano 2005 e 2006 expressa em mg/g.

CULTIVAR	FT (mg/g)	RUTINA	AC	MIREC	AF	TOTAL AF	HPLC (mg/g)
BRS 195	1,48	0,02	0,03	nd	nd	0,03	0,06
BRS LAGOA (2005)	1,56	0,07	0,01	nd	nd	0,01	0,09
BRS BOREMA	0,75	0,01	0,05	nd	nd	0,05	0,06
BRS MARIANA	1,4	0,07	nd	nd	0,01	0,01	0,08
BRS MARCIANA	1,02	0,01	0,05	0	0,01	0,06	0,07
BRS 225	1,01	0,03	0	0,01	0,01	0,01	0,05
MN 721	1,16	0,08	0,07	0	0,01	0,08	0,16
MN 716	1,19	0,19	0,02	nd	nd	0,02	0,22
MN 743 (2005)	1,43	0,33	0,02	nd	nd	0,02	0,36
MN 698	1,14	0,12	0,04	0	0	0,04	0,17
MN 610	1,08	0,08	0	0	0	0	0,09
PFC 200048	0,91	nd	0,02	0	0	0,02	0,02
PFC 99199	0,94	nd	0,03	nd	nd	0,03	0,03
PFC 2001052	1,34	0,41	0,03	nd	nd	0,03	0,45
EMBRAPA 127	1,07	0,01	0,03	nd	nd	0,03	0,05
EMBRAPA 128	1,12	0,42	0,01	nd	nd	0,01	0,43
BRS LAGOA (2006)	1,03	0,05	0	nd	0	nd	0,05
MN 743 (2006)	0,98	0,1	0,05	nd	nd	nd	0,15

**Legenda:** FT (fenólicos totais quantificados por Folin-Ciocalteu), AC (ácido caféico), MIREC (miricetina), AF (ácido ferúlico), TOTAL AF (somatório dos ácidos fenólicos: ácido caféico e ácido ferúlico), HPLC (somatório dos polifenólicos: rutina, miricetina, ácido ferúlico e ácido caféico encontrados por HPLC).

## 5 CONCLUSÕES

→As metodologias utilizadas (HPLC e Folin-Ciocalteu) permitiram a identificação e quantificação de compostos polifenólicos de diferentes cultivares de cevada;

→observou-se que o método de extração ultra-sônico (30 min) e os solventes etanólico e hidroetanólico, ambos aplicados neste estudo, mostraram-se adequados e eficientes para a análise do extrato de cevada. No entanto, optou-se nas análises pelo solvente hidroetanólico a 80% (m/v) pela maior extração dos compostos detectados;

→os compostos fenólicos identificados entre as cultivares pelo sistema de HPLC em extrato hidroetanólico (80%, m/v) foram a rutina (10,76- 420,50 mg/kg), o ácido caféico (3,11-74,04 mg/kg), o ácido ferúlico (0,48-0,77 mg/kg) e a miricetina (0,21-5,86 mg/kg). No extrato etanólico da cultivar de cevada MN 743 de 2006, foi quantificada a quercitrina (28,10mg/kg), além da rutina (81,7 mg/kg) e do ácido ferúlico (11,7 mg/kg);

→o somatório dos polifenóis identificados e quantificados por HPLC, exibiu o menor valor na cultivar PFC 200048 (28,37 mg/kg) e maiores valores entre as cultivares Embrapa 128 (435,14 mg/kg) e PFC 2001052 (456,72 mg/kg);

→o método de Folin-Ciocalteu, permitiu uma quantificação com relação aos fenóis totais das cultivares de cevada, com teores que variaram de 752,50 a 1564,37 mg/kg de cevada entre as variedades BRS Borema e BRS Lagoa do ano de 2005, respectivamente;

→observou-se que os fatores climáticos (temperatura média, índice pluviométrico e insolação) influenciaram no aumento do conteúdo de fenóis totais e do polifenólico rutina quando as cultivares foram expostas a uma menor insolação, maior índice pluviométrico e a uma menor temperatura média durante as épocas de plantio e colheita;

→diante da carência de informações e estudos a respeito dos compostos antioxidantes em grãos de cultivares de cevada, o presente trabalho contribuiu na geração de um banco de dados frente ao estudo da identificação e quantificação de compostos fenólicos entre as diferentes variedades analisadas

cultivadas no Brasil e na validação de uma metodologia de extração capaz de detectar diferentes polifenóis entre as mesmas;

→no entanto, sugere-se mais estudos para se avaliar a utilização de outras metodologias de detecção e extração, visando contribuir para a identificação de outros compostos que porventura não foram detectados e na avaliação dos fatores climáticos no conteúdo de compostos fenólicos em espécies de cevada Brasileira.

## 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.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

BABY, A. R. et al. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.

BABY, A. R. **Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

BEZERRA, A. S. et al. Determinação de Polifenóis Totais em cultivares de Cevada recomendadas para cultivo no Brasil. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA 2008, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2008. 1 CD-ROM.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BINNECK, E. et al. Padrões eletroforéticos de hordeínas e isoenzimas para identificação de cultivares de cevada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 312-321, 2002.

BONOLI, M. et al. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours. Evaluation of extraction capability of different solvent mixtures and

pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1/2, p. 1-12, 2004.

BONOLI, M. et al. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5195-5200, 2004.

BORS, W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355, 1990.

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

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1991, 594 p.

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.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Journal Lancet**, v. 344, n. 8926, p.862-863, 1994.

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.

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

COTELLE, N. et al. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 3, p. 211-219, 1992.

DANILA, A. M. et al. Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1139-1143, 2007.

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.

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.

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.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LCT, 2005, 876 p.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al. Determination of antioxidants in edible grain derivatives from the Canary Islands by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 105-111, 2005.

HIRABAYASHI, T. et al. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo, **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 221-226, 1995.

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.

HOLTEKJØLEN, A. K.; KINITZ, C.; KNUTSEN, S. H. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2253-2260, 2006.

HOU, W. C. et al. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. **Phytomedicine: international Journal of Phytoterapy and Phytopharmacology**, v. 10, n. 2-3, p. 170-175, 2003.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p.1811-1815, 2003.

KENDALL, N. T. Barley and Malt. In: **Handbook of Brewing**. Food Science and Tecnology. Ed. by William A. Hardwick. Marcel Dekker, Inc., p. 109-132, 1994.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v.16, n.3, p.305-314, 2003.

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

MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. **American Society for Horticultural Science**, v. 26, n. 1, p. 10-14, 1991.

MANCINI-FILHO, J. et al. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*, Breyne) extracts. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.137, n. 11, p. 443-447, 1998.

MANCINI-FILHO, J. et al. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (supl.), p. 195-199, 2003.

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

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.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Composição química de grãos crus de cultivares de *coffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et br. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 413-419, 2007.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n.1, p. 1/11, 2002.

MEYRE-SILVA, C. et al. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae) **Zeitschrift für Naturforschung. C. A Journal of biosciences**, Tübingen, v. 56, n. 11/12, p. 939-942, jan./feb. 2001.

METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.41, n. 5, p.1067-1075, 1997.

MINELLA, Euclides. Cevada brasileira: situação & perspectivas. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co2t1.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co2t1.htm)>. Acesso em: 17 jun. 2006.

MOLINA-CANO, J. L. et al. Genetic and environmental variation in malting and feed Quality of barley. **Journal of Cereal Science**, v. 25, n. 1, p.37-47, 1995.

MUCHERONI, E. Disponível em: <F:\Apócrifos & Religião - Cevada.mht>. Acesso em: 23 de mar. 2006.

MUÑOZ, O. et al. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 848-851, 2007 .

MUSCI, I.; GYULAI, Z.; BELADI, I. Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpes viruses in cell cultures. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 39, n. 2, p. 137-147, 1992.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

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.

NÖTHLINGS, U. et al. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 8, p. 924–931, 2007.

NOVOA, B. E. et al. Quercitrin, a flavonoid with hypotensive activity obtained from *Croton glabellus*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmaceuticas**, v. 4, n. 2, p. 7-14, 1985.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 8, p. 344-350, 2005.

OSCARSSON, M. et al. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. **Journal of Cereal Science**, v. 24, n. 2, p.161-170, 1996.

OSZMIANSKI J, et al. Antioxidant tannins from *Rosaceae* plant roots. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 579-583, 2007.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n.5, p.289-297, 1997.

POURCHET-CAMPOS, M. A. Perspectivas do uso de aditivos em alimentos: os antioxidantes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3-4, p.90-98, 1990.

PubChem Publi Chemical Database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 14 de mai. 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 15-20, 2006.

RAMÍREZ, B. G. **Absorción *in vivo* de oligômeros de epicatequina**, Tarragona, 2005. 254f. Tese (Doctorado en Bioquímica) – Universitat Rovira/Virgill, Tarragona, 2005.

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.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SANCHEZ DE MEDINA, F. et al. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 2, p. 771-779, 1996.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995, 331 p.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Florianópolis, Porto Alegre: Editora da UFSC; Editora da UFRGS, 2003, 821 p.

SIMONI, V.; MENA, F. Discriminación de cultivares de cebada por electroforesis capilar. Publicaciones IACA Laboratórios - Cebadas Cerveceras. Disponível em: <<http://www.iaca.com.ar/cebadascerveceras.htm>>. Acesso em: 11 de out. 2006.

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

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA E SILVA, M. B (2005). Flavonóides com capacidade antioxidante. Disponível em:<<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos%20DI%20PDF/Artigo%20Marisa.pdf>> Acesso em: 04 de nov. 2008.

STEPHEN, R. M.; EISENDRATH, B. Technical paper - Understanding cereal crops I wheat, oats, barley and rye, 1986. Disponível em: <<http://sleekfreak.ath.cx:81/3wdev/VITAHTML/SUBLEV/PO1/CEREALS1.HTM>>. Acesso em: 01 de out. 2007.

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.

TOMEI, R. R., SALVADOR, M. J. Disponível em: <[http://www.inicepg.univap.br/INIC\\_07/trabalhos/saude/epg/EPG00322\\_01C.pdf](http://www.inicepg.univap.br/INIC_07/trabalhos/saude/epg/EPG00322_01C.pdf)> Acesso em: 02 de fev. 2009.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

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.

VANCINI, R. L et al. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. Disponível em: <<http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf>> Acesso em: 02 de fev. 2009.

VERZA, S. G. et al. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VICENZO, R. Tópicos avançados em alimentos II – Bebidas. Universidade do Noroeste do Estado do RS (UNIJUÍ). Disponível em: <[http://www.sinpro-rs.org.br/paginasPessoais/layout2/..%5Carquivos%5CProf\\_394%5CAPOSTILA%20TECNOLOGIA%20DE%20ALIMENTOS\\_NUTRI%C3%87AO.pdf](http://www.sinpro-rs.org.br/paginasPessoais/layout2/..%5Carquivos%5CProf_394%5CAPOSTILA%20TECNOLOGIA%20DE%20ALIMENTOS_NUTRI%C3%87AO.pdf)>. Acesso em: 26 de set. 2007.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G. Determinação de ácidos carboxílicos e Fenólicos em café solúvel utilizando HPLC/DAD. **Revista Analytica**, n. 27, p. 76-79, 2007.

WANASUNDARA U.; AMAROWICZ R.; SHAHIDI F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p.1285-1290, 1994.

WHITTLE N. et al. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 105, n. 2, p. 89-99, 1999.

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.

YAGI, K.; OHISHI, N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 25, n. 2, p. 127-130, 1979.

YALÇIN, E. et al. Effects of genotype and environment on  $\beta$ -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.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n.2, p.201-210, 1997.

## ANEXO 1 – Manual de publicação da Revista Química Nova

**GERAL:** Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

**Artigos Originais** (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Artigos de Revisão** destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

***É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.***

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

**Artigos sobre Educação** (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Notas Técnicas** (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios

desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

**Assuntos Gerais** (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

**PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS** - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato .pdf, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de QN. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (\*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (gráficos, esquemas, etc) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm)

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. No texto, deverá ser indicada apenas indicar a inserção de cada um(a).

## REFERÊNCIAS

### *Revistas:*

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473. *Patentes:*

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771 1979*. (CA 91:P193174v)

Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988*. (CA 110:P23729y)

Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3, 1999*.

*Livros:*

Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*;

Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

*Programas de computação (Softwares):*

Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

*Teses:*

Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

*Material apresentado em Congressos:*

Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

*Páginas Internet:*

<http://jbcs.sbq.org.br>, acessada em Junho 2001.

*Material não publicado:*

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em Q.N. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

**SUBMISSÃO DOS ARTIGOS** - A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a **submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato PDF**. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, **sendo obrigatória** a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

**Material Suplementar** - Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. **Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.**

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

**MANUSCRITOS REVISADOS** - Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de **prazo máximo** de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

**VERSÃO FINAL** - Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato .pdf não são mais solicitados nessa fase.

**Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.**

*A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.*

**Copyright © 2008 Sociedade Brasileira de Química**

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.

## **ANEXO 2 – Manual de publicação do Journal of Chromatography Science**

Subject links within this page:

Scope | Languages | Submission of Manuscripts | Form and Style | Review Procedure | Notification | Requests for Revision | Author's Proofs | Publication Time | Chromatography Problem Solving & Troubleshooting | Copyrights

### Scope

The **Journal of Chromatographic Science** is devoted to the dissemination of information concerning all methods of chromatographic analysis. The standard manuscript is a description of recent original research that covers any or all phases of a specific separation problem, principle, or method. In addition to regular research papers, "Technical Notes" are published. These are brief disclosures of new chromatographic concepts or practices or brief descriptions of novel apparatuses or techniques. "Expedited Papers" are those determined by our reviewers to be of interest to most chromatographers and requiring minimal revision. They are published in the next available issue. General comments on the content of the **Journal** are appropriate for "Letters to the Editor," as are comments on the work of specific authors, in which case the authors will be allowed to reply. The editors encourage readers to communicate questions and criticisms inspired by the **Journal**.

Back to the top

### Languages

The **Journal** accepts manuscripts in English only.

### Submission of Manuscripts

**The Journal of Chromatographic Science** prefers to receive all manuscript submissions electronically. To submit a manuscript, please follow the instructions below:

**Getting Started :Please print out this page for future reference.**

1. Launch your web browser (Internet Explorer 5 or higher or Netscape 6 or higher) and go to the **JCS** Manuscript Central homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/jcs>).

2. Log-in or click the “Create Account” option if you are a first-time user of Manuscript Central.

3. If you are creating a new account:

After clicking on “Create Account” enter your name and e-mail information and click “Next”. Your e-mail information is very important.

Enter your institution and address information as prompted then click “Next.”

Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID) and then select your area of expertise. Click “Finish” when done.

4. Log-in and select “Author Center.”

Submitting Your Manuscript

5. After you have logged in, click the “Submit a Manuscript” link in the menu bar.

6. Enter data and answer questions as prompted

7. Click on the “Next” button on each screen to save your work and advance to the next screen.

8. You will be prompted to upload your files:

Click on the “Browse” button and locate the file on your computer.

Select the description of the file in the drop down next to the Browse button.

When you have selected all files you wish to upload, click the “Upload” button.

a. **NOTE:** you have a limit of 100 MB combined for all files you upload.

9. Review your submission (in both PDF and HTML formats) before sending to the Editors. Click the “Submit” button when you are done reviewing.

You may stop a submission at any phase and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation via e-mail. You can also log-on to Manuscript Central any time to check the status of your manuscript. The Editors will inform you via e-mail once a decision has been made.

Authors who are unable to submit their manuscripts electronically may call or write to: Managing Editor, **Journal of Chromatographic Science**, Post Office Box 48312, Niles, Illinois 60714, U.S.A; phone (847) 647-2900 ext. 1300; fax (847) 647-1155; e-mail [manage.ed@j-chrom-sci.com](mailto:manage.ed@j-chrom-sci.com). Regardless of online author participation, all submissions will be processed using the JCS manuscript central website. Unless otherwise requested, editorial correspondence will be directed to the person who submitted the manuscript, whether or not this is the first author. Submission implies

that the material has not been published in, or submitted to, any other **journal**. Previous oral presentation should be mentioned in the Acknowledgment section.

Back to the top

### Form and Style

The American Chemical Society's ACS Style Guide is generally used to determine spelling, hyphenation, style, usage, and abbreviation. Standardized, universally recognized terms and abbreviations should be used. Special nomenclature should be defined at the point of first use or listed in an appendix. Use consistent, SI-recommended units of measurement and give definitions for all terms. Define trade names and special symbols.

### Abstract

Abstracts are required for all manuscripts. State the objectives of the study, the techniques used, and what was accomplished. The length should reflect the content of the manuscript, but should not exceed 200 words. Present tense should be used throughout the abstract.

### Text

Consult the publication for general format. Indicate sections with side headings. Keep all information pertinent to a particular section—e.g., do not present results in the Experimental section. Avoid repetition. Do not use footnotes for descriptive or explanatory information that can be incorporated into the text. Equipment and methods should be described in sufficient detail to permit other chromatographers to duplicate the results, but information that is common knowledge to others in the field should not be included.

### Figures

Figures All figures should be cited in order in the text. Figures will be reproduced in the **Journal** exactly as submitted and must be professionally rendered original drawings or sharp, glossy prints. If structures are given in the manuscript, original drawings must be provided. All lines, lettering, and numbering must be sharp and unbroken. Use black text for all letters, numbers, and symbols. Do not use a typewriter to letter illustrations. Dot matrix printing is also unacceptable. Illustrations should be designed to fit the width of one journal column (8.3 cm). The width of original drawings should be twice the final published size to allow for 50% reduction. Letters and symbols should be approximately 4-mm tall on the original art. See the The ACS Style Guide for more detailed information on the preparation of figures. All

graphs, diagrams, chromatograms, and photographs must be numbered consecutively on the front with Arabic numerals in the order of citation. Include all figure legends together on a separate page.

#### Tables

Prepare tables in a consistent form, each appropriately titled and numbered consecutively with Roman numerals in the order of citation in the text. Type each table on a separate page, and collate at the end of the text in front of the figures.

#### Equations

Number equations consecutively using Arabic numerals. Place superscripts and subscripts accurately, indicate capital letters and italics, and distinguish between characters that may be confused—e.g., number one and lower-case “L” or zero and upper-case “O”. Avoid superscripts that may be confused with exponents. Variables should be in italics.

#### References

All references should appear at the end of the paper and should be cited in numerical order in the text. Reference numbers in the text should be enclosed within parentheses and placed on the line. Descriptive or explanatory (footnote) material is not given a reference number. Use abbreviations as given in *The ACS Style Guide* or the *International Serials Catalogue*. Include titles with all journal articles. The following are forms and examples for citing references:

- **Journals:** first author’s initials followed by the last name; additional authors (listed as they appear in the original work) with initials followed by last names; title of article without quotation marks, only the first letter of the first word capitalized; abbreviated title of journal, underscored for italics; volume number, followed by a colon; beginning and ending page numbers; and year of publication in parentheses.

#### Example:

19. K. Jinno and M. Kuwajima. Microcomputer-assisted liquid chromatographic separation system: application to toxic compounds identification in poisoned human fluids. *J. Chromatogr. Sci.* 27: 57–62 (1989).

- **Books:** first author’s initials followed by the last name; additional authors; title of book, underscored for italics; volume and/or edition number; editor’s initials followed by last name and the abbreviation Ed. publisher; city and state or country of publication; year of publication; and page numbers or chapter.

#### Example:

22. L.R. Snyder and J.J. Kirkland. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed. R.H. Thompson, A.S. Pereira, and N.D. Meyer, Eds. John Wiley & Sons, New York, NY, 1980, pp. 143–44.

- **Unpublished works:** This type of reference includes material “in press” (that is, formally accepted for publication), theses, and dissertations. Do not include material submitted for publication but not formally accepted.

**Example:**

8. E.J. Levy and J.Q. Walker. Model molecular thermometer: a standardization method, Part II. *J. Chromatogr. Sci.*, in press.

- **Patents:** initials and last name of person who applied for the patent; country where application was filed; patent number; and year in parentheses.

**Example:**

1. S.T. Preston, U.S. Patent 123456 (1987).

[Back to the top](#)

## Review Procedure

All submissions except those sent as “Letters to the Editor” are subject to review by two or more independent reviewers selected by the editor(s). Authors may suggest reviewers. The reviewers are asked to indicate the paper’s degree of interest to **JCS** readers and whether the manuscript should be published without change; with major or minor revision; or not at all. A request for a revised re-submission of a rejected manuscript may also be made by the editor.

## Notification

Manuscripts are acknowledged upon receipt. Each author is kept informed of delays in the review process and receives formal notification of the status of his or her submission after reviewers have commented upon it. If a manuscript is deemed unsuitable for publication, the author will be promptly notified and the original copy of the paper returned. The author of an accepted manuscript is notified of the schedule for publication and the approximate date galley proofs will be mailed.

[Back to the top](#)

## Requests for Revision

Authors are often asked to submit revised manuscripts incorporating the suggestions and recommendations of the reviewers. The editors reserve the right to submit a revision to the original reviewers for approval before accepting it for publication. Changes made in accordance with the reviewers, as well as reasons for not

incorporating suggestions, should be outlined in detail in the cover letter accompanying the revised manuscript.

#### Author's Proofs

Preliminary page proofs are sent to the corresponding authors. The author should correct only typographical or factual errors and fax, email, or telephone his or her corrections (or approval to publish without corrections) by the deadline date, which is usually 3 to 5 days after receipt of proofs. Failure to respond will delay publication of the article. Final page proofs are not customarily sent to the authors. Responsibility for accuracy of the published manuscript lies solely with the author.

#### Page Charges

There are no page charges. Authors receive complimentary copies of the issues in which their articles appear. Reprints, in quantities of 100 or more, can also be purchased through the **Journal**.

Back to the top

#### Publication Time

Manuscripts requiring only minor revision may be published within six months of submission. The average time before publication is two months after a manuscript or its revision is deemed acceptable. If possible, manuscripts accepted as "Expedited Papers" are published within eight weeks.

#### Chromatography Problem Solving and Troubleshooting

The editors welcome questions from readers regarding equipment and application techniques. Questions should be sent to Managing Editor, **Journal of Chromatographic Science**, P.O. Box 48312, Niles, IL 60714; or e-mailed to [manage.ed@j-chrom-sci.com](mailto:manage.ed@j-chrom-sci.com), and should include a name and affiliation.

#### Copyright

The **Journal** secures copyright protection on each issue, and any reproduction of articles or parts thereof requires publisher's permission as well as the authors'. As a matter of policy, the **Journal** generally grants written permission to reproduce illustrations and/or parts of articles. However, printing or photocopying of any substantial part of the **Journal** requires compensation.

**For more information**, call or write: Managing Editor, **Journal of Chromatographic Science** P.O. Box 48312 Niles, IL 60714 phone (847) 647-2900 ext. 1300 fax (847) 647-1155 [www.j-chrom-sci.com](http://www.j-chrom-sci.com)

## ANEXO 3 – Manual de publicação da Revista Ciência Rural

### Diretrizes para Autores

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

**2.** Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica editados em Word, idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 28 linhas em espaço duplo, as margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações**. Cada **figura e ilustração** deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página (cada tabela também constituirá uma página). **Ciência Rural não aceita mais trabalhos com tabelas, gráficos e figuras no formato paisagem devido dificuldades de formatação mas principalmente pela péssima visualização que as mesmas apresentam no trabalho final.**

**3.** O **artigo científico** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso deve aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

**4.** A **revisão bibliográfica** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes

das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

**5.** A **nota** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista ([www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr)).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

**9.1.** Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo: MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, nov. 2008 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

**9.5.** Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

**9.6.** Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

**9.7. Boletim:**

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

**9.8. Informação verbal:**

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

**9.9. Documentos eletrônicos:**

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital**, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadros. **As figuras devem ser enviadas à parte**, cada uma sendo considerada uma página. **Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser**

**feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff.** As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**12.** Será **obrigatório** o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados.

**13.** Lista de verificação (Checklist .pdf ou .doc).

**14.** A taxa de **tramitação** é de US\$ 15,00 (dólares) e a de **publicação** de US\$ 20,00 (dólares) por página impressa. **Os pagamentos deverão ser feitos em reais (R\$), de acordo com a taxa de câmbio comercial do dia.** Essas taxas deverão ser pagas no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250945-8 em nome da FATECIENS - Projeto 96945. Os pagamentos poderão ser por cartão de crédito VISA (.pdf ou .doc) ou ainda por solicitação de fatura (.pdf ou .doc). **A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação,** podendo ser enviada via fax (55 32208695), ou anexando o comprovante de depósito bancário escaneado ou ainda enviado por email (cienciarural@mail.ufsm.br) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura). A taxa de tramitação é obrigatória para todos os trabalhos, independentemente do autor ser assinante da Revista. **A taxa de publicação somente deverá ser paga (e o comprovante anexado) após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores.** Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de US\$ 120,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página. Este pagamento também deverá ser realizado até a publicação do artigo rubricado obedecendo uma das formas previamente mencionadas.

**15.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

## **Itens de Verificação para Submissão**

### **1) Quanto ao artigo**

O trabalho é original?

O trabalho representa uma contribuição científica para a área de Ciências Agrárias?

O trabalho está sendo enviado com exclusividade para a Ciência Rural?

O idioma usado está de acordo com as normas?

As normas da revista foram seguidas rigorosamente (lembre-se que caso as mesmas não tenham sido seguidas seu trabalho não irá tramitar. Retarde o envio mais alguns dias, mas confira as normas várias vezes e, principalmente, visite modelos de trabalhos (artigo, nota ou revisão) na página da revista [www.ufsm.br/ccr/revista](http://www.ufsm.br/ccr/revista). Existem também trabalhos que já foram publicados que podem ser visitados. Lembre-se, os mesmos estão disponíveis com acesso sem custos no site do SCIELO ([www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr)). A lista foi elaborada com base nas normas da revista. São perguntas diretas. Respostas **AFIRMATIVAS** estabelecem uma concordância com as normas possibilitando que o trabalho seja enviado à revista.

### **2) Quanto ao arquivo**

O arquivo deverá estar formatado com o tamanho de folha A4 (210x297mm), com margens superior, inferior, direita e esquerda de 2,5cm não devendo ultrapassar 28 linhas por página (as tabelas e figuras não devem ultrapassar as margens da página). Tabelas devem ser enviada junto com o artigo texto após as referências.

O trabalho está de acordo com as normas da revista, 20 páginas para revisão, 15 para artigo científico e 8 para nota (o texto não está em colunas, lembre-se cada figura ou tabela será uma página, o equivalente a uma lauda)?

Todas as páginas estão numeradas, inclusive a primeira, preferencialmente no canto inferior direito?

O nome dos autores está por extenso (ex.: Venancio Aires Cruz e não V. A. CRUZ.)? O endereço do autor de correspondência está completo (inclusive Cep e e-mail)?

Todas as afiliações estão corretamente identificadas, o departamento, a instituição, a cidade o estado e o país para todos os autores? Veja modelos (artigo, nota e revisões).

O arquivo para submissão está em ".doc" e com tamanho inferior a 2MB? As tabelas estão no arquivo ".doc"?

Os gráficos e figuras estão em extensão ".tiff" e com tamanho inferior a 2MB?

### **3) Quanto as referências, taxa de tramitação e termo de compromisso**

Todas as referências citadas ao longo do texto estão corretamente descritas, conforme as normas da Ciência Rural, e aparecem listadas (grande parte dos trabalhos enviados apresentam problemas no referido item e a aprovação é retardada por isso retenha o trabalho por mais alguns dias e confira as mesmas por duas ou mais vezes)? A taxa de tramitação do trabalho foi enviada? Vide normas da revista. O envio da taxa de tramitação pode ser por documento anexado, correio ou fax. Vide normas

### **4) Quanto as normas**

O trabalho está nas normas? Caso seja verificado pela Revista que o trabalho não foi preparado conforme as normas, o mesmo será rejeitado. Para uma reapresentação do trabalho outra taxa de submissão precisará ser paga.

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Avenida Roraima, 1000  
Prédio 42, Sala 3104  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.