CRISTINA TOSTES FILGUEIRAS

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

Londrina
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

CRISTINA TOSTES FILGUEIRAS

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof[a]. Dra. Elza Iouko Ida

Londrina
2009

CRISTINA TOSTES FILGUEIRAS

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof[a]. Dra. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina

_____

Prof[a]. Dra. Helena Teixeira Godoy
Universidade Estadual de Campinas

_____

Prof. Dr. Jesui Visentainer
Universidade Estadual de Maringá

_____

Prof[a]. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina

_____

Prof[a]. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 08 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Délcia e Sebastião,

Elementos essenciais em minha vida.

Meus exemplos de vida e amor.

À minha segunda mãe Quiqui e minha madrinha Glorinha,

Apoios fundamentais e inesquecíveis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Elza Iouko Ida pela dedicação e competência na orientação deste trabalho e pela amizade e incansável estímulo no decorrer da minha formação Doutoral.

À Fundação CAPES/MEC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Educação), pela concessão da bolsa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Professores Dr. Massami Shimokomaki, Dra. Rúbia Casagrande, Dra. Marcela Maria Baracat e Dra. Adriana Lourenço Soares, pela colaboração, incentivo e sugestões valiosas.

Aos docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta Instituição, pelos conhecimentos transmitidos e atenção dispensada.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta Instituição e a todos os seus funcionários, pelo apoio.

Aos estagiários de iniciação científica Ana Carolina de Souza, Estéfano Nakamura, Cristiano Barducci de Franca, Lucas Varéa Pereira, Pedro Paulo de Almeida Paccola que me apoiaram na execução deste trabalho e pela amizade.

Aos amigos e colegas do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, especialmente Cristiane Canan, Michele Rosset, Denis Marchi, Fernanda Delaroza, Cassiana Kissel, Nádia Steinmacher e Suellen Jensen, pela amizade e especial colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas irmãs Maria Amélia e Andréia, aos meus sobrinhos Ana Luísa, Laura e Pedro e também aos meus cunhados Celso e Sérgio pelo apoio, incentivo e carinhos constantes.

A todos que me apoiaram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

FILGUEIRAS, Cristina Tostes. **Extração**, **purificação e avaliação da propriedade antioxidante do ácido fítico do germe de milho.** 2009. 137p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR, 2009.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver o processo de obtenção do ácido fítico do germe de milho desengordurado e avaliar o seu potencial antioxidante *in vitro* e em carnes de frango armazenadas sob refrigeração. O desempenho do método de quantificação do ácido fítico foi assegurado pela ótima precisão com baixo coeficiente de variação e exatidão, especificidade, linearidade, robustez e baixo limite de detecção e quantificação. A eficiência da estratégia do processo de obtenção de ácido fítico foi avaliada após extração com HCl 0,8mol/L (1:5 peso/volume), centrifugação, etapas de precipitação e secagem. O ácido fítico obtido em pó apresentou rendimento de 67,01± 0,73% e grau de pureza de 85,41± 0,95%. O teor de fósforo total e fítico foram de 15,16 ± 1,58 g/100g e 15,05 ± 0,00 g/100g, respectivamente e o teor de proteínas foi de 0,24 ± 0,03 g/100g. O elevado teor de magnésio, sódio e potássio no ácido fítico obtido sugere a sua predominância na forma de seus respectivos fitatos. O ácido fítico obtido foi totalmente solúvel em pH 0,6 e 2,0 e apresentou 76,13% de solubilidade em pH 7,0. O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho foi confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais, por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. A atividade de seqüestro do radical hidroxil foi dependente da concentração do ácido fítico do germe de milho. Na concentração de 130,5 µM de ácido fítico do germe de milho, a atividade antioxidante máxima de seqüestro do radical hidroxil foi de 29,3%, enquanto que para o ácido fítico padrão, na concentração de 33,2 µM, a máxima atividade foi de 18,2%. A atividade quelante para o Fe^{+2} aumentou com elevação da concentração do ácido fítico obtido do germe de milho e com o tempo de contato com o Fe^{+2}. O potencial antioxidante do ácido fítico obtido foi confirmado pela aplicação em carnes de frango armazenadas sob refrigeração no qual inibiu a peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ferro, a oxidação lipídica, o desenvolvimento de aroma de requentado e formação de metamioglobina.

Palavras-chave: ácido fítico, germe de milho, purificação, antioxidante, peroxidação lipídica.

FILGUEIRAS, Cristina Tostes. **Corn germ phytic acid extraction, purification and evaluation of antioxidant potencial.** 2009. 137p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR, 2009.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a process of purifying phytic acid from defatted corn germ and to assess their antioxidant potential in chicken meat stored under refrigeration. The performance of determination method of phytic acid was demonstrated by high precision and accuracy with low coefficient of variation, high specificity, linearity, robustness and minimum limit of detection of 0.19 ug/mL and quantification of 0.58 ug/mL. The efficiency of process of purifying phytic acid was measured after extraction with HCl 0.8 mol/L, centrifugation, precipitation and drying steps. The purified phytic acid powder had a processing yield of 67.01±0.73% and purity index of 85.4±0.95%. The content of total phosphorus and phytic phosphorus was 15.16±1.58 g/100g and 15.05±0.00 g/100g, respectively and the protein content was 0.24±0.03 g/100g. The high content of magnesium, sodium and potassium in phytic acid suggests their predominance in the form of their phytates. The purified phytic acid was completely soluble at pH 0.6 and 2.0 and showed 76.13% of solubility at pH 7.0. The purified corn germ phytic acid antioxidant potential was evaluated through the deoxyribose, bathophenanthroline and $DPPH^{\bullet}$ assays. The bathophenanthroline assays revealed that the chelation activity towards Fe^{2+} increased concurrently with the increase of obtained phytic acid concentration and its Fe^{2+} contact time. The $DPPH^{\bullet}$ assay showed that purified phytic acid did not present electron-donating capacity to $DPPH^{\bullet}$. The purified phytic acid from corn germ and phytic acid standard showed a strong inhibitory activity of lipid peroxidation *in vitro* with IC_{50} of 1.66 mg/mL and 0.79 mg/mL, respectively. It was observed that the chelating activity towards Fe^{2+} increased proportionally to the increase of corn germ phytic acid concentration and thus inhibiting the formation of metamioglobin stabilizing consequently the thigh meat color. The antioxidant activity was also observed in meat warmed over flavor development. Finally, the efficiency of the antioxidant activity of phytic acid from corn germ was confirmed by inhibition of lipid oxidation, the development of warmed over flavor and formation of metamioglobin in refrigerated thigh chicken meat.

Key words: phytic acid, corn germ, purification, antioxidant, lipid peroxidation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10

2 OBJETIVOS 12

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

3.1 ÁCIDO FÍTICO 13
3.2 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO 15
3.3 ÁCIDO FÍTICO COMO ANTIOXIDANTE 19
3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 22
3.5 OUTRAS APLICAÇÕES DO ÁCIDO FÍTICO 25

4 MATERIAL E MÉTODOS 27

4.1 MATERIAL 27
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS 27
4.3 DESEMPENHO DA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO 27
4.3.1 Exatidão 27
4.3.2 Precisão 28
4.3.3 Linearidade 28
4.3.4 Limite de Quantificação 29
4.3.5 Limite de Detecção 29
4.3.6 Especificidade 30
4.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO 30
4.5 ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO 31
4.6 RENDIMENTO DO ÁCIDO FÍTICO 32
4.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO 32
4.7.1 Determinação de Minerais 32
4.7.2 Determinação de Fósforo Total e Inorgânico 33
4.7.3 Solubilidade do Ácido Fítico 33
4.7.4 Determinação de Proteína 33
4.8 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO FÍTICO OBTIDO 34
4.8.1 Preparo de amostras para os ensaios de DPPH$^{\bullet}$, deoxirribose e batofenantrolina 34
4.8.2 Precisão dos Métodos Analíticos 34
4.8.3 Ensaio de DPPH$^{\bullet}$ 34
4.8.4 Ensaio de Deoxirribose 35
4.8.5 Ensaio de Batofenantrolina 36
4.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO 36
4.9.1 Efeito do Ácido Fítico sobre a Atividade Inibidora da Peroxidação Lipídica in vitro induzida por Ferro 36
4.9.2 Preparo das Amostras 38
4.9.3 Medidas de Oxidação Lipídica 38
4.9.4 Determinação de Aroma de Requentado (WOF) 39
4.9.5 Determinação da Formação de Metamioglobina 39
4.10 ANÁLISES ESTATÍTICAS 40

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1 42
Guide for Authors 60
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2 64
ACEITE DO MANUSCRITO 65
5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3 85
Guide for Authors 110
5.4 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS 114
5.4.1 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos 114

5.4.2 1º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos 116
5.4.3 XVI EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica 118
5.4.4 XVII EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica 121
6 CONCLUSÃO 129
7 REFERÊNCIAS 130
ANEXO 136

1 INTRODUÇÃO

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato (IP6) está presente em cereais, leguminosas, oleaginosas, pólens e amêndoas com teor de 1 a 5% do seu peso (Cheryan, 1980). Nos cereais, o ácido fítico está distribuído em diferentes componentes do grão. A maior concentração do ácido fítico no trigo está na aleurona e, no arroz, no pericarpo, enquanto que o milho apresenta elevado teor no germe e ao redor de 6,5% (Erdman, 1979; Reddy et al., 1982).

O ácido fítico apresenta cargas negativas em ampla faixa de pH e possui 12 hidrogênios dissociáveis (Tsao et al., 1997). Estas características proporcionam ao ácido fítico uma propriedade quelante com metais polivalentes, especialmente cátions di e trivalentes, formando complexos (Vohra et al., 1965). A sua habilidade de formar um quelato com o ferro que o torna cataliticamente inativo, confere ao ácido fítico uma atuação como um antioxidante, pois inibe a oxidação com formação de radicais hidroxil (•OH) (Empson et al., 1991; Graf e Eaton, 1984; Graf et al., 1984; Graf et al., 1987).

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante (Berg et al., 1999; Prior et al., 2005). Dentre estes métodos destacam-se o sistema de quelar íons Fe^{+2} usando a batofenantrolina (BPS) e os métodos de seqüestro de radicais livres, tais como $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e radical hidroxil por meio do ensaio de deoxirribose (Prior et al., 2005). O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho foi confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. O seqüestro do radical hidroxil e a atividade quelante para o Fe^{+2} depende da concentração do ácido fítico sendo que a quelação aumenta com o tempo de contato com o Fe^{+2} (Filgueiras et al., 2009).

No *Codex Alimentarius*, o ácido fítico foi revisado como antioxidante com INS (System for Food Additives) número 391 (Pokorny et al., 2003). É rotineiramente empregado em muitos países em diversos produtos alimentícios, devido a sua propriedade antioxidante e tornou uma opção interessante como um aditivo natural em indústria de alimentos (Graf, 1983; Oatway et al., 2001; Pokorny et

al., 2003), área médica e indústria química (Graf, 1986; Reddy et al.,1982; Graf e Eaton, 1990). Empson et al. (1991) demonstraram que a adição de 1,5 mM de ácido fítico em carne de frango refrigerada inibiu substancialmente a formação de malonaldeído e o desenvolvimento do aroma de requentado ou em inglês “warmed over flavor” (WOF). Em estudos realizados por Soares et al. (2004) foi verificado que a adição de 2 mM de ácido fítico como antioxidante complementar em filés de peito de frango suplementados com vitamina E inibiu o desenvolvimento de aroma de requentado em até 95,30%, por 5 dias sob armazenamento a 6ºC. O germe de milho contendo ácido fítico, foi adicionado na dieta de suínos e, ao final, verificou-se uma inibição da rancidez da carne com manutenção da performance do crescimento (Harbach et al., 2007).

A quantificação de ácido fítico tem sido realizada principalmente pelo uso de métodos por precipitação e cromatografia, sendo que o método por cromatografia de troca iônica desenvolvido por Harland e Oberleas (1977) tem sido amplamente utilizado e adotado como oficial pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) embora o método envolva muitas etapas e quantifica indiretamente. Latta e Eskin (1980) modificaram este método utilizando o reagente de Wade após a cromatografia de troca iônica e quantificação direta do fitato por colorimetria. Ellis e Morris (1986) aplicaram o mesmo método de Harland e Oberleas (1977), porém utilizaram a resina AG1-X8 como mais apropriada para quantificação do ácido fítico devido a precisão e rapidez da análise. Diferentes métodos de quantificação de ácido fítico em produtos de cereais foram investigados, porém há várias limitações principalmente com relação à extração e quantificação direta ou indireta.

Considerando a atuação do ácido fítico como antioxidante, suas várias aplicações e elevada concentração no germe de milho, este trabalho teve como objetivo desenvolver o processo de purificação do ácido fítico do germe de milho e avaliar o seu potencial antioxidante *in vitro* e em carnes de frango armazenadas sob refrigeração.

2 OBJETIVOS

Desenvolver o processo de purificação do ácido fítico do germe de milho desengordurado após assegurar os parâmetros de desempenho da sua quantificação.

Avaliar o potencial antioxidante do ácido fítico purificado do germe de milho desengordurado por meio de ensaios de deoxirribose, batofenantrolina e $DPPH^{\bullet}$.

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ácido fítico purificado do germe de milho por meio da atividade antilipoperoxidativa e a aplicação em carnes de frango sob refrigeração, por meio de análises de TBARS, WOF e metamioglobina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato, IP6, é um componente que está presente principalmente em cereais, leguminosas, oleaginosas, pólens e amêndoas, cuja concentração varia de 1 a 5 % do seu peso (Cheryan,1980). Nos grãos, o ácido fítico é encontrado na forma de fitato de Ca_2Mg_5 (fitina), fitato de Na_2Mg_5 e K_2Mg_5 (Cilliers e Van Niekerk, 1986). Uma das principais funções fisiológicas do ácido fítico na planta é a sua atuação como reserva de fósforo e representa cerca de 60 a 97 % do fósforo total (Ravindran et al.,1994).

Nos cereais, o ácido fítico está distribuído em diferentes componentes do grão. No trigo a maior concentração do ácido fítico está na aleurona e no arroz no pericarpo, enquanto que no milho é elevado no germe com teor médio de 6,5 % (Erdman, 1979; Reddy et al., 1982). No arroz, o teor de fitato é cerca de 962 mg/100 g e a soja apresenta teor médio de 1300 mg /100 g e alguns de seus produtos como tofu e seus resíduos apresentam 200 e 560 mg/100 g, respectivamente (Joung et al., 2004). Na soja, o ácido fítico está presente nos cotilédones e dentro dos corpos protéicos (Liu, 1997). Assim, o germe de milho, pericarpo do arroz e cotilédones de soja pode ser uma fonte potencial de ácido fítico para sua extração, obtenção e aplicação como um aditivo alimentar.

O ácido fítico apresenta na sua estrutura química 12 hidrogênios dissociáveis e em pH neutro os grupos fosfatos podem apresentar um ou dois átomos de oxigênio carregados negativamente que contribuem para sua propriedade quelante com os cátions di e trivalentes, formando complexos (Vohra et al.,1965). Devido esta propriedade, muitas investigações sobre o ácido fítico foram desenvolvidas pelo seu potencial como um antinutriente por formar complexos com alguns minerais importantes, tornando-os bioindisponíveis (Cheryan,1980). Os minerais envolvidos neste processo incluem o zinco, ferro, cálcio, cobre e fósforo (Zhou e Erdman, 1995). Entretanto, o efeito do ácido fítico na biodisponibilidade de minerais depende de vários fatores, como a proporção mineral:fitato (Graf e Eaton, 1984) e o tipo de dieta (Conforth, 2002). As cargas negativas dos grupamentos

fosfatos contribuem para a sua complexação com cátions multivalentes e proteínas carregadas positivamente. Esta propriedade quelante é de grande importância, pois é responsável pela ação antioxidante (Empson et al., 1991) e fundamenta muitos métodos para determinação do ácido fítico (Oberleas, 1973).

O ácido fítico apresenta capacidade de complexação com proteínas por meio de interações eletrostáticas e forma ligações eletrostáticas fortes com resíduos de aminoácidos básicos em pH ácido. Portanto, a maioria das proteínas precipita em pH abaixo de 5,0. Em pH neutro ou alcalino, o complexo fitato-proteína dissocia devido às suas cargas negativas. Entretanto, cátions polivalentes podem formar pontes entre o ácido fítico e proteínas, promovendo sua associação em pH neutro (O´Dell e de Boland, 1976; Graf e Eaton, 1990). Vários trabalhos investigaram a extração do ácido fítico ou propriedades funcionais de proteínas em interação com fitato provenientes de diferentes fontes como germe de milho (O´Dell e de Boland, 1976), soja (Hartman, 1979), grão de bico (Reddy e Salunkhe, 1981), farelo de trigo e aveia (Hill e Tyler, 1954). No pH isoelétrico, as proteínas apresentam carga neutra e os complexos com fitatos não são formados. A redução da solubilidade de proteínas como resultado da formação de complexos com ácido fítico pode afetar adversamente as suas propriedades funcionais, tais como as propriedades hidrodinâmicas, capacidade emulsificante, capacidade de formação de espuma e dispersibilidade em meio aquoso (Reddy et al., 1982).

Através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), Costelo et al. (1976) identificaram a estrutura do ácido fítico em solução como uma conformação em cadeira com os grupos fosfatos das posições C_1, C_3, C_4, C_5 e C_6 na posição equatorial e C_2 na posição axial conforme apresentado na Figura 1.

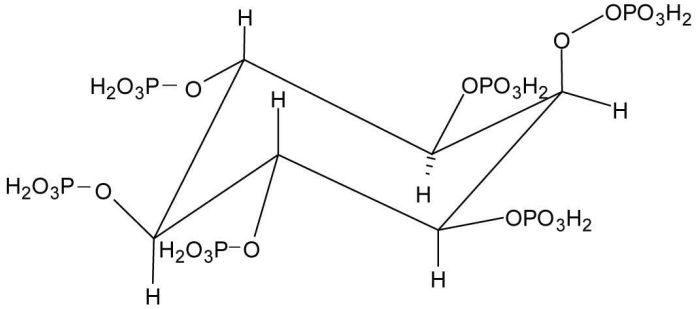

Figura 1. Estrutura do ácido fítico
Fonte: Plaami (1997)

A conformação estrutural do inositol apresenta nove estereoisômeros (cis-inositol, epi-inositol, allo-inositol, neo-inositol, mio-inositol, muco-inositol, chiro-inositol e seus enanciômeros e scyllo-inositol) e somente a forma mio-inositol foi isolada de plantas (Cosgrove, 1966).

O ácido fítico é um composto inerte, estável e na forma sólida pode ser estocado por muitos anos e em solução aquosa neutra, ou solução alcalina a 5ºC pode ser conservado por vários meses sem se decompor. As seis ligações éster fosfóricas apresentam alta energia potencial. A liberação de 50 % do fósforo requer hidrólise ácida com HCl 5N a 100ºC por 6 horas e para a liberação do fósforo total é necessário um refluxo a 100ºC por 6 horas em solução de pH 12 (Graf e Eaton, 1990). A hidrólise química ou enzimática do mio-inositol hexafosfato (IP6) resultou na formação dos seguintes produtos de degradação: inositol pentafosfato (IP5), inositol tetrafosfato (IP4), inositol trifosfato (IP3), inositol bifosfato (IP2) e inositol monofosfato (IP1) (Cosgrove, 1966).

3.2 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico pode ser obtido de várias fontes vegetais, entretanto, a maior concentração foi descrita no germe de milho com cerca de 8,0 % (Fukuji et al., 2008) e farelo de trigo com cerca de 4,8 % (Graf e Eaton, 1990).

DeBoland et al. (1975) descreveram que a extração do fitato de um produto depende do seu meio químico e pH, ou seja, o fitato geralmente é extraído com alta concentração de H^+ e força iônica. Quando o meio de extração foi apenas a água, a solubilidade variou conforme o produto. Assim, observaram que a extração do fitato em água do germe de milho em pH 6,1 apresentou 86% de solubilidade. Enquanto que, para soja e flocos de soja, a solubilidade foi de 69 e 97 % em pH 6,8 e 6,5, respectivamente. Porém, o gergelim apresentou apenas 13 % de solubilidade em pH 6,8.

A extração de ácido fítico com finalidade de quantificação tem sido descrita por vários investigadores.

Makower (1970) descreveu que para a extração de ácido fítico de feijão, utilizou HCl 0,5N na proporção de 3 mL para 0,2 g de amostra, sob agitação

contínua e aquecimento a 60ºC no primeiro minuto, prosseguindo à temperatura ambiente por 40 minutos. Os resultados foram satisfatórios quando comparados com extração usando outros solventes.

Harland e Oberleas (1977) desenvolveram um método para quantificação do fitato utilizando uma resina de troca aniônica (AG1-X8). A extração foi feita com 5 g de amostra com 100 mL de HCl 1,2 %, agitação por 2h e o extrato foi obtido após filtração à vácuo. O fitato foi eluído numa coluna contendo a resina de troca aniônica e retirado pela eluição de 15 mL de NaCl 0,7M. Em seguida, a solução obtida foi digerida com 0,5 mL de H_2SO_4 e 3,0 mL de HNO_3. A determinação do ácido fítico foi realizada por meio da medida do fosfato liberado por hidrólise ácida, calculando-se posteriormente o mio-inositolhexafosfato equivalente. A recuperação do fósforo por este método foi de 99,5 %, porém a quantificação do fitato foi efetuada de forma indireta. A quantificação de ácido fítico tem sido realizada principalmente pelo uso de métodos por precipitação e cromatografia, sendo que o método por cromatografia de troca iônica desenvolvido por Harland e Oberleas (1977) tem sido amplamente utilizado e adotado como oficial pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

Um método colorimétrico simples e rápido para a determinação do ácido fítico foi descrito por Latta e Eskin (1980). O ácido fítico foi extraído de 5g de um concentrado protéico de colza com 100 mL de HCl 2,4 % em temperatura ambiente e seguido de centrifugação. O extrato foi eluído através de uma coluna de troca iônica AG1X-8 permitindo a remoção do fósforo inorgânico e outros interferentes. Em seguida, o ácido fítico foi diretamente quantificado após a reação com cloreto férrico e ácido sulfosalissílico (reagente de Wade), com formação de um complexo de coloração rósea e leitura a 500nm. A recuperação do fitato de sódio por este método foi de 102 ± 3% indicando que não houve perdas durante a extração e eluição. O método foi considerado simples por não necessitar de digestão utilizada no procedimento de Harland e Oberleas (1977).

Camire e Clydesdale (1982) desenvolveram um método quantitativo por HPLC com prévia precipitação do ácido fítico com cloreto férrico seguido da sua conversão em fitato de sódio. O fitato foi injetato numa coluna de fase reversa contendo C18 e determinado por espectrometria de absorção atômica. Verificaram

que a extração do ácido fítico no farelo de trigo com H_2SO_4 3% foi mais eficiente do que a extração com TCA 3%. A recuperação do ácido fítico foi de 99 a 103%.

A extração de ácido fítico de 1,5 a 2,5 g de farinhas de sorgo foi descrita por Doherty et al. (1982) nos quais utilizaram 30mL de Na_2SO_4 10% mais HCl 1,2% a 25ºC. Na sequência, foi obtido o fitato de ferro III com a adição de $FeCl_3$, que foi digerido utilizando o procedimento micro-Kjeldahl para liberar o fitato. Este procedimento apresentou erro menor que 5%.

Graf e Dintzis (1982) realizaram extração de ácido fítico de farelo de trigo com bom rendimento. Utilizaram HCl 0,5N na proporção de 1 g de amostra para 20 mL de solvente, sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. O HCl foi escolhido como solvente por apresentar excelentes propriedades de extração sem perda significativa de fitato nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 6N.

Ellis e Morris (1986) analisaram a eficiência das resinas de troca aniônica AG1X-8 e AG1X-4 para a determinação de ácido fítico de acordo com o método descrito por Harland e Oberleas (1977). Foi verificada uma grande variação dos resultados quando se utilizou resina AG1X-8 com recuperação de 78,5 ± 11,5%. Entretanto, maior recuperação de ácido fítico ocorreu quando foi utilizada a mesma resina e mantida em equilíbrio com a amostra por 1,5 h. A utilização da resina AG1X-4 apresentou recuperação de 98,0 ± 1,1% e foi considerado um método de maior precisão e rapidez por não necessitar da etapa de equilíbrio.

Lehrfeld (1989) desenvolveu um método de análise de ácido fítico por cromatografia líquida de alta resolução ou HPLC, onde quantificou o teor de IP6, IP5 e IP4 em diferentes alimentos. Para extração de ácido fítico foi utilizado 0,5 g de amostra com 10 mL de solução HCl 0,5 M e ultrasonificação por 1 a 3 min, centrifugação a 15000 rpm por 15 min, e eluição do sobrenadante numa coluna de troca iônica (SAX). Em seguida, o eluato foi evaporado, solubilizado e centrifugado a 14000 rpm por 3 min. Para quantificação por cromatografia líquida foram empregados uma coluna de fase reversa (polymer macroporus) e um detector de índice de refração. A recuperação do inositol fosfato por este método foi de 99,5-100,5%. O teor de IP6, IP5 e IP4 de vários cereais foram quantificados e para o grão de milho o teor de ácido fítico foi de 0,78% e porcentagem relativa de 95 % de IP6 e 5 % de IP5.

Os métodos de quantificação de ácido fítico em geral requerem três etapas: extração, concentração e ou purificação e quantificação, sendo que a maior tendência dos procedimentos utilizaram HCl 2,4% como meio extrator por 1,5 a 3 horas (Harland e Oberleas, 1986). O ácido fítico, na forma pura, pode ser obtido com baixo custo a partir de várias fontes vegetais, como farelo de trigo, germe de trigo e milho, gergelim e outros. O ácido fítico destas fontes vegetais pode ser extraído com solução de HCl diluído a temperatura ambiente e precipitado pela adição de bicarbonatos, $FeCl_3$, KOH, NaOH, NH_4OH, $Ca(OH)_2$, $Mg(OH)_2$ ou álcool e então purificado por diferentes procedimentos (Graf, 1983).

Kolchev (1978) descreveu na sua patente Nº 4070422, um método para produção de fitato, onde o ácido fítico foi extraído de diferentes fontes vegetais como farelo de arroz, semente de girassol, soja e trigo. O ácido fítico foi extraído com solução de HCl 0,1M e proporção sólido:líquido de 1:10. Na solução aquosa, o ácido fítico foi precipitado com adição de $NaHCO_3$ atingindo um pH entre 7 e 8. Em seguida, o precipitado de ácido fítico foi dissolvido em solução ácida e saturado com um agente denaturante, como o dióxido de enxofre, éter ou formaldeído para eliminar as proteínas. Assim, o ácido fítico é novamente precipitado e recuperado na forma pura pela adição do agente alcalino.

Wang (1992) obteve ácido fítico a partir de 500 g de farelo de trigo com 4 L de HCl, pH 2-3, mais 8g de uréia. O ácido fítico foi precipitado com adição de solução contendo íons Ca^{+2}, pH 6-7. Na sequência, o precipitado foi dissolvido com HCl em pH 1,5. A remoção de íons foi realizada com resinas de troca catiônica e aniônica. Após concentração por evaporação, o produto final apresentou o rendimento de 63,8% de ácido fítico.

Diferentes métodos de quantificação de ácido fítico em produtos de cereais foram investigados, porém há várias limitações principalmente com relação à extração e quantificação direta ou indireta.

3.3 ÁCIDO FÍTICO COMO ANTIOXIDANTE

A autoxidação de lipídios em alimentos envolve reações de radicais livres, que são iniciadas pela exposição à luz, aquecimento, radiação ionizante, enzima lipoxigenase, íons metálicos ou são catalisadas por metaloproteínas. A reação de autoxidação clássica inclui as etapas de iniciação, propagação e terminação (Shahidi et al., 1992).

Muitos produtos alimentícios quando em contato direto com oxigênio perdem a qualidade devido a reações de oxidação. Níveis baixos de oxigênio ao redor de 1% favorecem mudanças indesejáveis no alimento, como sabor, descoloração, redução do valor nutricional e deterioração microbiológica. Essas transformações poderiam ser minimizadas pela redução das taxas de oxigênio pelo uso de embalagens a vácuo, atmosfera modificada ou com adição de antioxidantes. A presença de ferro como catalisador também promove a oxidação dos lipídios insaturados (Empson et al., 1991).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável como gorduras, proteínas, carboidratos ou DNA, diminui ou previne a oxidação do substrato. Quando “espécies reativas de oxigênio” (EROS) são geradas nos seres vivos, uma ampla variedade de antioxidantes como α-tocoferol, ácido ascórbico, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GTx) e catalase (CAT) desempenham seu papel. Um composto pode exercer atividade antioxidante *in vivo* ou em alimentos por inibir a geração de EROS, diretamente seqüestrando radicais livres ou elevando o nível de antioxidantes endógenos (estimulando a expressão de genes que codificam a SOD, CAT ou GTx). A ação fisiológica de muitos antioxidantes está estabelecida e a importância relativa desses antioxidantes *in vivo* depende de quais EROS são gerados, como e onde são gerados e qual o alvo biológico. Desse modo, é possível que um antioxidante proteja em um sistema e falhe em outro ou mesmo cause algum dano (Halliwell et al., 1995; Aruoma, 1999).

Os antioxidantes apresentam diferentes mecanismos de atuação e a partir deles tem sido classificados como bloqueadores de radicais livres, queladores

ou complexantes de íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica, ou como seqüestradores de oxigênio em sistemas fechados (Shahidi et al., 1992).

Graf et al. (1984) e Graf e Eaton (1990) descreveram que o ácido fítico de ocorrência natural atuou como antioxidante efetivo na inibição de reações de oxidação. Este antioxidante impediu a formação de radicais hidroxila devido à habilidade de formar quelato com ferro, tornando-o cataliticamente inativo. Zhou e Erdman (1995) descreveram que o ácido fítico atuou como um antioxidante natural em sistemas alimentares e apresentou funções potenciais na preservação.

As reações catalisadas pelo ferro tem desempenhado um papel importante na oxidação que pode ser prejudicial aos matériais biológicos. A maioria dessas reações envolvem a ativação do oxigênio e a subsequente reação com o ferro que gera espécies mais reativas, como as hidroxilas com consequência de efeitos danosos do ferro. Entretanto, este radical não tem sido descrito como mais importante do que os íons ferril e perferril que oxidam seletivamente os substratos aos quais o ferro estava ligado (Rush e Koppenol, 1986).

A ingestão de ácido fítico por humanos, embora sem especificação da sua concentração, não ocasionou efeito toxicológico, desconforto ou outros sintomas (Starkentein, 1911, apud Graf, 1983). Além disso o ácido fítico e seus metabólitos tem sido descritos como atóxicos e pouco reativos. Estas propriedades conferem uma melhor característica quando comparado com aditivos disponíveis como nitrito e metabissulfito (Graf, 1983).

Empson et al. (1991) descreveram que baixas concentrações de ácido fítico inibiram a oxidação lipídica em peito de frango cru e cozido e em alguns sistemas modelos. O ácido fítico atuou na inibição da indução do ferro. A eficácia do ácido fítico foi comprovada pela redução do oxigênio absorvido, formação de malonaldeído e redução do *warmed over flavor* (WOF), ou seja, sabor de requentado.

Hix (1994) avaliou o efeito de vários antioxidantes adicionados em bolachas doces, tais como BHA, ascorbil fosfato de magnésio, alfa tocoferol, ascorbil fosfato de magnésio mais alfa tocoferol, ácido ferrúlico e ácido fítico. Os resultados indicaram que o ácido fítico e o ácido ferrúlico atuaram como eficientes

antioxidantes. A análise sensorial indicou que as bolachas contendo ácido fítico como antioxidante tiveram aceitabilidade similar em relação ao BHA.

O ácido fítico em diferentes concentrações e pH foi descrito como inibidor mais eficiente na peroxidação lipídica quando comparado ao ascorbato, BHT e EDTA em carne homogeneizada. Os resultados indicaram que 2 mM de ácido fítico inibiram a peroxidação lipídica, acelerando a autoxidação do íon ferroso a férrico, formando quelato com ferro e tornando-o cataliticamente inativo. Provavelmente, o ácido fítico removeu o íon ferroso da mioglobina do fosfolipídio carregado negativamente e preveniu a autoxidação do fosfolipídio e formação de "off-flavors". O efeito antioxidante foi dependente da concentração e pH, sendo mais efetivo no pH próximo do neutro (Lee e Hendricks, 1995).

O ácido fítico foi reconhecido em 1997 como GRAS (Generally Recognised as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) e usado como um aditivo em produtos de panificação (Hix et al.,1997). No *Codex Alimentarius*, o ácido fítico foi revisado como antioxidante com INS (System for Food Additives) número 391 (Pokorny et al., 2003).

Antioxidantes como catequina, farinha de sésamo e ácido fítico reduziram a velocidade de oxidação lipídica em salame do tipo Milano e mortadela. Foram utilizados nesta investigação carne suína, fermentada e cozida, com alto teor de gordura entre 25 e 30%. Os resultados dos valores de peróxido e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) indicaram que os antioxidantes naturais reduziram a oxidação lipídica, enquanto que, o ascorbato de sódio apresentou efeito pró-oxidante. Entretanto, os antioxidantes naturais avaliados não foram eficientes na estabilidade da cor destes produtos (Ghiretti et al., 1997).

Lee e Hendricks (1997) investigaram a atividade antioxidante do fitato em micelas de ácido linoléico catalisadas por metal. Os resultados indicaram que o fitato facilitou a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} dependente da concentração e inibiu a formação de substâncias que reagiram com ácido tiobarbitúrico (TBARS), cujas substâncias foram resultantes da degradação de deoxirribose catalisada pela hemoglobina ou Fe^{2+}. O ácido fítico inibiu a oxidação do ascorbato como resultado da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} na presença de 100 mM de Fe^{3+} e 100 mM de ácido ascórbico. Inibiu também a formação de substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da catálise do H_2O_2 e hemoglobina. O ácido fítico

inibiu a oxidação lipídica em sistemas contendo ascorbato-ferro, dependente da concentração do ascorbato. Estes resultados indicaram que o fitato atuou como antioxidante na prevenção da deterioração oxidativa de alimentos.

Em estudos realizados por Soares et al. (2004) foi verificado que a adição de 2 mM de ácido fítico como antioxidante complementar em filés de peito de frango suplementados com vitamina E inibiu o desenvolvimento de WOF em até 95,30%, durante 5 dias sob armazenamento a 6ºC. Tais resultados demonstraram uma reação sinérgica entre os dois antioxidantes. O germe de milho contendo ácido fítico, foi adicionado na dieta de suínos e, ao final, verificou-se uma inibição da rancidez da carne com manutenção da performance do crescimento (Harbach et al., 2007). O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho foi confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. O seqüestro do radical hidroxil e a atividade quelante para o Fe^{+2} foi dependente da concentração do ácido fítico sendo que a quelação aumentou com o tempo de contato com o Fe^{+2} (Filgueiras et al., 2009).

3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1990), mecanismos de ação antioxidante podem incluir: supressão da formação de EROS tanto pela inibição de enzimas ou pela quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres; seqüestro de EROS e aumento ou proteção das defesas antioxidantes do organismo (Pietta, 2000). Portanto, a atividade antioxidante pode e deve ser avaliada com diferentes testes envolvendo vários mecanismos. A maioria das metodologias químicas são baseadas na habilidade de seqüestrar diferentes radicais livres, mas também podem ser utilizadas a absorção de UV e habilidade de quelar íons metais de transição (Moure et al., 2001).

Testes para medir a atividade seqüestradora de diferentes radicais, como ânion superóxido, radical hidroxil, óxido nítrico, radicais alquil-peroxil, $ABTS^{+}$ (radical cátion de 2,2'-azinobis), $DPPH^{\bullet}$ (radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil) têm sido empregados (Moure et al., 2001). Outros testes podem ser citados: oxidação de beta

caroteno em emulsão com ácido linoléico, potencial redox, poder redutor, razão de degradação de compostos fenólicos como conseqüência de sua atividade antioxidante, atividade queladora de íons metais, oxidação de DNA, oxidação de membranas biológicas, peroxidação lipídica induzida por UV, oxidação de mitocôndria de fígado de rato e peroxidação induzida por NADPH/ferro (Moure et al., 2001).

O primeiro produto da redução univalente do oxigênio é o ânion superóxido que apresenta baixa reatividade, no entanto ele reage facilmente com peróxido de hidrogênio gerando radical hidroxil (Robak & Gryglewski, 1988). O sistema xantina-oxidase é um teste fácil e rápido que gera ânion superóxido e possibilita a medida da atividade seqüestradora deste radical por diferentes compostos. O ânion superóxido formado reduz o substrato nitro blue tetrazolium ou citocromo c que é detectado por espectrofotometria. No entanto, algumas condições devem ser verificadas como observação se a substância em estudo não inibe a formação de ânion superóxido e se a substância não reduz o substrato (Halliwell et al., 1995).

Medidas de ação protetora contra peroxidação lipídica tem sido frequentemente utilizada com triacilglicerídeos, óleos vegetais e de peixe como substrato para oxidação. Outros substratos como fosfolipídios ou lipoproteínas também são empregados (Moure et al., 2001). Opcionalmente, cátions metálicos podem ser usados como catalisadores durante o ensaio de oxidação e também moléculas orgânicas com metal (Chen e Ahn, 1998). Os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) são altamente sensíveis a deterioração oxidativa e tem sido utilizados para testes com antioxidantes naturais (Moure et al., 2001).

Desde que foi descrita, a reação colorimétrica do ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma substância desconhecida formada durante incubação aeróbia de homogenatos de tecidos, a qual foi identificada como malonaldeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, a reação de peróxidos lipídicos com TBA tem sido adotada como um método para avaliar a extensão da peroxidação lipídica *in vitro*. A produção de MDA durante a peroxidação de membranas microssomais varia entre os diferentes tecidos, podendo dificultar o estudo da exata extensão da formação de peroxidação (Halliwell et al., 1995).

Aldeídos e açúcares também podem reagir com TBA para produzir cor que absorve em 535 nm e ambos interferem com a detecção de MDA quando presentes em quantidades milimolares. Então, o ensaio de TBA foi modificado reduzindo o aquecimento de 100ºC para 85ºC para evitar interferência da sacarose presente no tampão (Buege e Aust, 1978).

A medida direta de hidroperóxidos tem a vantagem sobre o ensaio de TBA em que permite uma comparação mais exata dos níveis de peróxidos lipídicos formados. Entretanto, seu uso é limitado pelo fato de que os hidroperóxidos em membranas biológicas são espécies transitórias que são expostas por fatores que catalisam sua quebra. Tem sido demonstrado que a peroxidação lipídica dependente de NADPH resulta num rápido aumento de hidroperóxidos seguidos por declínio causado provavelmente por sua quebra. *In vitro*, metais de transição, particularmente no seu estado reduzido, facilitam a decomposição de hidroperóxidos (Buege e Aust, 1978).

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante (Berg et al., 1999; Prior et al., 2005). Dentre estes métodos destacam-se o sistema de quelar íons Fe^{+2} usando a batofenantrolina (BPS) e os métodos de seqüestro de radicais livres, tais como $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e radical hidroxil por meio do ensaio de deoxirribose (Prior et al., 2005).

O ensaio de deoxirribose permite a determinação da razão constante de reações com o radical hidroxil (Aruoma, 1999). É um teste em tubo, relativamente simples no qual o radical é gerado pela mistura de ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+}-EDTA (Halliwell et al., 1995). Após aquecimento em condições ácidas, também ocorre a formação de MDA que é detectado pela complexação com o TBA (Halliwell et al., 1987). Porém, deve-se tomar cuidado com alguns aspectos como verificar se a substância não reagiu com o peróxido de hidrogênio, se o ataque do radical à substância pode formar compostos que reagem com o TBA e assegurar que a substância não interferiu com os produtos de medida (Halliwell et al., 1995). O método para determinação da atividade queladora do íon ferro pelo antioxidante, utilizando a BPS como um forte quelador de ferro, baseia na formação do complexo colorido $Fe_2(BPS)_3$, o qual pode ser alterado pela maior ou menor afinidade do antioxidante pelo ferro (Bolanm e Ulvik, 1987).

Um novo método para avaliar a atividade seqüestradora de compostos específicos ou extratos está sendo muito utilizado pela rapidez e facilidade. A redução do radical estável DPPH$^{\bullet}$ (2,2- difenil-1-picrilhidrazil), ou seja, a capacidade de doar elétrons para o radical é monitorado pela diminuição da absorvância deste radical em 517 nm (Parejo et al., 2000).

A utilização de mais de um método para avaliar a atividade antioxidante de uma substância se faz necessária, pois o potencial de um composto pode ser diferente de acordo com o ensaio empregado, ou mesmo, dentro de um ensaio quando a polaridade do meio é diferente, além do que o composto pode ser um poderoso antioxidante em um método e se comportar como pró-oxidante em outro (Moure et al., 2001).

3.5 OUTRAS APLICAÇÕES DO ÁCIDO FÍTICO

Os antioxidantes tem sido demonstrados por atuarem em processos crônicos como doenças cardiovasculares e câncer (Correa, 1995) e também pelos benefícios para a saúde humana (Empson et al., 1991) tais como redução de infecções intestinais (Graf e Eaton, 1990).

Grases et al. (1992) demonstraram que a ingestão de 50 a 100 mg de ácido fítico duas a três vezes ao dia na forma de sais de cálcio-magnésio ou por alimentos ricos em fitato foi eficiente no tratamento de litíase renal. A habilidade do ácido fítico quelar os minerais tem como conseqüência o seu efeito protetor que quela o ferro e previne o risco de câncer de cólon, redução do colesterol e triglicerídios (Zhou e Erdman, 1995).

Yang e Shamsuddin (1995) descreveram que o ácido fítico ingerido por meio de dietas naturais, como cereais e leguminosas, atuou na prevenção de câncer de cólon. Demonstraram também a eficácia do ácido fítico como coadjuvante no tratamento quimioterápico para este tipo de câncer.

Ensaios com ratos realizados por Ullah e Shamsuddin (1990) demonstraram que o ácido fítico a 1% não foi tóxico, após longo tempo de ingestão. Desta forma, Ko e Godin (1991) sugeriram a aplicação terapêutica do ácido fítico no

tratamento de isquemia e reperfusão miocardíaca, enquanto que, Rao et al. (1991) comprovaram esta ação terapêutica.

O ácido fítico com finalidade farmacológica foi descrito como um antagonista eficiente na atividade de crescimento de tumores (Morrison et al., 1994), redução da peroxidação lipídica sanguínea (Knight e Searles, 1994), inibição de tumores mamários em ratos (Hirose et al., 1994) e na prevenção de pólipos, adenomas e carcinoma coloretal (Weinberg, 1994). Outros usos potenciais de ácido fítico também têm sido descritos na área biomédica, química e outras (Graf e Eaton, 1990).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para obtenção de ácido fítico foi utilizado germe de milho desengordurado, que foi fornecido por uma Cooperativa Agrícola da região. O ácido fítico padrão utilizado foi o fitato de dodecassódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM= 923,8) de milho, de procedência Sigma.

4.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Todos os procedimentos analíticos foram realizados em triplicata.

4.3 DESEMPENHO DA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO

Para assegurar o processo de obtenção do ácido fítico, foram aplicados alguns parâmetros de desempenho da sua quantificação. Assim, a exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação foram determinados conforme descrito na resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003 emitida pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

4.3.1 Exatidão

A exatidão do método foi estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de recuperação do ácido fítico} = \frac{CME}{C} \times 100 \qquad \text{Equação } \mathbf{(1)}$$

Onde CME é a concentração média experimental e C é a concentração do ácido fítico padrão

4.3.2 Precisão

A precisão foi analisada por meio de repetibilidade do método onde foi avaliada a recuperação do ácido fítico padrão em diferentes concentrações. Assim, a precisão foi expressa pela seguinte equação:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \qquad \text{Equação } \mathbf{(2)}$$

Onde CV é o coeficiente de variação em porcentagem, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

4.3.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção, em triplicata, de cinco curvas padrões de ácido fítico com concentrações teóricas crescentes de 25 a 135 µg de padrão de ácido fítico versus a absorvância correspondente a cada concentração.

4.3.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) do método foi estimado pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{(DP \times 10)}{ic} \qquad \text{Equação } \mathbf{(3)}$$

Onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas de calibração com diferentes concentrações de ácido fítico padrão e ic é a inclinação da curva de calibração.

4.3.5 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) do método foi estimado pela seguinte equação:

$$LD = \frac{(DP \times 3{,}3)}{ic} \qquad \text{Equação } \mathbf{(4)}$$

Onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de várias curvas de calibração com diferentes concentrações de ácido fítico padrão e ic é a inclinação da curva de calibração.

4.3.6 Especificidade

Para verificar a especificidade do método, o ácido fítico padrão foi adicionado em uma matriz de germe de milho para detectar as prováveis substâncias interferentes que poderiam afetar os resultados. Assim, 20 mg de ácido fítico padrão foram adicionados em 10g de germe de milho triturado e o teor de ácido fítico foi determinado na presença da matriz do germe de milho triturado.

4.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico foi extraído a partir de 5 a 10 g de amostras trituradas em solução HCl 0,8 M, na proporção de 1:10 (p/v) e agitação constante por 2 horas. Em seguida, o material foi centrifugado a 400 g, por 10 min. e obtido o sobrenadante. Este foi diluído em água destilada e o ácido fítico foi quantificado, conforme o procedimento descrito por Latta e Eskin (1980), com modificação da resina de troca aniônica para Dowex-Agx-4, proposto por Ellis e Morris (1986). Para cromatografia, foi utilizada uma coluna de vidro (30 x 1,0 cm) contendo 0,6 g da resina de troca aniônica, que foi previamente preparada com eluições sucessivas de 10 mL de água destilada, 10 mL de NaCl 0,7 M e 10 mL de água destilada. Em seguida, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi aplicada na coluna, eluída com 10 mL de NaCl 0,1 M e 10 mL de NaCl 0,7 M e recolhido 10 mL do último eluato. A partir deste eluato, alíquotas de 3 mL foram transferidas para tubos de ensaios, adicionado 1 mL do reativo de Wade (ácido sulfosalicílico e cloreto férrico), e o complexo formado foi lido em espectrofotômetro UV-Visível (marca Cintra® 20, modelo GBC) a 500 nm.

A curva-padrão foi construída com solução de fitato de dodecassódio (Sigma), dissolvido em água destilada com concentrações que variaram de 22,5 a 135 µg de ácido fítico mL^{-1}. Estas alíquotas foram diluídas para 3 mL, com água destilada, e adicionado 1 mL de reagente de Wade. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 500 nm. Os dados obtidos foram plotados no gráfico e efetuada

a regressão linear para quantificar o teor de ácido fítico. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido fítico.

4.5 ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

Para extração de ácido fítico foi utilizado 20 g de germe de milho triturado e ressuspenso em HCl 0,8 M na proporção sólido-líquido de 1:5 (p/v) e agitação constante por 2 h. O pH final desta solução foi ajustado com adição de NaOH 4 M para 4,8 para precipitação da proteína. O material obtido foi centrifugado a 400 g por 10 min para obtenção do sobrenadante contendo o ácido fítico e o resíduo foi desprezado. No sobrenadante o teor de ácido fítico foi quantificado conforme item 2.4.

Em seguida, o pH do sobrenadante foi ajustado com NaOH 4 M até atingir o pH de 9,5 para precipitar o ácido fítico. Após cerca de 12 h para decantação do precipitado procedeu-se a centrifugação a 400 g por 10 min para obter o precipitado bruto. Neste precipitado, o ácido fítico foi ressuspenso com 15 mL de HCl 0,8 M e adicionado 10 mL de formaldeído e 0,5 g de terra diatomácea para desnaturação de proteínas e remoção de outros constituintes, respectivamente. O material obtido foi mantido sob agitação mecânica com aquecimento a 50ºC por 1 h. Esta solução foi mantida em repouso por 2 h para decantação do precipitado. Seguiu-se a filtração com papel de filtro Whatman #1 e obtido o sobrenadante. No sobrenadante, o ácido fítico foi precipitado com $NaHCO_3$ 1,5 M até atingir pH de 8,5. O material foi filtrado com papel de filtro Whatman #1. A secagem do precipitado foi realizada em estufa a 60ºC e obtido um pó de coloração branca contendo o ácido fítico.

4.6 RENDIMENTO DO ÁCIDO FÍTICO

A porcentagem de rendimento de ácido fítico obtido foi estimada pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento de ácido fítico}(\%) = \frac{AFf}{AFi} \times 100 \qquad \text{Equação } \mathbf{(5)}$$

Onde *AFi* é a massa de ácido fítico na amostra inicial e AF*f* é a massa de ácido fítico em pó.

4.7 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

O ácido fítico obtido foi caracterizado parcialmente pelas determinações dos constituintes minerais, fósforo total e inorgânico, teor de proteína e solubilidade (Chen et al.,1956; AOAC, 1997).

4.7.1 Determinação de Minerais

O teor de magnésio, cálcio e zinco foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica. A quantificação de potássio e sódio foi realizada por fotometria de chama (Dean, 1960; Okumura et al., 2004).

4.7.2 Determinação de Fósforo Total e Inorgânico

Para determinação do fósforo total, 0,1 g do ácido fítico em pó foram digeridos em 5 mL de solução nitro perclórica e determinado colorimetricamente conforme procedimento descrito por Chen et al. (1956).

A determinação do fósforo inorgânico da amostra foi feita a partir de 1 g de amostra do ácido fítico em pó. A extração foi realizada com solução TCA 12,3% sob agitação por 6 h e o teor de fósforo foi determinado colorimetricamente segundo Chen et al. (1956).

Para converter o teor de ácido fítico em fósforo fítico foi considerado a proporção de 28,2% de fósforo de sua massa molecular ($C_6H_{18}O_{24}P_6$; PM= 660 g/mol).

4.7.3 Solubilidade do Ácido Fítico

Para a determinação da solubilidade do ácido fítico obtido, 30 mg de ácido fítico foram diluídos em 100 mL de água destilada e também em solução de HCl pH 0,6, 2,0 e 3,5. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman #1 e a quantificação de ácido fítico foi efetuada conforme item 4.4.

4.7.4 Determinação de Proteína

O teor total de proteína do ácido fítico obtido foi determinado conforme o método da AOAC (1997) por meio da técnica de Kjeldahl para análise de nitrogênio total, utilizando o fator de 6,25 para conversão.

4.8 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO FÍTICO OBTIDO

4.8.1 Preparo de amostras para os ensaios de DPPH$^{\bullet}$, deoxirribose e batofenantrolina

O ácido fítico do germe de milho e ácido fítico padrão, em triplicatas, foram diluídos em água deionizada com obtenção de concentrações finais de 0,3 µM; 0,6 µM; 1,3 µM; 2,6 µM; 3,3 µM; 6,6 µM; 13,1 µM; 16,6 µM; 33,2 µM; 66,5 µM; 130,5 µM; 261,87 µM e 652,7 µM e empregadas para investigar o potencial antioxidante por meio de ensaios utilizando DPPH$^{\bullet}$, deoxirribose e batofenantrolina.

4.8.2 Precisão dos Métodos Analíticos

A precisão dos métodos de deoxirribose e batofenantrolina foi determinada pela repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio). A repetibilidade, para o ensaio de deoxirribose, foi avaliada no mesmo dia por meio de análises de amostras com a mesma concentração (6,6 e 66,5 µM de ácido fítico padrão). Para ensaio de batofenantrolina foram utilizadas concentrações de 3,3 e 6,6 µM de ácido fítico padrão. A precisão intermediária foi determinada nas mesmas concentrações e comparadas as análises em 3 dias diferentes.

4.8.3 Ensaio de DPPH$^{\bullet}$

A atividade antioxidante de diferentes concentrações de ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho foram determinadas pela capacidade doadora de elétrons do ácido fítico ao radical livre estável DPPH$^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Blois, 1958). Foram misturados em tubos de ensaio 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH igual a 5,5, 1 mL de etanol, 0,5 mL de solução etanólica de DPPH$^{\bullet}$(250 µM) e 50 µL de diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido

fítico do germe de milho. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 min e a absorvância foi lida a 517nm. O controle positivo não continha ácido fítico e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5,5 e 1,5 mL de etanol. A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade doadora de elétrons ao radical DPPH$^{\bullet}$ pelo ácido fítico e estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de Atividade antioxidante} = 100 - (100\ A_a / A_0) \qquad \text{Equação } \mathbf{(6)}$$

Onde A_a é a absorvância da amostra e A_0 é a absorvância do controle positivo.

4.8.4 Ensaio de Deoxirribose

A eficiência do ácido fítico no seqüestro do radical hidroxil foi avaliada pela degradação de deoxirribose (Halliwell et al., 1987). Foram misturados em tubos de ensaios 1 mL de tampão KH_2PO_4-KOH (20mM, pH 7,4), 10 µL de ascorbato (100 µM), 50 µL de diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico do germe de milho, 10µL de deoxirribose (2,8mM), 10 µL de H_2O_2 (1mM), 10 µL de Fe-EDTA ($FeCl_3$ 50 µM, EDTA 52 µM). Os tubos, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37ºC por 30 min. Após este período, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50 mM), 100 µL de NaOH (10M) e 500 µL de H_3PO_4 (20%) foram adicionados aos tubos e os mesmos foram incubados a 85ºC por 20 min. No ensaio, ocorreram as seguintes reações:

Fe^{3+} - EDTA + ascorbato → Fe^{2+} - EDTA + ascorbato oxidado (1)

Fe^{2+} - EDTA + H_2O_2 → OH^- + $^{\bullet}OH$ + Fe^{3+} - EDTA (2)

$^{\bullet}OH$ + deoxirribose → fragmentos → MDA (3)

2TBA + MDA → cromóforo róseo (4)

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada, principalmente, como MDA devido a degradação de deoxirribose causada pelo radical hidroxil. A medida foi realizada em 535 nm a temperatura ambiente.

Foram feitos concomitantemente o branco (ausência de deoxirribose) e o controle positivo (ausência de ácido fítico). Assim, a atividade antioxidante foi expressa como % de seqüestro do radical hidroxil pelo ácido fítico e estimada similarmente a equação **(6)**.

4.8.5 Ensaio de Batofenantrolina

A atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo ácido fítico foi determinada com o ensaio de batofenantrolina (BPS) (Bolanm e Ulvik, 1987). Neste ensaio, 10µL de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ (50 µM), 50µL das diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico do germe de milho e 10µL de BPS (0,2mM) foram adicionados a 2 mL de meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4. O Fe^{2+} e ácido fítico foram mantidos em contato por 0, 5, 10 ou 15 minutos no meio de reação antes da adição de BPS. Após adição dos reagentes, os tubos contendo a mistura de reação foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. A atividade queladora do ferro foi determinada pela formação do complexo $Fe_2(BPS)_3$.

A coloração proveniente da reação foi lida em 530 nm. Foram feitos concomitantemente o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação + Fe^{2+}+ BPS). A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo ácido fítico e estimada similarmente a equação **(6)**.

4.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DO GERME DE MILHO

4.9.1 Efeito do Ácido Fítico sobre a Atividade Inibidora da Peroxidação Lipídica *in vitro* induzida por Ferro

O efeito do ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho sobre a atividade inibidora da peroxidação lipídica induzida por ferro foi avaliado pela

diminuição da formação de malonaldeído (MDA) conforme procedimento descrito por Buege e Aust (1978) e modificado por Casagrande et al. (2006). Neste procedimento ocorrem as seguintes reações:

Fe^{3+} + ascorbato → Fe^{2+} + ascorbato oxidado (1)

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH + Fe^{3+}$ (2)

$LH + {}^{\bullet}OH \rightarrow L^{\bullet} + RH$ (3)

$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ (4)

$LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$ (5)

$LOOH \rightarrow LO^{\bullet}, LOO^{\bullet}$, aldeídos → MDA (6)

2TBA + MDA → cromóforo róseo (7)

Assim, foram misturados em tubos de ensaios 1mL de tampão KH_2PO_4-KOH 20 mM e pH 7,4, 10 µL de ascorbato 10 mM, 100 µL de diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico do germe de milho, 100 µL de ácido linoleico 20 mM, 10 µL de H_2O_2 100 mM e 10 µL de $FeCl_3$ 5 mM. Os tubos foram incubados a 37ºC por 30 min e adicionados 1mL de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 50mM, 100µL de NaOH 10M e 500µL de H_3PO_4 20% e, novamente incubados a 85ºC por 20 min. Os compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico foram extraídos com 2 mL de n-butanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9800 g por 15 minutos e lida a absorvância do sobrenadante em 535 nm a temperatura ambiente.

Foram feitos concomitantemente um branco sem o ácido linoleico e um controle positivo sem o ácido fítico. A atividade antioxidante foi expressa como % inibição da peroxidação lipídica pelo ácido fítico e estimada pela equação **(7)**.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{Ao - Aa}{Ao} \times 100 \qquad \text{Equação(7)}$$

Onde: Aa é a absorvância da amostra e Ao é a absorvância do controle positivo

4.9.2 Preparo das Amostras

As amostras de coxas com sobrecoxas de frango sem pele foram desossadas e trituradas (triturador doméstico) e utilizadas para aplicação de diferentes concentrações de antioxidantes. Assim, 500 g de carnes trituradas foram homogeneizadas com 50 mL de água deionizada contendo, cada uma, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM de ácido fítico padrão, ácido fítico do germe de milho ou 0,5 % de eritorbato de sódio. Uma amostra controle foi utilizada contendo apenas água deionizada e sem adição de antioxidante. Todas as amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno cobertas com uma camada de filme permeável e armazenadas nos tempos de 0, 2, 4 e 6 dias, sob refrigeração a 6 ± 1ºC com luz fluorescente. Em todos os tempos foram realizadas medidas, em triplicatas, de oxidação lipídica (TBARS), desenvolvimento de aroma de requentado (WOF) e formação de metamioglobina.

4.9.3 Medidas de Oxidação Lipídica

Durante o período de armazenamento de 0, 2, 4 e 6 dias, a 6 ± 1ºC, a oxidação lipídica foi acompanhada pelo método do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) conforme procedimento descrito por Tarladgis et al. (1964) e modificado por Crackel et al. (1988). O método consistiu em determinar espectrofotometricamente a 530 nm o complexo de coloração vermelha formado pela condensação de dois moles do TBA com 1 mol de malonaldeído e/ou outras substâncias que reagem com o TBA. Neste procedimento, 10 g de amostra, em triplicata, foram homogeneizadas em um erlenmeyer de 500 mL com 98 mL de água destilada, 2,5 mL de HCl 4 N e 5 gotas de antiespumante (8 partes de Span80 + 1,3 partes de Tween 20) e algumas pérolas de vidro. Em seguida, esta solução foi destilada por 10 minutos e coletados 50 mL. O destilado foi homogeneizado e uma alíquota de 5 mL foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Adicionou-se 5 mL de TBA 0,02 M e colocados em banho-maria fervente por 35 minutos. Após resfriar em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm. A curva padrão foi traçada pelo uso de solução aquosa de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0,1

a 7,0 M. Os resultados foram expressos em mg de TBARS / kg de amostra e a atividade antioxidante foi expressa como:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{(\text{TBARSc} - \text{TBARSa})}{(\text{TBARSc})} \times 100 \qquad \text{Equação(8)}$$

Onde: TBARSc é o valor de TBARS do controle

TBARSa é o valor de TBARS da amostra

4.9.4 Determinação de Aroma de Requentado (WOF)

Inicialmente, cada amostra adicionada de antioxidante, foi embalada a vácuo em saco plástico e aquecida em banho-maria fervente por 20 minutos conforme procedimento descrito por Igene e Pearson (1979). Após aquecimento, as amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno cobertas com uma camada de filme permeável e armazenadas por 48 horas sob refrigeração a 6±1ºC com luz fluorescente. Em seguida, as amostras foram reaquecidas em microondas na potência alta por 4 minutos e analisadas, em triplicata, quanto a oxidação lipídica em TBARS conforme descrito anteriormente. Os resultados de desenvolvimento de aroma de requentado ou WOF foram expressos em mg de TBARS/ kg de amostra e a atividade antioxidante foi estimada similarmente a equação **(7)**.

4.9.5 Determinação da Formação de Metamioglobina

Para análise da porcentagem de metamioglobina nas amostras de frangos trituradas contendo os antioxidantes, 5 g de cada amostra foram colocadas em um tubo de centrífuga de 50 mL e adicionou-se 25 mL de tampão fosfato 40mM e pH 6,8 conforme procedimento descrito por Krzywicki (1982). A mistura foi homogeneizada por 10 segundos a 13500 g e armazenada por 1 hora a 4 ºC. Após esse período foi realizada a centrifugação a 5000 g por 30 minutos a 4ºC. O

sobrenadante foi filtrado com papel de filtro Whatman #1 e a absorvância foi lida no espectrofotômetro a 700, 572 e 525 nm. A porcentagem de metamioglobina formada foi determinada conforme a equação **(9):**

MetMb (%) = {1,395 – [(A_{572}-A_{700}) / (A_{525}-A_{700})] } x 100 Equação**(9)**

Onde: A_{572} é a absorvância do sobrenadante a 572nm

A_{700} é a absorvância do sobrenadante a 700nm

A_{525} é a absorvância do sobrenadante a 525nm

A atividade antioxidante foi estimada similarmente a equação **(7)**.

4.10 ANÁLISES ESTATÍTICAS

Para avaliar a influência do tempo no ensaio de batofenantrolina os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism, Versão 4.00, 2003). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP) e considerado significativamente diferente quando foi obtido $P< 0,05$.

A concentração de ácido fítico que inibiu o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foi estimada pelo software GraphPad Prism (Versão 4.00, 2003), utilizando uma curva hiperbólica (one site binding hyperbola). Para avaliar o efeito da adição dos antioxidantes nas carnes de frango, os dados foram analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Tukey (Programa STATISTICA, Versão 6.0, 2001). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP) e considerado significativamente diferente quando obtido $P< 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de três artigos científicos e de resumos apresentados em eventos científicos e de iniciação científica, conforme segue.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

O artigo a seguir será encaminhado ao periódico ***Food Science and Technology***. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

Processo de Purificação de Ácido Fítico do Germe de Milho

Corn Germ Phytic Acid Purification or Obtaining Process

Cristina Tostes Filgueiras, Tatiana Shizue Fukuji, Elenise Sauer Leal, Lucas Varéa Pereira, Massami Shimokomaki, Elza Iouko Ida*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos/ Centro de Ciências Agrárias/ Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. E-mail: elida@uel.br

Processo de Purificação de Ácido Fítico do Germe de Milho

Corn Germ Phytic Acid Purification or Obtaining Process

Cristina Tostes Filgueiras, Tatiana Shizue Fukuji, Elenise Sauer Leal, Lucas Varéa Pereira**, Massami Shimokomaki, Elza Iouko Ida*

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver o processo de purificação do ácido fítico do germe de milho desengordurado após assegurar os parâmetros de desempenho da sua quantificação. O desempenho do método de determinação do ácido fítico foi demonstrado pela ótima precisão e exatidão com baixo coeficiente de variação, elevada especificidade, linearidade, robustez e os limites mínimos de detecção e quantificação do ácido fítico purificado foram de 0,19 µg/mL e 0,58 µg/mL, respectivamente. A eficiência do processo de purificação de ácido fítico do germe de milho foi avaliada após extração com HCl 0,8mol/L, centrifugação, precipitação e secagem. O ácido fítico purificado em pó apresentou rendimento de 67,01± 0,73% e grau de pureza de 85,41± 0,95% com 15,16 ± 1,58 g/100g de fósforo total, 15,05 ± 0,00 g/100g de fósforo fítico e teor de proteínas de 0,24 ± 0,03 g/100g. O elevado teor de magnésio, sódio e potássio no ácido fítico purificado sugere a sua predominância na forma de seus respectivos fitatos. Em pH 0,6 e 2,0 o ácido fítico purificado foi totalmente solúvel e em pH 7,0 apresentou 76,13% de solubilidade

Palavras-chave: purificação, ácido fítico, germe de milho, obtenção

Abstract

The objective of this work was to develop a process of purifying phytic acid from defatted corn germ after to ensure the parameters the performance of its quantification. The performance of determination method of phytic acid was demonstrated by high precision and accuracy with low coefficient of variation, high specificity, linearity, robustness and minimum limit of detection of 0.19 ug/mL and quantification of 0.58 ug/mL. The efficiency of process of purifying phytic acid was measured after extraction with HCl 0.8 mol/L, centrifugation, precipitation and drying steps. The purified phytic acid powder had a processing yield of 67.01±0.73% and purity index of 85.41±0.95%. The content of total phosphorus and phytic phosphorus was 15.16±1.58 g/100g and 15.05±0.00 g/100g, respectively and the protein content was 0.24±0.03 g/100g. The high content of magnesium, sodium and potassium in phytic acid suggests their predominance in the form of their phytates. The purified phytic acid was completely soluble at pH 0.6 and 2.0 and showed 76.13% of solubility at pH 7.0.

Key Words: purifying, phytic acid, corn germ, obtenção

1. Introdução

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato é um dos componentes dos grãos, tubérculos e leguminosas. Em geral, o ácido fítico possui 60 a 97% do fósforo total e atua como reserva de fósforo (Ravindran, Ravindran & Sivalogan, 1994). Nos cereais, o teor de ácido fítico varia de 3 a 6 g/100g e está distribuído em diferentes componentes do grão (Lolas, Palamidis & Markakis, 1976; Cheryan, 1980; Miller, Yongs & Oplinger,1980). O milho possui 88% do ácido fítico no germe (Reddy, Sathe & Salunkhe, 1982), e este contém 6 a 7 g/100g em base seca (O'Dell, de Boland & Koirtyohann, 1972; Erdman, 1979; Fukuji, Ferreira, Soares, Prete & Ida, 2008).

O ácido fítico apresenta um grande potencial para formação de complexos na presença de cátions (Graf & Eaton, 1990) e sob condições fisiológicas é fortemente ionizado. Este pode interagir com proteínas e íons metálicos formando complexos dos quais muitos são insolúveis e biologicamente indisponíveis para humanos (Graf & Eaton, 1985; Torre & Rodriguez, 1991). Devido a este fato, o ácido fítico foi investigado por vários pesquisadores e considerado como um antinutriente (Morris & Ellis, 1981; Oberleas & Harland, 1981; Sandstrom & Sandberg, 1992; Zhou & Erdman, 1995).

No entanto, a partir da década de 90, o ácido fítico foi reconhecido pelo seu aspecto positivo à saúde humana, principalmente devido a sua capacidade de quelar o ferro e inibir a produção do radical hidroxil (•OH) (Jariwalla, Sabin, Lawson & Herman, 1990; Vucenik, Sakamoto, Bansal & Shansuddin, 1993). O ácido fítico como antioxidante, também tem sido extensivamente investigado devido à redução do risco de câncer de cólon (Ullah & Shansuddin, 1990; Thompson & Zhang, 1991; Vucenik et al., 1993; Yang & Shansuddin, 1995), prevenção de cálculos renais (Ohkawa, Ebisuno, Kitagawa, Morimoto, Miyazaki & Yasukawa, 1984; Grases, Isern, Gabrial, Bauza, Almirall & Rafael, 1992; Zhou & Erdman, 1995) e diminuição do colesterol e triglicérides (Klevay, 1977; Jariwalla et al., 1990).

O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho foi confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. O seqüestro do radical hidroxil e a atividade quelante para o

Fe^{+2} foi dependente da concentração do ácido fítico sendo que a quelação aumentou com o tempo de contato com o Fe^{+2} (Filgueiras, Casagrande, Soares, Shimokomaki & Ida, 2009).

No *Codex Alimentarius*, o ácido fítico foi revisado como antioxidante com INS (System for Food Additives) número 391(Pokorny, Yanishlieva & Gordon, 2003). É rotineiramente empregado em muitos países em diversos produtos alimentícios, devido a sua propriedade antioxidante e tornou uma opção interessante como um aditivo natural em indústria de alimentos (Graf, 1983; Oatway, Vasanthan & Helm, 2001; Pokorny et al., 2003), área médica e indústria química (Graf, 1986; Reddy et al.,1982; Graf & Eaton, 1990). A adição de pequenas quantidades de ácido fítico em alimentos inibe as transformações oxidativas, reduz a degradação de ácido ascórbico e diminui a peroxidação em carnes de frango (Empson et al., 1991). Da mesma forma, em carnes de frango, o ácido fítico preveniu a oxidação lipídica na sua fase inicial com participação sinérgica com a vitamina E (Soares, Olivo, Shimokomaki & Ida, 2004). O germe de milho contendo ácido fítico, foi adicionado na dieta de suínos e, ao final, verificou-se uma inibição da rancidez da carne com manutenção da performance do crescimento (Harbach et al., 2007).

A quantificação de ácido fítico tem sido realizada principalmente pelo uso de métodos por precipitação e cromatografia, sendo que o método por cromatografia de troca iônica desenvolvido por Harland & Oberleas (1977) tem sido amplamente utilizado e adotado como oficial pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Neste método utiliza a resina AG1-X4 para recuperação do fitato, seguido de digestão ácida e quantificação do teor de fósforo por colorimetria. Latta & Eskin (1980) modificaram este método utilizando o reagente de Wade após a cromatografia de troca iônica e quantificação direta do fitato por colorimetria. Ellis & Morris (1986) aplicaram o mesmo método de Harland & Oberleas (1977), porém utilizaram a resina AG1-X8 como mais apropriada para quantificação do ácido fítico devido a precisão e rapidez da análise. A extração do ácido fítico de qualquer produto é a primeira etapa para posterior quantificação, sendo que vários extratores tem sido utilizados e os mais comuns são HCl 0,6 e 1,2mL/100mL e TCA 3 e 5mL/100mL (Thompson & Erdman, 1982; Reddy et al., 1982) ou somente HCl 2,4mL/100mL(Latta & Eskin,1980).

Diferentes métodos de quantificação de ácido fítico em produtos de cereais foram investigados, porém há várias limitações principalmente com relação à extração e quantificação direta ou indireta.

Considerando o uso potencial do ácido fítico como antioxidante e suas várias aplicações principalmente como aditivo natural, este trabalho teve como objetivo desenvolver o processo de purificação do ácido fítico do germe de milho após assegurar os parâmetros de desempenho da sua quantificação.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

Neste trabalho foram utilizados germe gordo (ou integral), germe desengordurado e germe fino de milho provenientes de uma indústria de processamento de milho da região. As amostras foram moídas em moinho de faca (modelo A11 basic, marca IKA) e classificadas com granulometrias acima de 100 mesh em jogo de peneiras (marca Bertel). O fitato de dodecassódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM= 923,8) de milho (Sigma) foi utilizado como padrão e outros reagentes foram de grau analítico. Todos os procedimentos analíticos foram realizados em triplicata.

2.2 Desempenho da quantificação do ácido fítico

A determinação do teor de ácido fítico no germe de milho desengordurado foi realizada, segundo o procedimento descrito por Latta & Eskin (1980), com modificação da resina para Dowex-Agx-4, conforme Ellis & Morris (1986). Para assegurar o processo de obtenção do ácido fítico, foram aplicados os seguintes parâmetros de desempenho da sua quantificação: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

2.3 Estratégia de extração e purificação do ácido fítico do germe de milho

A extração do ácido fítico foi realizada com 20g de germe de milho desengordurado e moído e HCl 0,8 mol/L na proporção sólido-líquido de 1:5 (peso/volume) com agitação por 2 h. O pH do extrato foi ajustado para 4,8 com NaOH 4mol/L, centrifugado a 400 g por 10 min e o resíduo desprezado. O pH do sobrenadante foi ajustado para 9,5 com NaOH 4mol/L para precipitar o ácido fítico e após 12 h para decantar o precipitado, procedeu-se a centrifugação a 400 g por 10 min e obtido o precipitado bruto que foi ressuspenso com 15 mL de HCl 0,8 mol/L. Em seguida, foi adicionado 10 mL de formaldeído e 0,50 g de terra diatomácea e agitado com aquecimento a 50ºC por 1 h e repouso por 2 h para decantar o precipitado. O material foi filtrado (Whatman #1) e o pH do sobrenadante ajustado para 8,5 com $NaHCO_3$ 1,5 mol/L para precipitar o ácido fítico e novamente filtrado (Whatman #1). O precipitado foi transferido para estufa a 60ºC por 2 h para secagem e obtenção do ácido fítico em pó.

O rendimento do processo de extração e purificação do ácido fítico foi estimado pela relação entre o teor de ácido fítico obtido e ácido fítico inicial multiplicado por 100.

2.4 Avaliação do processo de purificação do ácido fítico do germe de milho

O grau de pureza do ácido fítico purificado do germe de milho desengordurado foi analisado pela quantificação do seu teor considerando a sua massa total e a massa de ácido fítico estimada.

O teor de fósforo total foi determinado a partir de 0,10 g do ácido fítico obtido e digestão em 5 mL de solução nitro perclórica e quantificado por colorimetria segundo Chen, Toribara & Warner (1956). O teor de fósforo inorgânico foi quantificado a partir de 1,00 g de amostra do ácido fítico purificado e extração com TCA 12,3 mL/100mL, com agitação por 6 h e quantificado por colorimetria segundo Chen et al. (1956). Para converter o teor de ácido fítico em fósforo fítico foi considerado que a massa molecular do ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$; PM= 660 g/mol) contém uma proporção de 28,2 g/100g de fósforo.

Os constituintes minerais como magnésio, cálcio e zinco do ácido fítico purificado do germe de milho e do padrão foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica e potássio e sódio por fotometria de chama (Dean, 1960; Okumura, Cavalheiro & Nóbrega, 2004).

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC,1997).

A solubilidade do ácido fítico purificado foi avaliada com 30,00 mg de amostra em 100 mL de água destilada ou HCl 1mol/L para ajustes de pH 0,6; 2,0 e 3,5. O extrato foi agitado por 10 minutos a temperatura ambiente, filtrado (Whatman #1) e o teor de ácido fítico solúvel foi quantificado e expresso em porcentagem.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação dos parâmetros de desempenho da quantificação do ácido fítico do germe de milho

Para assegurar a estratégia de purificação do ácido fítico do germe de milho desengordurado, inicialmente foram aplicados os parâmetros de desempenho de sua quantificação como exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A recuperação média do ácido fítico padrão adicionado no germe de milho desengordurado foi de 95,61 ± 0,02% e indicou que a exatidão do método de quantificação foi eficaz. A precisão do método de quantificação foi confirmada pela repetibilidade e recuperação do ácido fítico padrão em diferentes concentrações com coeficientes de variação (CV) de 0,02 a 7,77%. Portanto, o baixo valor de CV indicou que o método apresentou uma boa precisão. A linearidade do método de quantificação de ácido fítico foi analisada pela curva média de calibração, com concentrações crescentes de 25 a 140 µg/mL de ácido fítico padrão e absorvância a 500nm. O coeficiente de regressão linear (R^2) de 99,98% indicou um bom ajuste dos dados. O método apresentou uma boa especificidade com a matriz de germe de milho uma vez que a recuperação foi de 94,64 ±

0,04% e não interferiu na quantificação do padrão de ácido fítico adicionado. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e inclinação da curva de calibração média. Considerando a precisão e exatidão nas condições experimentais, os valores de LD e LQ foram aceitáveis com 0,19 e 0,58 µg/mL de ácido fítico, respectivamente. A robustez do método de quantificação do ácido fítico foi avaliada considerando a suscetibilidade a variações das condições analíticas. Assim, foi considerada a estabilidade do reativo de Wade por 15 dias a 4ºC, fluxo de eluição de 2 mL/min na cromatografia de troca iônica e observado que os resultados não variaram.

Após estabelecer o método e assegurar o seu desempenho, o teor de ácido fítico foi quantificado nos diferentes germes de milho provenientes da indústria de processamento e os resultados estão apresentados na Tabela 1. O teor de ácido fítico diferiu significativamente ($P<0,05$) sendo que o germe desengordurado apresentou maior teor do que o germe gordo e germe fino, devido a diferentes condições de processamento para suas obtenções. O milho difere de outros cereais por apresentar maior concentração de ácido fítico no germe, com uma distribuição de aproximadamente 88,50% em relação ao grão inteiro (O'Dell et al., 1972). Nas indústrias de processamento de milho, geralmente o endosperma do grão é utilizado para preparo de produtos como canjica, creme, fubá e farinha, enquanto que o germe é destinado principalmente à extração de óleo (Reddy et al., 1982) e o resíduo é subutilizado. Dos componentes do milho analisados por Fukuji et al., (2008) o germe foi o que apresentou maior teor de ácido fítico com 8,09g/100g quando comparado com endosperma e grão inteiro do milho com teor de 0,07 e 1,15g/100g, respectivamente. Assim, o germe de milho desengordurado foi utilizado como matéria-prima no processo de obtenção, devido o seu elevado teor de ácido fítico e potencial de aplicação como um antioxidante.

3.2 Estratégia do processo de extração e purificação do ácido fítico de germe de milho

O extrato bruto de ácido fítico do germe de milho desengordurado e moído foi purificado a partir da extração com HCl 0,8mol/L, com agitação por 2h, ajuste de pH para 4,8 com NaOH 4mol/L e centrifugação. Segundo O'Dell & de Boland (1976) o ponto isoelétrico das proteínas solúveis do germe de milho ocorre em pH 4,8 com baixa associação com o fitato. Em pH ácido e abaixo do ponto isoelétrico da proteína, o ácido fítico forma ligações eletrostáticas fortes com resíduos de aminoácidos básicos e o ácido fítico precipita com as proteínas (Reddy et al., 1982). Assim, neste trabalho o pH final do extrato bruto foi ajustado para 4,8 para diminuir a interação fitato-proteína e aumentar o rendimento de ácido fítico extraído. Após etapas de precipitação, decantação e centrifugação, o precipitado contendo o ácido fítico foi ressuspenso com 15 mL de HCl 0,8mol/L, 10 mL de formaldeído e 0,50g de terra diatomácea. O formaldeído promoveu a desnaturação de proteínas e destruiu o complexo fitato-proteína e a terra diatomácea permitiu uma melhor separação do ácido fítico devido a adsorção dos resíduos, principalmente os compostos de carga positiva (Kolchev, 1978).

Após 2h de secagem do ácido fítico em estufa a 60ºC, obteve-se o ácido fítico purificado em pó de cor branca com rendimento de 67,01± 0,73% em relação ao teor de ácido fítico do extrato bruto.

A eficiência da estratégia do processo de purificação de ácido fítico do germe de milho desengordurado foi avaliada pelas características do produto obtido. O grau de pureza do ácido fítico purificado foi de 85,41± 0,95% e de impurezas de 14,59 ± 0,95%. Esta pureza poderia aumentar após eliminar os sais inorgânicos e possivelmente utilizar uma etapa adicional no processo, como um trocador de íon ou adequando a quantidade de terra diatomácea. A obtenção comercial do fitato de sódio purificado e livre de íons metálicos foi realizada utilizando a resina de troca aniônica dowex-50, conforme descrito na patente Nº 3.591.665 (1971). Os constituintes minerais do ácido fítico purificado e do padrão estão apresentados na Tabela 2. O elevado teor de magnésio no ácido fítico purificado sugere que o mesmo encontra-se predominantemente na forma de fitato de magnésio, enquanto que o

teor de sódio foi elevado no ácido fítico padrão. O ácido fítico pode ser encontrado em diversas fontes vegetais na forma de sais mistos de magnésio, cálcio e potássio (Morris & Ellis, 1981; Zhou & Erdman, 1995). A detecção de outros constituintes como cálcio, magnésio, zinco e potássio podem indicar também a presença de seus respectivos fitatos.

No ácido fítico purificado, o teor de fósforo total foi de 15,16 ± 1,58 g/100g e fósforo inorgânico de 0,11± 0,01g/100g. Considerando que todo fósforo orgânico encontra-se na forma de fósforo fítico, o seu teor estimado foi de 15,05 ± 0,00 g/100g, devido à diferença entre fósforo total e inorgânico. O teor de 15,05 ± 0,00 g/100g de fósforo orgânico foi convertido em 53,43 ± 0,00 g/100g de ácido fítico, utilizando o fator de conversão de 3,55. Portanto, se o fósforo total do ácido fítico purificado do germe de milho foi de 15,16 ± 1,58 g/100g e fósforo fítico de 15,05 ± 0,00 g/100g, foi estimado que 99,27% do fósforo total foram provenientes do fósforo fítico. Este resultado confirma que, segundo Ravindran et al., (1994), nos cereais, o ácido fítico é considerado uma reserva de fósforo e representa 60 a 97% do fósforo total contido no grão. A precipitação final do sobrenadante com $NaHCO_3$ 1,5mol/L durante o processo de purificação do ácido fítico, impediu a precipitação do fosfato inorgânico, que foi eliminado na filtração. Consequentemente, o ácido fítico purificado apresentou melhor rendimento em fósforo fítico. A precipitação com $NaHCO_3$ também foi descrita por Kolchev (1978) para obtenção de ácido fítico de diferentes fontes vegetais como farelo de arroz, semente de girassol, soja e trigo. A eficiência da precipitação do ácido fítico com $NaHCO_3$ 1,5mol/L foi confirmada pelo reduzido teor de fósforo inorgânico.

O teor de proteínas no ácido fítico de germe de milho desengordurado foi de 0,24 ± 0,03 g/100g e indica que o processo de purificação do ácido fítico foi eficaz na separação da proteína complexada com o ácido fítico. As etapas que contribuíram para a diminuição da formação destes complexos foram o ajuste de pH final da solução de extração para o ponto isoelétrico da proteína e adição de 0,50 g de terra diatomácea. Segundo O'Dell e de Boland (1976) o ácido fítico apresenta afinidade com proteínas formando complexos insolúveis que poderiam indisponibilizar o ácido fítico e diminuir a sua capacidade como quelante e aplicação como antioxidante.

Os resultados da solubilidade do ácido fítico purificado em água e meio ácido estão apresentados na Tabela 3. Em pH 0,6 e 2,0, o ácido fítico foi totalmente solúvel ($P<0,05$) e em pH 3,5, o ácido fítico apresentou 82,83% de solubilidade. Segundo Nolan & Duffin (1987) em meio ácido e pH inferior a 3,0 os fitatos são, em geral, solúveis. Em água, cujo pH foi de 5,5 e em pH 7,0, o ácido fítico apresentou 70,56 e 76,13% de solubilidade, respectivamente. Possivelmente, esta menor solubilidade foi devido à presença de outros sais como bicarbonato de sódio que, em solução, aumentam o pH do meio. No fitato purificado, houve predominância do íon magnésio e em pH próximo de 6,0 alguns fitatos como fitato de cálcio, zinco, magnésio e cobre apresentam baixa solubilidade (Oberleas, 1973; Nolan & Duffin, 1987).

Conclusão

O processo de extração e purificação de ácido fítico do germe de milho desengordurado foi assegurado pelo ótimo desempenho do método de quantificação e purificação com 67,01± 0,73% de rendimento e 85,41± 0,95% de pureza. O ácido fítico purificado apresentou elevado teor de fósforo fítico e magnésio, baixo teor de proteínas e alta solubilidade em pH fortemente ácido.

Agradecimentos

C. T. F. agradece a Fundação CAPES/MEC pela concessão de bolsa de Doutorado e E.I.I. e M. S. ao CNPq/MCT pelo apoio financeiro e bolsa produtividade.

5. Referências

AOAC. (1997). *Official method of* analysis (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analitycal Chemists.

Chen JR, P. S., Toribara, T. S. & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorous. *Analytical Chemistry, 28*, 1756-1758.

Cheryan, M. (1980). Phytic acid interaction in food systems. *CRC Crtical Reviews in Food Science and Nutrition.13,* 297.

Dean, J. A. (1960). Flame Photometry. New York: McGraw-Hill.

Ellis, R. & Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chemistry, 63*(1), 58-59.

Empson, K. L., Theodore, P. L. & Graf, E. (1991). Phytic acid as a food antioxidant. *Journal of Food Science, 56*(2), 560-563.

Erdman, J. W. (1979). Oilseed Phytates: Nutritional Implications. *Journal of American Oil Chemist's Society, 56*, 736.

Filgueiras, C.T., Casagrande, R., Soares, A.L., Shimokomaki, M., Ida, E.I. (2009). Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Química Nova*, (aceito para publicação)

Fukuji, T. S., Ferreira, D. L., Soares, A. L., Prete, C. E. C. & Ida, E. I. (2008). Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. *Acta Scientiarum Agronomy, 30*(1), 31-35.

Graf, E. (1983). Applications of phytic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society, 60*(11), 1861-1867.

Graf, E. (1986). Phytic Acid: Chemistry and Applications. Minneapolis: Pilatus Press.

Graf, E. & Eaton, J.W. (1985). Dietary suppression of colonic cancer. Fiber of phytate. *Cancer, 56*, 717-718.

Graf, E. & Eaton, J.W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical in Biology Medicine, 8*, 61-90.

Grases, F.F., Isern, M., Gabrial, J., Bauza, C., Almirall, P. & Rafael, M. (1992). Use of phytic acid, its salts and phytate-rich diet for treatment of prepathological and pathological conditions associated with idiopathic oxalocalcic renal lithiasis. Spain ES 2058025. A1. *Pharmacology*.

Harbach, A.P.R., Costa, M.C.R., Soares, A.L., Bridi, A.M., Shimokomaki, M., Silva, C.A. & Ida, E.I. (2007). Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. *Food Chemistry,100*, 1630-1633.

Harland, B.F. & Oberleas, D. (1977). A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chemistry*, *54*(4), 827-832.

Jariwalla, R. J., Sabin, R., Lawson, S. & Herman, Z. S. (1990). Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *Journal of Applied Nutrition, 42*,18-28.

Klevay, L. M. (1977). Coronary heart disease: the Zinc/copper hypothesis. *American Journal of Clinical Nutrition, 28*, 764-774.

Kolchev, L. A. (1978) Method for Producing phytin. United States Patent Nº 4070422, *Chemical Abstracts, 45*, 24.

Latta, M. & Eskin, M. (1980). A simple and rapid method for phytate determination. *Journal Agriculture Food Chemistry, 28*(6), 313-1315.

Lolas, G.M., Palamidis, N. & Markakis, P. (1976). The Phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chemistry, 53*(6), 867-871.

Miller, G.A., Yongs, V.L. & Oplinger, E.S. (1980). Environmental and Cultivar Effects on Oat Phytic Acid Concentration. *Cereal Chemistry, 57*(3), 189-191.

Morris, E.R. & Ellis, R. (1981). Phytate-zinc molar ratio of breakfast cereals and bioavailability of zinc to rats. *Cereal Chemistry, 58*, 363-366.

Nolan, K.B. & Duffin, P.A. (1987). Effects of Phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of Phytate. *Journal Science Food Agriculture, 40*, 79-85.

Oatway, L., Vasanthan, T. & Helm, J.H. (2001). Phytic acid. *Food Reviews International, 20*(17), 419-431.

Oberleas, D. (1973). Phytates. In: National Academy of Sciences. Toxicants occurring naturally in foods (pp. 363-371). Washington: National Academy of Sciences.

Oberleas, D. & Harland, B. (1981). Phytate content of foods: effect on dietary zinc bioavailability. *Journal of American Dietetic Association, 79*, 433-436.

O'Dell, B.L., de Boland, A. & Koirtyohann, S.R. (1972). Distribution of Phytate and Nutricionally Important Elements among the Morphological Components of Cereal Grains. *Journal Agriculture Food Chemistry, 20*(3), 718-721.

O'Dell, B.L. & de Boland, A. (1976). Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. *Journal Agriculture Food Chemistry, 24*(4), 804-808.

Ohkawa, T., Ebisuno, S., Kitagawa, M., Morimoto, S., Miyazaki, Y. & Yasukawa, S. (1984). Rice Bran Treatment for Patients with Hypercalciuric Stones: Experimental and Clinical Studies. *Journal of Urology, 132*, 1140-1145.

Okumura, F., Cavalheiro, E.T.G. & Nóbrega, J.A. (2004). Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. *Química Nova, 27*(5), 832-836.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2003). Antioxidants in food. Washington: CRCPress.

Ravindran, V., Ravindran, G. & Sivalogan, S. (1994). Total and Phytate Phosphorus Contents of Various Foods and Feedstuffs of Plant Origin. *Food Chemistry, 50*, 133-136.

Reddy, N. R., Sathe, S. K. & Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in Legumes and Cereals. *Advances in Food Research, 28*, 1-91.

Sandstrom, B. & Sandberg, A.S. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *Journal of Trace Elements and Eletrolytes in Health and Disease, 6*, 99-103.

Soares, A. L., Olivo, R., Shimokomaki, M. & Ida, E.I. (2004). Synergism Between Dietary Vitamin E and Exogenous Phytic Acid in Prevention of Warmed-Over-Flavor Development in Chicken *Pectoralis major*. *Brazilian Archives Biology and Technology, 47*(1), 57-62.

Thompson, D.B. & Erdman JR, J.W. (1982). Phytic acid in Soybeans. *Journal of Food Science, 47*, 513-517.

Thompson, L.U. & Zhang, L. (1991). Phytic acid and minerals: effect on early markers of food products of cereals and colon carcinogenesis. *Carcinogenesis, 12*, 2041-2045.

Torre, M. & Rodriguez, A.R. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1*(1), 1-22.

Ullah, A. & Shansuddin, A. M. (1990). Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F 344 rats. *Carcinogenesis, 11*, 2219-2222.

Vucenik, I., Sakamoto, K., Bansal, M. & Shansuddin, A. M. (1993). Inhibition rat mammary carcinogenesis by inositol hexaphosphate (phytic acid). A pilot study. *Cancer Letters, 75*, 95-102.

Yang, G.Y. & Shamsuddin, A.M. (1995). IP6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: involvement of intracellular inositol phosphates. *Anticancer-Research, 15*(6), 2479-2487.

Zhou, J. R. & Erdman, J. W. (1995) Jr. Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35*(6), 495-508.

Zumstein, F. & Assmann, E. (1971). Phytic acid Production. United States Nº 3.591.665. *Chemical Abstracts, 73*, 4160.

Tabela 1. Teor de ácido fítico de germes de milho de uma indústria de processamento

Amostra	Ácido fítico (g/100g)*
Germe gordo	4,53[b]± 0,02
Germe desengordurado	4,73[a]± 0,01
Germe Fino	4,10[c]± 0,03

*teor de ácido fítico em triplicata expressos em base seca.
Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Constituintes minerais do ácido fítico do germe de milho e padrão

Constituintes(g/100g)	Ácido fítico padrão	Ácido fítico do germe de milho
Cálcio	0,52 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Magnésio	0,01 ± 0,02	2,62 ± 0,02
Potássio	0,18 ± 0,02	0,38 ± 0,01
Sódio	0,70 ± 0,01	0,40 ± 0,01
Zinco	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01

Tabela 3. Solubilidade do ácido fítico do germe de milho desengordurado em água e diferentes pH

Meio de solubilidade	Teor de ácido fítico (g/100g)	Solubilidade do ácido fítico (%)
Água (pH 5,5)	4,94 ± 0,32	70,56[d]
pH 0,6	7,00 ± 0,29	100,00[a]
pH 2,0	6,99 ± 0,33	99,94[a]
pH 3,5	5,79 ± 0,56	82,83[b]
pH 7,0	5,33 ± 0,41	76,13[c]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Guide for Authors

An official journal of the Swiss Society of Food Science and Technology (SGLWT/SOSSTA) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

LWT - Food Science and Technology is an international journal that publishes innovative papers in the fields of food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and nutrition. The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication. Submission of a paper will be held to imply that it presents original research, that it has not been published previously, and that it is not under consideration for publication elsewhere.

Papers featuring animal trials are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submission for all types of manuscripts to *LWT - Food Science and Technology* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, http://ees.elsevier.com/lwt, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail generated by EES and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. Authors must submit revisions via EES. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to authorsupport@elsevier.com.

Books for review should be sent to the Editors; all other correspondence should be sent directly to the publishers.

Three types of peer-reviewed papers will be published:

Timely Reviews. These concise reviews should present a focused aspect on a topic of current interest or an emerging field. They are not intended as comprehensive literature surveys covering all aspects of the topic, but should include all major findings and bring together reports from a number of sources. They should aim to give balanced, objective assessments by giving due reference to relevant published work, and not merely present the prejudices of individual authors or summarise only work carried out by the authors or by those with whom the authors agree. Undue speculation should also be avoided. These reviews will receive priority in publication.

Research Papers. Reports of complete, scientifically sound, original research which contributes new knowledge to its field. The paper must be organised as described below.

Research Notes. Brief reports of scientifically sound, original research of limited scope of new findings. Research Notes have the formal organisation of a full paper. Such notes will receive priority of publication.

Peer Reviews
It is the journal policy to keep the peer reviewing anonymous. Names of reviewers are only revealed if they are in agreement with the request of the author. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper.

Language
Manuscripts should be written in English. Authors whose mother tongue is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by someone familiar with English scientific writing. The Editors reserve the right to make any necessary linguistic alterations without consulting the authors.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS - Research papers and research notes
Authors should aim at producing 6 printed A4 pages (research papers) or 3 printed pages (research notes), which corresponds to approximately 18 and 9 pages of double-spaced type, respectively. All papers should follow the new style for LWT. Please see Volume 36 issue 1 onward. Manuscripts should be double-spaced throughout, with a left-hand margin of not less than 4 cm. On the first page, immediately below the title, give authors' names, affiliations and business addresses. Number the lines of each page. If your manuscript cites submitted but unpublished papers, send one copy of each of these papers with your manuscript.

The SI system (Systeme International d'Unites, often referred to as 'International Units') must be used for reporting units of measurement. Do not use %, ppm, M, N, etc. as units for concentrations. If analytical data are reported, replicate analyses must have been carried out and the number of replications must be stated.

Standard error or other evidence of reliability of data must be given.

Editorial Style
Title. The title of the papers should be short but informative.

Abstract. Each article should include an abstract, not exceeding 200 words.

Introduction. In the Introduction, briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation being reported.

Methods. Results. Discussion. Following the Introduction, authors are free to structure papers as appropriate. However, for the sake of clarity and uniformity, the above or similar section headings are recommended. If necessary, each section may be divided into further subsections, but do not use more than two levels for subtitles.

The Materials and Methods section must provide enough detail that a competent worker can repeat the experiments. However, detailed descriptions of well-known methods should be avoided in the experimental section. References to the relevant literature are sufficient. The Discussion should not be a compilation of current literature, but a consideration of the significance and consequences of the authors' present findings.

References
All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References should be given in the following form:

Watt, D. K., Brasch, D. J., Larsen, D. S., & Melton, L. D. (1999). Isolation, characterisation, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, 39(2), 165-180.

Closs, C. B., Roberts, I. D., Conde-Petit, B., & Eschler, F. (1997). Phase separation and rheology of aqueous amylopectin/ galactomannan systems. In E. J. Windhab, & B. Wolf. Proceedings of the 1st international symposium on food rheology and structure (pp. 233-237). Hannover: Vincentz Verlag.

Stephen, A. M. (1995). Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker.
Wurzburg, O. B. (1986). Cross-linked starches. In O. B. Wurzburg, Modified starches: properties and uses (pp. 41). Boca Raton, FL: CRC Press.

Tables
Tables should be numbered and headed by a short but informative title. The experimental conditions, as far as they are necessary for understanding, should be given. Use no vertical and few horizontal lines. Probabilities may be indicated by *P < 0.05, **P <0.01 and ***P <0.001. Tables should be submitted on separate sheets.

Figures and Illustrations
Figures must be provided on separate sheets. Do not repeat material already included in tables. Figures should be comprehensible without reference to the text. All drawings and graphs should not exceed 20 x 20.5 cm in size. All illustrations should be consecutively numbered. Keys to graphs etc., should not appear on the figure, but only in the figure legend. Legends should consist of a short title followed by a brief description of experimental conditions and, where necessary, a key. Where it is necessary to use photographs, these should again be clearly labelled and numbered. Authors are strongly advised to consult Elsevier's artwork instructions before uploading any graphics files for electronic submission. These are available at http://authors.elsevier.com/artwork.

Colour Illustrations
If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see http://www.authors.elsevier.com/artworkinstructions. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to grey scale (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

Key Words
Four to five pertinent key words should be provided. If possible the Food Science and Technology Abstracts (FSTA) Thesaurus should be used (IFIS Publ., Shinfield, Reading RG2 9BB, UK http://www.foodScienceCentral.com).

PREPARATION OF MANUSCRIPTS - Timely Reviews

Timely reviews on topics of interest to wide readership will be published.
The reviews may address pertinent issues in food science, technology, processing, nutritional aspects of raw and processed foods and may include nutraceuticals, functional foods, use of "omics" in food quality, food processing and preservation, and food production. Articles should be focused on a narrow topic of interest.
Topics to be covered should be at the cutting edge of science, well thought out, succinct, focused and clear. Ideally, the review should provide a view of the state of the art and suggest possible future needs and trends.
All articles will be subjected to peer review process.

Submit an abstract of the proposed review to the Reviews Editor (Professor Shridhar Sathe, ssathe@fsu.edu for consideration prior to preparing the full length manuscript. Abstract of the proposed work should include the following:
a. The abstract should identify the need for the proposed article, the intended audience, and five key words.
b. Title (120 characters or less)
c. Short abstract (≤ 300 words).
d. Identify the address and contact information for the contact author. The contact information should include author name, postal address, telephone number, fax number, and email.
e. Anticipated time needed to complete the proposed work once the initial abstract has been approved.

Manuscript Preparation
a. All manuscripts must be electronically submitted through the journal web-site.
b. Use 8.5 x 11" (or A4) page size.

c. All lines and pages must be numbered.
d. All text should be double-spaced.
e. Set all margins at 1".
f. Total manuscript length ≤ 3,000 words (text portion).
g. Total number of Tables ≤ 5.
h. Total number of figures ≤ 5.
i. Maximum number of references (including those cited in tables and figures) not to exceed 50.
j. In the reference list identify five (5) key references (indicated by an * in front of the reference in the reference section). In two to three sentences explain why this reference is a key reference.
k. All tables and figures must be prepared according to LWT style (please refer to instructions prior to this section).

Proofs
When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. **Offprints**
The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge. **Copyright**
Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see http://www.elsevier.com/copyright). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com **Author Enquiries**
Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature at http://www.elsevier.com/trackarticle. Other questions or queries will also be dealt with via the website http://authors.elsevier.com. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

O artigo a seguir foi encaminhado ao periódico Química Nova e aceito para publicação, conforme segue.

Aceite do Manuscrito

Número do Manuscrito: 439/08V2

Recomendação

Publicar

Comentários

A publicação de figuras coloridas tem custo repassado aos autores, quando da publicação (vide normas da QN). Indicar claramente em carta à editoria se aceitam arcar com esse repasse ou enviar as figuras em preto-e-branco.

Cópia do e-mail enviado ao Autor

REF.: 439/08V2

Ilmo(a).Sr(a).
Prof(a). Ida, Elza
UEL
Londrina, Pr

Prezado(a) Prof(a). Ida, Elza,

Comunicamos a V.Sa. que seu manuscrito "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO" [REF.: 439/08V2] foi aceito para publicação em Química Nova, com as correções indicadas pela editoria:

[ ] Corrigir as referências seguindo as normas da revista, verificando também as abreviações dos periódicos (vide home page da SBQ: http://quimicanova.sbq.org.br). Atenção especial a negritos e itálicos.

[X] Enviar arquivos separados de texto, figuras, gráficos, tabelas etc. As figuras devem ser enviadas, preferencialmente, em origin, chemdraw ou corel. Os arquivos NÃO PODEM TER marcas de correção.

[X] Reduzir/redesenhar as Figuras para 8,5 cm de largura total (equivalente a uma coluna da revista).

[ ] Se Figuras e Tabelas foram copiadas da literatura é necessário permissão de publicação emitida pela editora da revista ou livro.

Assessor 1 - Comentários:

As sugestões propostas foram acatadas e o material encontra-se adequado para publicação neste periodico

Assessor 1 - Report:

Recomendação Aceito

==========

Assessor 2 - Comentários:

Os autores atenderam às sugestões de forma integral, promovendo as alterações sugeridas de forma clara e objetiva. O texto apresenta contribuição original e importante para a pesquisa nesta área de atuação, estando apto, em nosso entendimento, a ser publicado na forma em que se apresenta.

Assessor 2 - Report:

Recomendação Aceito

==========
Comentários do(a) Gerente Editorial:

A publicação de figuras coloridas tem custo repassado aos autores, quando da publicação (vide normas da QN). Indicar claramente em carta à editoria se aceitam arcar com esse repasse ou enviar as figuras em preto-e-branco.

==========

Por favor, envie a versão final, através do sistema on line da QN, em formato Word e as figuras, se possível, em um dos programas indicados acima. Caso contrário, verificar nas Instruções para Autores outros programas/extensões aceitáveis.

Agradecemos o seu interesse, cooperação e compreensão. Em caso de dúvidas, por favor, entre em contato.

Informações adicionais sobre formatação e estilo adotados pela QN, podem ser obtidos em http://quimicanova.sbq.org.br.

Atenciosamente,

Pricila Gil
SBQ - gerente editorial
Caixa Postal: 26037
05513-970 São Paulo - SP

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO

Cristina Tostes Filgueiras, **Adriana Lourenço Soares**, **Massami Shimokomaki**, **Elza Iouko Ida***

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

Rúbia Casagrande

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

*e-mail: elida@uel.br

CORN GERM PHYTIC ACID ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION. The obtained corn germ phytic acid (CGPA) antioxidant potential was evaluated through the deoxyribose, bathophenanthroline (BPS) and DPPH$^{\bullet}$ assays. In the concentration of 130.5μM of CGPA the hydroxyl radical maximum sequestering antioxidant activity was 29.3% while standard phytic acid (SPA) presented this maximum activity of 18.2% in the concentration of 33.2μM of SPA. The BPS assays revealed that the chelation activity towards Fe^{2+} increased concurrently with the increase of CGPA concentration and its Fe^{2+} contact time. Finally, DPPH$^{\bullet}$ assay showed that CGPA and SPA did not present electron-donating capacity to DPPH$^{\bullet}$.

Keywords: Phytic acid; antioxidant; corn germ.

INTRODUÇÃO

O ácido fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato (IP6) está presente em cereais, leguminosas, oleaginosas, pólens e amêndoas, em concentrações variando de 1 a 5% do seu peso.[1] Nos cereais, o AF está distribuído em diferentes componentes do grão. A maior concentração do AF no trigo está na aleurona e, no arroz, no pericarpo, enquanto que o milho apresenta elevado teor no germe e ao redor de 6,5%. [2,3,4,5]

O AF apresenta cargas negativas em ampla faixa de pH e possui 12 hidrogênios dissociáveis.[6] Estas características proporcionam ao AF uma propriedade quelante com metais polivalentes, especialmente cátions di e trivalentes, formando complexos.[7] Devido à propriedade quelante e formação de complexos com alguns minerais importantes, tornando-os bioindisponíveis, muitas investigações foram desenvolvidas considerando-se o AF como um antinutriente.[1] Entretanto, a bioindisponibilidade depende de fatores experimentais como proporção metal:fitato[8] e tipo de dieta.[9] Por outro lado, a propriedade quelante do AF é de elevada importância devido a sua ação como um antioxidante e anticancerígeno.[8,10,11,12,13] A habilidade do AF formar um quelato com o ferro que o torna cataliticamente inativo, confere ao AF uma atuação como um antioxidante, pois inibe a oxidação com formação de radicais hidroxil (•OH).[10,14,15,16]

Estudos *in vitro* indicaram que o AF e seus derivados, o inositol pentafosfato (IP5), inositol tetrafosfato (IP4) e inositol trifosfato (IP3) apresentam capacidade de ligação aos íons metálicos dependendo do número de fosfatos desprotonados da molécula.[17]

A propriedade antioxidante ou quelante do AF torna-o um composto único e versátil como aditivo de alimentos[18] e rotineiramente empregado em vários países para prevenir a descoloração, melhorar a qualidade nutricional e prolongar a validade dos produtos.[19] O AF foi reconhecido em 1997 como GRAS (Generally Recognised as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) e tem sido usado como um aditivo em produtos de panificação.[20] No *Codex Alimentarius*, o AF foi revisado como antioxidante com INS (System for Food Additives) número 391.[21]

O potencial antioxidante do AF foi confirmado por vários autores, principalmente em produtos cárneos ou sistemas modelos[10,12,13,19,22,23,24] com finalidade de preservar o produto. Entretanto, não há descrições na literatura sobre o mecanismo de ação do AF como antioxidante por meio de ensaios específicos.

Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante.[25,26] Dentre estes métodos destacam-se o sistema de quelar íons Fe^{+2} usando a batofenantrolina (BPS) e os métodos de seqüestro de radicais livres, tais como $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e radical hidroxil por meio do ensaio de deoxirribose.[26]

O método para determinação da atividade queladora do íon ferro pelo antioxidante, utilizando a BPS como um forte quelador de ferro, baseia na formação do complexo colorido $Fe_2(BPS)_3$, o qual pode ser alterado pela maior ou menor afinidade do antioxidante pelo ferro.[27] O método para avaliar o sequestro de radicais livres está baseado na capacidade de compostos doarem elétrons ao radical estável $DPPH^{\bullet}$ [28,29] e o ensaio de deoxirribose avalia a eficiência do antioxidante no seqüestro de radicais hidroxil.[30] No ensaio de deoxirribose, o açúcar é degradado na presença de radical hidroxil gerado pela mistura de Fe^{3+}, ascorbato, H_2O_2 e EDTA. Os radicais hidroxil ao reagirem com a deoxirribose, resulta em uma série de reações formando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e avaliadas como malonaldeído (MDA). O MDA pode ser detectado pela sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em condições ácidas.[30,31] Qualquer outra molécula, adicionada à mistura de reação, com capacidade de reagir com radical hidroxil pode competir com a deoxirribose por este radical, acarretando, portanto, num decréscimo da taxa de degradação de deoxirribose.[32]

Considerando a atuação do AF como antioxidante, suas várias aplicações e elevada concentração no germe de milho, este trabalho avaliou o potencial antioxidante do AF obtido do germe por meio de ensaios de deoxirribose, batofenantrolina e $DPPH^{\bullet}$.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Para obtenção de AF foi utilizado germe de milho desengordurado, que foi fornecido por uma Cooperativa Agrícola da região. O material continha 4,8% de AF que foi extraído com HCl 0,8M (1:5 p/v), seguido de centrifugação, etapas de precipitação e secagem.[33] O rendimento da obtenção foi de 67,0% e pureza de 85,4% e, o AF assim obtido foi denominado como AF-GM e quantificado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria a 500nm[34] com modificação da resina para DOWEX-AGX-4.[35] O AF padrão utilizado foi o fitato de dodecassódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM= 923,8) de milho, com 90% de pureza, da Sigma.

Preparo das Amostras

O AF-GM e AF padrão, em triplicatas, foram diluídos em água deionizada com obtenção de concentrações finais de 0,3 µM; 0,6 µM; 1,3 µM; 2,6 µM; 3,3 µM; 6,6 µM; 13,1 µM; 16,6 µM; 33,2 µM; 66,5 µM; 130,5 µM; 261,87 µM e 652,7 µM e empregadas para investigar o potencial antioxidante por meio de ensaios utilizando $DPPH^{\bullet}$, deoxirribose e batofenantrolina.

Precisão dos Métodos Analíticos

A precisão dos métodos de deoxirribose e batofenantrolina foi determinada pela repetibilidade (intra-ensaio) e precisão intermediária (inter-ensaio). A repetibilidade, para o ensaio de deoxirribose, foi avaliada no mesmo dia por meio de análises de amostras com a mesma concentração (6,6 e 66,5 µM de AF padrão). Para ensaio de batofenantrolina foram utilizadas concentrações de 3,3 e 6,6 µM de AF padrão. A precisão intermediária foi determinada nas mesmas concentrações e comparadas as análises em 3 dias diferentes.

Ensaio de DPPH$^{\bullet}$

A atividade antioxidante de diferentes concentrações de AF padrão e AF-GM foram determinadas pela capacidade doadora de elétrons do AF ao radical livre estável DPPH$^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).[36] Foram misturados em tubos de ensaio 1 mL de tampão acetato 100mM, pH igual a 5,5, 1 mL de etanol, 0,5 mL de 250µM de solução etanólica de DPPH$^{\bullet}$ e 50µL de diferentes concentrações de AF padrão ou AF-GM. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 min e a absorvância foi lida a 517nm. O controle positivo não continha AF e o branco foi constituído de 1 mL de tampão acetato 100mM, pH5,5 e 1,5 mL de etanol. A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade doadora de elétrons ao radical DPPH$^{\bullet}$ pelo AF e estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de Atividade antioxidante} = 100 - (100\ A_a / A_0) \qquad \text{Equação } \mathbf{(1)}$$

Onde A_a é a absorvância da amostra e A_0 é a absorvância do controle positivo.

Ensaio de Deoxirribose

A eficiência do AF no seqüestro do radical hidroxil foi avaliada pela degradação de deoxirribose.[31] Foram misturados em tubos de ensaios 1mL de tampão KH_2PO_4-KOH (20mM, pH 7,4), 10 µL de ascorbato (100µM), 50µL de diferentes concentrações de AF padrão ou AF-GM, 10µL de deoxirribose (2,8mM), 10µL de H_2O_2 (1mM), 10µL de Fe-EDTA ($FeCl_3$ 50µM, EDTA 52µM). Os tubos, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37ºC por 30 min. Após este período, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50mM), 100µL de NaOH (10M) e 500µL de H_3PO_4 (20%) foram adicionados aos tubos e os mesmos foram incubados a 85ºC por 20 min. No ensaio, ocorreram as seguintes reações:

Fe^{3+} - EDTA + ascorbato $\rightarrow$ Fe^{2+} - EDTA + ascorbato oxidado (1)

Fe^{2+} - EDTA + $H_2O_2 \rightarrow OH^-$ + $^{\bullet}OH$ + Fe^{3+} - EDTA (2)

$^{\bullet}OH$ + deoxirribose → fragmentos → MDA (3)

2TBA + MDA → cromóforo róseo (4)

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada, principalmente, como MDA devido a degradação de deoxirribose causada pelo radical hidroxil. A medida foi realizada em 535nm a temperatura ambiente. Foram feitos concomitantemente o branco (ausência de deoxirribose) e o controle positivo (ausência de AF). Assim, a atividade antioxidante foi expressa como % de seqüestro do radical hidroxil pelo AF e estimada similarmente a equação **(1)**.

Ensaio de Batofenantrolina

A atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo AF foi determinada com o ensaio de batofenantrolina (BPS).[27] Neste ensaio, 10µL de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ (50 µM), 50µL das diferentes concentrações de AF padrão ou AF-GM e 10µL de BPS (0,2mM) foram adicionados a 2 mL de meio de reação contendo 125mM de sacarose, 65mM de KCl, e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4. O Fe^{2+} e AF foram mantidos em contato por 0, 5, 10 ou 15 minutos no meio de reação antes da adição de BPS. Após adição dos reagentes, os tubos contendo a mistura de reação foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. A atividade queladora do ferro foi determinada pela formação do complexo $Fe_2(BPS)_3$.

A coloração proveniente da reação foi lida em 530nm. Foram feitos concomitantemente o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação + Fe^{2+}+ BPS). A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo AF e estimada similarmente a equação **(1)**.

Análises Estatísticas

Para avaliar a influência do tempo no ensaio de batofenantrolina os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Bonferroni (Programa GraphPad Prism, Versão 4.00, 2003). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (SEM) e considerado significativamente diferente quando foi obtido $P< 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Precisão dos Métodos Analíticos

A precisão do ensaio de deoxirribose, foi avaliada e os coeficientes de variação (CV) intra-ensaios foram de 8,6 a 9,1% para concentração de 6,6 µM e 6,9 a 10,1% para concentração de 66,5 µM de AF padrão. Os coeficientes de variação inter-ensaio, para 14 determinações, foram de 1,2 e 3,7%, respectivamente para as concentrações de 6,6 e 66,5 µM de AF padrão. Assim, o ensaio de deoxirribose apresentou uma ótima precisão nas concentrações de 6,6 e 66,5 µM de AF padrão.

A precisão do ensaio utilizando a BPS também foi avaliada e os coeficientes de variação intra-ensaios variaram de 2,1 a 2,7% para concentração de 3,3 µM e de 1,7 a 1,8% para a concentração de 6,6 µM de AF padrão. Os coeficientes de variação inter-ensaio para as concentrações de 3,3 µM de 10 determinações e de 6,6 µM de 11 determinações, foram respectivamente de 7,6 e 1,1%. Segundo ANVISA e pesquisadores, o CV menor do que 15% indica que o método apresenta uma boa precisão.[37,38]

Avaliação da Atividade Doadora de Elétrons pelo AF ao Radical Estável $DPPH^{\bullet}$

Neste ensaio, não foi possível a obtenção de resultado satisfatório para a avaliação da atividade antioxidante do AF. Embora o método seja simples e propicia resultados

rápidos quando comparado com outros ensaios, foi observado que o AF não apresentou capacidade de doação de elétrons ao DPPH$^{\bullet}$(2,2-difenil-1-picrilhidrazil), confirmando a sua ação quelante.

Avaliação da Atividade Sequestradora do AF sobre o Radical Hidroxil pelo Ensaio de Deoxirribose

O ensaio de deoxirribose foi utilizado para verificar se o AF é eficiente no seqüestro de radicais hidroxil. Na Figura 1A, observa-se que o AF padrão apresentou atividade antioxidante máxima de 18,2% a partir da concentração de 33,2 µM. Entretanto, na Figura 1B, o AF-GM apresentou atividade antioxidante máxima de 29,3% a partir da concentração de 130,5 µM. Comparando a atividade antioxidante do AF padrão e AF-GM, nas mesmas concentrações, ou seja, de 33,2 µM, observa-se que o AF-GM apresentou atividade antioxidante de 18,1% e similar a do AF padrão. Como a atividade antioxidante máxima do AF-GM foi maior que a do AF padrão, esta diferença pode estar associada ao possível teor de IP6 no AF-GM. O AF (IP6) pode ser hidrolisado quimicamente ou por fitases formando o IP5, IP4, IP3 e, possivelmente, inositol di- e monofosfato durante estocagem, fermentação, germinação ou processamento.[18,39,40] Entretanto, somente o IP6 e IP5 possuem atividade quelante e apresentam capacidade de afetar a biodisponibilidade de minerais de forma significativa.[41] Além disso, o IP5[40] geralmente apresenta uma ação sinérgica com o IP6, aumentando sua capacidade antioxidante.

A outra possível diferença na atividade antioxidante seria a presença de outras substâncias no AF-GM que poderiam afetar o seqüestro do radical hidroxil. O radical hidroxil é altamente reativo com meia vida nas células estimada em somente 10^{-9} segundos. Uma das características do radical hidroxil é a formação de outras espécies de radicais que são menos reativos e quando em contato, reage com todas proteínas, DNA, ácidos graxos poliinsaturados das membranas e quase todas moléculas biológicas.[42] Quando um antioxidante interfere com danos causados pelo radical hidroxil, geralmente não atuará

somente pelo seqüestro do radical, mas pelo seqüestro ou bloqueio dos precursores de sua formação (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio) e/ou pela quelação de íons metais de transição.[43] Portanto, uma substância poderá apresentar um potencial contra o radical hidroxil *in vivo* devido atividades seqüestradora de radical e queladora de íon ferro, como confirmado nesta investigação com os ensaios de deoxirribose e de batofenantrolina.

Figura 1

Avaliação da Atividade Queladora do Íon Ferro pelo AF utilizando a Batofenantrolina (BPS)

A atividade queladora do íon ferro pelo AF utilizando o ensaio de BPS foi também utilizada para avaliar o potencial antioxidante do AF padrão e AF-GM. A Figura 2 e Figura 3 mostram o efeito de diferentes concentrações do AF padrão e AF-GM e tempos de contato com o ferro para formação do complexo Fe^{2+} e AF antes da adição da BPS. A atividade queladora do íon Fe^{2+} pelo AF padrão foi dependente significativamente da concentração ou seja, a atividade queladora do íon Fe^{2+} aumentou com elevação da concentração de 1,3 a 6,6 µM do AF padrão (Figura 2). O mesmo foi observado com o AF-GM, porém o tempo de contato do AF-GM com o ferro afetou significativamente a sua atividade queladora do íon Fe^{2+} (Figura 3). Na concentração de 6,6 µM de AF padrão, após 15 minutos de adição de BPS, foi observada (Figura 2) uma atividade queladora de Fe^{2+} de aproximadamente 70% enquanto que para o AF-GM, na mesma concentração (Figura 3), a atividade queladora foi de 33%.

Neste ensaio, os resultados confirmam o potencial do AF em quelar íons ferro (Figura 2 e Figura 3). Porém, foi observada uma maior afinidade entre o Fe^{2+} e BPS do que Fe^{2+} e AF, pois quando o AF e BPS são adicionados simultaneamente no meio de reação, ou seja, tempo 0, ocorreu uma baixa atividade queladora do íon Fe^{2+} e quando em contato prévio de 5, 10 ou 15 minutos entre o Fe^{2+} e AF-GM, antes da adição de BPS, a atividade

queladora do íon Fe^{2+} aumentou significativamente (Figura 3). Assim, o tempo de contato de 15 minutos foi estabelecido para verificar o efeito de diferentes concentrações de AF padrão e AF-GM na atividade queladora do íon Fe^{2+} (Figura 4). Observa-se na Figura 4A, que a máxima atividade foi de 98,2% de quelação do íon Fe^{2+} na concentração de 16,6 µM de AF padrão. Entretanto, para o AF-GM a mesma atividade máxima foi alcançada na concentração de 652,7 µM (Figura 4B). Estes resultados demonstraram que o AF padrão apresentou uma maior atividade de quelação de íons Fe^{2+}, quando comparado com o AF-GM.

Embora haja evidências de que a atividade antioxidante do AF depende da quelação do íon Fe^{2+}, o mecanismo de interação entre o AF e minerais ainda não está totalmente esclarecido.[44] O AF é descrito como um forte quelador de íons Fe^{2+} e possivelmente mantém todo o ferro na forma oxidada, prevenindo assim, a formação de hidroperóxidos lipídicos e, consequentemente, a peroxidação lipídica.[45] O AF pode também inibir a formação de aroma de requentado ou “warmed-over flavor” (WOF) em produtos alimentícios devido a formação de quelatos de ferro inativos cataliticamente.[10] Para o desenvolvimento de WOF em carnes cozidas, os fosfolipídios e os triglicerídios em menor proporção, foram apontados como os principais responsáveis.[46] Os íons Fe^{2+} que catalisam a formação de WOF em carnes são provenientes da mioglobina, que nos processos de cozimento e trituração, é parcialmente destruída liberando Fe^{2+}.[47] Esta habilidade de formação de quelatos de ferro permite ao AF ser mais efetivo na inibição de WOF quando comparado a outros agentes quelantes.[10] De 12 tipos de agentes quelantes de ferro avaliados, o AF foi o que apresentou maior atividade quelante na inibição de danos oxidativos em sistemas biológicos.[15] Além disso, já foi descrito[8] que o AF exerce maior propriedade antioxidante devido a sua afinidade relativamente elevada pelo ferro. A capacidade de quelação de íons Fe^{+2} pelo AF pode ser fundamental em outros mecanismos do sistema de defesa antioxidante, influenciando também na atividade de enzimas em reações oxidativas.[9]

Figura 2, **Figura 3, Figura 4.**

CONCLUSÃO

O AF-GM apresentou potencial antioxidante confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais, por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. A atividade de seqüestro do radical hidroxil foi dependente da concentração de AF-GM. A atividade quelante para o Fe^{+2} aumentou com elevação da concentração do AF-GM e com o tempo de contato com o Fe^{+2}.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pela concessão de bolsa de doutorado e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Cheryan, M.; *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1980**,*13*, 297.

2. Erdman, J. W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 736.

3. Leal, E.S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2000.

4. Nogueira, R.B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2004.

5. Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D.K.; *Adv. Food Res.* **1982,** *28*, 1.

6. Tsao, G.T.; Zheng, Y.; Lu, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *63*, 731.

7. Vohra, P.; Gray, G.A.; Kratzer, F.H.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1965**, *120*, 447.

8. Graf, E.; Eaton, J.W.; *Free Radical Biol. Med.* **1990**, *8*, 61.

9. Conforth, D. P. in Reddy, N. R.; Sathe, S.K. (Eds.); *Food phytates*, 2002.

10. Empson, K.L.; Labuza, T.P.; Graf, E.; *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 560.

11. Barreto, A.C.S.; *International Congress of Meat Science and Technology*, **1996**, *42*, 119.

12. Lee, B.J.; Hendricks, D.G.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 241.

13. Ghiretti, G. P.; Zanardi, E.; Novelli, E.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R.; *Meat Sci.* **1997**, *47*,167.

14. Graf, E.; Eaton, J.W.; *J. Nutr*. **1984**, *114*, 1192.

15. Graf, E.; Mahoney, J.R.; Bryant, R. G.; Eaton, J.W.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3620.

16. Graf, E.; Empson, K.l.; Eaton, J.W.; *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11647.

17. Persson, H.; Tûrk, M.; Nyman, M.; Sandberg, A. S.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3194.

18. Oatway, L.; Vasanthan, T.; Helm, J.H.; *Food Rev. Int.* **2001**, *17*, 419.

19. Graf, E.; *J. Am. Oil Chem. Soc*. **1983**, *60*, 11.

20. Hix, D. K.; Klopfenstein, C. F.; Walker, C. E.; *Cereal Chem.* **1997**, *74*, 281.

21. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M.; *Antioxidants in food*, Washington, 2003.

22. Soares, A. L.; Olivo, R.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I.; *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2004**, *47*, 57.

23. Harbach, A.P.R.; Costa, M.C.R.; Soares, A.L.; Bridi, A.M.; Shimokomaki, M.; Silva, C.A.; Ida, E.I.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 1630.

24. Stodolak, B.; Starzynska, A.; Czyszczon, M.; Zyla, K.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 1041.

25. Berg, R. V. D.; Haenen, G. R. M. M.; Berg, H. V. D.; Bast, A.; *Food Chem.* **1999**, *66*, 511.

26. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290.

27. Bolanm, B. J.; Ulvik, R. J.; *Biochem. J.* **1987***, 243*, 55.

28. Silva, M. M.; Santos, M. R.; Caroço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L.; *Free Radical Res*. **2002**, *36,* 1219.

29. Ahn, H. J.; Kim, J. H.; Jo, C.; Kim, M. J.; Byun, M. W.; *Food Chem*. **2004**, *88*,173.

30. Aruoma, O. I.; *Methods in Enzymol.* **1994**, *233*, 57.

31. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I.; *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 215.

32. Marquele, F.D.; Di Mambro, V.M.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Valim, Y.M.L.; Fonseca, M.J.V.; *J. Pharm. Biomed.* **2005**, *39*, 455.

33. Fukuji, T. S.; Ferreira, D. L.; Soares, A. L.; Prete, C. E. C.; Ida, E. I.; *Acta Sci. Agro*. **2008**, *30*, 31.

34. Latta, M.; Eskin, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 1313.

35. Ellis, R.; Morris, E. R.; *Cereal Chem.* **1986**, *63*, 58.

36. Blois, M.S.; *Nature*, **1958**, *181*, 1199.

37. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária– ANVISA. Resolução RE nº 899: **2003**.

38. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quím. Nova*, **2004**, 27, 771.

39. Burbano, C.; Muzquiz, M.; Osagie, A.; Ayet, G.; Cuadrado, C.; *Food Chem.* **1995**, *52*, 321.

40. Plaami, S.; *Lebensm.Wiss.Technol.* **1997**, *30*, 633.

41. Sandberg, A. S.; Carlsson, N. G.; Svanberg, U.; *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 159.

42. Aruoma, O. I.; *Asia - Pac. J. Clin. Nutr.* **1999**, *8*, 53.

43. Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O.I.; *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 601.

44. Febles, C. I.; Arias, A.; Hardisson, A.; Rodriguez-Alvarez, C.; Sierra, A.; *Food Chem.* **2001**, *74*, 437.

45. Phillippy, B. Q.; Graf, E.; *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *22*, 939.

46. Igene, J. O.; Pearson, A. M.; *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1285.

47. Gray, J. I.; Pearson, A. M.; *Adv. Food Res.* **1984,** *29*, 1.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: (A) Atividade de seqüestro do radical hidroxil pelo ácido fítico padrão por meio de ensaio de deoxirribose. Resultados expressos como média± SEM.

(B) Atividade de seqüestro do radical hidroxil pelo ácido fítico do germe de milho por meio de ensaio de deoxirribose. Resultados expressos como média± SEM.

Figura 2: Atividade quelante do íon ferro pelo ácido fítico padrão, em diferentes concentrações. Resultados são representados pela média ± SEM. * diferença estatística significativa em relação a BPS adicionada imediatamente (P< 0,05).

Figura 3: Atividade quelante do íon ferro pelo ácido fítico do germe de milho, em diferentes concentrações. Resultados são representados pela média ± SEM. * diferença estatística significativa em relação a BPS adicionada imediatamente (P< 0,05).

Figura 4: (A) Atividade quelante do íon ferro pelo ácido fítico padrão por meio de ensaio de batofenantrolina. Resultados expressos como média± SEM.

(B) Atividade quelante do íon ferro pelo ácido fítico do germe de milho por meio de ensaio de batofenantrolina. Resultados expressos como média± SEM.

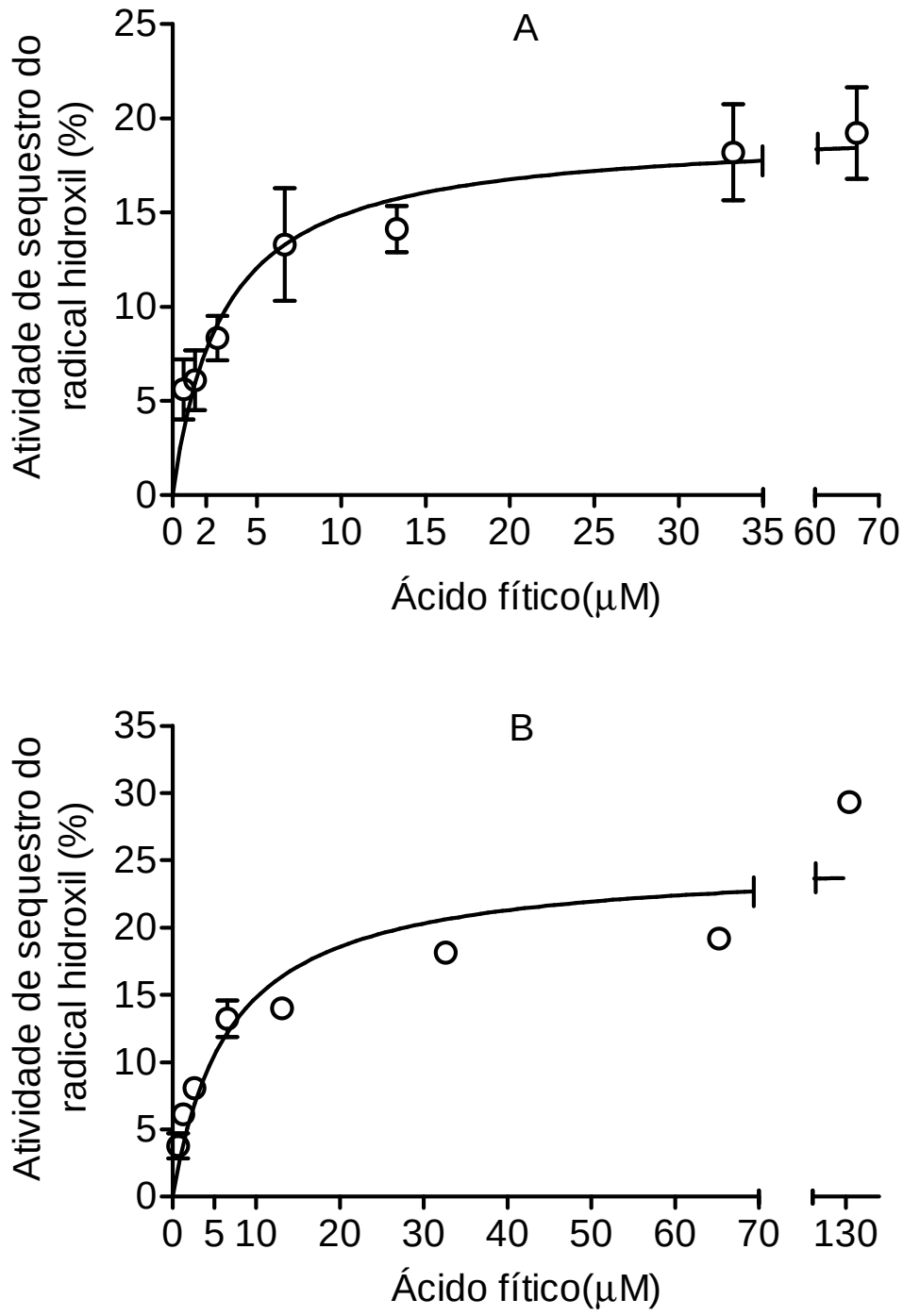
A
Atividade de sequestro do radical hidroxil (%)
0
5
10
15
20
25
0 2 5 10 15 20 25 30 35 60 70
Ácido fítico(µM)
B
Atividade de sequestro do radical hidroxil (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
0 5 10 20 30 40 50 60 70 130
Ácido fítico(µM)

Figura 1

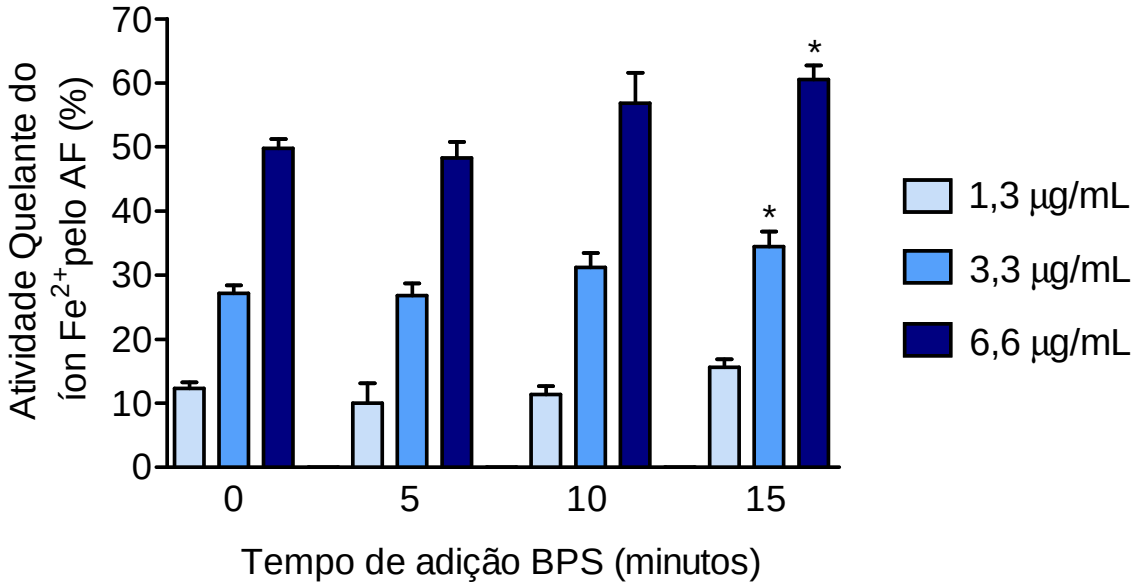

Figura 2

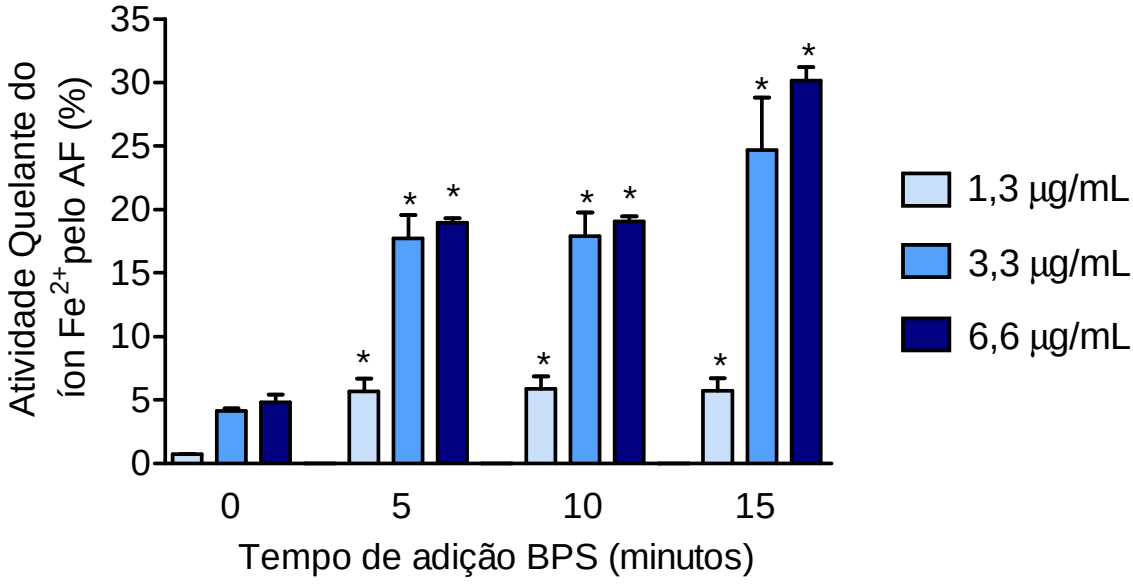

Figura 3

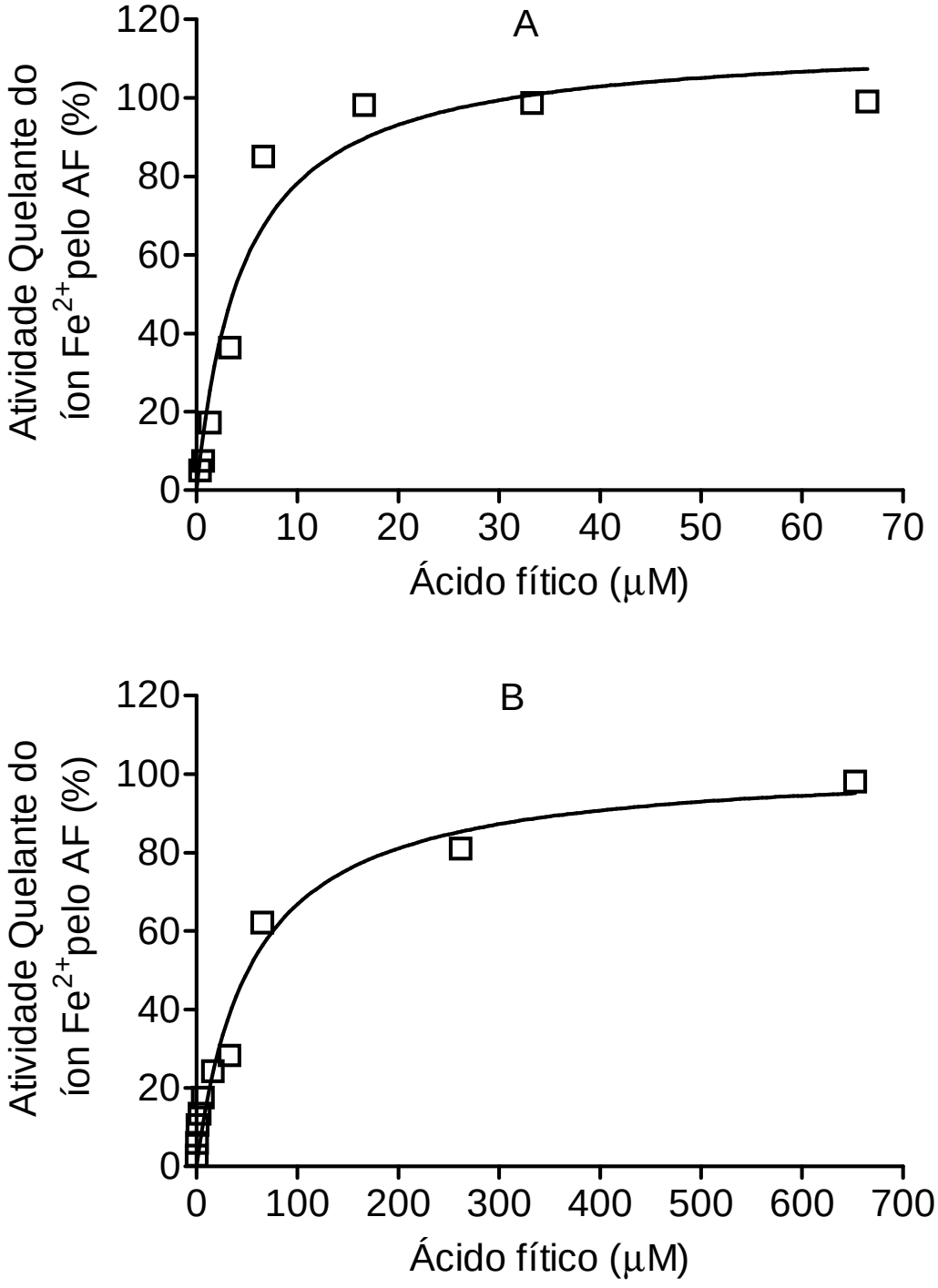
A
Atividade Quelante do íon Fe^{2+}pelo AF (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Ácido fítico (µM)
B
Atividade Quelante do íon Fe^{2+}pelo AF (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
700
Ácido fítico (µM)

Figura 4

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

O artigo a seguir será encaminhado ao periódico ***Food Chemistry***. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO APLICADO EM CARNES DE FRANGO SOB REFRIGERAÇÃO

Antioxidant activities of corn germ phytic acid on refrigerated broiler chicken meat

Cristina Tostes Filgueiras, Rúbia Casagrande, Marcela Maria Baracat, Pedro Paulo de Almeida Paccola, Massami Shimokomaki, Elza Iouko Ida*

Cristina Tostes Filgueiras, **Pedro Paulo de Almeida Paccola**, **Massami Shimokomaki**, **Elza Iouko Ida***

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

Rúbia Casagrande, Marcela Maria Baracat

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

*e-mail: elida@uel.br

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO APLICADO EM CARNES DE FRANGO SOB REFRIGERAÇÃO

Antioxidant activities of corn germ phytic acid on refrigerated broiler chicken meat

Cristina Tostes Filgueiras, Rúbia Casagrande, Marcela Maria Baracat, Pedro Paulo de Almeida Paccola, Massami Shimokomaki, Elza Iouko Ida*

Resumo

Este trabalho avaliou a atividade antioxidante do ácido fítico obtido do germe de milho aplicado em carnes de frango sob refrigeração. A atividade foi avaliada pelas medidas antilipoperoxidativa, TBARS, aroma de requentado e teor de metamioglobina. O ácido fítico obtido do germe de milho e padrão apresentaram elevada atividade de inibição de peroxidação lipídica *in vitro* com IC_{50} de 1,66 mg/mL e 0,79 mg/mL, respectivamente. As atividades foram dependentes da concentração do ácido fítico e do tempo de armazenamento de carnes de frango refrigeradas. Foi observada que a atividade quelante em relação ao Fe^{2+} aumentou com elevação da concentração do ácido fítico do germe de milho e inibiu a formação da metamioglobina com manutenção da cor da coxa de frango. A atividade antioxidante também foi observada na inibição do desenvolvimento do sabor de carnes requentadas. A eficiência da atividade antioxidante do germe de milho foi confirmada pela inibição da oxidação de lipídios, do desenvolvimento do aroma de requentado e da formação de metamioglobina em carnes de frangos refrigeradas.

Palavras-chave: ferro da mioglobina, atividade peroxidativa, oxidação lipídica, coxa de frango, aroma de requentado.

ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant activity of obtained phytic acid from the corn germ applied in refrigerated thigh chicken meat. The activity was assessed by measuring antilipoperoxidative, TBARS, warmed over flavor and metamioglobin content. The obtained phytic acid from corn germ and phytic acid standard showed a strong inhibitory activity of lipid peroxidation *in vitro* with IC_{50} of 1.66 mg/mL and 0.79 mg/mL, respectively. The activities were dependent on concentrations of phytic acid and of storage time in refrigerated chicken meat. It was observed that the chelating activity towards Fe^{2+} increased proportionally to the increase of corn germ phytic acid concentration and thus inhibiting the formation of metamioglobin stabilizing consequently the thigh meat color. The antioxidant activity was also observed in meat warmed over flavor development. Finally, the efficiency of the antioxidant activity of phytic acid from corn germ was confirmed by inhibition of lipid oxidation, the development of warmed over flavor and formation of metamioglobin in refrigerated thigh chicken meat.

Key Words: iron state mioglobin, peroxidative activity, lipid oxidation, thigh chicken meat, warmed over flavor.

Introdução

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato (IP6) está presente em cereais, leguminosas, oleaginosas, pólens e amêndoas, em concentrações de 1 a 5% do seu peso (Cheryan, 1980). Nos cereais, o ácido fítico está distribuído em diferentes componentes do grão. A maior concentração do ácido fítico no trigo está na aleurona e, no arroz, no pericarpo, enquanto que o milho apresenta elevado teor no germe com 6,5% (Erdman, 1979; Reddy et al., 1982; Fukuji et al., 2008).

O ácido fítico apresenta cargas negativas em ampla faixa de pH e possui 12 hidrogênios dissociáveis (Plaami, 1997). Estas características proporcionam a formação de complexos devido a sua propriedade quelante com metais polivalentes, especialmente cátions di e trivalentes, tornando-os bioindisponíveis (Vohra et al., 1965; Graf e Eaton, 1990). A bioindisponibilidade depende de fatores experimentais como proporção metal:fitato (Graf e Eaton, 1990) e tipo de dieta (Conforth, 2002).

Entretanto, a propriedade quelante do ácido fítico é de elevada importância devido a sua ação como um antioxidante e anticancerígeno (Graf e Eaton, 1990; Empson et al.,1991; Barreto et al., 2003; Lee e Hendricks, 1995; Ghiretti et al., 1997). A habilidade do ácido fítico formar um quelato com o ferro, que o torna cataliticamente inativo, confirma a sua atuação como um antioxidante, pois inibe a oxidação com formação de radicais hidroxil (•OH) (Graf et al.,1984; Graf et al.,1987; Graf e Eaton, 1990; Empson et al.,1991). Os antioxidantes sintéticos como butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno e galato de propila são amplamente utilizados para retardar a oxidação lipídica durante estocagem de carnes de frango, produtos de carnes de porco e de bovino (Shahidi et al., 1987; St. Angelo, 1996; McCarthy et al., 2001a, 2001b). Contudo, há um aumento de recomendação pela demanda por antioxidantes naturais devido a problemas de toxidez e carcinogenicidade dos antioxidantes sintéticos (Branen, 1975; Ito et al., 1983; Grice, 1986; Wichi, 1988).

A propriedade antioxidante ou quelante do ácido fítico torna-o um composto único e versátil como aditivo de alimentos (Oatway et al.,2001), é rotineiramente empregado em vários países para prevenir a descoloração, melhorar a qualidade nutricional e prolongar a validade dos produtos (Graf, 1983). O ácido fítico foi reconhecido em 1997 como GRAS (Generally Recognised as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) e usado como um aditivo em produtos de panificação (Hix

et al.,1997). No *Codex Alimentarius*, o ácido fítico foi revisado como antioxidante com INS (System for Food Additives) número 391(Pokorny et al., 2003).

O principal processo que desencadeia a oxidação lipídica em carnes é a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, sendo que os íons metálicos de transição como o Fe^{2+} e o Cu^{+}, geralmente participam como catalisadores da reação (Keller e Kinsella, 1973). Compostos heme das carnes também podem contribuir para este processo, sendo que o ferro heme, em geral apresenta importância na iniciação da oxidação em carnes cruas e cozidas, enquanto que o ferro não-heme exerce um maior papel na peroxidação lipídica de carnes cozidas (Decker e Welch, 1990; Kanner et al., 1988). Assim, os produtos resultantes dessas reações, bem como os radicais livres formados irão contribuir para a oxidação da mioglobina das carnes para metamioglobina a qual apresenta uma coloração escura indesejável (Renerre e Labas, 1987).

O potencial antioxidante do ácido fítico foi confirmado por vários autores, principalmente em produtos cárneos ou sistemas modelos (Empson et al., 1991; Lee e Hendricks, 1995; Ghiretti et al., 1997; Graf, 1983; Soares et al., 2004; Harbach et al., 2007; Stodolak et al., 2007) com finalidade de preservar o produto. Empson et al. (1991) demonstraram que a adição de 1,5mM de ácido fítico em carnes de frango refrigerada inibiu substancialmente a formação de malonaldeído e o desenvolvimento de aroma de requentado ou *"warmed over flavor"* (WOF). O efeito protetor do ácido fítico contra a peroxidação lipídica em homogenatos de carnes também foi investigado por Lee e Hendricks (1995). Estes autores observaram que a atividade antioxidante do ácido fítico foi dependente da concentração e apresentou maior eficiência na inibição da peroxidação lipídica quando comparado a outros antioxidantes como ascorbato, BHT e EDTA.

Em estudos realizados por Soares et al. (2004) foi verificado que a adição de 2mM de ácido fítico como antioxidante complementar em filés de peito de frango suplementados com vitamina E inibiu o desenvolvimento de WOF em até 95,30%, durante 5 dias sob armazenamento a 6ºC. Tais resultados demonstraram uma reação sinérgica entre os dois antioxidantes.

Os antioxidantes como catequina, farinha de sésamo e ácido fítico reduziram a velocidade de oxidação lipídica em salames do tipo Milano e mortadelas. Os resultados dos valores de peróxido e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) indicaram que os antioxidantes naturais reduziram a oxidação lipídica,

enquanto que o ascorbato de sódio apresentou efeito pró-oxidante. Entretanto, os antioxidantes naturais avaliados não foram eficientes na estabilidade da cor destes produtos (Ghiretti et al., 1997).

O potencial antioxidante do ácido fítico do germe de milho foi confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. O seqüestro do radical hidroxil e a atividade quelante para o Fe^{+2} foi dependente da concentração do ácido fítico sendo que a quelação aumentou com o tempo de contato com o Fe^{+2} (Filgueiras et al., 2009).

Considerando a atuação antioxidante do ácido fítico, suas várias aplicações e elevada concentração no germe de milho, este trabalho avaliou a atividade antioxidante *in vitro* do ácido fítico obtido do germe de milho aplicada em carnes de frango sob refrigeração.

2- Material e Métodos

2.1 Material

Para obtenção de ácido fítico foi utilizado germe de milho desengordurado, que foi fornecido por uma indústria de processamento de milho da região. O material continha 4,8% de ácido fítico que foi extraído com HCl 0,8M (1:5 p/v), seguido de centrifugação, etapas de precipitação e secagem (Fukuji et al., 2008). O rendimento da obtenção foi de 67,01 ± 0,73%, pureza de 85,41± 0,95% e o ácido fítico assim obtido foi quantificado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria a 500nm (Latta e Eskin, 1980) com modificação da resina para Dowex-Agx-4 (Ellis e Morris, 1986). O ácido fítico padrão utilizado foi o fitato de dodecassódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM= 923,8) de milho, com 90% de pureza de procedência Sigma. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de diferentes fontes comerciais.

A eficiência da atividade antioxidante do ácido fítico padrão, ácido fítico do germe de milho e do eritorbato de sódio foi avaliada após aplicação em coxas com sobrecoxas de frango adquiridas após o abate e prontos para serem comercializadas em açougues.

2.2 Efeito do ácido fítico sobre atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ferro

O efeito do ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho sobre a atividade inibidora da peroxidação lipídica induzida por ferro foi avaliado pela diminuição da formação de malonaldeído (MDA) conforme procedimento descrito por Buege e Aust (1978) e modificado por Casagrande et al. (2006). Neste procedimento ocorrem as seguintes reações:

Fe^{3+} + ascorbato → Fe^{2+} + ascorbato oxidado (1)

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH + Fe^{3+}$ (2)

$LH + {}^{\bullet}OH \rightarrow L^{\bullet} + RH$ (3)

$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ (4)

$LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$ (5)

$LOOH \rightarrow LO^{\bullet}, LOO^{\bullet}$, aldeídos → MDA (6)

2TBA + MDA → cromóforo róseo (7)

Assim, foram misturados em tubos de ensaios 1mL de tampão KH_2PO_4-KOH 20mM e pH 7,4, 10 µL de ascorbato 10mM, 100µL de diferentes concentrações de ácido fítico padrão ou ácido fítico do germe de milho, 100µL de ácido linoleico 20mM, 10µL de H_2O_2 100mM e 10µL de $FeCl_3$ 5mM. Os tubos foram incubados a 37ºC por 30 min e adicionados 1mL de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 50mM, 100µL de NaOH 10M e 500µL de H_3PO_4 20% e, novamente incubados a 85ºC por 20 min. Os compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico foram extraídos com 2mL de n-butanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9800 g por 15 minutos e lida a absorvância do sobrenadante em 535nm a temperatura ambiente.

Foram feitos concomitantemente um branco sem o ácido linoleico e um controle positivo sem o ácido fítico. A atividade antioxidante foi expressa como % inibição da peroxidação lipídica pelo ácido fítico e estimada pela equação **(1)**.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{Ao - Aa}{Ao} \times 100 \qquad \text{Equação(1)}$$

Onde: Aa é a absorvância da amostra e Ao é a absorvância do controle positivo.

2.3 Preparo das amostras

As amostras de coxas com sobrecoxas de frango sem pele foram desossadas e trituradas (triturador doméstico) e utilizadas para aplicação de diferentes concentrações de antioxidantes. Assim, 500g de carnes trituradas foram homogeneizadas com 50 mL de água deionizada contendo, cada uma, 2,5mM, 5mM e 10mM de ácido fítico padrão, ácido fítico do germe de milho ou 0,5% de eritorbato de sódio. Uma amostra controle foi utilizada contendo apenas água deionizada e sem adição de antioxidante. Todas as amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno cobertas com uma camada de filme permeável e armazenadas nos tempos de 0, 2, 4 e 6 dias, sob refrigeração a 6 ± 1ºC com luz fluorescente, simulando condições de comercialização. Em todos os tempos foram realizadas medidas, em triplicatas, de oxidação lipídica (TBARS), desenvolvimento de aroma de requentado (WOF) e formação de metamioglobina.

2.3.1 Medidas de oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi acompanhada pelo método do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) conforme procedimento descrito por Tarladgis et al. (1964) e modificado por Crackel et al. (1988). A curva padrão foi traçada pelo uso de solução aquosa de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0,1 a 7,0M. Os resultados foram expressos em mg de TBARS / kg de amostra e a atividade antioxidante foi expressa como:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{TBARS_c - TBARS_a}{(TBARS_c)} \times 100 \qquad \text{Equação(2)}$$

Onde: $TBARS_c$ é o valor de TBARS do controle

$TBARS_a$ é o valor de TBARS da amostra

2.3.2 Determinação de aroma de requentado

Inicialmente, cada amostra adicionada de antioxidante, foi embalada a vácuo em saco plástico e aquecida em banho-maria fervente por 20 minutos conforme procedimento descrito por Igene e Pearson (1979). Após aquecimento, as amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno cobertas com uma camada de filme permeável e armazenadas por 48 horas sob refrigeração a 6±1ºC com luz fluorescente. Em seguida, as amostras foram reaquecidas em microondas na potência alta por 4 minutos e analisadas, em triplicata, quanto a oxidação lipídica em TBARS conforme descrito anteriormente. Os resultados de desenvolvimento de aroma de requentado ou WOF foram expressos em mg de TBARS/ kg de amostra e a atividade antioxidante foi estimada similarmente a equação **(1)**.

2.3.3 Determinação da formação de metamioglobina

Para análise da porcentagem de metamioglobina nas amostras de frangos trituradas contendo os antioxidantes, 5 g de cada amostra foram colocadas em um tubo de centrífuga de 50 mL e adicionou-se 25 mL de tampão fosfato 40mM e pH 6,8 conforme procedimento descrito por Krzywicki (1982). A mistura foi homogeneizada por 10 segundos a 13500 g e armazenada por 1 hora a 4 ºC. Após esse período foi realizada a centrifugação a 5000 g por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi filtrado com papel de filtro Whatman #1 e a absorvância foi lida no espectrofotômetro a 700, 572 e 525 nm. A porcentagem de metamioglobina formada foi determinada conforme a equação **(3):**

$$MetMb\ (\%) = \{1{,}395 - [(A_{572}-A_{700}) / (A_{525}-A_{700})]\} \times 100 \qquad \text{Equação (3)}$$

Onde: A_{572} é a absorvância do sobrenadante a 572nm

A_{700} é a absorvância do sobrenadante a 700nm

A_{525} é a absorvância do sobrenadante a 525nm

A atividade antioxidante foi estimada similarmente a equação **(1)**.

2.4 Análises Estatísticas

A concentração de ácido fítico que inibiu o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foi estimada pelo software GraphPad Prism (Versão 4.00, 2003), utilizando uma curva hiperbólica (one site binding hyperbola). Para avaliar o efeito da adição dos antioxidantes nas carnes de frango, os dados foram analisados utilizando-se a ANOVA de uma via seguido do teste-t de comparações múltiplas de Tukey (Programa STATISTICA, Versão 6.0, 2001). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média e considerado significativamente diferente quando obtido $P< 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito do ácido fítico sobre atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ferro

A atividade inibidora de peroxidação lipídica pelo ácido fítico do germe de milho e ácido fítico padrão foi avaliada usando o sistema Fe^{+2}/ascorbato. Na presença de Fe^{+2}, a peroxidação lipídica pode ser diretamente iniciada pela geração do radical hidroxil, por meio da quebra do peróxido de hidrogênio de acordo com a reação de Fenton ou pela formação dos complexos de oxigênio com os diferentes estados redox do ferro como íon ferril $(FeO)^{2+}$ ou perferril (Fe^{2+} O_2^- ou $Fe^{3+}O_2^-$) (Ozgová et al., 2003). O conhecimento químico do complexo perferril sugere que o mesmo não teria reatividade suficiente para retirar átomos de hidrogênio ou inserir oxigênio no ácido linoleico e assim, iniciar a peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1990). Portanto, considerando a peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2}/ascorbato, a sequência da reação pode ter sido iniciada pela retirada de um átomo de hidrogênio do ácido linoléico pelo radical hidroxil ou ferril, formando o radical lipídico. Entre os radicais formados como produtos finais da peroxidação lipídica, os hidroperóxidos são os mais estáveis à temperatura ambiente, no entanto em presença de íons ferro sua decomposição em radicais peroxil ($LOO^{\bullet}$) e alcoxil ($LO^{\bullet}$) é acelerada (Dinis et al., 1994). Assim, o efeito do ácido fítico na peroxidação

lipídica pode ser devido principalmente ao seqüestro dos radicais peroxil e alcoxil e/ou quelação do íon ferro. Vários estudos demonstraram que o elevado potencial antioxidante do ácido fítico contra a peroxidação lipídica induzida pelo ferro foi devido à combinação da propriedade queladora de metais e habilidade em seqüestrar radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1990; Graf e Eaton, 1990; Empson et al., 1991; Lee e Hendricks, 1995; Lee e Hendricks, 1997; Phillippy e Graf, 1997; Lee et al., 1998; Stodolak et al., 2007, Filgueiras et al., 2009).

Observa-se na Figura 1A, que a máxima atividade de inibição da peroxidação lipídica foi de 78,32% na concentração de 12,0 mg/mL de ácido fítico padrão. Comparando a atividade antioxidante do ácido fítico padrão e ácido fítico de germe de milho, na mesma concentração, ou seja, de 12,0 mg/mL, observa-se que o ácido fítico de germe de milho apresentou atividade antioxidante de 78,62% e similar a do ácido fítico padrão (Figura 1B). O ácido fítico apresentou uma forte atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* e de acordo com os resultados obtidos, o ácido fítico padrão e do germe de milho apresentaram IC_{50} de 0,79 mg/mL e 1,66 mg/mL, respectivamente. A inibição da peroxidação pelo ácido fítico provavelmente foi devido ao seqüestro de peróxidos lipídicos, radicais peroxil e alcoxil e/ou quelação de Fe^{+2}. Assim, após confirmada a eficiência do ácido fítico do germe de milho na inibição da peroxidação lipídica *in vitro* foi realizada a sua aplicação em sistemas alimentares, etapa fundamental para avaliação do seu potencial antioxidante.

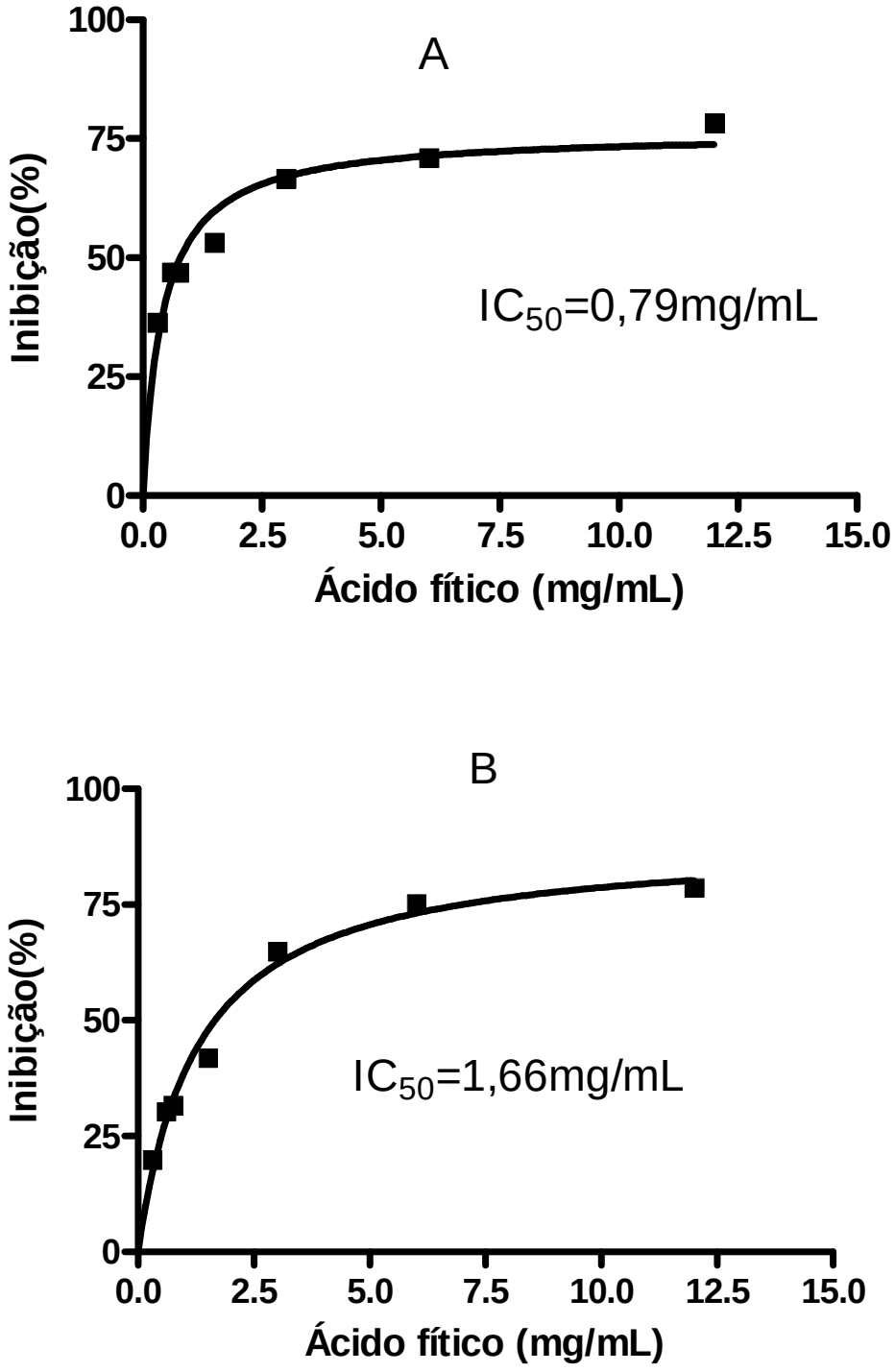

Figura 1: (A) Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} para diferentes concentrações de ácido fítico padrão. Resultados expressos como média± DP.

(B) Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} para diferentes concentrações de ácido fítico do germe de milho. Resultados expressos como média± DP.

3.2 Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho, ácido fítico padrão e eritorbato de sódio

A atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho, ácido fítico padrão e eritorbato de sódio em carnes de frango foi acompanhada por medidas de oxidação lipídica (TBARS), desenvolvimento de aroma de requentado (WOF) e formação de metamioglobina e os resultados estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Atividade antioxidante (%) medida por TBARS do ácido fítico do germe de milho (AF-GM) em carnes de frango estocadas a 6ºC por 6 dias

Tratamento	*Período de Estocagem (dias)*			
	0	2	4	6
AF-GM (2,5mM)	$28,22^{gA}$ ±0.23	$15,06^{gB}$ ±0.55	$13,64^{fC}$ ±0.15	$12,88^{fD}$ ±0,63
AF-GM (5mM)	$39,31^{eA}$ ±0.04	$34,74^{eB}$ ±0.08	$28,82^{dC}$ ±0.97	$25,22^{dD}$ ±0,45
AF-GM (10mM)	$40,73^{dA}$ ±0.17	$37,47^{dB}$ ±0.78	$31,56^{cC}$ ±0.99	$28,69^{cD}$ ±0,13
AF Padrão (2,5mM)	$34,52^{fA}$ ±0.06	$33,31^{fB}$ ±0.97	$25,08^{eC}$ ±0.11	$18,17^{eD}$ ±0,73
AF Padrão (5mM)	$44,31^{cA}$ ±0.77	$40,30^{cB}$ ±0.42	$31,42^{cC}$ ±0.01	$28,83^{cD}$ ±0,40
AF Padrão (10mM)	$45,78^{bA}$ ±0.58	$43,17^{bB}$ ±0.15	$36,25^{bC}$ ±0.25	$31,11^{bD}$ ±0,47
Eritorbato de sódio (0,5%)	$66,63^{aA}$ ±0.01	$56,63^{aB}$ ±0.30	$44,42^{aC}$ ±0.08	$40,04^{aD}$ ±0,36

*Resultados expressos como média ± desvio padrão

*Valores com letras diferentes (a-g) na mesma coluna e (A-D) na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05)

Tabela 2. Atividade antioxidante (%) medida pelo desenvolvimento de aroma de requentado do ácido fítico do germe de milho (AF-GM) em carnes de frango estocadas a 6ºC por 6 dias

Tratamento	*Período de Estocagem (dias)*			
	0	2	4	6
AF-GM (2,5mM)	$43,21^{eA}$ ±0.12	$35,51^{fB}$ ±0,28	$28,67^{fC}$ ±0.36	$18,80^{gD}$±0,58
AF-GM (5mM)	$44,24^{dA}$ ±0,78	$40,18^{dB}$ ±0,51	$37,14^{dC}$ ±0.46	$33,62^{eD}$±0,15
AF-GM (10mM)	$45,16^{cA}$ ±0.58	$43,08^{cB}$ ±0,44	$41,41^{cC}$ ±0.44	$38,32^{cD}$±0,89
AF Padrão (2,5mM)	$45,53^{cA}$ ±0,47	$37,62^{eB}$ ±0,34	$30,72^{eC}$ ±0,12	$21,93^{fD}$±0,41
AF Padrão (5mM)	$48,55^{bA}$ ±0,66	$43,14^{cB}$ ±0,59	$40,66^{cC}$ ±0.38	$36,19^{dD}$±0,45
AF Padrão (10mM)	$48,64^{bA}$ ±0.13	$45,11^{bB}$ ±0,47	$43,77^{bC}$ ±0,62	$40,54^{bD}$±0,33
Eritorbato de sódio (0,5%)	$77,51^{aA}$ ±0,33	$65,23^{aB}$ ±0,11	$60,60^{aC}$ ±0,49	$52,03^{aD}$±0,22

*Resultados expressos como média ± desvio padrão

*Valores com letras diferentes (a-g) na mesma coluna e (A-D) na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05)

Tabela 3. Atividade antioxidante (%) medida pela formação de metamioglobina do ácido fítico do germe de milho (AF-GM) em carnes de frango estocadas a 6ºC por 6 dias

Tratamento	*Período de Estocagem (dias)*			
	0	2	4	6
AF-GM (2,5mM)	17,42 ^{fA} ±0,16	16,48 ^{fB} ±0,98	15,37 ^{fC} ±0,99	15,11^{fC}±0,54
AF-GM (5mM)	19,11 ^{dA} ±0.20	17,28 ^{eB} ±0,36	17,03 ^{dB} ±0,23	17,00^{dB}±0,33
AF-GM (10mM)	20,46 ^{cA} ±0,21	19,66 ^{cB} ±0,09	18,37 ^{cC} ±0,61	18,19^{cC}±0,37
AF Padrão (2,5mM)	18,13 ^{eA} ±0,33	17,59 ^{eA} ±0,16	16,06 ^{eB} ±0,01	15,97^{eB}±0,29
AF Padrão (5mM)	18,98 ^{dA} ±0.19	18,30 ^{dB} ±0,94	16,19 ^{eC} ±0,72	16,05^{eC}±0,66
AF Padrão (10mM)	24,61 ^{bA} ±0.89	20,66 ^{bB} ±0,62	20,03 ^{bC} ±0,29	20,00^{bC}±0,56
Eritorbato de sódio (0,5%)	63,52 ^{aA} ±0,60	50,55 ^{aB} ±0,51	40,35 ^{aC} ±0,19	40,35^{aC}±0,89

*Resultados expressos como média ± desvio padrão

*Valores com letras diferentes (a-f) na mesma coluna e (A-C) na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05)

O ácido eritórbico e seus sais (eritorbatos) são substâncias relativamente solúveis em água e seu efeito antioxidante é especialmente favorecido nos produtos cárneos, uma vez que sua ação é incrementada na presença de traços de metais e em pH abaixo de 7,0. Os compostos desta classe também são utilizados em produtos curados para acelerar o processo de cura (Giese, 1996). É permitido o seu uso como antioxidante em produtos cárneos em quantidade suficiente para a obtenção da característica desejável e acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1998).

Nas carnes de frango estocadas a 6ºC por 6 dias, o eritorbato de sódio exibiu a maior atividade antioxidante (P<0,05) quando comparado com os antioxidantes ácido fítico do germe de milho e ácido fítico padrão (Tabelas 1, 2 e 3). A análise de variância dos valores obtidos da atividade antioxidante indicou que houve diferença significativa (P<0,05) entre todas as amostras tratadas com os diferentes antioxidantes, durante o período de estocagem a 6ºC por 6 dias (Tabelas 1 e 2). A atividade antioxidante do ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho, observada por meio de medidas de TBARS e aroma de requentado, foram dependentes significativamente das concentrações testadas e do tempo de estocagem da carne de frango a 6ºC. Assim, no tempo zero (Tabela 1) observa-se que, logo após a adição do antioxidante às carnes de frango, a atividade antioxidante máxima do ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho, na concentração de 10mM, foi de 45,78% e de 40,73%, respectivamente. Entretanto, durante o 4º e 6º dias de estocagem as atividades antioxidantes do ácido fítico padrão (5mM) e ácido fítico do germe de milho (10mM) não apresentaram diferenças

significativas (P<0,05) entre si. Os valores de TBARS representam o conteúdo de produtos de oxidação lipídica secundária, ou seja, aldeídos ou carbonilas que contribuem com o sabor indesejável das carnes oxidadas ou produtos cárneos (Juntachote et al., 2006).

Quando a avaliação antioxidante foi medida por meio de desenvolvimento de aroma de requentado, os resultados foram semelhantes, onde a máxima atividade do ácido fítico padrão e ácido fítico do germe de milho, na concentração de 10mM, foram de 48,64% e 45,16%, respectivamente (Tabela 2). Durante o 2º e 4º dias de estocagem, não houve diferença significativa (P<0,05) entre as atividades antioxidantes do ácido fítico padrão (5mM) e ácido fítico do germe de milho (10mM). Portanto, para inibição da oxidação lipídica de carnes de frango, o ácido fítico do germe de milho pode ser utilizado em substituição ao ácido fítico padrão. A elevada atividade antioxidante apresentada pelo ácido fítico do germe de milho está relacionada à sua habilidade de formar quelato com íon ferro e impedir a formação de radical hidroxil (Filgueiras et al., 2009), consequentemente diminui a peroxidação lipídica em carnes (Graf et al., 1984; Graf e Eaton, 1990). O ácido fítico é descrito como um forte quelador de íons Fe^{2+} e possivelmente mantém todo o ferro na forma oxidada e previne assim, a formação de hidroperóxidos lipídicos (Halliwell e Gutteridge, 1990; Phillippy e Graf, 1997). A presença de outras substâncias no ácido fítico do germe de milho da mesma forma poderia contribuir para um aumento da sua atividade antioxidante. Segundo Halliwell et al. (1995), quando um antioxidante interfere com danos causados pelo radical hidroxil, geralmente não atuará somente pelo seqüestro do radical, mas pelo seqüestro ou bloqueio dos precursores de sua formação (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio) e/ou pela quelação de íons metais de transição. Devido a sua habilidade de quelar íons ferro, o ácido fítico também pode inibir a formação de aroma de requentado. Durante o cozimento, a mioglobina da carne libera quantidades significativas de ferro livre que se liga a fosfatidiletanolamina. O complexo Fe^{3+}- fosfatidiletanolamina catalisa a rápida autooxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na fosfatidiletanolamina o qual resulta num drástico aumento de TBARS e consequentemente no desenvolvimento de WOF e rancidez das carnes (Decker e Welch, 1990; Graf e Panter, 1991). Entretanto, o sequestro de íons ferro pelo ácido fítico reduziu significativamente a taxa de peroxidação de fosfolipídios, inibindo,

consequentemente o desenvolvimento de WOF devido a formação de quelatos de ferro inativos cataliticamente (Empson et al., 1991). Lee et al. (1998) verificaram que o 5mM de ácido fítico foi mais efetivo que a carnosina na inibição da peroxidação lipídica em carnes bovina moída e cozida e esta inibição foi dependente da concentração do ácido.

Durante o período de estocagem das carnes de frango por 6 dias a 6ºC foi observada uma diminuição gradual da atividade antioxidante do ácido fítico do germe de milho, ácido fítico padrão e eritorbato de sódio, como consequência do aumento dos valores de TBARS, WOF e metamioglobina (Tabelas 1, 2 e 3). Resultados similares foram obtidos por Stodolak et al. (2007), na estocagem por três dias a 4ºC, de homogenatos de carnes de boi crua e cozida adicionados de diferentes concentrações de ácido fítico padrão. O rompimento da membrana muscular pela homogeinização permitiu a penetração de oxigênio nos tecidos musculares, fazendo com que grupos metilenos e ligações insaturadas se tornem mais reativas, acelerando a peroxidação lipídica em carne (Mitsumoto et al., 1991). Nesta investigação, não foi possível obter informações quanto à dieta recebida pelos frangos. Entretanto, já foi comprovado que é possível melhorar o potencial antioxidante do tecido muscular pelo enriquecimento da dieta de animais com antioxidantes (Mitsumoto et al., 1991; Morrissey et al., 1998; O'Neill et al., 1999; Ruiz et al., 1999). Dentre esses antioxidantes, a incorporação de vitamina E via suplementação de dieta confere a estabilidade da oxidação lipídica, atuando principalmente na fase inicial do processo oxidativo (Monahan et al., 1994; Buckley et al., 1995). Soares et al. (2004) verificaram que 2mM de ácido fítico padrão contribuiu significativamente para a inibição da oxidação lipídica em filés de peito de frango suplementado com vitamina E.

A estabilidade da cor da carne está diretamente relacionada ao seu tempo de armazenamento. A cor vermelha brilhante da oximioglobina indica carnes frescas com alta qualidade que é atrativa aos consumidores. A adição de 5mM de ácido fítico do germe de milho estabilizou a cor das carnes de frango ($P<0,05$) a partir do 2º dia de estocagem a 6ºC (Tabela 3). A habilidade do ácido fítico de quelar metais de transição envolvidos na produção de radicais livres e/ou seqüestro desses radicais, pode estar atrasando a oxidação da oximioglobina para metamioglobina (Lee et al., 1998). Foi observada que a atividade quelante em relação ao Fe^{2+}

aumentou com elevação da concentração do ácido fítico do germe de milho e inibiu a formação da metamioglobina com manutenção da cor da coxa de frango. A influência de fatores biológicos na descoloração da carne depende principalmente da natureza das fibras musculares. A estabilidade da cor depende do tipo de músculo (Reddy e Carpenter, 1991). Embora muitos fatores influenciam na estabilidade da cor das carnes, há predominância da oxidação da mioglobina por radicais livres ou produtos da peroxidação lipídica (Renerre e Labas, 1987; Gray et al., 1996; Youssef et al., 2003).

4. Conclusão

O ácido fítico de germe de milho inibiu a peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ferro e apresentou grande potencial para ser empregado como antioxidante em produtos cárneos frescos. A eficiência da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho foi confirmada pela inibição da oxidação lipídica, do desenvolvimento de aroma de requentado e da formação de metamioglobina em carnes de frango refrigeradas por 6 dias. Na concentração de 10mM e 5mM, o ácido fítico do germe de milho e ácido fítico padrão apresentaram respectivamente, atividades antioxidantes semelhantes e contribuíram com um aumento da estabilidade lipídica das carnes.

Referências Bibliográficas

Barreto, A. C. S.; Ida, E. I. ; Silva, R. S.; Torres, E. A. F. S.; Shimokomaki, M. (2003). Empirical Models for Describing Poultry Meat Lipid Oxidation Inhibition by Natural Antioxidants. *Journal of Food Composition and Analysis*, *16*(5), 587-594.

Branen, A. L. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemist_s Society*, *52*(2), 59–63.

Brasil. Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998. Atribuição para funções de aditivos para a categoria de carnes. Disponível na internet: http://www.anvisa.com.br.

Buckley, D. J.; Morrissey, P. A.; Gray, J. I. (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. *Journal Animal Science*, *73*, 3122-3130.

Buege, J.A.; Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302-310.

Casagrande, R.; Georgetti, S.R.; Verri, W.A., JR; Jabor, J.R.; Santos, A.C.; Fonseca, M.J.V. (2006). Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*, *7*, 1-8.

Cheryan, M. (1980). Phytic acid interaction in food systems. *CRC Crtical Reviews in Food Science and Nutrition.13,* 297.

Conforth, D. P. (2002). Food Phytates. Boca Raton: CRC Press.

Crackel, R.L.; Gray, J.I.; Booren, A.M.; Buckely, D.J. (1988) Effect of antioxidants on lipid stability in restructured beef steaks. *Journal of Food Science*, *53*(2), 656.

Decker, E. A.; Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*, 674–677.

Dinis, T.C.P.; Madeira, V.M.C.; Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors membrane lipid peroxidation and peroxyl radical scavengers. *Archives Biochemistry and Biophysics*, *315*(1), 161-169.

Ellis, R. ; Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chemistry, 63*(1), 58-59.

Empson, K. L.; Theodore, P. L.; Graf, E. (1991). Phytic acid as a food antioxidant. *Journal of Food Science, 56*(2), 560-563.

Erdman, J. W. (1979). Oilseed Phytates: Nutritional Implications. *Journal of American Oil Chemist's Society, 56*, 736.

Filgueiras, C.T.; Casagrande, R.; Soares, A.L.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I. (2009). Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Química Nova*, (aceito para publicação).

Fukuji, T. S.; Ferreira, D. L.; Soares, A. L.; Prete, C. E. C.; Ida, E. I. (2008). Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. *Acta Scientiarum Agronomy, 30*(1), 31-35.

Giese, J. (1996). Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, *29* (11).

Ghiretti, G. P.; Zanardi, E.; Novelli, E.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. (1997). Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. *Meat Science* , *47*,167-176.

Graf, E. (1983). Applications of phytic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society, 60*(11), 1861-1867.

Graf, E.; Eaton, J.W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical in Biology Medicine, 8*, 61-90.

Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *The Journal of Biological Chemistry, 259*(6), 3620-3624.

Graf, E.; Empson, K.l.; Eaton, J.W. (1987). Phytic acid: a natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, *262*,11647-11650.

Graf, E., ; Panter, S. S. (1991). Inhibition of warmed-over flavor development by polyvalent cations. *Journal of Food Science*, *56*(4), 1055–1058.

Gray, I. I.; Gomaa, E.A.; Buckley, D.J. (1996). Oxidative quality and shelf-life meats. *Meat Science*, *43*, 111-123.

Grice, H.C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*, *24*, 1127-1130.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* , *33(*7), 601-617.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1-85.

Harbach, A.P.R.; Costa, M.C.R.; Soares, A.L.; Bridi, A.M.; Shimokomaki, M.; Silva, C.A. ; Ida, E.I. (2007). Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. *Food Chemistry,100*, 1630-1633.

Hix, D. K.; Klopfenstein, C. F; Walker, C. E. (1997). Physical and chemical attributes and consumer acceptance of sugar-sanp cookies containing naturally occurring antioxidants. *Cereal Chemistry*, *74*, 281-283.

Igene, J. O.; Pearson, A. M. (1979). Role of phospholids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science*, *44*(5), 1285-1290.

Ito, N.; Fukushima, S.; Hasegawa, A.; Shibata, M.; Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, *70*, 343–347.

Juntachote, T.; Berghofer, E.; Siebenhandl, S.; Bauer, F. (2006). The antioxidative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, *72*, 446-456.

Kanner, J.; Hazan, B.; Doll, L. (1988). Catalytic free iron ions in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *33*, 412–415.

Keller, J. D.; Kinsella, I. E. (1973). Phospholipids changes and lipid oxidation during cooking and frozen storage of raw ground beef. *Journal of Food Science*, *38*, 1200–1204.

Krzywicki, K. (1982). The determination of haem pigment in meat. *Meat Science*, *7*, 29.

Latta, M.; Eskin, M. (1980). A simple and rapid method for phytate determination. *Journal Agriculture Food Chemistry, 28*(6), 313-1315.

Lee, B. J.; Hendricks, D. G. (1995). Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. *Journal of Food Science*, *60*(2), 241-244.

Lee, B. J.; Hendricks, D. G. (1997). Metal - catalysed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. *Journal of Food Science*, *62*(5), 935-938.

Lee, B. J.; Hendricks, D. G.; Conforth, D. P. (1998). Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in model beef system. *Journal of Food Science*, *63*(3), 394–398.

McCarthy, T. L.; Kerry, J. P.; Kerry, J. F.; Lynch, P. B.; Buckley, D. J. (2001a). Evaluation of the antioxidant potential of natural food plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, *57*, 45–52.

McCarthy, T. L.; Kerry, J. P.; Kerry, J. F.; Lynch, P. B.; Buckley, D. J. (2001b). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, *57*, 177–184.

Mitsumoto, M.; Cassens, R. G.; Schaefer, D. M.; Arnold, R. N.; Scheller, K. R. (1991). Improvement of color and lipid stability in beef longissimus with dietary vitamin E and vitamin C dip treatment. *Journal of Food Science*, *56*(6), 1489–1492.

Monahan, F. J.; Asghar, A.; Gray, J. I.; Buckely, D. J. ; Morrissey, P. A. (1994). Effect of oxidized dietary lipid and vitamin E on the colour stability of pork chops. *Meat Science, 37*, 205-215.

Morrissey, P. A.; Sheehy, P. J. A.; Galvin, K.; Kerry, J.; Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, *49*, 73–86.

Oatway, L.; Vasanthan, T.; Helm, J.H. (2001). Phytic acid. *Food Reviews International, 20*(17), 419-431.

O'Neill, L. M.; Galvin, K.; Morrissey, P. A.; Buckley, D. J. (1999). Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Science*, *52*, 89-94.

Ozgová, S.; Hermánek, J.; Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH, Fe-ascorbate and Fe-microsomal systems. *Biochemical Pharmacology*, *66*, 1127-1137.

Phillippy, B. Q.; Graf, E. (1997). Antioxidant functions of inositol 1,2,3- trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate**.** *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(6), 939–946.

Plaami, S. (1997). Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm.Wiss.Technology, 30*, 633-647.

Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. (2003). Antioxidants in food. Washington: CRCPress.

Reddy, I.M.; Carpenter, C.E. (1991). Determination of metmyoglobin reductase activity in bovine skeletal muscle. *Journal of Food Science*, *56*, 1161-1164.

Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D.K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research*, *28*, 1-91.

Renerre, M.; Labas, R. (1987). Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science*, *19*, 151-165.

Ruiz, J. A.; Pérez-Vendrell, A. M.; Esteve-García, E. (1999). Effect of b-carotene and vitamin E on oxidative stability in leg meat of broilers fed supplemental fats. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *47*, 448-454.

Shahidi, F.; Rubin, L. J.; Wood, D. F. (1987). Control of lipid oxidation in cooked ground pork with antioxidants and dinitrosyl ferrohemochrome. *Journal of Food Science*, *52*, 564–567.

Soares, A. L.; Olivo, R.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I. (2004). Synergism Between Dietary Vitamin E and Exogenous Phytic Acid in Prevention of Warmed-Over-Flavor Development in Chicken *Pectoralis major*. *Brazilian Archives Biology and Technology, 47*(1), 57-62.

St. Angelo, A. J. (1996). Lipid oxidation in Foods. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition, 36*, 175–224.

Stodolak, B.; Starzynska, A.; Czyszczon, M.; Zyla, K. (2007) The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. *Food Chemistry, 101,* 1041.

Tarladgis, B.G.; Pearson , A. M.; Dugan, L. R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods – II Formation of the TBA – Malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal Science and Food Agriculture, 15*, 602.

Wichi, H. P. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisol (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, *26*, 717-723.

Youssef, E. Y.; Garcia, C. E. R.; Shimokomaki, M. (2003). Effect of salt on color and warmed over flavor in charqui meat processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *46*(4), 593-598.

Vohra, P.; Gray, G.A.; Kratzer, F.H. (1965). Phytic acid metal complexes**.** *Proceeding Society Experimental Biology Medicine* , *120*, 447.

Guide for Authors

Submission of Papers

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System - http://ees.elsevier.com/foodchem . **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor:

Professor Gordon Birch
School of Food Biosciences
University of Reading
Whiteknights, PO Box 226
Reading RG6 6AP, UK

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute).

It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Review Policy
A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

Types of Contributions
Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.
1.*Research papers* - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).
2.*Review articles* - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).
3.*Rapid communications* - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.
4.*Short communications* - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.
5.*Viewpoints* - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.
6.*Letters to the Editor* - Letters are published from time to time on matters of topical interest.
7.*Book reviews*

Manuscript Preparation
General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An

electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.
Abstracts: Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.
Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.
Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used.
Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:
Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry, 66*(3), 307-312.
Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisins: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisins in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.
Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.
Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*:
doi:10.1016/jphysletb.2003.10.071
When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should

not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Preparation of electronic illustrations
Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.
General points
?Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
?Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
?Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
?Number the illustrations according to their sequence in the text.
?Use a logical naming convention for your artwork files.
?Provide all illustrations as separate files.
?Provide captions to illustrations separately.
?Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: http://www.elsevier.com/artworkinstructions .**You are urged to visit this site.**

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Proofs
When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover

image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

Copyright
Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see http://authors.elsevier.com). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting http://www.elsevier.com/trackarticle. Other questions or queries will also be dealt with via the website http://authors.elsevier.com . Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.

5.4 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

5.4.1 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos

RESUMO

PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO

FILGUEIRAS, C.T (1*).; SHIMOKOMAKI, M (1).; CASAGRANDE, R (2).; BARACAT, M. M (2).; SOARES, A. L (1).; RIBEIRO, M. L. L (3).; IDA, E. I (1)

(1)Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e * Discente de Doutorado - (2)Departamento de Ciências Farmacêuticas- (3)Departamento de Bioquímica/Biotecnologia - Caixa Postal 6001- Cep 86051-990 – UEL- Londrina, PR, Brasil. E-mail: elida@uel.br

O ácido fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato está presente em muitos grãos e oleaginosas em proporções que variam de 1 a 5% em massa. A adição de AF em alimentos diminui as mudanças oxidativas induzidas pelo ferro e em carne de frango e outros produtos cárneos foi observada a redução de peroxidação. Como antioxidante, o AF tem sido aplicado em diversos alimentos, porém o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a propriedade seqüestradora de radical hidroxil *in vitro* do AF de germe de milho. O AF foi obtido do germe de milho após extração com HCl (1:5 p/v), seguido de centrifugação, etapas de precipitação e secagem. O teor de AF foi quantificado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria a 500nm. A atividade seqüestradora do radical hidroxil pelo AF foi determinada utilizando o ensaio de deoxirribose através da diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico(TBA) provenientes da degradação do açúcar deoxirribose pelo radical hidroxil gerado pela reação de Fenton. O radical hidroxil formado da reação entre Fe^{3+} - EDTA e H_2O_2 em presença de ácido ascórbico complexam com o açúcar deoxirribose levando a formação de produtos que reagem com TBA produzindo uma coloração rósea. A atividade seqüestradora do hidroxil pelo AF foi dependente da concentração e a máxima atividade foi de 30% com concentração de AF de 1,5mM. Devido à habilidade de o AF formar um quelato com metais di e tri valentes e inativar a reação de oxidação, os resultados comprovam que o AF atua como um bom inibidor da formação de radicais hidroxil.

Palavras chaves: germe de milho, ácido fítico, antioxidante

PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO

Cristina T. Filgueiras (1*); Massami Shimokomaki (1).; Rúbia Casagrande (2); Marcela M. Baracat(2); Adriana L. Soares(1); Mara L.L. Ribeiro(3); Elza I. Ida(1)

Universidade Estadual de Londrina

(1)Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e * Discente de Doutorado - (2)Departamento de Ciências Farmacêuticas- (3)Departamento de Bioquímica/Biotecnologia-Universidade Estadual de Londrina.Caixa Postal 6001-CEP 86051-990–Londrina, PR, Brasil. *cristinafilgueiras@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

O ácido fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato está presente em muitos grãos e oleaginosas em proporções que variam de 1 a 5% em massa. O AF é um antioxidante por atuar na inibição da oxidação e formação de radicais hidroxil (°OH) devido a sua habilidade de formar um quelato de ferro que o torna cataliticamente inativo (Graf et al., 1984). Empson, Theodore e Graf (1991) demonstraram que a adição de pequenas quantidades de AF em alimentos pode diminuir as mudanças oxidativas induzidas pelo ferro e confirmaram que o AF inibiu as transformações oxidativas com redução da degradação de ácido ascórbico e diminuição da peroxidação em carnes de frango. Em alguns países o AF é aplicado como antioxidante em óleo de soja, carnes, pastas de peixe, macarrão pré-cozido, pães, caviar, vegetais frescos e outros (Graf, 1983). Como antioxidante, o AF tem sido aplicado em diversos alimentos, porém o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Considerando a atuação do AF como antioxidante, suas várias aplicações e elevada concentração no germe de milho, este trabalho avaliou a propriedade antioxidante do AF obtido do germe de milho utilizando o ensaio de deoxirribose.

2. OBJETIVO

Foi investigar a propriedade seqüestradora do radical hidroxil *in vitro* do AF obtido do germe de milho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e Determinação do AF do Germe de Milho

O AF foi obtido na forma bruta a partir do germe de milho após extração com HCl (1:5 p/v), seguido de centrifugação, etapas de precipitação e secagem (Fukuji, 2005). O teor de AF foi quantificado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria a 500nm (Latta e Eskin, 1980).

3.2. Determinação da Atividade Antioxidante do AF Utilizando o Ensaio de Deoxirribose

50μL de diferentes concentrações de AF padrão e obtido do germe de milho foram adicionados em tubos de ensaios contendo 1mL de tampão KH_2PO_4-KOH 20mM, pH 7,4, 100μM de ascorbato, 50μM de $Fe_3Cl.6H_2O$, 52μM de EDTA, 2,8mM de deoxirribose e 1mM de H_2O_2 e incubados a 37ºC por 30 minutos. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas foram determinadas com adição de 1mL de TBA 1%, preparado em 50mM de NaOH, 0,1mL de NaOH 10M e 0,5mL de H_3PO_4 20% e incubados por 20 minutos a 85ºC. A coloração rósea, proveniente da reação, foi lida em 535nm. A atividade antioxidante foi expressa como % média ± desvio padrão de atividade seqüestradora do radical hidroxil pelo AF. A validação do método foi realizada utilizando critérios de precisão intra e inter-ensaio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

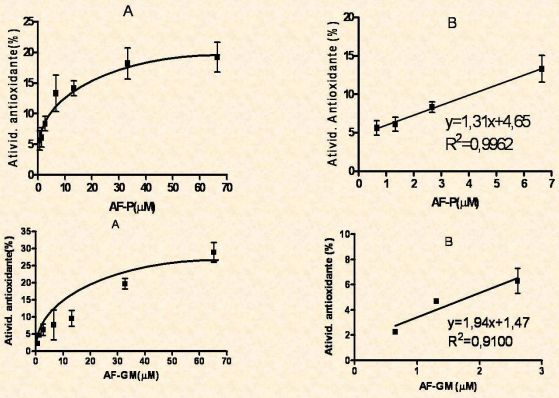

Figura 2: (A) Atividade seqüestradora do radical hidroxil pelo AF obtido na forma bruta do germe de milho. (B) Concentração de AF versus atividade antioxidante

A atividade seqüestradora do radical hidroxil pelo AF foi dependente da concentração do AF (Figuras 1 e 2). No padrão, na concentração de 38,2 μM de AF foi observada atividade antioxidante máxima de 18,19% (Figura 1A) enquanto que, na mesma concentração de AF obtido, foi observada atividade de 19,73%, porém atividade de 28,91% ocorreu na concentração de 76,4 μM (Figura 2A). Assim, comprova-se que o AF obtido na forma bruta apresentou um bom potencial com propriedade antioxidante. Os coeficientes de variação intra-ensaios realizados por 5 dias consecutivos variaram de 1,5 a 13,8% para a concentração de 7,6 μM e de 6,9 a 10,1% para a concentração de 76,4 μM de AF padrão. Os coeficientes de variação inter-ensaio para as concentrações de 7,6 μM de 21 determinações e de 76,4 μM de 22 determinações, foram respectivamente de 4,1 e 8,5%. O método apresentou uma boa precisão nas concentrações de 7,6 e 76,4 μM de AF e a ANVISA (Brasil, 2002) considera CV inferior a 15%.

5. CONCLUSÕES

O AF obtido a partir do germe de milho apresentou propriedade antioxidante inibindo a formação de radicais hidroxil e o método utilizado apresentou boa precisão, conforme coeficientes de variação obtidos a partir de intra e inter-ensaios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL.. ANVISA. Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.
EMPSON, K. L.; THEODORE, P. L.; GRAF, E. **Journal of Food Science**, 56: 2, p. 560-563, 1991.
FUKUJI, T.S. **Ácido fítico de germe de milho híbrido e produtos derivados: processo de purificação e caracterização química parcial**. 2005 (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina.
GRAF, E. **Journal of American Oil Chemists' Society**, 60:11, 1983.
GRAF, E. et al . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259: 6, p. 3620-3624, 1984.
LATTA, M.; ESKIN, M. A. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 28, n.6, p. 1313-1315, 1980.

5.4.2 1º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM GERME DE MILHO E ESTRATÉGIA PARA SUA OBTENÇÃO

Cristina Tostes Filgueiras*, Lucas Varéa Pereira, Pedro Paulo de Almeida Paccola**, Massami Shimokomaki[1], Elza Iouko Ida[1]***

[1]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/*Doutoranda do Programa de Pós Graduação em ciência de Alimentos/**Bolsistas de Iniciação Científica, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: elida@uel.br

RESUMO

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato é um componente que está presente em maior concentração em grãos e em menor quantidade nos tubérculos e leguminosas. O germe de milho contém 6 a 7% em base seca e seu potencial antioxidante tem sido investigado. O objetivo este trabalho foi quantificar o teor de ácido fítico de germe de milho e estabelecer uma estratégia para sua obtenção. Para assegurar a quantificação do ácido fítico, foram aplicados os seguintes parâmetros de desempenho: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A eficiência da estratégia de obtenção de ácido fítico foi avaliada utilizando para extração o germe de milho desengordurado e HCl 0,8M na proporção de 1:5 (p/v) e agitação por 2h. Em seguida o pH foi ajustado para 4,8 e o material centrifugado. O pH do sobrenadante foi ajustado para 9,5 e decantado, centrifugado e ressuspenso. Após filtração o material foi transferido para estufa de secagem e obtido o ácido fítico. A quantificação de ácido fítico do germe de milho desengordurado foi assegurada devido a ótima precisão com baixo coeficiente de variação e exatidão, especificidade, linearidade e robustez. O limite de detecção e quantificação do ácido fítico obtido foram de 0,193 µg/mL e 0,587 µg/mL, respectivamente. O ácido fítico obtido apresentou-se na forma de pó de coloração branca com rendimento de 67,0%. O grau de pureza do ácido fítico obtido foi de 85,4%. A impureza de 14,6% foi constituída predominantemente de sais inorgânicos. O fósforo total do ácido fítico obtido foi de 15,16% e fósforo fítico de 15,05%, e assim pode-se estimar que 99,27% do fósforo total foram provenientes do fósforo fítico. Em pH 0,6 o ácido fítico foi totalmente solúvel e em pH 2,0 e 3,5 apresentou 99,94% e 82,83% de solubilidade, respectivamente.

Palavras-chave: ácido fítico, germe de milho, obtenção de ácido fítico

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM GERME DE MILHO E ESTRATÉGIA PARA SUA OBTENÇÃO

Universidade Estadual de Londrina

Cristina Tostes Filgueiras *, Lucas Varéa Pereira, Pedro Paulo de Almeida Paccola**, Massami Shimokomaki (1), Elza Iouko Ida(1*)**

(1)Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos /* Discente de Doutorado/Bolsistas de Iniciação Científica -Universidade Estadual de Londrina.Caixa Postal 6001-CEP 86051-990– Londrina, PR, Brasil. *elida@uel.br**

1. INTRODUÇÃO

O ácido fítico ou mio-inositol hexafosfato é um componente que está presente em maior concentração em grãos e em menor quantidade nos tubérculos e leguminosas (Ravindran et al., 1994). O germe de milho contém 6 a 7% em base seca e seu potencial antioxidante tem sido investigado (Soares et al., 2004; Filgueiras et al., 2009). A quantificação de ácido fítico tem sido realizada principalmente pelo uso de métodos por precipitação e cromatografia, sendo que o método por cromatografia de troca iônica tem sido amplamente utilizado e adotado como oficial pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Neste método foi utilizado a resina AG1-X4 para recuperação do fitato, seguido de digestão ácida e quantificação do teor de fósforo por colorimetria (Harland & Oberleas, 1977). A extração do ácido fítico de qualquer produto é a primeira etapa para posterior quantificação, sendo que vários extratores tem sido utilizados e os mais comuns são HCl 0,6 e 1,2% e TCA 3 e 5% (Thompson & Erdman, 1982; Reddy et al., 1989) ou somente HCl 2,4% (Latta e Eskin, 1980). Diferentes métodos de quantificação de ácido fítico em produtos de cereais foram investigados, porém há várias limitações principalmente com relação à extração e quantificação direta ou indireta. Entretanto, a obtenção do ácido fítico de grãos de cereais ou produtos somente foi descrita na forma de antigas patentes.

2. OBJETIVOS

Quantificar o teor de ácido fítico de germe de milho e estabelecer uma estratégia para sua obtenção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para assegurar a quantificação do ácido fítico, foram aplicados os parâmetros de desempenho como: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A eficiência da estratégia de obtenção de ácido fítico foi avaliada utilizando para extração o germe de milho desengordurado e HCl 0,8M (1:5 p/v) e agitação por 2h. Em seguida o pH foi ajustado para 4,8 e o material centrifugado. O pH do sobrenadante foi ajustado para 9,5 e decantado, centrifugado e ressuspenso. Após filtração o material foi transferido para estufa de secagem e obtido o ácido fítico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O limite de detecção e quantificação do ácido fítico obtido foram de 0,193µg/mL e 0,587µg/mL, respectivamente. O ácido fítico obtido apresentou-se na forma de pó de coloração branca com rendimento de 67,01%. O grau de pureza do ácido fítico obtido foi de 85,41%. A impureza de 14,59% com predominância de sais inorgânicos. O fósforo total do ácido fítico obtido foi de 15,16% e fósforo fítico de 15,05%, e assim estimou-se que 99,27% do fósforo total foram provenientes do fósforo fítico. Em pH 0,6 e 2,0 o ácido fítico foi totalmente solúvel (P<0,05) e em pH 3,5 apresentou 82,83% de solubilidade (Tabela 1).

Tabela 1. Solubilidade do ácido fítico do germe de milho desengordurado em água e diferentes pH

Meio de solubilidade	Teor de ácido fítico (g/100g)	Solubilidade do ácido fítico (%)
Água (pH 5,5)	4,94 ± 0,32	70,56[d]
pH 0,6	7,00 ± 0,29	100,00[a]
pH 2,0	6,99 ± 0,33	99,94[a]
pH 3,5	5,79 ± 0,56	82,83[b]
pH 7,0	5,33 ± 0,41	76,13[c]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05)

5. CONCLUSÃO

A quantificação de ácido fítico do germe de milho desengordurado foi assegurada pela ótima precisão com baixo coeficiente de variação e exatidão, especificidade, linearidade e robustez. A aplicação da estratégia de extração e obtenção de ácido fítico do germe de milho desengordurado possibilitou a sua obtenção com 67,01% de rendimento e 85,41% de pureza. O ácido fítico obtido apresentou elevado teor de fósforo fítico e magnésio, baixo teor de proteínas e alta solubilidade em pH fortemente ácido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. (1997). *Official method of* analysis (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analitycal Chemists.

Filgueiras, C.T., Casagrande, R., Soares, A.L., Shimokomaki, M., Ida, E.I. (2009). *Química Nova*, (aceito para publicação)

Harland, B.F. & Oberleas, D. (1977). *Cereal Chemistry, 54* (4), 827-832.

Latta, M. & Eskin, M. A. (1980). *Journal Agriculture Food Chemistry*, *28* (6), 1313-1315.

Ravindran, V., Ravindran, G. & Sivalogan, S. (1994). *Food Chemistry, 50*, 133-136.

Soares, A. L., Olivo, R., Shimokomaki, M. & Ida, E.I. (2004). *Brazilian Archives Biology and Technology, 47*(1), 57-62.

Thompson, D.B. & Erdman JR, J.W. (1982). *Journal of Food Science, 47*, 513-517.

Órgãos Financiadores: CNPq e CAPES/MEC

5.4.3 XVI EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica

RESUMO EXPANDIDO

OBTENÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO DE GERME DE MILHO

Ana Carolina de Souza (IC - UEL), Estéfano Nakamura (IC - CNPq), Cristina Tostes Filgueiras (Doutoranda), Elza Iouko Ida (Orientadora), e-mail: elida@uel.br.

Universidade Estadual de Londrina(UEL)/ Centro de Ciências Agrárias/ Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos – Londrina – PR.

Palavras-chave: ácido fítico, milho, antioxidante

Resumo

O ácido fítico (AF) ou mio – inositol hexafosfato é um componente que está presente em maior concentração no germe de milho. A obtenção do AF de fontes vegetais é útil para aplicação como antioxidante em diversos sistemas alimentares ou outros produtos com agregação de valores às matérias-primas. O AF foi obtido a partir de extração em meio ácido e isolado de outros componentes por precipitação. Apresentou-se na forma de pó de cor branca e levemente amarelada e com rendimento de 60,2%.

Introdução

O fitato é o inositol mais abundante da natureza e, em geral, estão em concentrações elevadas em cereais, legumes, frutos secos e sementes. O fitato foi considerado por muitos pesquisadores com propriedades antinutritivas e foi proposto sua eliminação da dieta para evitar os problemas de biodisponibilidade de determinados metais. Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que só em caso de ingerir grandes quantidades de alimentos ricos em fitato junto com dietas pobres em conteúdo mineral poderiam ocorrer problemas de biodisponibilidade mineral (EMPSON et al., 1991).

Uma das principais funções fisiológicas do AF na planta é a sua atuação como reserva de fósforo representando cerca de 60 a 97% do fósforo total (RAVINDRAN, RAVINDRAN E SIVALOGAN, 1994). Nos cereais o AF está distribuído em diferentes componentes do grão.

No trigo e arroz, o AF está presente em maior concentração na camada de aleurona e no pericarpo, respectivamente. O milho difere de outros cereais por apresentar maior concentração de AF no germe (REDDY, SATHE e SALUNKHE, 1982).

Várias aplicações do AF foram demonstradas, principalmente pela sua ação antioxidante em alimentos (FUKUJI, 2005; GRAF, 1983; GRAF et al., 1984; EMPSON, THEODORE e GRAF 1991; LEE e HENDRICKS, 1995). Assim, destaca-se a importância de investigar o AF como um antioxidante natural devido as suas propriedades e facilidades de obtenção.

O objetivo deste trabalho foi apresentar um procedimento de obtenção de AF de germe de milho.

Materiais e Métodos

O procedimento de obtenção de AF do germe de milho foi realizado conforme descrição de Kolchev (1978) com modificações segundo Fukuji (2005).

A extração de AF foi realizada com 20 g de germe de milho triturado em solução contendo HCl 0,8M com agitação constante por 2 h. O pH final desta solução foi ajustado para 4,8 para precipitação da proteína com adição de solução de NaOH 4M. O material obtido foi centrifugado a 400 g por 10 min para obtenção do sobrenadante contendo AF e o resíduo foi desprezado.

Em seguida, foi realizada a precipitação do sobrenadante com solução de NaOH 4M e pH 9,5. Após cerca de 12 h para decantação, procedeu-se a centrifugação a 400 g por 10 min e obteve-se o precipitado bruto. Neste precipitado o AF foi ressuspendido com HCl 0,8M e adicionado formaldeído e terra diatomácea para desnaturação de proteínas e remoção de outros constituintes, respectivamente. O material assim obtido foi mantido sob agitação mecânica com aquecimento a 50ºC por 1 h. Esta solução foi mantida em repouso por 12 horas para decantação do precipitado. O material foi filtrado com papel de filtro e obtido o sobrenadante. A precipitação deste sobrenadante foi realizada com solução de $NaHCO_3$ 1,5M e pH 8,5 seguido de filtração com papel de filtro. A secagem do precipitado final foi realizada em estufa a 60ºC, por 2 h.

A porcentagem de rendimento de AF obtido foi calculada pela relação entre a massa de AF na amostra inicial (AFi) e massa de AF obtida no precipitado final seco (AFf), multiplicado por 100.

O teor de AF foi determinado conforme procedimento descrito por Latta e Eskin (1980) com modificações.

Resultados e Discussão

Após secagem em estufa a 60ºC do precipitado final foi calculado o rendimento do AF em relação ao teor de AF no sobrenadante inicial. O AF obtido, em pó, apresentou cor branca e levemente amarelada quando comparado com o padrão de fitato de dodecasódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM= 923,8, de procedência Sigma). O rendimento obtido neste trabalho foi de 60,2% o qual foi similar ao descrito por Leal (2000) que obteve AF de germe de milho com rendimento de 63,46%.

Conclusões

Foi possível estabelecer um procedimento e obter o AF a partir do germe de milho com rendimento de 60,2% utilizando para extração do AF solução HCl 0,8 M, precipitação bruta do extrato com NaOH 4M em pH 9,5 e precipitação final do fitato com solução $NaHCO_3$ 1,5 M em pH 8,5.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Londrina pela bolsa de Iniciação Científica.

Referências

B. J. Lee; D. G. Hendricks. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. *Journal of Food Science*, 1995, 60, 2, 241-244.

E. Graf. Aplications of Phytic Acid. *Journal of American Oil Chemists´ Society*, 1983, 60, 11.

E. Graf; J.R. Mahoney; R.G. Bryant; J.W. Eaton. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259, 6, 3620-3624.

E. S. Leal, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2000.

K. L. Empson; P. L. Theodore; E. Graf, Phytic acid as a food antioxidant. *Journal of Food Science*, 1991, 56, 2, 560 – 563.

L. A. Kolchev, U.S. Patent 4 070 422, 1978; *Chemical Abstracts*, 1978, 45, 24.

M. Latta; M. Eskin. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1980, 28, 1313.

N. R. Reddy; S. K. Sathe; D. K. Salunkhe. Phytates in Legumes and Cereals. *Advances in Food Research*, 1982, 28, 1 – 91.

T. S. Fukuji, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2005.

V. Ravindran; G. Ravindran; S. Silvalogan. Total and Phytate Phosphorus Contents of Various Foods and Feedstuffs of Plant Origin. *Food Chemistry*, 1994, 50, 133 – 136.

5.4.4 XVII EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica

RESUMO EXPANDIDO

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO POR CROMATOGRAFIA E ESPECTROFOTOMETRIA

Lucas Varéa Pereira[1], Cristina Tostes Filgueiras[2], Elza Iouko Ida[3]

1 Acadêmico do Curso de Graduação de Química da Universidade Estadual de Londrina e Bolsista de Iniciação Científica – PIBIC/UEL.
2 Aluna do Curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina.
3 Professora Adjunta e Pesquisadora do CNPq em Produtividade em Pesquisa. Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR. E-mail: elida@uel.br

Resumo

A validação de um método analítico é fundamental para implementar um controle de qualidade em qualquer laboratório analítico. No milho, o ácido fítico (AF) está concentrado no germe, com cerca de 8,0% em base seca. O objetivo desta pesquisa foi validar um método para quantificação de AF e confirmar sua eficiência na aplicação da determinação do teor de AF em germes de milho gordo e *in natura*. O método de quantificação utilizado foi a cromatografia de troca iônica com utilização da resina DOWEX-AGX-4 e espectrofotometria a 500nm. O método apresentou uma boa exatidão com recuperação média de 92,11 a 98,43%; elevada precisão com coeficientes de variação de 0,0004 a 7,77%. O método apresentou especificidade e linearidade com limite de detecção calculado de 0,193 µg/mL e limite de quantificação de 0,587 µg/mL. A aplicação do método após a validação, possibilitou quantificar o teor de AF de 7,79% para o germe de milho gordo e 6,50% para o germe de milho *in natura*, com desvio padrão de 0,76 e 0,66, respectivamente . Assim, o método utilizado foi eficaz e pode ser aplicado com segurança para quantificar o teor de AF em processos de extração ou obtenção de diferentes derivados de germe de milho.

Palavras-chave: validação, quantificação, ácido fítico, germe de milho.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser validado. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

O Ácido Fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato está distribuído em diferentes formas nos grãos de cereais, associado a componentes específicos ou partes da semente (REDDY, 2002). No trigo e no arroz, o AF está presente em maior concentração na camada aleurona e no pericarpo, respectivamente. O milho difere de outros cereais por apresentar maior concentração de AF no germe, com uma distribuição de 88% (REDDY, SATHE E SALUNKE, 1982). O germe de milho apresenta elevado teor de AF, sendo relatado teor de 6,0 a 7,0% (ERDMAN, 1979; LEAL, 2000; FUKUJI *et al*, 2008).

Os seis grupamentos fosfato do AF podem formar complexos fortes e insolúveis com cátions, tais como Cu^{++}, Zn^{++}, Co^{++}, Mn^{++}, Fe^{+++} e Ca^{++} (OBERLEAS, 1973). Em pH elevado, o AF forma complexos insolúveis com cátions polivalentes e diminui a biodisponibilidade nutricional de muitos minerais, característica que o torna um antinutriente (GRAF, 1983). Em valores de pH comuns a maioria dos alimentos (pH 4,7), adquire carga negativa, conferindo alto poder de complexação a moléculas de carga positiva. A habilidade de quelação do AF tem sido considerada por alguns pesquisadores como um fator de diminuição do colesterol e triglicérides (JARIWALLA *et al*., 1990; KLEVAY, 1977).

O AF é considerado um antioxidante por atuar eficazmente na inibição da oxidação e formação de radicais hidroxil devido a sua habilidade de formar um quelato de ferro que o torna cataliticamente inativo (GRAF *et al.*, 1984) Em alguns países, o AF é aplicado como antioxidante em óleo de soja, carnes, pastas de peixe, macarrão pré-cozido, pães, caviar, vegetais frescos e outros (GRAF, 1983).

Considerando a necessidade de testar a confiabilidade dos resultados do método, este trabalho teve como objetivo validar o método de quantificação de AF por meio de cromatografia de troca iônica e espectrofotometria e aplicar na quantificação do teor de AF em germes de milho gordo e *in natura*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Validação do método de quantificação do teor de AF

Foi utilizado o método de determinação de AF proposto por Latta e Eskin (1980) com modificação da resina para DOWEX-AGX-4 segundo Ellis e Morris (1986). O fitato de dodecassódio ($Na_{12}C_6H_6O_{24}P_6$; PM=923,8 (Sigma) proveniente do milho foi utilizado como padrão de AF.

A validação do método para quantificação de AF foi efetuada verificando os critérios de precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação (BRASIL, 2003).

A precisão foi calculada através da repetibilidade do método, sendo expressa pelo coeficiente de variação em porcentagem (CV%). A exatidão foi verificada por meio da porcentagem de recuperação do padrão de AF. Para determinação da linearidade do método foram obtidas cinco curvas padrões de AF, em triplicata, com concentrações teóricas crescentes de 25 a 135 µg de padrão, e a partir de seus valores médios foi obtida a curva média de calibração. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e da inclinação da curva de calibração média.

2.2 Extração de AF e aplicação do método validado às amostras

A extração foi realizada com 10 g de germe de milho gordo e *in natura,* fornecidos por uma Cooperativa Agroindustrial da região. O germe foi moído e adicionado solução de HCl 0,8M na proporção 1:5 (p/v) com agitação constante de 250 rpm por 2h. Realizou-se a centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos para obtenção do sobrenadante contendo o AF. O sobrenadante foi diluído 1:500 (v/v) para aplicação e confirmação do método validado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método para quantificação de AF apresentou baixos coeficientes de variação no intervalo de 0,0004 a 7,77% e recuperação de até 98,43%, confirmando que o método apresentou uma boa precisão e exatidão (**Tabela 1**).

O método demonstrou linearidade conforme construção de 5 curvas de calibração. A partir de seus valores médios foi obtida a curva média de calibração conforme **Equação 1** e **Figura 1**.

$$y = 0{,}00142(\pm 0{,}00004)x + 0{,}00025(\pm 0{,}0016) \quad (\textbf{Equação 1})$$ onde:

y = absorvância a 500nm

x = concentração teórica de AF em µg/mL.

TABELA 1 – Recuperação do padrão de AF para determinação da precisão e exatidão do método

Concentração do AF padrão (µg/mL)	Concentração Média Experimental (µg/mL)	Coeficiente de variação (%)	Recuperação média do AF (%)
19,58	18,51 ± 0,76	4,09	94,57
39,15	37,28 ± 1,29	3,47	95,22
78,30	76,37 ± 1,43	1,87	97,53
117,45	114,76 ± 8,92	7,77	97,71
156,60	154,13 ± 1,55	1,01	98,43
195,75	189,40 ± 10,77	5,69	96,85
234,90	217,56 ± 0,084	0,0004	92,62
274,05	252,42 ± 6,51	0,023	92,11

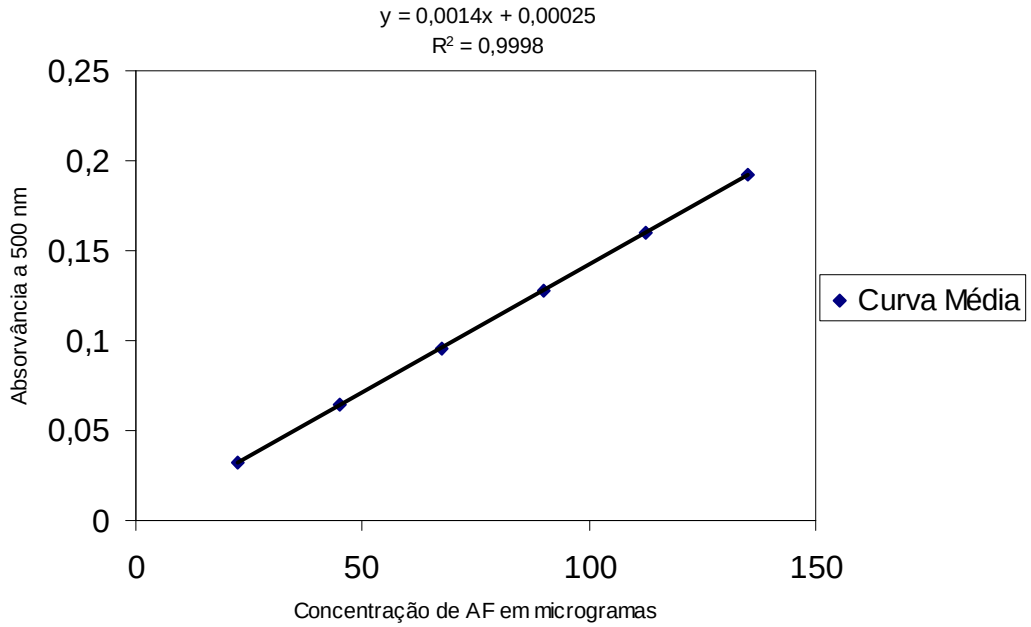

Figura 1 – Curva média de calibração para quantificação do teor de AF.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos com base na curva de calibração média (**Figura1**) foram de 0,193 µg de AF/mL e 0,587 µg de AF /mL, respectivamente. Quando adicionado o padrão de AF na matriz de germe de milho, a recuperação foi de 94,64 ± 0,043%, indicando que o método apresentou uma boa especificidade.

O método validado foi aplicado para quantificar o teor de AF no germe de milho gordo e *in natura* e foi obtido o de teor de 7,79% e 6,50% e desvio padrão de 0,76 e 0,66, respectivamente. Estes resultados estão coerentes e confirmam com os obtidos por outros autores (ERDMAN, 1979; LEAL, 2000; FUKUJI *et al*, 2008).

4. CONCLUSÃO

O método para quantificação de AF foi validado demonstrando-se eficaz, com boa precisão, exatidão, especificidade e linearidade. Pode ser aplicado com segurança para quantificar o teor de AF em processos de extração ou obtenção de diferentes derivados de germe de milho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

ELLIS, R.; MORRIS, E. R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 58-59, 1986.

ERDMAN, J. W. Oilseed Phytates: Nutritional Implications. **Journal of American Oil Chemist's Society,** v. 56, p. 736, 1979.

FUKUJI, T. S.; FERREIRA, D. L.; SOARES, A. L.; PRETE, C. E. C.; IDA, E. I. Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. **Acta Sci Agro**., v. 30, n. 1, p. 31-35, 2008.

GRAF, E. Applications of phytic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Champaign, v. 60, n. 11, p. 1861-1867, 1983.

GRAF, E.; MAHONEY, J. R.; BRYANT, R. G.; EATON, J. W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 6, p. 3620-3624, 1984.

JARIWALLA, R. J.; SABIN, R.; LAWSON, S.; HERMAN, Z. S. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. **Journal of Applied Nutrition,** v. 42, p 18-28, 1990.

KLEVAY, L. M. Coronary heart disease: the Zinc/copper hypothesis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 28, p 764-774, 1977.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 313-1315, 1980.

LEAL, E. S. **Extração, obtenção e caracterização parcial de ácido fítico do germe grosso de milho e aplicação como antioxidante.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2000.

OBERLEAS, D. **Phytates**. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Toxicants occurring naturally in foods. Washington: National Academy of Sciences, p. 363-371, 1973.

REDDY, N. R. Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. (Ed.) **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002, p.25-51.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in Legumes and Cereals. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 1-91, 1982.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

AGRADECIMENTOS

Ao programa PIBIC/CNPq/UEL e à Universidade Estadual de Londrina pela concessão de bolsa de Iniciação Científica a LVP, e ao CNPq pelo financiamento parcial desta pesquisa.

6 CONCLUSÃO

O processo de extração e purificação de ácido fítico do germe de milho desengordurado foi assegurado pelo ótimo desempenho do método de quantificação e purificação com 67,01± 0,73% de rendimento e 85,41± 0,95% de pureza. O ácido fítico purificado apresentou elevado teor de fósforo fítico e magnésio, baixo teor de proteínas e alta solubilidade em pH fortemente ácido.

O ácido fítico purificado do germe de milho apresentou potencial antioxidante confirmado pela atividade de seqüestro de radicais livres e quelação de metais, por meio de ensaios de deoxirribose e batofenantrolina. A atividade de seqüestro do radical hidroxil foi dependente da concentração de ácido fítico do germe de milho. A atividade quelante para o Fe^{+2} aumentou com elevação da concentração do ácido fítico purificado e com o tempo de contato com o Fe^{+2}.

O potencial antioxidante do ácido fítico purificado foi confirmado pela aplicação em carnes de frango armazenadas sob refrigeração no qual inibiu a peroxidação lipídica *in vitro* induzida por ferro, a oxidação lipídica, o desenvolvimento de aroma de requentado e formação de metamioglobina.

7 REFERÊNCIAS

AOAC. (1997). *Official method of* analysis (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analitycal Chemists.

Aruoma, O. I. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, *8*(1), 53-63.

Berg, R. V. D.; Haenen, G. R. M. M.; Berg, H. V. D.; Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry, 66*(2), 511-517.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bolanm, B.J.; Ulvik, R.J. (1987). Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. *Biochemical Journal*, *243*, 55-59.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Buege, J.A.; Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302-310.

Camire, A. L. ; Clydesdale, F. M. (1982). Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *Journal of Food Science, 47*(2), 575-578.

Casagrande, R.; Georgetti, S.R.; Verri, W.A., JR; Jabor, J.R.; Santos, A.C.; Fonseca, M.J.V. (2006). Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*, *7*, 1-8.

Chen, X.; Ahn, D. U. (1998). Antioxidants activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe^{+2} or ultraviolet light. Journal of the American Oil Chemists Society, 75, 1717-1721.

Chen JR, P. S.; Toribara, T. S. ; Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorous. *Analytical Chemistry, 28*, 1756-1758.

Cheryan, M. (1980). Phytic acid interaction in food systems. *CRC Crtical Reviews in Food Science and Nutrition.13,* 297.

Cilliers, J.L.; Van Niekerk, P.J. L. (1986). LC determination of phytic acid by postcolum colorimetric detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *34*(4), 680-683.

Conforth, D. P. (2002). Food Phytates. Boca Raton: CRC Press.

Correa, P. (1995). The role of antioxidants in gastric carcinogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *35*(1), 59-64.

Costello, A.J.R.; Gloanck, T.; Myers, T. C. (1976). P-nuclear magnetic resonance- pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydrate Research*, *46*, 159.

Cosgrove, D. J. (1966). The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Pure and Applied Chemistry*, *16*, 209-224.

Crackel, R.L.; Gray, J.I.; Booren, A.M.; Buckely, D.J. (1988) Effect of antioxidants on lipid stability in restructured beef steaks. *Journal of Food Science*, *53*(2), 656.

Dean, J. A. (1960). Flame Photometry. New York: McGraw-Hill.

DeBoland, A. R.; Garner, G. B.; O'Dell, B. L. (1975). Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *23*(6), 1186-1189.

Doherty, C.; Faubion, J. M.; Rodney, L. W. (1982). Semi automated determination of phytate in sorghum e sorghum products. *Cereal Chemistry*, *59*(5), 373-377.

Ellis, R. ; Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. *Cereal Chemistry, 63*(1), 58-59.

Empson, K. L.; Theodore, P. L.; Graf, E. (1991). Phytic acid as a food antioxidant. *Journal of Food Science, 56*(2), 560-563.

Erdman, J. W. (1979). Oilseed phytates: nutritional implications. *Journal of American Oil Chemist's Society, 56*, 736.

Filgueiras, C.T.; Casagrande, R.; Soares, A.L.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I. (2009). Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Química Nova*, (aceito para publicação).

Fukuji, T. S.; Ferreira, D. L.; Soares, A. L.; Prete, C. E. C.; Ida, E. I. (2008). Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. *Acta Scientiarum Agronomy, 30*(1), 31-35.

Ghiretti, G. P.; Zanardi, E.; Novelli, E.; Campanini, G.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. (1997). Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. *Meat Science* , *47*,167-176.

Graf, E. (1983). Applications of phytic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society, 60*(11), 1861-1867.

Graf, E. (1986). Phytic Acid: Chemistry and Applications. Minneapolis: Pilatus Press.

Graf, E.; Dintzis, F. R. (1982). High- performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *Analytical Biochemistry*, *119*, 413-417.

Graf, E.; Eaton, J.W. Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. (1984). *The Journal of Nutrition*, *114* (7), 1192-1198.

Graf, E.; Eaton, J.W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical in Biology Medicine, 8*, 61-90.

Graf, E.; Empson, K.l.; Eaton, J.W. (1987). Phytic acid: a natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, *262*,11647-11650.

Graf, E.; Mahoney, J. R.; Bryant, R. G.; Eaton, J. W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *The Journal of Biological Chemistry, 259*(6), 3620-3624.

Grases, F.F.; Isern, M.; Gabrial, J.; Bauza, C.; Almirall, P.; Rafael, M. (1992). Use of phytic acid, its salts and phytate-rich diet for treatment of prepathological and pathological conditions associated with idiopathic oxalocalcic renal lithiasis. Spain ES 2058025. A1. *Pharmacology*.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* , *33(*7), 601-617.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. (1987). The deoxyrribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*,*165*(1), 215-219.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, *186*, 1-85.

Harbach, A.P.R.; Costa, M.C.R.; Soares, A.L.; Bridi, A.M.; Shimokomaki, M.; Silva, C.A. ; Ida, E.I. (2007). Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. *Food Chemistry,100*, 1630-1633.

Harland, B.F. ; Oberleas, D. (1977). A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chemistry*, *54*(4), 827-832.

Harland, B.F. ; Oberleas, D. (1986). Anion-exchange method for determination of phytate in foods: collaborative study. *Journal Association Official Analytical Chemical*, *69*(4), 667-670.

Hartman Jr., G. H. (1979). Removal of phytate from soy protein. *Journal of American Oil Chemists’ Society, 56*, 731-735.

Hill, R.; Tyler, C. (1954). The reaction between phytate and protein. *Journal Agricultural Science,44*, 324-425.

Hirose, M.; Hoshiya, T.; Akagi, K.; Futakuchi, M.; Ito, N. (1994). Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenzalphaanthracene. *Cancer Letters*, *83*(1), 149-156.

Hix, D. B. (1994). Physical, chemical and sensory characteristics of sugar-snap cookies containing naturally occurring antioxidants. *Dissertation Abstrats International*, *54*(8), 138.

Hix, D. K.; Klopfenstein, C. F; Walker, C. E. (1997). Physical and chemical attributes and consumer acceptance of sugar-sanp cookies containing naturally occurring antioxidants. *Cereal Chemistry*, *74*, 281-283.

Igene, J. O.; Pearson, A. M. (1979). Role of phospholids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science*, *44*(5), 1285-1290.

Joung, H.; Nam, G.; Yoon, S.; Lee, J.; Shim, J. E.; Paik, H.Y. (2004). Bioavailable zinc intake of Korean adults in relation to the phytate content of Korean foods. *Journal of Composition and Analysis***,** *17*, 713-724.

Knight, J. A.; Searles, D.A. (1994). The effects of various antioxidants on lipid peroxidation in stored whole blood. *Ann-Clin-Lab-Science*, *24*(4), 294-301.

Ko, K. M.; Godin, D. V. (1991). Effects of phytic acid on the myoglobin-t-butylhydroperoxide-catalysed oxidation of uric acid and peroxidation of erythrocyte membrane lipids. *Mol-Cell-Biochemistry*, *101*(1), 23-29.

Kolchev, L. A. (1978) Method for Producing phytin. United States Patent Nº 4070422, *Chemical Abstracts, 45*, 24.

Krzywicki, K. (1982). The determination of haem pigment in meat. *Meat Science*, *7*, 29.

Latta, M. ; Eskin, M. (1980). A simple and rapid method for phytate determination. *Journal Agriculture Food Chemistry, 28*(6), 313-1315.

Lee, B. J.; Hendricks, D. G. (1995). Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. *Journal of Food Science*, *60*(2), 241-244.

Lee, B. J.; Hendricks, D. G. (1997). Metal - catalysed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. *Journal of Food Science*, *62*(5), 935-938.

Lehrfeld, J. (1989). High- performance liquid chromatographic analysis of phytic acid on pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chemistry*, *66*(6), 510-515.

Liu, K.S. (1997). Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. ITP. USA.

Makower, R. U. (1970). Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chemistry*, *47*(31), 288-295.

Morrison, R. S.; Shi, E.; Kan, M.; Yamaguchi, F.; Mckeehan, W.; Rudnicka-Nawrot, M.; Palczewski, K. (1994). Inositolhexakisphosphate (InsP6): an antagonist of fibroblast growth factor receptor binding and activity. *In-Vitro-cell-Development Biology Animal*, *30*(11), 783-789.

Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Núñez, M. J.; Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, *72*, 145-171.

Oatway,L.; Vasanthan,T. ; Helm, J. H. (2001). Phytic acid. *Food Reviews International*, *20*(17), 419-431.

Oberleas, D. (1973). Phytates. In: National Academy of Sciences. Toxicants occurring naturally in foods (pp. 363-371). Washington: National Academy of Sciences.

O'Dell, B.L.; de Boland, A. (1976). Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. *Journal Agriculture Food Chemistry, 24*(4), 804-808.

Okumura, F., Cavalheiro, E.T.G. ; Nóbrega, J.A. (2004). Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. *Química Nova, 27*(5), 832-836.

Parejo, I.; Codina, C.; Petrakis, C.; Kefalas, P. (2000). Evaluation of scavenging activity asseed by Co(II)/ EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH$^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal Pharmacology Toxicology Methods*, *44*, 507-512.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63*(7), 1035-1042.

Plaami, S. (1997). Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effects in nutrition. *Lebensm.Wiss.Technology, 30*, 633-647.

Pokorny, J.; Yanishlieva, N. ; Gordon, M. (2003). Antioxidants in food. Washington: CRCPress.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4290-4302.

Rao, P. S.; Liu, X. K.; DAS, D. K.; Weinstein, G. S.; Tyras, D. H. (1991). Protection of ischemic heart from reperfusion injury by mio-inositol hexaphosphate, a natural antioxidant. *Ann-Thorac-Surg*, *52*(4), 908-912.

Ravindran, V.; Ravindran, G.; Sivalogan, S. (1994). Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chemistry, 50*, 133-136.

Reddy, N. R.; Salunkhe, D. K. (1981). Interactions between phytate, protein and minerals in whey fractions of black gram. *Journal of Food Science, 46*, 564-567.

Reddy, N. R.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research, 28*, 1-91.

Robak, J.; Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochemical Pharmacology*, *37*(5), 837-841.

Rush, J. D.; Koppennol, W. H. (1986). Oxidizing intermediates in the reaction of ferrous EDTA with hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(15), 6730-6733.

Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*(1), 67-103.

Soares, A. L.; Olivo, R.; Shimokomaki, M.; Ida, E.I. (2004). Synergism Between Dietary Vitamin E and Exogenous Phytic Acid in Prevention of Warmed-Over-Flavor Development in Chicken *Pectoralis major*. *Brazilian Archives Biology and Technology, 47*(1), 57-62.

Tarladgis, B.G.; Pearson , A. M.; Dugan, L. R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods – II Formation of the TBA – Malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *Journal Science and Food Agriculture, 15*, 602.

Tsao, G.T.; Zheng, Y.; Lu, J. (1997). Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63, 731-740.

Ullah, A. ; Shansuddin, A. M. (1990). Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F 344 rats. *Carcinogenesis, 11*, 2219-2222.

Vohra, P.; Gray, G.A.; Kratzer, F.H. (1965). Phytic acid metal complexes**.** *Proceeding Society Experimental Biology Medicine* , *120*, 447,1965.

Wang, J. (1992). Extraction of phytic acid from bran and its composition analysis. *Huaxue Shijie*, *33*(6), 269-272.

Weinberg, E. D. (1994). Association of iron with colorectal cancer. *Biometals*, *7*(3), 211-216.

Yang, G.Y. ; Shamsuddin, A.M. (1995). IP6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: involvement of intracellular inositol phosphates. *Anticancer-Research, 15*(6), 2479-2487.

Zhou, J. R. ; Erdman, J. W. Jr. (1995). Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35*(6), 495-508.

ANEXO

Tabela 1 – Recuperação do padrão de AF para determinação da precisão e exatidão do método

Concentração do AF padrão(C) (µg/mL)	Concentração Média Experimental(CME) (µg/mL)	Coeficiente de variação (CV%)	Recuperação média do AF (%)
19,58	18,51 ± 0,76	4,09	94,54
39,15	37,28 ± 1,29	3,47	95,22
78,30	76,37 ± 1,43	1,87	97,54
117,45	114,76 ± 8,92	7,77	97,71
156,60	154,13 ± 1,55	1,01	98,42
195,75	189,40 ± 10,77	5,69	96,76
234,90	217,56 ± 0,084	0,040	92,62
274,05	252,42 ± 6,61	0,026	92,11

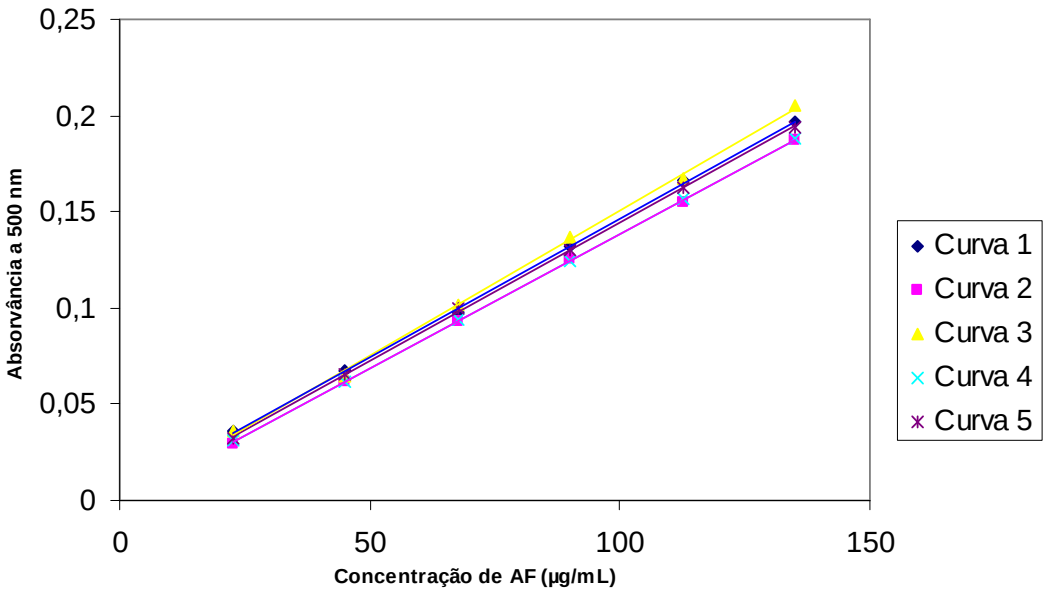

Figura 1 – Curvas de calibração de concentrações teóricas crescentes de AF em função da absorvância a 500 nm

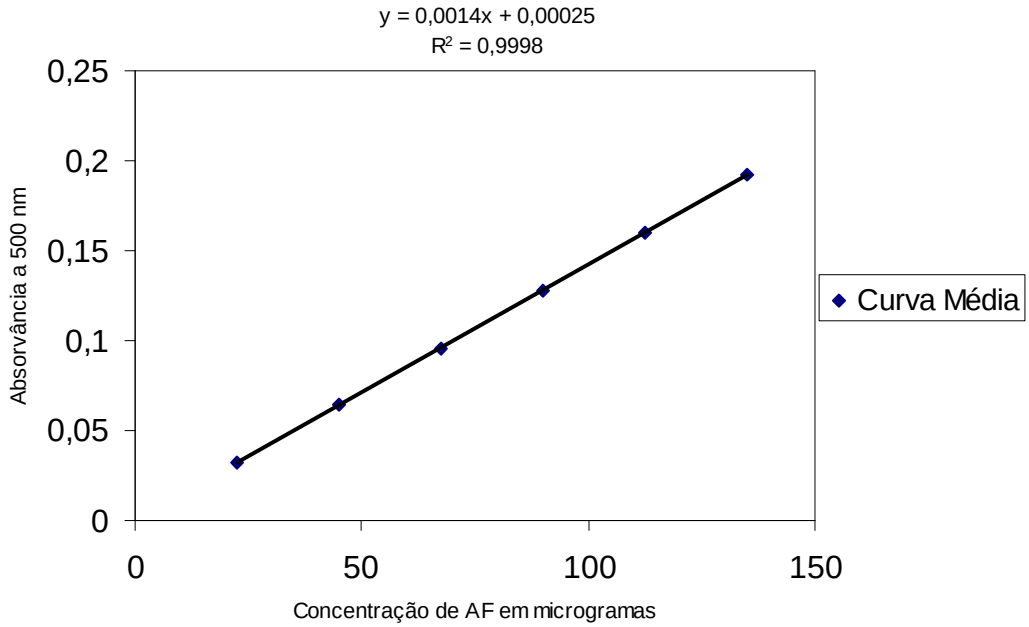

Figura 2 – Curva média de calibração obtida dos valores médios de cada curva de calibração do gráfico da Figura 1

LD = 0,00025 x 3,3 / 0,00142 = 0,58 µg de AF / 3mL de amostra

LD = 0,193 µg de AF / mL de amostra

LQ = 0,00025 x 10 / 0,00142 = 1,76 µg de AF / 3mL de amostra

LQ = 0,587 µg de AF / mL de amostra

O valor de 3,3 utilizado no cálculo é considerado um fator múltiplo da variação de dados devido aos erros aleatórios que considera os parâmetros estatísticos t e z, com um limite de confiança de 95%.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo