



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**METABOLÔMICA E BIOPROSPECÇÃO DE  
VARIEDADES CRIOULAS E LOCAIS DE MILHO**  
*(Zea mays L.)*

SHIRLEY KUHNEN

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina para  
obtenção do título de Doutor em  
Recursos Genéticos Vegetais

Florianópolis

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**METABOLÔMICA E BIOPROSPECÇÃO DE  
VARIEDADES CRIOULAS E LOCAIS DE MILHO  
(*Zea mays* L.)**

SHIRLEY KUHNEN

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Bernardi  
Ogliari e Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina para  
obtenção do título de Doutor em  
Recursos Genéticos Vegetais

Florianópolis

2007

**Ao meu filho Mateus,  
com amor  
DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margarete e Carlos, por terem me proporcionado as oportunidades necessárias para a conclusão desse trabalho e pelo apoio.

Aos meus irmãos, Gabriela, Carolina e Vladimir, e minha sobrinha Ana Victoria pelo carinho e o apoio constante.

Ao meu filho Mateus, nascido durante esse período, por ter me proporcionado momentos de muita alegria e felicidade e por me ajudar a ser uma pessoa cada vez melhor.

Ao restante da família, em especial ao meu tio Nivaldo Cabral Kuhnen, pelos sensatos conselhos e apoio.

Ao Caco, pelo bem que me fez, pelo amor e apoio.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Maraschin, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Professor Paulo F. Dias pela orientação nos ensaios biológicos e amizade.

À Professora Juliana B. Ogliari pelo apoio, confiança e participação no projeto.

Ao Professor Antonio Gilberto Ferreira, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Universidade Federal de São Carlos) pela obtenção dos espectros e pela hospitalidade durante a minha permanência no seu laboratório.

À Gláucia, Elisângela e Maiara, do LRMN da UFScar, pelo auxílio na aquisição dos espectros.

À Professora Dra. Ivonne Delgadillo, à Doutora Alexandra Nunes e à doutoranda Ana Isabel Loureiro Correia (Grupo de Bioquímica Alimentar, Departamento de Química, Universidade de Aveiro – Aveiro, Portugal) pelo auxílio na aquisição dos espectros de FT-IR e análises quimiométricas.

Aos funcionários Luis Pacheco, do LMBV e Maria Luisa Peixoto, do LFDV, pelo auxílio técnico.

À Bernadete, secretária do Programa, pelo auxílio e grande amizade.

Ao Luciano Henrique Campestrini, meu grande amigo, pelo apoio e convivência.

Aos colegas de laboratório, Priscilla, Gustavo, Bianca, Aline e Volmir pelo auxílio e convivência durante esses anos.

Aos amigos Elizeane, Maria Cristina, Vivian, Alexandra, Raquel, Elisa, Wagner e Vanessa pelos bons momentos de descontração.

À CAPES, pela concessão da bolsa para realização desse trabalho.

Aos agricultores de Anchieta pelas sementes das variedades de milho.

Ao povo Brasileiro que me proporcionou, desde a infância, um ensino público e de qualidade.

## SUMÁRIO

---

<b>1 RESUMO</b> .....	x
<b>2 ABSTRACT</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELA</b> .....	xiv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvi
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
4.1 Milho.....	04
4.1.1 Importância econômica e alimentar.....	04
4.1.2 Origem e domesticação.....	06
4.2 Identificação do local de estudo.....	10
4.3 Caracterização dos compostos de interesse.....	13
4.3.1 Metabólitos primários: amido e proteínas.....	13
4.3.2 Metabólitos secundários.....	16
4.3.2.1 Compostos fenólicos.....	18
4.3.2.2 Antocianinas.....	19
4.3.2.3 Carotenóides.....	20
4.4 Compostos bioativos – ênfase nos processos de vasculogênese e angiogênese.....	21
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	25
5.1 <b>OBJETIVO GERAL</b> .....	25
5.2 <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	37
Análises espectroscópica (FT-IR) e quimiométrica da farinha e de sua fração amídica (amilose/amilopectina) de variedades locais e de cultivares comerciais de milho ( <i>Zea mays</i> ).....	38
1 Resumo.....	38
2 Introdução.....	39
3 Material e Métodos.....	41
3.1 Seleção do material vegetal.....	41
3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM).....	41
3.1.2 Cultivares comerciais.....	41
3.2 Coleta e preparo das amostras.....	42
3.3 Determinação do conteúdo de glicose e açúcar redutor nas amostras de farinha.....	42
3.4 Extração e fracionamento dos componentes amídicos amilose e amilopectina.....	42
3.5 Caracterização estrutural química das amostras de farinhas e das frações amilose e amilopectina por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR).....	43
4 Resultados e Discussão.....	43
4.1 Caracterização estrutural da farinha de grãos inteiros e degerminados por	

espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR) e análise quimiométrica.....	43
4.2 Rendimento da extração das FAMs e FAPs de farinhas das VCLM e dos cultivares comerciais.....	57
4.3 Caracterização estrutural das FAMs e FAPs por espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR) e análise quimiométrica.....	61
5 Conclusões.....	72
6 Referências Bibliográficas.....	73
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>77</b>
Análise da fração amídica (amilose e amilopectina) por espectroscopia de ressonância magnética de <sup>13</sup> C ( <sup>13</sup> C-RMN) e de <sup>1</sup> H ( <sup>1</sup> H-RMN) e quimiometria.....	78
1 Resumo.....	78
2 Introdução.....	79
3 Material e Métodos.....	80
3.1 Seleção do material vegetal.....	80
3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM).....	80
3.1.2 Cultivares Comerciais.....	80
3.2 Coleta e preparo das amostras.....	81
3.3 Extração e fracionamento do componente amídico em amilose e amilopectina.....	81
3.4 Determinação do conteúdo de proteínas associadas às frações amilose.....	81
3.5 Caracterização das frações amilose e amilopectina por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H e análise quimiométrica.....	81
4 Resultados e Discussão.....	82
4.1 <sup>13</sup> C-RMN.....	82
4.2 <sup>1</sup> H-RMN.....	90
4.3 Análise quimiométrica – PCA.....	92
4.3.1 <sup>13</sup> C-RMN.....	92
4.3.2 <sup>1</sup> H-RMN.....	97
5 Conclusões.....	102
6 Referências Bibliográficas.....	103
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>106</b>
Análise quantitativa, espectroscópica (FT-IR) e quimiométrica da fração protéica de grãos de variedades locais e comerciais de milho ( <i>Zea mays</i> ).....	107
1 Resumo.....	107
2 Introdução.....	108
3 Material e Métodos.....	109
3.1 Seleção do material vegetal.....	109
3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM).....	109
3.1.2 Cultivares Comerciais.....	110
3.2 Coleta e preparo das amostras.....	110
3.3 Caracterização da composição química das farinhas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR).....	110

3.4 Determinação do conteúdo de proteínas nas amostras de farinha (grãos inteiros).....	111
4 Resultados e Discussão .....	112
5 Conclusões.....	124
6 Referências Bibliográficas.....	125
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>129</b>
Caracterização dos compostos carotenóidicos, antociânicos e (poli)fenólicos nas farinhas de variedades locais de milho originárias do extremo oeste de Santa Catarina e de cultivares comerciais.....	130
1 Resumo.....	130
2 Introdução .....	131
3 Material e Métodos.....	133
3.1 Seleção do material vegetal.....	133
3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM).....	133
3.1.2 Cultivares híbridos.....	133
3.2 Coleta e preparo das amostras.....	133
3.3 Caracterização do pericarpo dos grãos das VCLM por espectroscopia vibracional na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e análise quimiométrica.....	134
3.4 Estabelecimento do protocolo de extração para a determinação do conteúdo antociânico de sementes de milho.....	135
3.5 Caracterização e classificação dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de amostras de farinhas das VCLM e cultivares comerciais por espectrofotometria UV-visível associada à quimiometria.....	136
3.6 Determinação do conteúdo de (poli)fenóis totais.....	136
3.7 Identificação de compostos (poli)fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	136
3.8 Extração e dosagem de carotenóides.....	137
3.9 Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	137
3.10 Purificação e caracterização estrutural dos carotenóides extraídos de sementes de milho por técnicas cromatográficas.....	138
4 Resultados e Discussão .....	138
4.1 Análise do pericarpo por FT-IR e quimiometria.....	139
4.2 Extração e caracterização das antocianinas.....	143
4.3 Extração e Caracterização dos (poli)fenóis.....	151
4.4 Carotenóides.....	160
4.4.1 Identificação e quantificação.....	160
4.4.2 Purificação.....	169
5 Conclusões.....	173
6 Referências Bibliográficas.....	173
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>179</b>
Caracterização do perfil metabólico (ênfase em carotenóides, polifenóis e antocianinas) de flores femininas de variedades crioulas e locais de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	180
1 Resumo.....	180
2 Introdução .....	181

3 Material e Métodos.....	182
3.1 Material Vegetal.....	182
3.2 Caracterização da composição química do tecido floral por espectroscopia vibracional no infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e análise quimiométrica.....	183
3.3 Obtenção dos extratos florais.....	184
3.4 Caracterização espectroscópica do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) e análise quimiométrica.....	184
3.4.1 Espectrofotometria UV-visível.....	184
3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1H-RMN).....	184
3.4.3 Determinação do conteúdo de fenóis totais.....	185
3.4.4 Identificação dos ácidos (poli)fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	185
3.4.5 Análise do conteúdo de antocianinas totais.....	186
3.4.6 Caracterização estrutural das antocianinas usando MALDI-TOFF.....	186
3.5 Caracterização espectroscópica (UV-vis) e cromatográfica (CLAE) do extrato MeOH-Tolueno (1:1 v/v).....	186
3.5.1 Espectrofotometria UV-visível.....	186
3.5.2 Identificação de carotenóides usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	186
4 Resultados e Discussão .....	187
4.1 Análise do tecido floral liofilizado por FT-IR e quimiometria.....	187
4.2 Caracterização dos extratos florais - MeOH-HCl (1%, v/v).....	197
4.2.1 Espectroscopia UV-visível.....	197
4.2.2 MALDI-TOF.....	203
4.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( <sup>1</sup> H-RMN) e análise quimiométrica.....	204
4.2.4 Quantificação e identificação de (poli)fenóis.....	210
4.3 Caracterização dos extratos florais - MeOH-tolueno (v/v).....	214
4.3.1 Espectroscopia UV-visível.....	215
4.3.2 Identificação de carotenóides usando CLAE.....	215
5 Conclusões.....	218
6 Referências Bibliográficas.....	219
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>223</b>
Avaliação do efeito de carotenóides de grãos de milho sobre processos de formação de vasos sanguíneos.....	224
1 Resumo.....	224
2 Introdução .....	225
3 Material e Métodos.....	227
3.1 Seleção do material vegetal.....	227
3.2 Extração e Dosagem de Carotenóides.....	227
3.3 Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	228
3.4 Ensaio da vesícula vitelínica (VV) e da membrana corioalantóica (MC) de embriões de galinha.....	228
3.5 Análise de dados e estatística.....	230
4 Resultados e Discussão .....	230
4.1 Caracterização química do extrato carotenóidico.....	230



4.2 Ensaio da vesícula vitelínica (VV) e da membrana corioalantóica (MC) de embriões de galinha.....	232
5 Conclusões.....	235
6 Referências Bibliográficas.....	237
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>241</b>

## 1. RESUMO

O declínio do cultivo de variedades crioulas e locais de milho (VCLM), após a revolução verde, está associado à destruição da agricultura familiar em diversas regiões do mundo. O estudo do metaboloma de VCLM está entre as estratégias que visam agregar valor à matéria-prima e produtos derivados daqueles genótipos, estimulando a permanência de pequenos agricultores no campo. Neste contexto, o presente trabalho determinou o perfil metabólico de grãos e flores femininas (estigmas/estiletos) de VCLM, cultivadas e desenvolvidas por pequenos agricultores do município de Anchieta (SC). Adicionalmente, foram avaliados os efeitos do extrato carotenóidico dos grãos sobre os processos *in vivo* de formação de vasos sanguíneos de embriões de *Gallus domesticus*, como um parâmetro do potencial de atividade biológica. A partir de um protocolo simplificado de extração e fracionamento dos componentes amilose e amilopectina, diferenças de composição química, de interesse industrial, foram detectadas por FT-IR, <sup>13</sup>C-RMN e <sup>1</sup>H-RMN. Diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) no conteúdo protéico total dos grãos das VCLM foram observadas, sendo as prolaminas, seguido das glutelinas, as proteínas majoritárias no endosperma. A análise dos componentes principais (PCA) dos dados espectrais de FT-IR (1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>) permitiu a rápida distinção das amostras em função da sua constituição protéica. No que concerne à caracterização dos pigmentos presentes nos grãos, foram obtidos resultados satisfatórios com o extrator butanol-HCl (70:30, v/v), indicando a predominância de flobafenos em algumas das VCLM. No extrato organossolvente butanol-HCl a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu a identificação e a quantificação dos ácidos protocatecuico, gálico, cinâmico, clorogênico, caféico e ferúlico, em quantidades variáveis consoante à VCLM. As xantofilas zeaxantina e luteína foram identificadas como os carotenóides majoritários nas amostras de grãos, além de pequenas quantidades de β-criptoxantina, β-caroteno e α-caroteno. O protocolo de purificação destes metabólitos secundários, via técnicas cromatográficas, resultou em frações com grau de pureza satisfatório, 88% e 93%, respectivamente para zeaxantina e luteína. Os ensaios de atividade biológica com o extrato carotenóidico dos grãos da variedade MPA1 revelaram potente atividade anti-vasculogênica e anti-angiogênica, utilizando a vesícula vitelínica e a membrana corioalantóica de embriões de galinha (*G.domesticus*) como modelo de estudo. Dentre os genótipos em análise, 7 variedades com teores superiores de antocianinas totais (460 nm e 525 nm) foram selecionadas para a obtenção de amostras de flores femininas

(estigmas/estiletos). Cianidina e pelargonidina foram identificadas como as antocianidinas majoritárias por MALDI-TOF/MS, e o perfil cromatográfico (CLAE) de composição de ácidos (poli)fenólicos mostrou serem os ácidos protocatecuico, gálico e cinâmico os compostos majoritários naqueles tecidos. Luteína foi o principal pigmento carotenóidico detectado nos estigmas/estiletos, seguida de  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e zeaxantina. A diversidade química encontrada nas VCLM revelou o potencial de exploração daqueles genótipos como fontes de compostos de elevado valor econômico e de interesse à saúde humana e à indústria alimentícia. Esses resultados demonstram a eficácia da metabolômica na análise do potencial de uso e de agregação de valor de matérias-primas originadas de VCLM. Tal abordagem, constitui-se em estratégia que visa contribuir, em alguma extensão, à manutenção dos agricultores no campo, os quais são os principais responsáveis pela conservação *on farm* desta espécie.

## 2. ABSTRACT

The decline of the maize landraces (ML) cultures following the green revolution is associated to destruction of familiar agriculture in several regions of the world. The metabolomic analysis of such genotypes is among the strategies that aim at to add value to maize raw materials and derived products, contributing to the standing of small farmers in the field. In this study the metabolic profile of grains and silks of ML was performed. The maize genotypes analyzed have been cultivated and developed by small farmers at southern Brazil (Anchieta county, Santa Catarina State) over decades. The effect of the grain carotenoid extract on the *in vivo* process of blood vessels formation in *Gallus domesticus* embryos was studied, as a parameter for the potential of biological activity. By using a simplified extraction and fractionation protocol, differences in the chemical composition (of industrial interest) for the amylose and amylopectin fractions of ML were detected by FT-IR, <sup>13</sup>C-NMR, and <sup>1</sup>H-NMR. Significant differences (P<0.01) of the total protein content of ML grains were observed, being prolamins, followed by glutelins, the main protein types found in the endosperm. The principal component analysis (PCA) of FT-IR data (1650-1500 waves.cm<sup>-1</sup>) allowed a fast distinction of the samples as a function of their protein constitution. Concerning the characterization of the grain's pigments, satisfactory results were obtained with the extractor butanol-HCl (70:30, v/v), indicating a predominance of phlobaphenes in the organosolvent fraction of ML. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the butanol-HCl organosolvent extract showed as the main polyphenols the protocatechuic acid, gallic acid, cinnamic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid. The xanthophylls zeaxanthin and lutein were identified as the major carotenoids in the grain samples, with smaller amounts of β-cryptoxanthin, β-carotene, and α-carotene. The proposed purification protocol of these secondary metabolites using chromatographic techniques resulted in fractions with satisfactory purity degree, 88% and 93%, respectively for zeaxanthin and lutein. The biological assay using the carotenoid extract of the grains of the MPA1 variety revealed a potent anti-vasculogenic and anti-angiogenic activity on the vitelline vesicle and the chorioallantoic membrane of chicken embryo (*G. domesticus*). Among the germoplams in study, seven varieties with superior total anthocyanin content (460nm and 525nm) were selected for obtaining corn silk samples. Cyanidin and pelargonidin were identified as the main anthocyanidins in that tissue by MALDI-TOF/MS. The chromatographic (HPLC) polyphenolic acid profile

showed protocatechuic acid, gallic acid, and cinnamic acid as the major compounds in female flowers samples. Lutein was the main carotenoid pigment found, followed by  $\beta$ -carotene and small amounts of  $\alpha$ -carotene and zeaxanthin. The chemical diversity found in ML's tissue samples shows the potential of exploitation of those genotypes as source of compounds with high commercial value and of interest to human health and food industry. These results point to the suitability of metabolomics in studies of the potential of usage and for adding value to ML raw materials. Such an approach might contribute, in any extension, to avoid rural exodus, maintaining the active agents of the ML *on farm* conservation, i.e., small farmers in their production unit.

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1	Formas de uso alimentar de grãos, estigma/estilete, pólen e colmo do milho.....	05
<b>CAPÍTULO 1</b>		
TABELA 1	Sinais espectrais de FT-IR (onda.cm <sup>-1</sup> ) das amostras de farinhas de grãos inteiros de VCLM e comerciais e seus respectivos grupamentos.....	45
TABELA 2	Conteúdo médio* (g/100g, peso seco) das frações ricas em amilose (FAM), amilopectina (FAP), glucose e de açúcares redutores em amostras farinhas de variedades crioulas e locais de milho e de cultivares comerciais.....	58
TABELA 3	Sinais espectrais de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) das amostras de FAM e FAP* de 26 VCLM e dos cultivares comerciais.....	62
<b>CAPÍTULO 2</b>		
TABELA 1	Deslocamentos químicos (ppm) de 13C das frações rica em amilose (FAM) extraídas de amostras de grãos de variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e de padrões daqueles polissacarídeos.....	83
TABELA 2	Conteúdo médio* de proteínas (mg/g) nas frações rica em amilose (FAM) de amostras de grãos das variedades crioulas e locais e dos cultivares comerciais de milho.....	89
<b>CAPÍTULO 3</b>		
TABELA 1	Conteúdo médio* (média ± desvio padrão, mg/g) das quatro frações protéicas (globulina, albumina, prolamina e glutelina) encontradas nos grãos inteiros de variedades crioulas e locais de milho e nos cultivares comerciais.....	113
TABELA 2	Resumo da análise de variância das variáveis globulina, albumina, zeína I, zeína II e glutelina determinadas na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.....	118
TABELA 3	Componentes principais (PC) calculados a partir dos dados quantitativos das frações protéicas (globulina, albumina, zeína I, zeína II e glutelinas) de amostras de farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.....	120
<b>CAPÍTULO 4</b>		
TABELA 1	Concentração média* (µg/g, média ± desvio padrão) de (poli)fenóis totais**, ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido <i>t</i> -cinâmico e ácido ferúlico*** em amostras de grãos de variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares	

	comerciais.....	153
TABELA 2	Resumo da análise de variância das variáveis ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido <i>t</i> -cinâmico e ácido ferúlico determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.....	157
TABELA 3	Componentes principais (PC) da análise de PCA dos dados quantitativos de (poli)fenóis (ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido <i>t</i> -cinâmico e ácido ferúlico) determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.....	159
TABELA 4	Concentração média* ( $\mu\text{g/g}$ , média $\pm$ desvio padrão) de carotenóides totais**, zeaxantina, luteína, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -caroteno e $\alpha$ -caroteno*** em amostras de sementes de variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.....	162
TABELA 5	Resumo da análise de variância das variáveis zeaxantina, luteína, $\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -caroteno e $\alpha$ -caroteno determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.....	166

## CAPÍTULO 5

TABELA 1	Bandas ( $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) espectrais de FT-IR das amostras de tecido floral das VCLM em estudo com os seus respectivos grupos funcionais.....	188
TABELA 2	Conteúdo médio de fenóis totais* ( $\mu\text{g/mg}$ , peso seco) determinado por espectroscopia de UV-visível e de compostos (poli)fenólicos identificados por CLAE** ( $\mu\text{g/mg}$ , peso seco) em amostras de flores femininas das VCLM estudadas.....	211
TABELA 3	Conteúdo* de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) do tecido floral de VCLM determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	217

## CAPÍTULO 6

TABELA 1	Conteúdo de carotenóides* ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ , peso seco – média $\pm$ desvio padrão) nos grãos de variedades crioulas e locais de milho determinados por CLAE (450 nm).....	231
----------	---	-----

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1	Mapa geopolítico de Santa Catarina mostrando a localização do município de Anchieta (Retirado de <a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina_Municip_Anchieta.svg">http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina_Municip_Anchieta.svg</a> ).....	11
FIGURA 2	Vias de síntese dos principais metabólitos secundários de vegetais superiores (adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2004).....	17
FIGURA 3	Compostos do metabolismo secundário comumente encontrados em milho: ácido siríngico (A), quercetina (B), ácido <i>p</i> -cumárico (C), pelargonidina (D), β-caroteno (E) e luteína (F).....	18
FIGURA 4	Fotografia do sistema de incubação dos ovos de galinha ( <i>G. domesticus</i> ); (B) Esquema mostrando a abertura na casca e em detalhe (C) fotografia de um embrião de 2 dias (E2) com a vesícula vitelínica, onde se visualizam ilhotas sanguíneas (círculo), onde são implantados os discos de metilcelulose; (D) Aspecto dos vasos primordiais durante a vasculogênese (embrião de 4 dias; E4) e o local da implantação do disco (seta); (E) Vista geral de um embrião de 6 dias de idade e o início da formação da membrana corioalantóica (MC); (F) Aspecto da angiogênese na MC (8 dias de incubação; E8) e o local da implantação do disco (seta); (G) Quadro comparativo dos padrões morfológicos dos embriões nas idades de 2 – 4 dias (com os segmentos de comprimento cefálico-cervical – CCV e cervical-caudal – CVC) e 8 dias.....	24

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1	Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos inteiros da variedade comercial AS-3430 e da variedade local Cateto Vermelho.....	44
FIGURA 2	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos inteiros de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	47
FIGURA 3	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	48
FIGURA 4	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos inteiros de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	49
FIGURA 5	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR na região espectral de 1200 a 950 ondas.cm <sup>-1</sup> ..	50
FIGURA 6	Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados da variedade local Mato Grosso.....	50
FIGURA 7	Espectros de FT-IR (1100-940 cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados da variedade local Mato Grosso.....	51
FIGURA 8	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR na janela espectral de 3000 a 600 ondas.cm <sup>-1</sup> de amostras de farinha de grãos	



	inteiros e de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais.....	52
FIGURA 9	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	52
FIGURA 10	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR nas janelas espectrais de 1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	53
FIGURA 11	Contribuição fatorial de PC2 das amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	54
FIGURA 12	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	55
FIGURA 13	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos degerminados para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	55
FIGURA 14	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1250-900 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	56
FIGURA 15	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos degerminados para os dados de FT-IR na região espectral compreendida entre 1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> .....	57
FIGURA 16	Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) das FAM e FAP da variedade local Mato Grosso.....	61
FIGURA 17	Espectros de FT-IR parciais (1230 – 860 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras comerciais de amilose (Sigma, MO – USA) (A) e amilopectina (Fluka).....	64
FIGURA 18	Espectros de FT-IR na região entre 1230 – 800 ondas.cm <sup>-1</sup> de fração amilose e amilopectínica da variedade local Asteca.....	65
FIGURA 19	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (1800-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) da FAM e da FAP de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	66
FIGURA 20	Contribuição fatorial de PC2 das FAMs e FAPs para os dados espectrais de FT-IR (1800-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	67
FIGURA 21	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR nas janelas espectrais de 1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> da FAM e da FAP dialisada das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.....	68
FIGURA 22	Contribuição fatorial de PC2 das FAMs e FAPs dialisada para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	70
FIGURA 23	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> ) da FAM e FAP dialisada de 26 VCLM, dos cultivares comerciais em estudo e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka).....	71
FIGURA 24	Contribuição fatorial de PC1 das FAMs e FAPs dialisada das VCLM em estudos e dos padrões comerciais para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	72

## CAPÍTULO 2

FIGURA 1	Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ da fração rica em amilose (FAM) das VCLM Cateto e Língua de Papagaio e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka) mostrando os sinais de maior intensidade. Os deslocamentos químicos associados aos carbonos da $\alpha$ -D-glucose estão indicados como C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6. S = solvente ( $\text{DMSO}-\delta_6$ , 39,5 ppm).....	85
FIGURA 2	Espectros de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ da fração rica em amilose (FAM), e rica em amilopectina (FAP) (0 ppm a 5,7 ppm) da variedade Cateto e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka). S= solvente ( $\text{DMSO}-\delta_6$ , 2,5 ppm).....	91
FIGURA 3	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de $^{13}\text{C}$ -RMN (2 ppm a 200 ppm), da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilose (Sigma).....	93
FIGURA 4	Contribuição fatorial de PC1 das amostras da fração rica em amilose (FAM) e do padrão comercial de amilose (Sigma), calculada a partir dos dados de $^{13}\text{C}$ -RMN para a região espectral compreendida entre 2 ppm e 200 ppm.....	94
FIGURA 5	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de $^{13}\text{C}$ -RMN obtida a partir dos dados espectrais da janela entre 2 ppm a 200 ppm, subtraída das ressonâncias em 18 ppm e 56 ppm, da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilo (Sigma).....	95
FIGURA 6	Contribuição fatorial de PC1 para as amostras da fração rica em amilose (FAM) e do padrão comercial de amilose (Sigma), calculada a partir dos dados de $^{13}\text{C}$ -RMN (janela espectral 2 ppm a 200 ppm) após a retirada das ressonâncias em 18 ppm e 56 ppm.....	96
FIGURA 7	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de $^1\text{H}$ -RMN, para a janela espectral compreendida entre 0,5 ppm a 8,5 ppm da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial (Sigma).....	98
FIGURA 8	Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados espectrais de $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral: 0,3 ppm a 8,5 ppm) de amostras da fração rica em amilose (FAM) de VCLM e do padrão comercial de amilose (Sigma).....	99
FIGURA 9	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral entre 0,1 ppm a 7,5 ppm) da fração rica em amilopectina de 24 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilopectina (Fluka).....	100
FIGURA 10	Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados de $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral: 0,1 ppm a 7,5 ppm) de amostras da fração rica em amilopectina (FAP) e do padrão comercial de amilopectina (Fluka).....	102

**CAPÍTULO 3**

FIGURA 1	Distribuição percentual das classes de proteínas salino-solúveis (globulina e albumina), prolamina (zeína I e zeína II) e glutelina em amostras de farinhas das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.....	117
FIGURA 2	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de glutelina e zeína I encontrados nas amostras de farinha (grãos inteiros) das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.....	119
FIGURA 3	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (janela espectral de 1650-1500 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de farinha (grãos inteiros) das 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.....	122
FIGURA 4	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR na região espectral compreendida entre 1650-1500 ondas.cm <sup>-1</sup> .....	123

**CAPÍTULO 4**

FIGURA 1	Detalhe da coloração dos grãos das variedades crioulas e locais de milho em estudo. <b>A</b> - Rosado, <b>B</b> – Roxo do Valdecir, <b>C</b> – MPA01, <b>D</b> - Branco do Aldanir.....	134
FIGURA 2	Detalhe da coloração das amostras de pericarpos isolados e tamisados dos grãos das variedades Roxo do Valdecir (A), Composto São Luis (B), Mato Grosso Palha Roxa (C), Branco (D), Roxo do Emílio (E), Rajado 8 Carreiras (F) e Língua de Papagaio (G).....	139
FIGURA 3	Espectros de FT-IR (3000 – 650 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de pericarpos isolados e tamisados das variedades Roxo do Emílio e Rajado 8 Carreiras.....	140
FIGURA 4	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (3000-650 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de pericarpos isolados de grãos de 7 variedades crioulas e locais de milho.....	141
FIGURA 5	Contribuição fatorial de PC1 para os dados de FT-IR (3000-600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) das amostras de pericarpos isolados de grãos das VCLM.....	142
FIGURA 6	Perfis de absorbância UV-visível dos extratos MeOH-HCl (1%, v/v) e butanol-HCl (70:30, v/v) das amostras de grãos da variedade Roxo do Valdecir, para a janela espectral de 240 a 750 nm.....	145
FIGURA 7	Perfil de absorbância UV-visível (400 a 650 nm) de extratos butanol-HCl (70, 30%, v/v) de amostras de pericarpo da variedade Roxo do Emílio, segundo o tempo de incubação.....	146
FIGURA 8	Perfil de absorbância UV-visível dos extratos butanol-HCl (70, 30%, v/v) de amostras de grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais, para uma janela espectral entre 400 a 600 nm.....	147
FIGURA 9	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os valores de absorbância (289-750 nm) dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de grãos das 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais em	

	estudo.....	148
FIGURA 10	Contribuição fatorial de PC1 das absorbâncias (400 - 600 nm) dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de grãos de 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.....	149
FIGURA 11	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os valores de absorbância na janela espectral de 400 a 600nm dos extratos butanol-HCL (70:30, v/v) de grãos das 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.....	150
FIGURA 12	Contribuição fatorial de PC1 das absorbâncias (400 - 600 nm) dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de grãos de 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.....	151
FIGURA 13	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de ácido protocatecuico e ácido <i>t</i> -cinâmico encontrados nas amostras de farinha das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo. R8C = Rajado 8 carreiras, CV = Cateto Vermelho, RV = Roxo do Valdecir, Palha RE = Palha roxo do emílio; Ros. = Rosado, LP = Língua de Papagaio, RE = Roxo do Emílio, Cat. = Cateto. ....	158
FIGURA 14	Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) presentes na fração organosolvente extraída de amostras de sementes da variedade Roxo do Valdecir. S = solvente; 1 e 2 = compostos não identificados.....	165
FIGURA 15	Percentagem de luteína e zeaxantina sobre o conteúdo total de carotenóides determinado por CLAE (450nm) em grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.....	168
FIGURA 16	Perfil espectral de varredura (350-750 nm) das frações organosolventes purificadas de carotenóides de grãos de milho (VCLM MPA1), segundo a fase móvel utilizada na CLC. <b>A</b> – éter de petróleo; <b>B</b> – éter de petróleo: éter etílico (1:1, v/v); <b>C</b> - éter etílico; <b>D</b> - éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v). As setas indicam o comprimento de onda de absorção máxima para as respectivas frações.....	170
FIGURA 17	Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) da fração eluída com éter de petróleo + éter etílico (50%, v/v) na CLC do extrato carotenóidico da variedade MPA1. <b>S</b> = solvente.....	171
FIGURA 18	Cromatograma (CLAE, 450 nm) da fração carotenóidica eluída com éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v) de amostras de sementes do cultivar comercial <i>BRS1030</i> ( <b>A</b> ) e da variedade local MPA01 ( <b>B</b> ).....	172
<b>CAPÍTULO 5</b>		
FIGURA 1	Detalhe das flores femininas das variedades Rosado ( <b>A</b> ) e Palha Roxa 1 do Emílio ( <b>B</b> ).....	183
FIGURA 2	Espectros de FT-IR na região entre 3000 – 600 ondas.cm <sup>-1</sup> de amostras de tecido floral liofilizados das variedades crioulas e locais de milho Rosado, Cateto Vermelho e Mato Grosso Palha Roxa.....	189
FIGURA 3	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (3000 -	

	600 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM estudadas.....	190
FIGURA 4	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados espectrais de FT-IR (3000 - 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	191
FIGURA 5	Contribuição fatorial de PC2 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados espectrais de FT-IR (3000 - 600 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	192
FIGURA 6	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR na janela espectral de 1650-1500 ondas.cm <sup>-1</sup> de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM em estudo.....	193
FIGURA 7	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM, para os dados de FT-IR na região espectral de 1650-1500 ondas.cm <sup>-1</sup> .....	194
FIGURA 8	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1200 - 950 ondas.cm <sup>-1</sup> ) de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM em estudo.....	195
FIGURA 9	Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados de FT-IR na região espectral de 1200 - 950 ondas.cm <sup>-1</sup> ...	196
FIGURA 10	Contribuição fatorial de PC2 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados de FT-IR (1200 - 950 ondas.cm <sup>-1</sup> ).....	196
FIGURA 11	Perfil espectral UV-visível (370 a 700nm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de amostras de flores femininas das 8 VCLM em estudo.....	199
FIGURA 12	Perfil espectral UV-visível (370 a 700nm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de amostras de flores femininas das 8 VCLM em estudo.....	199
FIGURA 13	Contribuição fatorial de PC1 dos extratos MeOH-HCl (1%, v/v) de flores calculada a partir dos dados espectrais UV-visível (370-700 nm).....	200
FIGURA 14	Conteúdo médio de antocianinas (mg/g, peso seco) de tecido floral de VCLM determinado por espectrofotometria UV-visível - 525 nm (A) e 460 nm (B). <b>RE</b> = Roxo do Emílio; <b>Ros</b> = Rosado; <b>R8C</b> = Rajado 8 carreiras; <b>CV</b> = Cateto Vermelho; <b>PR1E</b> = Palha Roxa 1 do Emílio; <b>RV</b> = Roxo do Valdecir; <b>LP</b> = Língua de Papagaio; <b>MGPR</b> = Mato Grosso Palha Roxa; (n= 7). Colunas e barras verticais representam a média ± desvio padrão da média, respectivamente.....	202
FIGURA 15	Antocianidinas detectadas por MALDI-TOF e eletrospray no extrato MeOH-HCl (1%, v/v) bruto das flores das variedades Roxo do Valdecir e Rosado.....	204
FIGURA 16	Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (400 MHz) (0 a 8 ppm) do extrato metanólico acidificado das variedades Roxo do Valdecir, Rosado e Língua de Papagaio, mostrando as regiões de detecção de carboidratos, ácidos orgânicos, carboidratos e compostos aromáticos. TMS (tetrametilsilano – padrão interno); Solvente (MeOH-δ <sub>6</sub> ).....	205
FIGURA 17	Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de <sup>1</sup> H-RMN (janela espectrais de 0,1 a 8,0 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores femininas das 8 VCLM em estudo.....	206
FIGURA 18	Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados espectrais de	

	1H-RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato metanólico acidificado de flores de VCLM.....	207
FIGURA 19	Contribuição fatorial de PC2 determinada a partir dos dados espectrais de 1H-RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato metanólico acidificado de flores das VCLM.....	207
FIGURA 20	Distribuição fatorial de PC1 e PC3 para os dados de 1H-RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores femininas das 8 VCLM estudadas.....	208
FIGURA 21	Contribuição fatorial de PC3 calculada a partir dos dados espectrais de 1H-RMN (0,2 a 8,07 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores das VCLM em estudo.....	209
FIGURA 22	Perfil cromatográfico de (poli)fenóis (CLAE, 280 nm) presentes no extrato MeOH-HCL (1%, v/v) do tecido floral da variedade Rosado. 1- ácido protocateuico, 2- ácido gálico, 3- ácido <i>t</i> -cinâmico, 4- ácido caféico, a - composto não identificado.....	212
FIGURA 23	Porcentagem dos ácidos (poli)fenólicos identificados por CLAE no tecido floral das 8 VCLM em estudo.....	213
FIGURA 24	Perfil espectral UV-visível de amostras do extrato MeOH-tolueno (1:1, v/v) de flores femininas das 8 VCLM para as janelas espectrais entre 400 a 750nm.....	215
FIGURA 25	Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) presentes no extrato MeOH-tolueno (v/v) do tecido floral saponificado da variedade Rosado. 1- luteína, 2- β-caroteno, 3- α-caroteno, S – solvente.....	216

## CAPÍTULO 6

FIGURA 1	Estruturas químicas dos carotenóides encontrados em grãos de milho e do ácido retinóico, um derivado do β-caroteno.....	225
FIGURA 2	Efeito do extrato carotenóidico de grãos de milho da variedade MPA1 (0,1 – 10 μM de equivalente de zeaxantina/disco) administrados em membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 4 dias de idade, cultivados <i>in ovo</i> . O <i>inset</i> mostra a porcentagem do número de vasos nos grupos controle. Discos de metilcelulose contendo apenas água ultrafiltrada (C-MC) ou água ultrafiltrada e DMSO 2% (C-DMSO) foram utilizados como controles negativos. Discos de metilcelulose contendo ácido retinóico (AR; 10 μM) ou luteína (10 μM) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a porcentagem do número de vasos sanguíneos no limite dos discos de metilcelulose quando comparados ao grupo controle (C-DMSO). Colunas e barras verticais representam a média ± erro padrão da média (n=8) e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese em relação ao controle (C-DMSO), usando ANOVA seguido do teste <i>post-hoc</i> Tukey (p<0,05).....	233
FIGURA 3	Micrografias ópticas dos vasos vitelínicos do anexo embrionário da vesícula vitelínica de embriões de galinha de 4 dias de idade, tratados com (A) metilcelulose (grupo controle) e (B) 10 μM de equivalente de	

- zeaxantina/disco de carotenóides de grãos de milho da variedade MPA1. *Bar* = 2 mm..... 234
- FIGURA 4 Efeito do extrato carotenóidico de grãos de milho da variedade MPA1 (0,1 – 10  $\mu$ M de equivalente de zeaxantina/disco) administrados em membranas corioalantóicas de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*. O *inset* mostra a percentagem de vasos nos grupos controles. Discos de metilcelulose contendo apenas água ultrafiltrada (C-MC); água ultrafiltrada e DMSO 2% (C-DMSO) – controles negativos. Discos de metilcelulose contendo luteína e ácido retinóico (10  $\mu$ M) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a percentagem de vasos sanguíneos no limite dos discos de metilcelulose quando comparados ao grupo controle (C-DMSO). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 8), e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle (C-DMSO), usando ANOVA seguido do teste *post-hoc* Tukey (p < 0,05). ..... 236

### 3. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma preocupação crescente por parte da comunidade científica brasileira em fomentar atitudes políticas e técnicas que visem a conservação dos recursos fitogenéticos, de modo a garantir o equilíbrio ambiental e o desenvolvimento agrícola do País.

Nesse contexto, a importância do milho não está apenas na produção de biomassas com aplicação na alimentação humana e animal, mas em todo o relacionamento que o mesmo tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos quanto a fatores sociais. Além da sua grande importância no agronegócio nacional, esta cultura é base para a sustentação da pequena propriedade, constituindo um dos principais insumos no complexo agro-industrial brasileiro, e apresenta diversos benefícios quando de sua utilização em sistemas de cultivo que utilizam a rotação de culturas e o plantio direto (ICEPA, 2004).

Pela sua versatilidade de uso, sua importância nutricional e social, o milho é um dos mais importantes produtos do setor agrícola do País. Grande parte dos sistemas produtivos caracteriza-se pelo baixo nível de tecnificação/mecanização e, como os agricultores não possuem grandes extensões de terras, dependem da produção advinda de sua propriedade para sua subsistência. O modelo de agricultura familiar encontrado em algumas regiões do País, como por exemplo, no extremo oeste de Santa Catarina, representa, em um número significativo de casos, a ruptura com a rede agro-industrial globalmente organizada, por cultivarem sementes próprias (variedades crioulas e locais - VCLM), num regime de subsistência ou semi-subsistência (OGLIARI & ALVES, 2006). Contudo, dado ao pequeno valor agregado das matérias-primas do milho, os retornos econômicos recebidos pelos agricultores usualmente são não significativos, gerando um desestímulo à sua permanência naquela atividade e também no meio rural, potencializando o risco de extinção dos genótipos locais e crioulos (erosão genética). Tal cenário não é, obviamente, de interesse, considerando-se o significativo valor social e econômico daquele cereal. Assim, iniciativas que visem a conservação de variedades ainda preservadas por comunidades locais, como a do município de Anchieta-SC, tornam-se vitais para o desenvolvimento racional e sustentado das VCLM. Para tal, é necessária a adoção de estratégias racionais e com suporte científico que estimulem os pequenos agricultores à manutenção e ampliação das áreas de cultivo de genótipos locais e crioulos de milho. A determinação de perfis metabólicos (metaboloma) constitui-se em uma



alternativa adequada e inovadora, uma vez que compreende a análise quantitativa e qualitativa dos metabólitos presentes em um organismo ou em um dado tecido. O acesso as peculiaridades químicas de diferentes genótipos com propósitos nutricionais, medicinais e de agregação de valor gera possibilidades adicionais de uso da biomassa em questão, com conseqüências positivas sobre a qualidade de vida das populações rurais, permitindo a manutenção das mesmas nessa atividade e a conservação daqueles genótipos. O detalhamento das características de composição química de VCLM estabelecerá subsídios técnico-científicos que permitirão agregar valor às matérias primas oriundas daquele germoplasma, via detecção de perfis metabólicos típicos e de interesse ao melhoramento genético, à saúde humana e animal e/ou à alimentação (por exemplo, alimentos funcionais). Nesse contexto, observa-se que a ingestão de alimentos que exerçam, como medida profilática, uma ação modulatória na formação de vasos sanguíneos é uma tendência mundial. Tendo em vista que as VCLM apresentam maior diversidade genética e, conseqüentemente, maior diversidade química comparativamente às variedades melhoradas, espera-se um maior espectro de possibilidades de atividades biológicas de interesse à saúde humana, como na vasculogênese e angiogênese. De fato, trabalhos que correlacionam a ingestão de compostos (poli)fenólicos, polissacarídeos, e estilbenos, entre outros, com uma menor incidência de desordens fisiopatológicas, como as desordens cardiovasculares, têm sido relatados com freqüência na literatura (IGURA *et al.*, 2001; DEWANTO *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2005).

Portanto, a médio prazo, é possível vislumbrar que os resultados obtidos no presente estudo subsidiem a geração de novas tecnologias e produtos, em processos interativos com a indústria alimentar, cosmética e/ou farmacêutica. Desse modo, permitir-se-á aos pequenos agricultores maiores retornos econômicos, com a conseqüente manutenção e/ou aumento da área de cultivo daquele germoplasma, corroborando para conservação desta importante reserva gênica de *Z. mays* (conservação *on farm*).

A apresentação dos resultados obtidos no presente estudo foi organizada em 6 capítulos. A primeira parte consistiu na caracterização química da farinha das VCLM e de cultivares comerciais, com ênfase em 3 classes de compostos químicos: amido, proteínas e pigmentos e a segunda parte consistiu na caracterização química das flores femininas de 7 VCLM e nos resultados dos ensaios biológicos de vasculogênese e angiogênese. Um dos capítulos foi destinado à caracterização da farinha e da fração amídica (amilose/amilopectina)

(*Capítulo 1*) usando espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) associada à quimiometria. No capítulo subsequente (*Capítulo 2*) foram apresentados os resultados da caracterização das mesmas frações amídicas investigadas por FT-IR, por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$ , seguido da análise dos dados por técnicas de análise multivariada. Os dados quantitativos da composição protéica das amostras de farinha das variedades em estudo foram mostrados no *Capítulo 3*, bem como a comparação do perfil espectral de FT-IR daquela biomassa, para a região de *fingerprint* para proteínas, via análise de componentes principais (PCAs). No *Capítulo 4* foram apresentados os dados referentes à quantificação e identificação dos compostos carotenóidicos, antociânicos e (poli)fenólicos das farinhas das diversas variedades, realizada através de técnicas espectroscópicas (UV-visível) e cromatográficas (CLAE). O *Capítulo 5* destinou-se à caracterização química das flores femininas das VCLM, com ênfase à identificação e determinação do conteúdo de carotenóides, (poli)fenóis e antocianinas. Por último, os resultados relativos aos ensaios biológicos foram apresentados no *Capítulo 6*, onde o efeito sobre os processos de formação de vasos sanguíneos (vasculogênese e angiogênese) do extrato carotenóidico de grãos de milho daquele cereal foi investigado.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Milho

#### 4.1.1 Importância econômica e alimentar

A cultura do milho tem grande importância na economia mundial, sendo responsável por 7% da energia consumida no mundo (FAO, 2007). Da mesma forma, este cereal apresenta significativa relevância econômica e social para o Brasil. Há duas décadas, o País mantém a posição de terceiro produtor mundial, após os Estados Unidos e a China, com uma produção na safra agrícola 2003/2004 de aproximadamente 42,5 milhões de toneladas e uma estimativa para a safra 2005/2006 de 41 milhões de toneladas, em uma área de 12,5 milhões de hectares (www.conab.gov.br). Seus produtos como grãos, matéria verde fresca, amido, amilose, xaropes de glucose e maltodextrinas são utilizados na alimentação humana, diretamente ou após a industrialização, e, principalmente, na alimentação de aves, suínos e bovinos, que são as principais fontes de proteínas de origem animal em todo o mundo. Portanto, não é de surpreender o fato de que o crescimento da demanda de milho em aplicações industriais no Brasil tenha acompanhado o crescimento da produção de aves e suínos (ICEPA, 2004).

Nos países industrializados, o milho pode ser encontrado em quase todos os produtos: cosméticos, roupas, papel, pasta dental, tintas, loções, entre outros. Além disso, recentemente, o milho vem sendo utilizado na confecção de polímeros biodegradáveis que são matérias-primas para as indústrias de embalagens e automobilística (MIRANDA PEIXOTO, 2002). Na **Tabela 1** estão listados os usos de alguns órgãos e do pólen do milho na alimentação humana (BULL & CANTARELLA, 1993; DUKE *et al.*, 2002; MIRANDA PEIXOTO, 2002).

Além da importância econômica, o milho também tem relações com aspectos sociais e culturais, servindo como parte da subsistência de muitas famílias rurais (KIRINO, 2003). No Brasil, 30,8% do total de agricultores que cultivam este cereal o fazem em áreas inferiores a 1 hectare, o que representa apenas 1,89% da produção nacional (DUARTE, 2004). Além disso, cerca de 60% dos estabelecimentos rurais que produzem milho consomem-no na propriedade, porém, apesar deste elevado percentual, aqueles estabelecimentos representam apenas 25% da produção nacional de milho (IBGE, 2005).

**TABELA 1** – Formas de uso alimentar de grãos, estigma/estilete, pólen e colmo do milho.

<b>Grãos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ podem ser consumidos ainda verdes, crus ou cozidos, principalmente nas variedades doces.</li> <li>▪ quando completamente amadurecidos, podem ser utilizados para a obtenção de fubás, farinhas e amido de milho. Representam uma importante matéria-prima à elaboração de pães, doces, biscoitos, cremes, sorvetes, balas e na indústria alimentícia de modo geral.</li> <li>▪ a fração amídica pode ser transformada em dextrina ou dextrose, as quais são utilizadas na elaboração de adesivos, xaropes e enlatados. O produto da hidrólise total do amido pode ser transformado em frutose, um insumo utilizado como adoçante na indústria de doces e bebidas.</li> <li>▪ pipoca (algumas variedades).</li> <li>▪ tostados e moídos podem ser utilizados como substituto do café.</li> <li>▪ o óleo é utilizado diretamente no preparo dos alimentos, ou então como insumo à produção de margarinas ou maioneses, por exemplo.</li> <li>▪ utilizados para obtenção de álcool etílico no preparo de bebidas alcoólicas.</li> </ul>
<b>Estigma/Estilete</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ consumidos <i>in natura</i> antes da polinização, tendo sabor levemente adocicado.</li> </ul>
<b>Pólen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ utilizado como ingrediente na elaboração de alimentos como sopas, por exemplo, sendo rico em proteínas.</li> </ul>
<b>Colmo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ a parte interna é suculenta e pode ser consumida de maneira similar ao colmo da cana de açúcar. O extrato aquoso é utilizado no preparo de xaropes.</li> </ul>

Fonte: (BULL & CANTARELLA, 1993; DUKE *et al.*, 2002; MIRANDA PEIXOTO, 2002)

Além da utilização como alimento, existem relatos do aproveitamento dos grãos de algumas variedades de milho na elaboração de preparados com finalidade terapêutica (BRACK-EGG, 1999) e registros científicos da utilização medicinal dos extratos de suas

flores femininas (VELÁZQUEZ *et al.*, 2005). De fato, vários estudos etnobotânicos relatam o emprego do milho como planta medicinal por etnias com forte tradição cultural. O uso terapêutico mais citado para *Z. mays* está relacionado ao sistema urinário, seguido de sua utilização no tratamento da hipertensão e constipação. O uso medicinal de estigmas de *Z. mays* como diurético é citado em 93 livros de fitoterapia, em 13 países (VELÁZQUEZ *et al.*, 2005). O produto fitoterápico Herbal Maydis Stigma® (estigmas de flores de *Z. mays* desidratados e fragmentados), por exemplo, é uma das formas atuais de utilização terapêutica desta planta, sendo reconhecido pela medicina popular e pela alopatia tradicional como um diurético moderado, auxiliando na eliminação de cálculos renais. Adicionalmente, os estigmas de milho são utilizados contra a hiperplasia de próstata, cistite, gota, nefrite crônica e distúrbios similares (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; MAKSIMOSIĆ *et al.* 2005). Apesar das diversas formas de uso referidas, os trabalhos relativos à atividade farmacológica dos tecidos/órgãos de milho são escassos, sugerindo a necessidade de um detalhamento maior, como subsídio à exploração racional daquela espécie como fonte de compostos bioativos de elevado valor de mercado.

#### **4.1.2 Origem e domesticação**

Diversas evidências e estudos indicam que a origem e a domesticação do milho ocorreram no sudeste do México, a partir da sua utilização por povos indígenas. O processo de domesticação provavelmente ocorreu há 9.000 anos atrás, a partir da gramínea selvagem mexicana denominada *Teosinte* (*Zea mays* ssp. *parviglumis* ou spp. *Mexicana* - WANG *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 2002; KANE & RIESEBERG, 2005). Os agricultores ancestrais, por meio de um processo contínuo de melhoramento e também em decorrência de pressões de seleção impostas pelo manejo agrícola, obtiveram uma planta ereta, com um único colmo e com espigas maiores, contendo maior quantidade e qualidade de grãos. Essas características fenotípicas são bastante distintas do seu ancestral selvagem que tem vários colmos, espigas pequenas e com poucos grãos (FREITAS, 2001; MIRANDA PEIXOTO, 2002). Recentes estudos de microsátélites reforçaram a hipótese de que o milho atual não é o produto de múltiplos eventos independentes de domesticação, mas de um evento simples. No entanto, a teoria da introgressão de genes a partir de outros tipos de teosintes, após o evento inicial de

domesticação, tem sido usada para explicar a enorme diversidade fenotípica e genética do milho (WANG *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 2002).

Durante o processo de domesticação das plantas, a diversidade cultural dos povos, associada à enorme diversidade ambiental, proveram e ainda provêm a humanidade de uma infinidade de sistemas de produção, baseados em um grande número de espécies e formas de manejo. Esse processo de seleção e melhoramento de variedades permitiu que as espécies domesticadas se adaptassem a uma ampla gama de ambientes, segundo o seu potencial genético e de diversidade. Dessa forma, ao longo de milhares de anos, comunidades locais com diferentes tradições culturais, em distintas condições ambientais, cultivaram e selecionaram raças primitivas de *Z. mays*, legando às gerações posteriores o milho atual, altamente domesticado e produtivo (MACHADO & PARTENIANI, 1998).

O homem é considerado o principal agente difusor desta espécie que se reproduz somente via disseminação de suas sementes, seja através de processos migratórios, seja através da troca de mercadorias, ou mesmo durante os eventos de conquista. Quando Colombo retornou à Europa, em 1493, após o descobrimento da América, levou consigo alguns grãos deste cereal até então desconhecido, introduzindo-o nos países mediterrânicos. Cerca de 100 anos depois, comerciantes e navegadores distribuíram o cereal pelos cinco continentes, principalmente através dos movimentos de colonização realizados pelos povos europeus naquele período (MACHADO & PARTENIANI, 1998; FREITAS, 2001; MIRANDA PEIXOTO, 2002; MATSUOKA *et al.*, 2002). Atualmente, são conhecidos cinco principais tipos de *Z. mays*, referindo-se às características apresentadas pelos grãos, que já existiam na América antes de 1492, sendo eles: Pipoca, Duro, Dentado, Farináceo e Doce (DUKE *et al.*, 2002; MIRANDA PEIXOTO, 2002). Atualmente, mais de 250 cultivares deste cereal são conhecidos, sendo que todos tiveram sua origem direta ou indiretamente ligada aos trabalhos de seleção/melhoramento efetuados pelas civilizações pré-colombianas. Muitas dessas variedades primitivas se perderam, juntamente com a cultura das populações indígenas extintas durante o processo de colonização das Américas. No entanto, a grande diversidade genética adquirida nestes milhares de anos possibilitou ao milho adaptar-se a uma ampla gama de condições edafoclimáticas, fazendo com que seja um dos cereais mais extensivamente cultivado no mundo, ao lado do trigo e arroz. É uma planta que distribuiu-se desde o nível do mar até 4.000 metros de altitude, de regiões áridas, com índice pluviométrico de 400 mm/ano,

até regiões tropicais com mais de 1.500 mm/ano. Dentro desta diversidade de ambientes, já foram identificados cultivares tolerantes a extremos de pH, vírus, bactérias e fungos, ao ataque de herbívoros, a solos de baixa fertilidade e a exposição à radiação UV, por exemplo (DUKE *et al.*, 2002; MACHADO & PARTENIANI, 1998; FREITAS, 2001; MIRANDA PEIXOTO, 2002).

Um aspecto importante a ser considerado na análise histórica da domesticação e cultivo deste cereal refere-se ao processo de melhoramento vegetal vigente, em âmbito mundial, até a década de 50, o qual se baseava na seleção dos genótipos mais adaptados a um determinado ambiente e era realizado por sucessivas gerações de agricultores, tendo como resultado o que denominamos hoje variedades crioulas e locais de milho - VCLM (WEID & SOARES, 1998). Embora existam diferentes definições para o termo variedades crioulas e locais, é importante salientar que para ZEVEN (1998), variedade crioula/local é aquela que tem elevada capacidade de tolerar estresses (a)bióticos, mantendo um nível de produtividade alto ou intermediário sob um sistema de produção agrícola com baixo *input* de energia. No presente estudo, as VCLM serão entendidas como sendo produto da seleção e manejo desenvolvidos por agricultores, ao longo dos anos de cultivo, e pelas pressões de seleções impostas pelo ambiente.

No entanto, como fruto da revolução industrial, um novo paradigma passou a dominar o pensamento científico agrônômico, onde se buscou a máxima artificialização do ambiente de produção, visando controlar todos os fatores naturais que podem interferir na produção. As características de produção (Kg de biomassa) e de produtividade (Kg biomassa/unidade de área) passaram a ser privilegiadas em detrimento de outras características fenotípicas, resultando em uma redução da variabilidade genética desses novos cultivares, os quais se tornaram mais vulneráveis a pragas e doenças e também exigentes em termos de balanço hídrico e nutricional. Para compensar essa fragilidade, criou-se um sistema de controle e manipulação ambiental baseado na utilização intensa de agrotóxicos, irrigação, adubação química e de mecanização das práticas agrícolas, com claros efeitos negativos sobre a micro e a mesofauna nas áreas cultivadas. Como exemplo disto, menciona-se os efeitos dos pesticidas como agentes de desequilíbrio das cadeias tróficas, produzindo fortes impactos negativos sobre os insetos. Neste contexto, é possível prever danos ao fluxo gênico entre populações de interesse, como *Zea mays*, e a conseqüente redução de sua variabilidade genética. Além disso,

esse modelo produtivo vem reduzindo aceleradamente o uso de determinados tipos de variedades, concentrando-se apenas naquelas de alta resposta ao uso de fertilizantes (WEID & SOARES, 1998). De fato, a redução da base genética tende a se agravar ainda mais, uma vez que em diversos programas de melhoramento genético daquela espécie as próprias variedades comerciais são utilizadas como base para o desenvolvimento de novos genótipos (RAIJ, 1998).

A perda da diversidade genética dessa espécie coincide com a destruição da agricultura familiar tradicional em todo o mundo. Por múltiplas formas e causas, os agricultores familiares foram sendo expulsos de suas terras e substituídos por empresas que aplicam o pacote tecnológico moderno das monoculturas mecanizadas e dependentes de agrotóxicos. Com os pequenos produtores, perdem-se também as variedades locais e o conhecimento dos recursos genéticos. Até a introdução das variedades melhoradas e dos híbridos de milho, ocorrida de forma maciça a partir dos anos 70, a absoluta maioria dos agricultores plantava sementes próprias. Atualmente, apenas agricultores familiares de baixa renda ainda mantêm essa tradição (WEID & SOARES, 1998). Em função disto, as iniciativas voltadas ao resgate de variedades ainda preservadas por grupos humanos regionais tornam-se vitais para o desenvolvimento da cultura do milho (SOARES *et al.*, 1998), notadamente no que se refere à conservação de genótipos locais sem aparente utilidade comercial, minimizando o estreitamento da base genética dessa espécie vegetal decorrente do modelo globalizado do sistema de produção intensiva. Segundo OGLIARI & ALVES (2006), VCLM cultivadas em regiões de agricultura familiar, por exemplo, são valiosas fontes alternativas de características genéticas relevantes para cultivos, sendo por isso consideradas como um reservatório de genes, além de possuírem outras características desejáveis, tais como teores apreciáveis de metabólitos secundários de interesse à alimentação e saúde humana (como por exemplo, polifenóis, antocianinas e carotenóides) diversos tipos de amidos e ainda alto rendimento de grãos, sob condições de cultivo com baixa demanda energética.

A garantia de manutenção da variabilidade genética das espécies cultivadas é essencial ao presente e futuro da humanidade, pois relaciona-se diretamente com a evolução da agricultura atual, a qual deve se adequar para garantir a segurança alimentar humana, seja solucionando o problema de fornecimento de alimentos, seja respondendo à crescente procura por alimentos com maior valor nutricional (BRUSH, 2001). Tal abordagem é uma



preocupação crescente e que tem levado à criação de programas de conservação da diversidade genética dos recursos vegetais, garantindo o acesso e uso destes às futuras gerações (BRUSH, 2001; ALVES *et al.*, 2004). Esse debate intensificou-se a partir da Convenção sobre Diversidade Biológica, realizada no Rio de Janeiro em 1992, a qual estabeleceu alguns fundamentos estratégicos para o manejo, o uso e a conservação dos recursos genéticos vegetais, definindo em seus objetivos básicos “a conservação, a utilização sustentável e a repartição justa e equitativa dos benefícios advindos do uso dos recursos genéticos” (GOEDERT *et al.*, 2001).

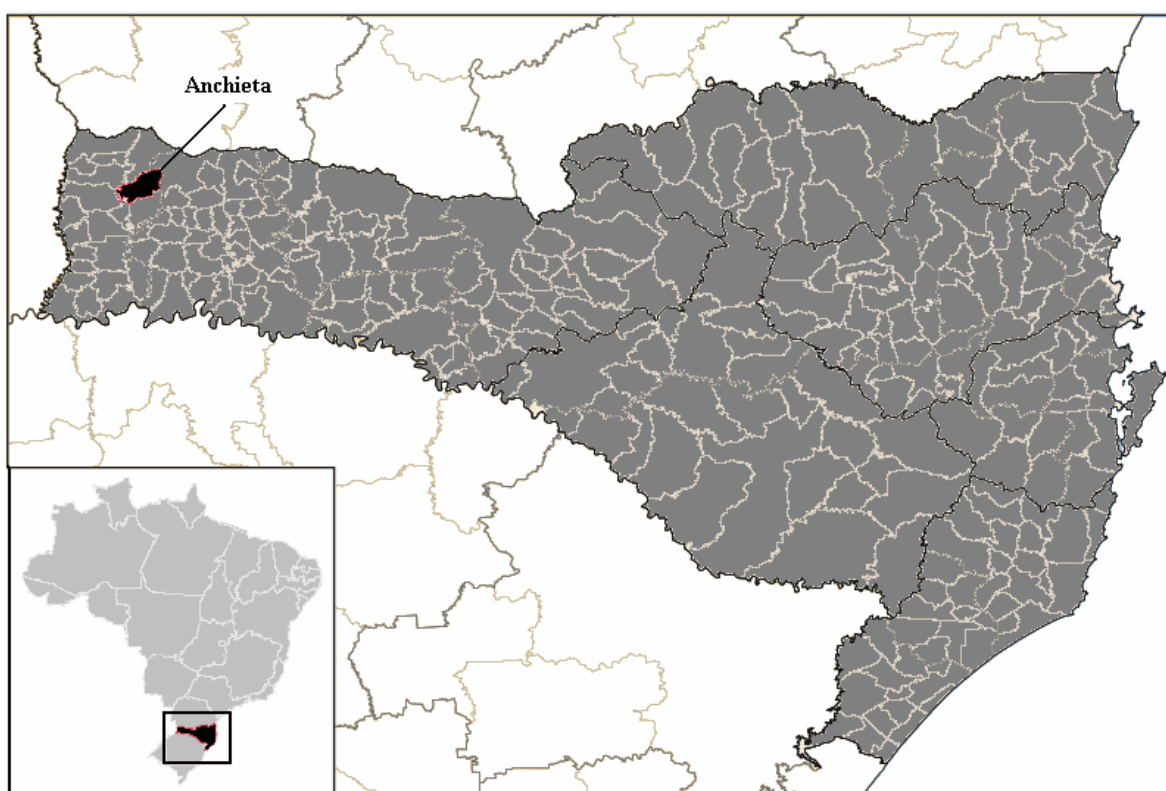
A importância do uso, manejo e conservação das variedades locais é foco de discussão em diversos fóruns internacionais e nacionais, os quais têm apontado como razões principais para a conservação e manejo das variedades locais: 1) a resistência e adaptação, além da boa produtividade daquele germoplasma, mesmo em condições edafoclimáticas adversas; 2) as razões tradicionais ou peculiaridades, como características organolépticas que agregam valor à comercialização e, 3) a preferência e apreciação pelas famílias de pequenos produtores rurais (NEGRI, 2003).

#### **4.2 Identificação do local de estudo**

No Estado de Santa Catarina, a cultura do milho é uma atividade agrícola importante, merecendo destaque por sua produção o município de Anchieta, localizado no extremo oeste catarinense, principalmente devido à sua importância como base da alimentação animal. Na safra 2005/2006, foram colhidos 3.100 mil toneladas de grãos em SC, cultivados em uma área aproximada de 784.810 ha, registrando-se ainda um déficit de 1.770 mil toneladas (EPAGRI/CEPA, 2007). É importante também relatar que cerca de 58% dos cultivos de milho ocorrem em áreas de até 10 hectares, sendo 62% da produção consumida dentro das propriedades. Esses dados demonstram a estreita relação entre a cultura do milho e a subsistência dos pequenos agricultores (CENSO AGROPECUÁRIO/SC, 1996).

O município de Anchieta está situado a 26° 30' de latitude sul e 50° 30' de longitude oeste do meridiano de Greenwich, na microrregião do extremo oeste catarinense (**Figura 1**). A área do município abrange 229,53 km<sup>2</sup>, sendo o espaço rural organizado em 31 comunidades, existindo diversas associações de pequenos agricultores para os mais diversos fins (VOGT,

2005). No entanto, é importante considerar que a população do município registrou um decréscimo nos últimos anos. No início da década de 80, de um total de 11.383 habitantes, 8.131 (71,4%) residiam em áreas rurais, enquanto em 2000 a população do município foi reduzida para 7.134 habitantes, com 65,75% destes ocupando o espaço rural (CANCI *et al.*, 2002). Os estabelecimentos agrícolas apresentam uma área média de 18 ha, conferindo uma característica de predominância de pequenas propriedades à estrutura fundiária local. Apenas 1% das propriedades agrícolas possui áreas entre 100 e 500 ha e 4% entre 50 e 100 ha (SANTA CATARINA, 2003).



**FIGURA 1** - Mapa geopolítico de Santa Catarina mostrando a localização do município de Anchieta (Retirado de [http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina\\_Municip\\_Anchieta.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina_Municip_Anchieta.svg)).

No município de Anchieta, a agrobiodiversidade está presente entre as famílias rurais, sendo que no caso do milho crioulo seu plantio é observado em 40,61% das propriedades de pequenos agricultores, com área média de cultivo de 3,20 ha, um fato que demonstra sua grande importância como espécie agrícola (CANCI *et al.*, 2002). Este cenário faz com que

aquele município seja conhecido como a capital catarinense do milho crioulo, conforme o projeto lei de nº 466/99, aprovado pela Assembléia Legislativa do estado de Santa Catarina.

Além do milho, as culturas do fumo e da soja também se destacam na região, sendo o fumo de grande importância econômica. A cana-de-açúcar, feijão, trigo, mandioca e arroz também são representativas fontes de renda agrícola. Na pecuária, o município se destaca na produção de suínos, aves e na bovinocultura de leite e de corte (CANCI, 2004). Porém, o milho crioulo atualmente é a cultura de maior representatividade em termos de área, sendo que uma diversidade expressiva de genótipos é encontrada, com características e particularidades de interesse agrônomo e nutricional. De fato, em levantamento recente (VOGT, 2005) foi observado que em um universo de 223 estabelecimentos agrícolas amostrados, 96 destes (43%) cultivam VCLM, estando distribuídos em 28 comunidades daquele município. Além disso, 76% dos agricultores cultivam variedades locais específicas há menos de 5 anos, com cerca de 4% cultivando a mesma variedade há mais de 20 anos, enquanto apenas 2% o fazem há mais de 30 anos. As variedades locais Pixurum 05, Amarelão, Mato Grosso, Palha Roxa e Branco estiveram presentes em 71% dos estabelecimentos em 2005 (VOGT, 2005). Dentre as variedades locais, a Pixurum 05 foi a que teve maior representatividade, sendo cultivada em 32% dos estabelecimentos consultados. Destacaram-se também as variedades Rosado, Asteca, Roxo, Palha Roxa e Gurvena, por serem cultivadas por um tempo médio superior a 10 anos. As variedades comumente cultivadas como Pixurum 05, Amarelão, Mato Grosso, Palha Roxa e Branco apresentaram-se bem distribuídas geograficamente em todo o município (VOGT, 2005; CANCI, 2006).

Dados adicionais permitiram observar que 90% da produção de VCLM no município de Anchieta destinam-se ao consumo na propriedade e apenas 10% são comercializados. Os usos das VCLM na propriedade destinam-se principalmente a alimentação animal, na forma de grãos (41%), forragem (24%) e silagem (8%) e o restante à alimentação humana, como farinha de milho (18%) e canjica (10%) (VOGT, 2005).

O papel que os pequenos agricultores do extremo oeste catarinense desempenham na manutenção da variabilidade genética do milho crioulo, alcançada por meio da conservação nas pequenas propriedades, deve ser enfatizado. Além disto, é importante destacar que seu cultivo constitui-se em uma alternativa viável economicamente para a agricultura familiar, sendo uma realidade no município de Anchieta e comunidades vizinhas. Tomados em

conjunto, estes aspectos demonstram a necessidade de realização de estudos científicos mais aprofundados em relação ao cenário atual da pequena agricultura do extremo oeste de SC, como estratégia para avaliar, conservar e melhorar o sistema produtivo local, bem como para agregar valor à produção e comercialização das VCLM.

Considerando que a caracterização da variabilidade genética e fitoquímica constituem estratégia de interesse por permitir a manipulação das reservas gênicas disponíveis em prol do melhoramento de plantas, a caracterização química das VCLM, no que se refere aos compostos do metabolismo primário e secundário gera, por sua vez, possibilidades adicionais de uso daquela biomassa.

### **4.3 Caracterização dos compostos de interesse**

A caracterização química das VCLM é de grande interesse por gerar possibilidades adicionais de uso da biomassa em questão. Tal caracterização pode ser obtida adotando-se como estratégia de estudo uma abordagem adequada e dedicada à determinação do perfil metabólico (metaboloma) daquele germoplasma, apoiada em técnicas analíticas consolidadas, como por exemplo, a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR). O metaboloma é a manifestação real do genoma e do proteoma de uma determinada amostra no momento da análise, sendo o levantamento quantitativo e qualitativo de todos os metabólitos presentes em um organismo ou em um dado tecido. Até o presente momento, contudo, nenhum método analítico possibilita, isoladamente, a obtenção de um quadro completo do metaboloma de um organismo. Em função disto, a combinação de diversas técnicas de análise instrumental associadas à quimiometria torna-se necessária, assim como a inclusão de compostos do metabolismo primário e secundário, tais como carboidratos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, (poli)fenóis, terpenos e alcalóides (SUMNER *et al.*, 2003; FUKUSAKI & KOBAYASHI, 2005; VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

### 4.3.1 Metabólitos primários: amido e proteínas

Em decorrência de seu potencial nutritivo e da composição química, o milho constitui-se em um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Embora, a maior parte da produção seja destinada à alimentação de animais, estima-se a existência de 600 produtos provenientes desta matéria-prima. Como exemplo disto, nas indústrias alimentícias é empregado como matéria-prima para a produção de amido, óleo, farinha e glucose e é usado para conferir propriedades texturais desejáveis aos alimentos. Além disto, diversos produtos químicos, tais como adesivos, termoplásticos e rações animais apresentam em sua formulação um ou mais constituintes oriundos da biomassa desta espécie (BULL & CANTARELLA, 1993; WHITE, 2001).

De acordo com ZUBBER & DARRAH (1987), o grão de milho é constituído por tecidos do endosperma (85%, p/p), sendo que 70% desta biomassa é amido, embrião (10%, p/p) e pericarpo (5%, p/p). O pericarpo e a camada de aleurona são responsáveis pela variação da cor dos grãos dessa gramínea. As cores dos grãos e da palha da espiga podem variar entre vermelha, marrom, laranja, vermelho púrpura, azul e amarelo (GOODMAN & SMITH, 1987), sendo controladas por diversos genes (NEUFFER *et al.*, 1987).

O grão de milho é uma importante fonte de proteína e energia para a nutrição humana e animal, apresentando níveis elevados de amido (amilose e amilopectina), fibras, ácidos graxos poliinsaturados e açúcares. Dentre esses compostos, o amido se caracteriza por constituir o polissacarídeo de armazenamento mais abundante em alimentos de origem vegetal (KARIM *et al.*, 2000). Apesar da ampla distribuição do amido no reino vegetal, poucas plantas são usadas como matéria-prima para obtenção comercial do mesmo, destacando-se o milho que é a maior fonte desse polissacarídeo produzido no mundo (WHITE, 2001).

Nas células, o amido está organizado em pequenos grânulos, podendo diferir em tamanho, forma e teor de  $\alpha$ -glucanas, lipídeos, umidade, proteínas e minerais (TESTER & KARKALAS, 1996; BULÉON *et al.*, 1998). Os grânulos de amido são constituídos por dois tipos de  $\alpha$ -glucanas, sintetizadas a partir da sacarose produzida através do processo de fotossíntese. Esses dois tipos de polímeros são representados pela amilose e amilopectina (BULÉON *et al.*, 1998). A amilose é uma molécula linear, constituída por unidades de D-

glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -D-(1→4), representando cerca de 25 a 30% do amido, podendo apresentar variações desse valor entre germoplasma. O seu peso molecular é geralmente de 50.000 a 200.000 Da. A amilopectina, por sua vez, é uma molécula com peso molecular variando entre 1.000.000 a 3.000.000 Da, sendo também constituída por unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -D-(1→4). No entanto, apresenta ramificações periódicas no carbono 6 e constitui cerca de 70-75% do grânulo de amido. Existem ainda evidências de polissacarídeos de tamanho intermediário no milho, representando de 5-7% do amido (WHITE, 2001; RIDOUT *et al.*, 2002; TESTER *et al.*, 2004). Segundo FERGASON (2001), o amido do milho não pode ser precisamente dividido nas frações amilopectina e amilose por existir associado a essas frações uma mistura de várias moléculas de tamanho e peso intermediários, o que pode resultar em elevada diversidade estrutural. Portanto, a constituição desses polissacarídeos pode servir futuramente como um marcador bioquímico para avaliação da diversidade de frações amídicas entre variedades. Tal aspecto é de interesse, haja vista que algumas variedades podem ter aplicações diretas na indústria de alimentos, uma vez que grande parte do amido nativo tem uso limitado na indústria por não possuir as propriedades funcionais necessárias.

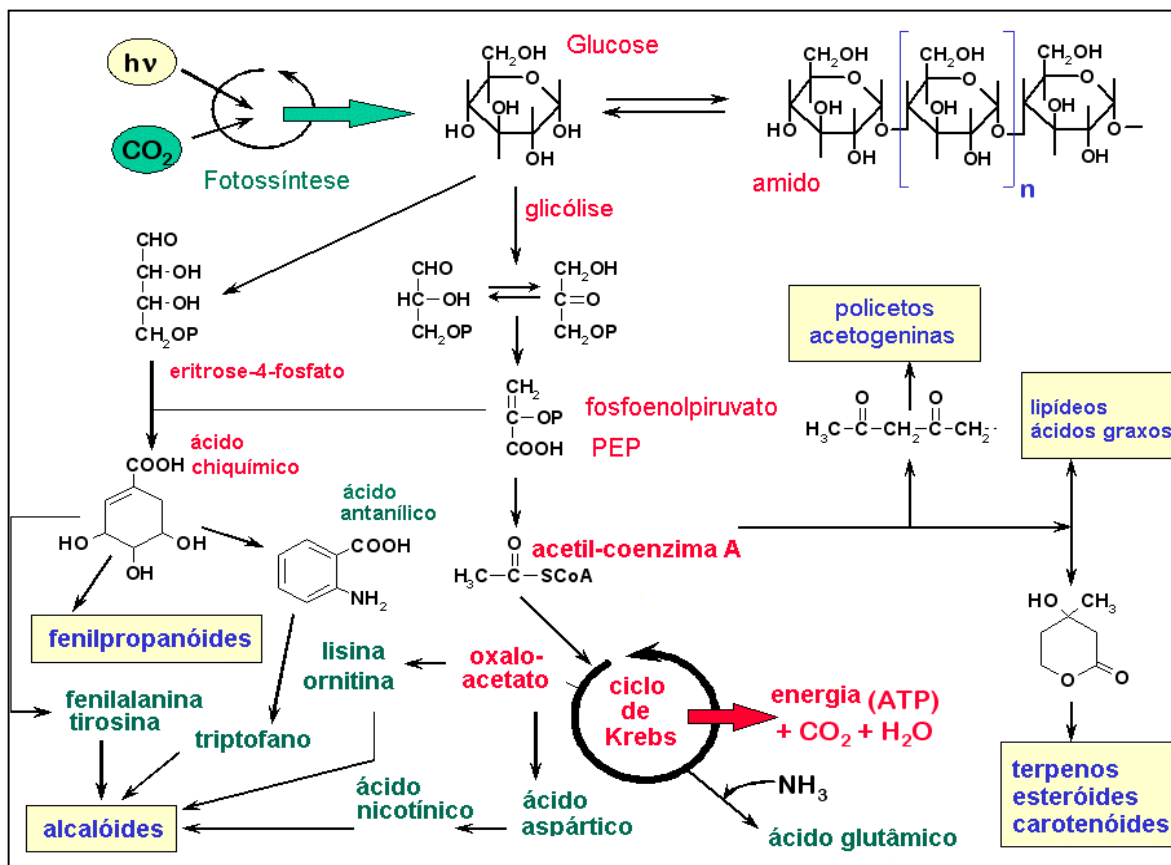
As proteínas constituem o segundo componente químico majoritário em importância nos grãos de milho. O conteúdo protéico dos grãos pode variar entre 6 a 12%, com predomínio de ocorrência no endosperma (SHUKLA & CHERYAN, 2001). As proteínas do milho podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com a sua solubilidade: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em solução salina), prolaminas (solúveis em solução alcoólica forte) e gluteninas (solúveis em alcális) (LANDRY & MOUREAUX, 1970; VASAL, 2001). Cabe ressaltar que a qualidade nutricional das proteínas do milho é considerada baixa, devido à deficiência dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano (CHEFTEL *et al.*, 1989). Porém, este cereal representa a base da alimentação nos países pobres, o que tem justificado as pesquisas que buscam solucionar este problema por meio do desenvolvimento de milhos mutantes com altos níveis de lisina nos grãos (MERTZ *et al.*, 1992).

### 4.3.2 Metabólitos secundários

Além dos compostos predominantes na composição dos grãos de milho, outros denominados metabólitos secundários, também estão presentes. A partir do ano de 2000 a “*United States Dietary Guidelines for Americans*” passou a recomendar a ingestão diária de uma diversidade de grãos, preferencialmente em sua forma inteira. Isto porque, os grãos fornecem muito mais do que carboidratos à nossa dieta, sendo fontes ricas de nutrientes como fibras, vitaminas B e E, selênio, zinco, cobre, magnésio e metabólitos secundários. Contudo, o processo de beneficiamento dos grãos elimina grande parte desses constituintes tão importantes à prevenção de diversas doenças, como as cardiovasculares e o câncer (SLAVIN *et al.*, 2001).

Os compostos advindos do metabolismo secundário da planta, ao contrário dos compostos do metabolismo primário (polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos), são encontrados, na maioria das vezes, em grupos vegetais restritos, como por exemplo, em apenas um gênero. Os metabólitos secundários não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas podem ser imprescindíveis à sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema, possuindo características químicas variadas (TAIZ & ZEIGER, 2004). De acordo com a sua origem, podem ser classificados em compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (HARBORNE, 1999).

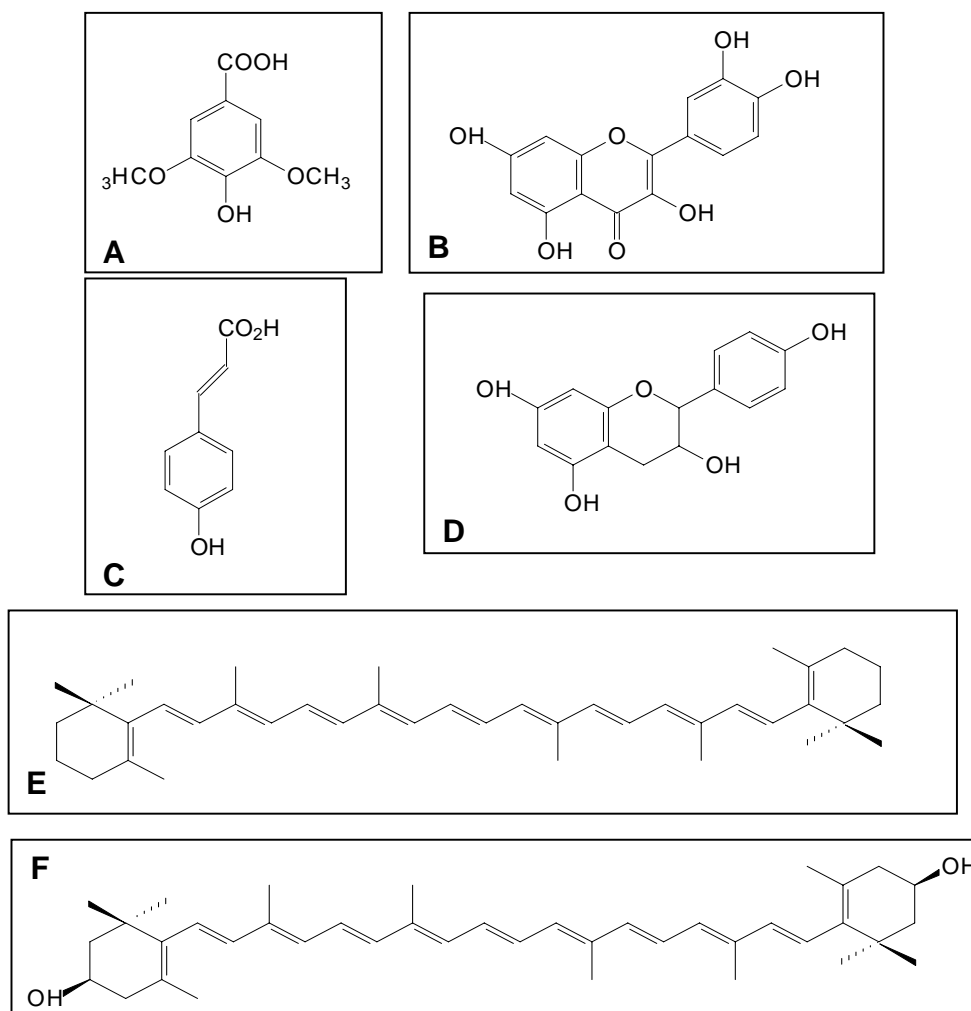
A via de síntese dos metabólitos secundários está intimamente relacionada à via principal do metabolismo de carboidratos, como mostra a **Figura 2**. Resumidamente, dois compostos intermediários, o fosfoenolpiruvato (proveniente da via glicolítica) e a eritrose-4-fosfato (oriunda da via das pentoses-fosfato), originam o ácido chiquímico - um importante precursor de diversos compostos que possuem núcleos aromáticos, como por exemplo os alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas, lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis. Alternativas à via principal de carboidratos com a finalidade de síntese de compostos secundários são a via do mevalonato e a via de condensação do acetato. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróides, enquanto a condensação do acetato resulta na formação das acetogeninas (WALTON & BROWN, 1999).



**FIGURA 2** - Vias de síntese dos principais metabólitos secundários de vegetais superiores (adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2004).

Dentre os diversos grupos de metabólitos secundários, as antocianinas, os (poli)fenóis e os carotenóides (**Figura 3**) destacam-se por exercerem funções variadas no ciclo de vida da planta, como mediadores da interação planta-ambiente, planta-insetos, planta-microorganismos e interações planta-planta, por exemplo (OKSMAN-CALDENTY, 1996; BOURGAUD *et al.*, 2001; VERPORTE & MEMELINK, 2002). Além disso, são compostos que possuem atividades biológicas já documentadas na literatura ligadas à saúde humana. São conhecidos mais de 100.000 metabólitos secundários produzidos por plantas, sendo que a cada ano são descobertos aproximadamente mais 4.000 compostos (ZHANG *et al.*, 2002).





**FIGURA 3** - Compostos do metabolismo secundário comumente encontrados em milho: ácido siríngico (**A**), quercetina (**B**), ácido *p*-cumárico (**C**), pelargonidina (**D**),  $\beta$ -caroteno (**E**) e luteína (**F**).

#### 4.3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são moléculas formadas por um ou mais anéis benzênicos, ligados a grupos hidroxilas, podendo ainda apresentar como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (HARBORNE, 1999). Esse grupo de compostos pode ser dividido em fenóis simples e polifenóis, baseando-se no número de unidades de hidroxilas na

molécula. Derivados de ácidos fenólicos simples, como os ácidos benzóico e cinâmico, apresentam atividade antioxidante, a qual esta relacionada ao número de hidroxilas presentes na molécula (CURVELIER *et al.*, 1992). Em grãos de milho amarelo, foi observada a presença dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, caféico e sinápico; enquanto nos grãos de milho roxo foram detectadas quantidades inferiores dos ácido *p*-cumárico, vanílico, ferúlico e protocatéico, além de derivados de quercetina e hesperidina (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

Além do papel dos (poli)fenóis como agentes antioxidantes, outras atividades biológicas têm sido relatadas, tais como anti-tumoral (RAO *et al.*, 1993), anti-inflamatória (MAGGI-CAPEYRON *et al.*, 2001) e anti-viral (KING *et al.*, 1999). Polifenóis como os flavonóides e os precursores de ligninas são potentes antioxidantes, com efeitos anti-mutagênicos e anti-carcinogênicos reconhecidos (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1994; RICE-EVANS *et al.*, 1997; SUGIHARA *et al.*, 1999).

#### 4.3.2.2 Antocianinas

Dentre os pigmentos flavonoídicos vegetais, as antocianinas têm despertado grande interesse. Esses compostos são resultantes das vias do ácido chiquímico e do malonato (**Figura 2**), os quais têm como precursores a fenilalanina e três unidades de acetato, pertencendo, portanto à classe dos fenilpropanóides (WALTON & BROWN, 1999). Na natureza, esses pigmentos são responsáveis pela coloração vermelha, rosa, púrpura e azul de tecidos de flores e frutos, atuando na atração de polinizadores, ou ainda na proteção da planta contra danos causados por agentes abióticos como os raios ultra-violeta (TAIZ & ZEIGER, 2004). As antocianinas existem na natureza na forma de heterosídeos, liberando, quando submetidas à hidrólise ácida, uma molécula de açúcar e uma aglicona denominada antocianidina (HARBORNE, 1999). As principais antocianidinas encontradas nos grãos de milho roxo provenientes do Peru são: pelargonidina, peonidina e cianidina (AOKI *et al.*, 2002). No Japão, o milho roxo tem sido usado como fonte de pigmentos adicionados a bebidas e geléias, entre outros alimentos. Recentemente, diversos estudos têm sugerido que as antocianinas possuem atividades biológicas diversas, tais como antioxidante (TSUDA *et al.*, 1996; GABRIELSKA *et*

*al.*, 1999), anti-mutagênica (YOSHIMOTO *et al.*, 1999) e anti-tumoral (KOIDE *et al.*, 1997). Com exemplo disto, os pigmentos dos grãos do milho roxo foram associados a um decréscimo na carcinogênese de cólon de ratos, induzida por Ph1P (2-amino-1-metil-6-fenil-imidazo [4,5-*b*] piridina) (HAGIWARA *et al.*, 2001). Neste sentido, as antocianinas têm sido indicadas não só como corantes de alimentos, mas também como constituintes de alimentos que previnem doenças, i.e., alimentos funcionais.

#### 4.3.2.3 Carotenóides

Nas plantas, os carotenóides participam do processo fotossintético absorvendo energia luminosa e transferindo-a para os centros de reação da clorofila (WALTON & BROWN, 1999), além de protegerem o aparato celular fotossintético contra danos foto-oxidativos (BARTLEY & SCOINIK, 1995). Estes pigmentos naturais, amplamente distribuídos no reino vegetal, são responsáveis pela coloração amarela, alaranjada e avermelhada de muitos alimentos. A estrutura básica de um carotenóide é um esqueleto tetraterpênico (40 átomos de carbono) formado por oito unidades de isopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). De maneira geral, os carotenóides podem ser separados em dois grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos carotenóides, e os oxicarotenóides, conhecidos genericamente como xantofilas (BRITTON, 1992). A função biológica mais conhecida dos carotenóides é sua atividade pró-vitamina A, porém, outras funções têm sido atribuídas a essa classe de compostos, tais como antioxidante (HANDELMAN, 2001) e preventiva de doenças degenerativas (SCHÜNEMANN *et al.*, 2002; MICHAUD *et al.*, 2000; SLATTERY *et al.*, 2000).

Nos grãos de milho, os carotenóides mais comuns são a luteína e a zeaxantina (AMAN *et al.*, 2005). Esses oxicarotenóides, em particular, são pigmentos que possuem atividade protetora contra a radiação solar. Nos seres humanos, os carotenóides têm participação efetiva na proteção da retina contra a radiação ultravioleta. Tais compostos podem ser encontrados na região central da retina (mácula), sendo que sua presença tem sido relacionada a uma menor incidência de doenças como a degeneração macular e o aparecimento de cataratas, além de combater alguns tipos de câncer (SNODDERLY, 1995).

#### 4.4 Compostos bioativos - ênfase nos processos de vasculogênese e angiogênese

Atualmente, diversas evidências sugerem uma relação entre processos fisiopatológicos de natureza inflamatória e/ou imunológica e a formação de vasos sanguíneos (JANAVEL *et al.*, 2001; CARMELIET, 2003). Neste sentido, as atividades anti-inflamatória, antioxidante e anti-mutagênica exercidas por algumas classes de compostos químicos podem estar relacionadas, em alguma extensão, ao seu envolvimento na ativação de processos de formação de vasos. Por outro lado, a vitamina A e seu derivado, o ácido retinóico, são bem conhecidos por sua atividade anti-angiogênica e anti-tumoral (PAL *et al.*, 2000; BLEBEA *et al.*, 2002; SATAKE *et al.*, 2003).

Os vasos sanguíneos que integram juntamente com os vasos linfáticos e o coração, o sistema cardiovascular, são formados a partir dos processos de vasculogênese e angiogênese (CARMELIET, 2003). A vasculogênese se refere à formação dos primeiros vasos sanguíneos, a partir de células progenitoras endoteliais, durante o desenvolvimento embrionário. Porém, existem algumas evidências de que esse processo de vascularização, a partir de células endoteliais, também ocorra no adulto (MANNIOTIS *et al.*, 1999). Neste caso, pelo menos em algumas condições patológicas, como doenças tumorais e isquêmicas, as células endoteliais podem ser mobilizadas, a partir da medula óssea, para a circulação, via ativação desencadeada por sinalizadores químicos tais como as citocinas, os fatores de crescimento angiogênicos e hormônios, promovendo a formação de vasos *de novo* (conceito de vasculogênese em adulto - ZAMMARETTI & ZISCH, 2005).

A angiogênese, por sua vez, consiste na formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, ocorrendo tanto no período embrionário onde é responsável pela remodelagem da vascularização primária, como também durante o crescimento no adulto. Nesta fase, participa nos ciclos de reprodução (proliferação do endométrio), desenvolvimento placentário e em outros processos, a exemplo de crescimento dos cabelos, inflamação e cicatrização (CARMELIET, 2003).

A angiogênese pode ocorrer em duas condições: fisiológica e patológica, sendo a primeira de extrema importância para o reparo tecidual. Por outro lado, o segundo tipo de angiogênese está associado com distúrbios nos mecanismos de controle ou regulação da formação dos vasos sanguíneos e com o desenvolvimento de desordens como isquemias,

distúrbios infamatórios e imunológicos. O limiar entre a angiogênese fisiológica e a patológica está no equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos (CARMELIET, 2003). Em alguns casos, a inibição da angiogênese constitui uma estratégia terapêutica, ou profilática, da enfermidade (FOLKMAN, 1971). Porém, a terapia pró-angiogênica pode ser uma solução viável, por exemplo, em quadros de isquemia (JANAVEL *et al.*, 2001).

Além do desenvolvimento de medicamentos que exerçam uma ação anti- ou pró-angiogênica, são crescentes os esforços para a recomendação de alimentos que possam exercer efeitos semelhantes (LOSSO, 2003). Produtos naturais como a cartilagem de tubarão, a cartilagem bovina, os polissacarídeos de algas marinhas, as isoflavonas da soja, as catequinas, o estilbeno *trans*-resveratrol e algumas pró-antocianidinas foram investigados quanto à sua ação anti-angiogênica (HOLT, 1995; LOSSO, 2003; DIAS *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação entre uma dieta rica em frutas e vegetais com uma menor incidência de doenças degenerativas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares. Porém, os mecanismos que resultam nesses benefícios ainda não estão bem estabelecidos (LOSSO, 2003).

Entre as diferentes metodologias usadas para avaliar os processos de vasculo/angiogênese destacam-se os ensaios da vesícula vitelínica e o da membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*, espécie cuja fisiologia, genética e embriologia está extensamente documentada e possui inúmeras similaridades em relação à fisiologia humana. Além disso, o embrião de galinha desenvolve-se em um ambiente próprio, livre de influência materna ou placentária, sendo o acesso aos vasos sanguíneos e ao embrião facilitado (MOURY & SCHOENWOLF, 1995).

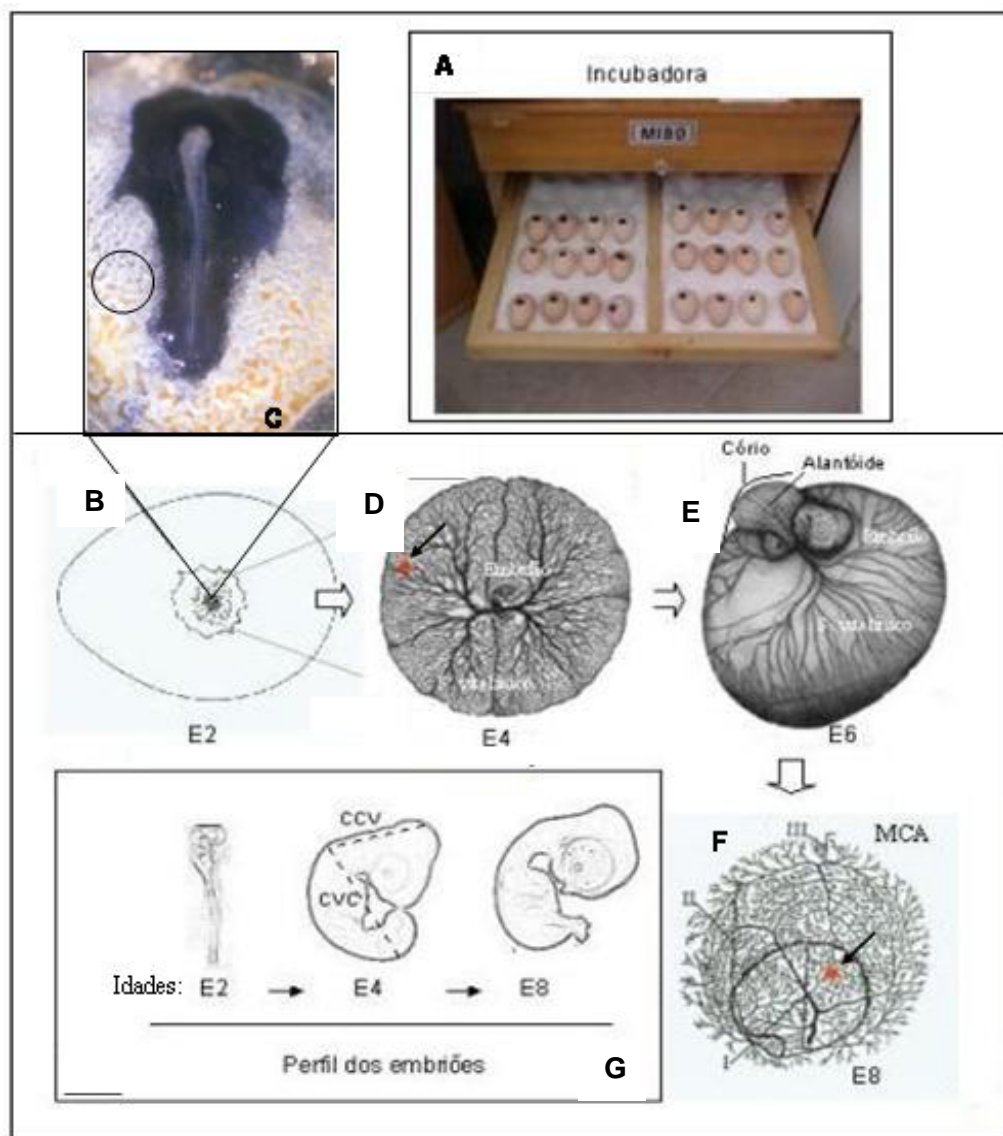
Nessa espécie, os primórdios da topografia e os diversos sistemas estabelecem-se rapidamente (em menos de 96 horas de incubação), consistindo em uma base razoável para estimativas de toxicidade e teratogenicidade (BUPP BECKER & SHIBLEY, 1998). Até o final do quarto dia de incubação, estão presentes esboços das principais estruturas do embrião, tais como as flexuras (flexões), a rotação do tubo neural (GOODRUM & JACOBSON, 1981; MÄNNER *et al.*, 1993; MÄNNER, 1995), o desenvolvimento de somitos (CHRIST & ORDAHL, 1995), de arcos branquiais, do botão caudal (SCHOENWOLF, 1994; CATALA *et al.*, 1995), da vesícula óptica, dos membros, da vesícula vitelínica e do alantóide, bem como a vascularização intra e extra-embriônicas (MEIER & JACOBSON, 1982).

É importante ressaltar que o primeiro indício da presença de vasos sangüíneos nos ovos de *G. domesticus* é observado na área vasculosa localizada nas bordas do blastodermo, após 24 horas de incubação, caracterizando-se pelo aparecimento das ilhotas sangüíneas (EYAL-GILADI, 1991 - **Figura 4**). Essas ilhotas que consistem em agregados de células endoteliais, anastomosam-se e adquirem uma luz vascular, formando os primeiros vasos sangüíneos (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; AREY, 1974).

Uma rede vascular limitada pelo vaso sino terminal se estabelece após 33 horas de incubação e associa-se ao endoderma subjacente, envolvendo parcialmente o vitelo do ovo, organizando a vesícula vitelínica, em anexo ao embrião. Nesse anexo embrionário, as artérias e veias onfalomesentéricas, estabelecem muito cedo, juntamente com o coração, uma circulação vitelínica (PATTEN, 1951; HOUILLON, 1972).

Os processos de formação de novos vasos a partir das ilhotas sangüíneas e os movimentos de dobramento do coração ocorrem ao longo das primeiras 40 horas de incubação após a fertilização (AREY, 1974; SWEENEY, 1998). Além disso, verifica-se o surgimento dos vasos alantóicos no decorrer do terceiro dia de incubação. O alantóide – um divertículo da parede ventral do intestino posterior – aumenta de volume, devido à deposição de produtos da excreção e interpõe-se entre dois anexos pré-existentes; o âmnio e o cório.

A associação do mesoderma somático dos dois anexos com o mesoderma angiogênico do alantóide resulta no surgimento de um novo anexo: a membrana córioalantóica. No 8º dia de incubação, a membrana córioalantóica consiste em uma vesícula achatada, vascularizada, que recobre totalmente o embrião e o saco vitelínico (HUETTNER, 1949; PATTEN, 1951).



**FIGURA 4** – (A) Fotografia do sistema de incubação dos ovos de galinha (*G. domesticus*); (B) Esquema mostrando a abertura na casca e em detalhe (C) fotografia de um embrião de 2 dias (E2) com a vesícula vitelínica, onde se visualizam ilhotas sanguíneas (círculo), onde são implantados os discos de metilcelulose; (D) Aspecto dos vasos primordiais durante a vasculogênese (embrião de 4 dias; E4) e o local da implantação do disco (seta); (E) Vista geral de um embrião de 6 dias de idade e o início da formação da membrana corioalantóica (MC); (F) Aspecto da angiogênese na MC (8 dias de incubação; E8) e o local da implantação do disco (seta); (G) Quadro comparativo dos padrões morfológicos dos embriões nas idades de 2 – 4 dias (com os segmentos de comprimento cefálico-cervical – CCV e cervical-caudal – CVC) e 8 dias.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil metabólico de grãos e estigmas/estiletes de VCLM cultivadas e desenvolvidas por pequenos agricultores do município de Anchieta, localizado no extremo oeste de Santa Catarina, com ênfase às frações amídica, protéica, antociânica, fenólica e carotenoídica e investigar a atividade do extrato carotenoídico sobre os processos de vascularização de embriões de *Gallus domesticus*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Determinar os perfis espectrais de infravermelho (FT-IR) de amostras de farinha, produzidas a partir de grãos inteiros e degerminados, das variedades em estudo e comparar a similaridade entre as mesmas usando a análise dos componentes principais (PCAs);
- Extrair, fracionar e quantificar os constituintes amiláceos (amilose e amilopectina) das VCLM e dos cultivares comerciais em estudo;
- Caracterizar a estrutura química das frações amídicas dos grãos em estudo por técnicas espectroscópicas (FT-IR,  $^{13}\text{C}$ -RMN e  $^1\text{H}$ -RMN);
- Determinar o conteúdo das proteínas albumina, globulina, prolamina e glutelina, nos grãos em estudo;
- Extrair e determinar o conteúdo de compostos carotenoídicos e (poli)fenólicos dos grãos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Extrair e caracterizar por espectroscopia UV-vis os pigmentos antociânicos dos grãos das VCLM de interesse
- Extrair, identificar e quantificar os compostos (poli)fenólicos e carotenoídicos presentes nas flores femininas (estigmas/estiletes) das VCLM de interesse via e CLAE.
- Determinar o conteúdo e identificar as antocianinas das flores femininas das VCLM através da espectroscopia UV-vis e a espectrometria de massa (MALDI-TOF);
- Avaliar a atividade da fração carotenoídica extraída dos grãos de milho na vasculogênese e angiogênese da vesícula vitelínica e da membrana corioalantóica dos embriões de *Gallus domesticus*.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A.C.; VOGT, G.A.; FANTINI, A.C.; OGLIARI, J.B.; MARASCHIN, M. Variedades locais de milho e a agricultura familiar do extreme oeste catarinense. In: CANCI, A.; VOGT, G.A.; CANCI, I. (Eds.). **A diversidade das espécies crioulas em Anchieta-SC: Diagnóstico, resultado de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade**. São Miguel do Oeste: McLee, 112 p. 2004.
- AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 99-105, 2005.
- AOKI, H.; KUZE, N.; KATO, Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). **Foods & Food Ingredients Journal of Japan**, v. 199, p. 63-65, 2002.
- AREY, L.B. **Developmental Anatomy**. Saunders, London. 695 p., 1974.
- BARTLEY, G.E.; SCOINIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual, attraction, and human health. **Plant Cell**, v. 7, p. 1027-1038, 1995.
- BLEBEA, J.; JONATHAN-HIEN, V.; ASSADNIA, S.; MCLAUGHLIN, P.J.; ATNIP, R.G.; ZAGON, I.S. Differential effects of vascular growth factors on arterial and venous angiogenesis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 35, n. 3, p. 532-538, 2002.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.
- BRACK-EGG, A. *Zea mays* L. In: **Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú**, Cuzco, Peru: Imprenta del Centro Bartolomé de las Casas, p.537-538, 1999.
- BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. **Corn Silk**, British Herbal Medicine Association, 64 p., 1996.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). **Carotenoids**, vol 1B, Birkhäuser Verlag, Basel: Switzerland; p.13-62, 1982.

- BRUSH, S.B. **Genes in the field: *On farm* conservation of crop diversity**. Rome-Italy: IPGRI, Lewis Publishers, Boca Raton-USA-IDRC, 2001.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOR, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho – Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP, p.2-24, 1993.
- BUPP BECKER, S.R.; SHIBLEY Jr, I.A. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. **Alcohol and Alcoholism**, v. 33, n. 5, p. 457-464, 1998.
- CANCI, A; VOGT, GA; CANCI, I; (Eds). **A diversidade das espécies crioulas em Anchieta-SC: diagnóstico, resultado de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade**. Ed. McLee. 112 p., 2004.
- CANCI, A; VOGT, GA; CANCI, IJ. **Milho crioulo: produção orgânica de sementes em casa**. São Paulo:ANCA. 31 p., 2002.
- CANCI, I.V. **Relações dos sistemas informais de conhecimento no manejo da agrobiodiversidade no oeste de Santa Catarina**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 191 p., 2006.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653-660, 2003.
- CATALA, M.; TEILLET, M.A. ; LE-DOUARIN, N.M. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail – chick chimaera system. **Mechanism of Development**, v. 51, p. 51-65, 1995.
- CENSO AGROPECUÁRIO 1995/1996. **Estabelecimentos por grupos de área total**. Santa Catarina, Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 10 de setembro de 2005.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 346 p., 1989.
- CHRIST, B.; ORDHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy Embryology**, v. 191, p. 381-396, 1995.

CURVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERST, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenolics: structure-activity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 324-325, 1992.

DEWANTO, V.; WU, X.; LIU, R.H. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4959-4964, 2002.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA, J.M.; VENDRUSCOLO, L.F.; NEIVA, T.J.; MARASCHIN, M.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 436-446, 2005.

DUARTE, J.O. **EMBRAPA Milho e Sorgo: Sistema de Produção**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho/importancia.htm>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2005.

DUKE, J.A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M.J.; DUCCELLIER, J.; DUKE, P.K. **Handbook of medicinal herbs**. 2<sup>a</sup> ed., Boca Raton, London: CRC Press, 2002.

EPAGRI/ICEPA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2003-2004. Disponível em <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>. Acesso em: 10/02/2008.

EPAGRI/ICEPA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2005-2006. Disponível em <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>. Acesso em: 12/11/2007.

EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v. 3, p. 143 – 166, 1991.

FAO. Statistical Database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/346/default.aspx>. Acesso em: 10/11/2007.

FAO. The State of the World's Plant Genetic Resource for Food and Agriculture. **Report on the State of the World's Plant Genetic Resources**. Rome, 1996. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat>. Acesso em: 14 de março de 2006.

FERGASON, V. High amylase and waxy corns. HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, London: CRC Press, 2001.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FREITAS, FO. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP-SP. Resumo, 2001.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: Potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 347–354, 2005.

GABRIELSKA, J.; OSZMIANSKI, J.; KOMOROWSKA, M.; LAGNER, M. Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effects. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, p. 319-324, 1999.

GOEDERT, C.O.; WETZEL, M.M.V.S.; COSTA, I.R.S.; BUSTAMANTE, P.G.; CAJUEIRO, E.V.M. **Rede de bancos de Recursos Genéticos**. Brasília: Embrapa (documento 69), 43 p., 2001.

GOODMAN, M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E., VIÉGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e Produção de Milho**, Fundação Cargill, São Paulo, 1, p. 41-70, 1987.

GOODRUM, G.R.; JACOBSON, A.G. Cephalic flexure formation in the chick embryo. **Journal of Embryology and Experimental Zoology**, v. 216, p. 339 – 408, 1981.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, T.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, p. 17-25, 2001.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HANDELMAN, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 818-822, 2001.

HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON, N.J.; BROWN, D. (Eds). **Chemicals from plants, perspectives on secondary products plant products**. Imperial College Press. p.1-25, 1999.

HOLT, S. Nutraceuticals and angiogenesis: new therapeutic horizons. *Altern Compl Therapies*. jun./jul. 1995.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo:Edgard Blücher, 160 p., 1972.

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina\\_Municip\\_Anchieta.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:SantaCatarina_Municip_Anchieta.svg). Acesso dia: 23/08/2007.

HUETTNER, A. **Fundamentals Comparative Embryology of the Vertebrates**. New York: Mac Millan, 309 p., 1949.

IBGE. **Censo Agropecuário. 1995/1996**. Rio de Janeiro, 1997, 21, 286 p., 2005.

IGURA, K.; OHTA, T.; KURODA, Y.; KAJI, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 171, p. 11-16, 2001.

JANAVEL, G.L.V.; DEL-VALLE, H.F.; LASCANO, E.C.; NEGRONI, J.A.; CASAS, J.C.L.; CROTTOGINI, A.J. Angiogénesis terapéutica en la cardiopatía isquémica. **Revision de la Federacion Argentina del Cardiopatía**, v. 30, p. 245-251, 2001.

KANE, N. C.; RIESEBERG, L.H. Maize genetics: the treasure of the sierra madre. **Current Biology**, v. 15, p. 137-139, 2005.

KARIM, A.A.; NORZIAH, M.N.; SEOW, C.C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, p. 9-36, 2000.

KING, P.J.; MA, G.; MIAO, W.; JIA, Q.; MCDOUGHALL, B.R.; REINECKE, M.G.; CORNELL, C.; KUAN, J.; KIM, T.R.; ROBINSON Jr., W.E. Structure–activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 42, p. 497–509, 1999.

KIRINO, P. Farmers and food security. IFA – FAO. **Agriculture Conference**: Rome – Italy, 2003. Disponível: <http://www.fao.org>. Acesso em 15 de maio de 2006.

KOIDE, T.; HASHIMOTO, Y.; KAMEI, H.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.; TERABE, K. Antitumor effects of anthocyanins fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v. 12, p. 277-280, 1997.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneite des glutelines du grain de maïs: Extraction selective et composition em acides amines dès trois fraction isolees. **Bulletin of Society Chimica Biology**, v. 52, p. 1021-1037, 1970.

LOSSO, J.N. Targeting excessive angiogenesis with functional foods and nutraceuticals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 455–468, 2003.

MACHADO, C.T.T.; PARTENIANI, M.L.S. Origem, domesticação e difusão. In: SOARES, A.D.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, J.M. (Eds.) **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rede Projetos Tecnologías Alternativas. Rio de Janeiro-RJ, p. 19-2, 1998.

MAGGI-CAPEYRON, M.F.; CEBALLOS, P.; CRISTOL, J.P.; DELBOSC, S.L.E.; DOUCEN, C.; PONS, M.L.E.; GER, C.L.; DESCOMPS, B. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5646–5652, 2001.

MAKSIMOVIĆ, Z.; MALENČIĆ, D.; KOVAČEVIĆ, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 873–877, 2005.

MANIOTIS, A.J.; FOLBERG, R.; HESS, A.; SEFTOR, E.A.; GARDNER, L.M.; PE'ER, J.; TRENT, J.M.; MELTZER, P.S.; HENDRIX, M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, p. 739-52, 1999.

MÄNNER, J. Formation of cervical flexure: an experimental study on chick embryos. **Acta Anatomy**, v. 152, p. 1–10, 1995.

MÄNNER, J.; SEIDL, W.; STEDING, G. Correlation between the embryonic head flexures on cardiac development. An experimental study in chick embryo. **Anatomy Embryology**, v. 188, p. 269–285, 1993.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M. M.; SANCHEZ, J.G.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p.6080-6084, 2002.

MEIER, S.; JACOBSON, A.G. Experimental studies of the origin and expression of metameric pattern in chick embryo. **Journal of Experimental Zoology**, v. 219, p. 217–232, 1982.

MERTZ, E.T. Discovery of high lysine, high tryptophan cereals. In: MERTZ, E.T. (Ed.). **Quality Protein Maize**. St. Paul, MN, Am. Soc. Cereal Chem., p. 1-8, 1992.

MICHAUD, D.S.; FESKANICH, D.; RIMM, E.B.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 7, p. 990-997, 2000.

MIDDLETON Jr., E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J.B. (Ed.). **The Flavonoids**. London:Chapman & Hall, p. 619–652, 1994.

MIRANDA-PEIXOTO, C. O milho: o rei dos cereais – da sua descoberta há 8000 anos até as plantas transgênicas. **Seed News.**, 2002. Disponível em <http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtml>.

MOURY, J.D.; SCHOENWOLF, G.C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. **Developmental Dynamics**, 204: 323 – 337, 1995.

NEGRI, V. Landraces in central Italy: where and why they are conserved and perspectives for their on farm conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, Holland, p. 871-885, 2003.

NEUFFER, M.G.; JONES, K.; ZUBER, M.S. The mutants of maize. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **Melhoramento e Produção de Milho**, v. 1, São Paulo : Fundação Cargill, p. 124-126, 1987.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.S.; THIJSSSEN, M.;

OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.

OKSMAN-CALDENTY, K.M.; HILTUNE, R. Transgenic crops for improves pharmaceutical products. **Field Crops Research**, v. 45, p. 57-69, 1996.

PAL, S.; IRUELA-ARISPE, M.L.; HARVEY, V.S.; ZENG, H.; NAGY, J.A.; DVORAK, H.F.; MUKHOPADHYAY, D. Retinoic Acid Selectively Inhibits the Vascular Permeabilizing Effect of VPF/VEGF, an Early Step in the Angiogenic Cascade. **Microvascular Research**, v. 60, p. 112–120, 2000.

PATTEN, B.M. **Early Embryology of the Chick**. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Blakiston, 244 p., 1951.

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

RAIJ, B. Principais realizações da Embrapa Meio Ambiente em 1998. **Meio Ambiente e Agricultura**, v. 24, 1999.

RAO, C.V.; DESAI, D.; SIMI, B.; KULKARNI, N.; AMIN, S.; REDDY, B.S. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Reserch**, v. 53, p. 4182–4188, 1993.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152–159, 1997.

RIDOUT, M.J.; GUNNING, A.P.; PARKER, R.H.; MORRIS, V.J. Using AFM to image internal of starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 123-132, 2002.

SANTA CATARINA, 2003. **Caracterização regional: São Miguel do Oeste**. Secretaria de Estado do Planejamento, Orçamento e Gestão, 52 p., 2003.

SATAKE, K.; TAKAGI, E.; ISHII, A.; KATO, Y.; IMAGAWA, I.; KIMURA, Y.; TSUKUDA, M. Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma, **Auris Nasus Larynx**, v. 30, p. 403-412, 2003.

SCHOENWOLF, G.C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. **Ciba Foundation Symposium**, v. 181, p. 25-50, 1994.



SCHÜNEMANN, H.J.; McCANN, S.; GRANT, B.J.B.; TREVISAN, M.; MUTI, P.; FREUDENHEIM, J.L. Lung function in relation to intake of carotenoids and other antioxidant vitamins in a population based study. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, p. 463-471, 2002.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial proteín from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 171-192, 2001.

SLATTERY, M.L.; BENSON, J.; CURTIN, K.; MA, K.N.; SCHAEFFER, D.; POTTER, J.D.; Carotenoids and colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 575-582, 2000.

SLAVIN, J.L.; JACOBS, D.; MARQUART, L.; WIEMER, K. The role of whole grains in disease prevention. **Journal of the American Diet Association**, v. 101, v. 7, p. 780-786, 2001.

SNODDERLY, D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1448-1461, 1995.

SOARES, A.C.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, J.M. **Milho crioulo – conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro, RJ, p. 21-27, 1998.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 27, p. 1313–1323, 1999.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

SWEENEY, L.J. Hematopoietic System. In: **Basic Concepts in Embryology**. New York: McGraw-Hill, p. 397 – 411, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. **Plant Physiology**. New York, p. 320-345, 2004.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J. Swelling and gelatinization of oat starches. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 271-277, 1996.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

TSUDA, T.; SHIGA, K.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effects of anthocyanins pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 1033-1039, 1996.

VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. London, Boca Raton: CRC Press, 2001. CD-ROM.

VELAZQUEZ, D.V.O.; XAVIER, H.S.; BATISTA, J.E.M.; CASTRO-CHAVES, C. Zea mays L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. **Phytomedicine**, v. 12, p. 363–369, 2005.

VERPORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 181-187, 2002.

VOGT, G.A. **A dinâmica do uso e manejo de variedades locais de milho em propriedades agrícolas familiares**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 116 p., 2005.

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. **Chemicals from plants: Perspectives on plant secondary products**. London, 425 p., 1999.

WEID, J.M.; SOARES, A.C. Relação entre agricultura e biodiversidade. In: SOARES, A.D.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, J.M. (Eds.). **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rede Projetos e Tecnologias Alternativas. Rio de Janeiro. p.1-7, 1998.

WHITE, P.J. Properties of corn starch. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. London, Boca Raton: CRC Press, 2001. CD-ROM.

YOSHIMOTO, M.; OKUNO, S.; YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O.; YAMAGUCHI, M.; YAMADA, J. Potential mechanism on cancer chemoprevention by anthocyanins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 537-541. 1999.

ZAMMARETTI, P.; ZISCH, A.H. Adult endothelial progenitor cells renewing vasculature. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

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

ZHANG, W.; CURTIN, C.; FRANCO, C. Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 688-696, 2002.

ZUBBER, M.S.; DARRAH, L.L. Breeding, genetic, and seed corn production. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (Ed.). **Corn, Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: Am. Assoc. Cereal Chem., p. 31-47, 1987.

WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, v. 398, p. 236-239, 1999.

# *Capítulo 1*

## **ANÁLISES ESPECTROSCÓPICA (FT-IR) E QUIMIOMÉTRICA DA FARINHA E DE SUA FRAÇÃO AMÍDICA (AMILOSE/AMILOPECTINA) DE VARIEDADES LOCAIS E DE CULTIVARES COMERCIAIS DE MILHO (*Zea mays*)**

### **1 RESUMO**

O milho é a principal fonte de amido no mundo, embora o uso industrial do mesmo em sua forma nativa seja limitado. O amido é constituído pelas cadeias amilose e amilopectina, que por possuírem um grau de ramificação diferente, apresentam propriedades funcionais também distintas. O presente estudo teve como objetivo determinar os perfis espectrais de infravermelho (FT-IR) de amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados, bem como de frações ricas em amilose (FAM) e ricas em amilopectina (FAP), de 26 variedades crioulas e locais de milho (VCLM) e de cinco cultivares comerciais, obtidas a partir de um protocolo simples e rápido de extração e fracionamento do amido. Uma constituição química diferenciada entre amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados foi detectada através da comparação dos perfis espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup> e 1250-900 ondas.cm<sup>-1</sup>), associada à análise de componentes principais (PCA). Além disso, observou-se maior similaridade entre as amostras de grãos degerminados, comparativamente aos grãos inteiros. O fracionamento do amido nos seus constituintes (FAM e FAP) resultou em conteúdos distintos destes entre as amostras de farinha, com teores superiores nas VCLM em relação às variedades comerciais. Subsequentemente, a análise por FT-IR de padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka) revelou serem as bandas em 1018 e 997 ondas.cm<sup>-1</sup>, respectivamente, características dos mesmos, tendo sido estas detectadas nas amostras analisadas (FAM e FAP). A distinção entre os espectros de FT-IR (1800-600 ondas.cm<sup>-1</sup> e 1250-900 ondas.cm<sup>-1</sup>) da FAM e da FAP (dialisadas) foi possível através de PCA, havendo uma menor similaridade estrutural entre as amostras da FAM. Os resultados encontrados sugerem o emprego dessa técnica espectroscópica associada à PCA pela indústria de alimentos visando a distinção de matéria-prima e/ou produtos contendo amilose e amilopectina, bem como o potencial de algumas frações das VCLM no setor industrial.

## 2 INTRODUÇÃO

Devido ao seu valor nutricional, o milho é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Embora majoritariamente a produção seja destinada à alimentação animal (62%), principalmente de aves, bovinos e suínos, este cereal é matéria-prima na indústria alimentícia para a produção de amido, óleo, farinha e glucose, além de conferir propriedades texturais desejáveis aos alimentos (BULL & CANTARELLA, 1993).

O milho é a principal fonte de amido em âmbito mundial. Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 95% do amido manufaturado é proveniente dos grãos de milho. O elevado conteúdo de amido nos grãos de milho, em média 66g% - peso seco -, é o que torna este processo economicamente viável e rentável. Além do amido, estão presentes também nos grãos compostos como proteínas (7-13 g/100g), ácidos graxos, fibras e pigmentos (WATSON, 1984; BOYER & HANNAH, 2001; WHITE, 2001; CUEVAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; LOZANO-ALEJO *et al.*, 2007).

O amido é estocado no interior dos grãos na forma de grânulos constituídos pelos polímeros amilose e amilopectina. A amilose é uma molécula linear, constituída por unidades de D-glucose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -D-(1→4), representando aproximadamente 25 a 30% do amido, ainda que variações dessa amplitude sejam observadas entre germoplasma. A amilopectina, por sua vez, é uma molécula de peso superior à amilose, sendo também formada por unidades de D-glucose unidas por ligações  $\alpha$ -D-(1→4), porém, apresentando ramificações periódicas no carbono 6 e constituindo cerca de 70-75% do grânulo de amido. Existem ainda evidências de polissacarídeos de tamanho intermediário nos grãos de milho, representando de 5 a 7% do amido (WHISTLER & DANIEL, 1984; WHITE, 2001; RIDOUT *et al.*, 2002; TESTER *et al.*, 2004). Na indústria alimentícia, a amilose é um importante aditivo por conferir uma textura determinada (espessante de pudins, massa de tomate e outros alimentos processados), formato e integridade aos alimentos. Da mesma forma, a amilopectina possui diversas aplicações na indústria, sendo empregada principalmente para conferir características de textura adequada aos alimentos enlatados e de laticínios, como por exemplo, maciez e cremosidade, ou melhorar a estabilidade de alimentos congelados e a aparência de alimentos secos (YOUNG, 1984; WHITE, 2001).

Na indústria alimentícia, a espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) tem se destacado como ferramenta de análise adequada por ser considerada um método analítico sensível e altamente reprodutível. Nesta técnica, os grupos funcionais das biomoléculas são caracterizados por sua capacidade de absorção da radiação eletromagnética de comprimento de onda na faixa do infravermelho. Dessa forma, cada biomolécula possui seu *fingerprint* estrutural (DOWMEY, 1998; DÉLÉRIS & PETIBOIS, 2003).

A técnica de FT-IR torna-se ainda mais promissora quando associada a técnicas de análise estatística multivariada, particularmente através da determinação dos componentes principais (PCA), uma vez que a mesma permite a rápida extração de informações relevantes de um conjunto de dados complexos, como em um espectro de FT-IR. Essa abordagem tem sido comumente utilizada para verificar a autenticidade de alimentos, permitindo a identificação dos sinais espectrais mais significativos e que corroboram para explicar de forma mais ampla a variabilidade amostral de um conjunto de dados (DOWMEY, 1998; VAIDYANATHAN & GOODACRE, 2000; FUKUSAKI & KOBAYASHI, 2005).

Estudos que visam a caracterização estrutural de polissacarídeos (fração amídica) podem servir futuramente para a rápida identificação de variedades de milho que possam ter aplicações na indústria de alimentos, ou como um marcador bioquímico para avaliação da diversidade química entre variedades de milho. Tal aspecto é de interesse, haja vista que grande parte do amido nativo tem uso limitado na indústria por não possuir as propriedades funcionais necessárias. Assim, é de grande interesse a investigação das características estruturais da fração amídica oriunda de germoplasma de *Z. mays*, visando sua aplicação na indústria alimentícia. Particularmente, no Município de Anchieta – região extremo-oeste do Estado de Santa Catarina, são cultivadas variedades de milho com características agrônômicas e nutricionais diferenciadas, em função do modelo de agricultura familiar adotado. Nesta região, já foram identificadas cerca de 30 variedades crioulas e locais de milho (VCLM), cultivadas em um regime de subsistência ou semi-subsistência (OGLIARI & ALVES, 2006). Neste contexto, o presente estudo objetivou determinar os perfis espectrais de infravermelho (FT-IR) de amostras de farinha, produzidas a partir de grãos inteiros e degerminados, e de frações ricas em amilose (FAM) e em amilopectina (FAP) de 26 VCLM e de 5 cultivares

comerciais. A análise da similaridade estrutural química das frações amídicas foi realizada via análise estatística multivariada (PCAs) dos dados espectrais de FT-IR.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção do material vegetal

##### 3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM)

As 26 VCLM utilizadas nesse estudo foram obtidas junto aos pequenos agricultores do município de Anchieta, localizado no extremo oeste catarinense, pelo Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar (SINTRAF). Amostras de grãos do seguinte germoplasma foram repassadas ao grupo do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da UFSC: Roxo do Valdecir, Rajado 8 carreiras, Palha Roxa 02, Rosado, Cateto Vermelho, Cateto, Pires, Palha Roxa 1 do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 07, MPA 13, Branco do Aldanir, Pixurum 04, Mato Grosso, Pixurum 06, Composto São Luis, Asteca, MPA 02, Pixurum 01, Cunha 01, MPA 01, Pixurum 05, Roxo do Emílio, Amarelão 03, Moroti e Língua de Papagaio.

##### 3.1.2 Cultivares comerciais

Amostras de grãos de cultivares comerciais recomendados para a região Sul do Brasil foram utilizadas no presente estudo para efeitos de análise comparativa, são eles: *BRS-1030*; *BR106*; *AG-9090*; *Pioneer 3069* e *AS-3430*.

O cultivar *BRS-1030* (Embrapa), um híbrido simples, é de ciclo precoce, com florescimento em 61 dias, de porte baixo, com grãos semi-duros de cor alaranjada. O cultivar *AG-9090* (Agrocere) é de ciclo precoce, com florescimento em 72-80 dias e grãos são semidentados, de cor alaranjada e com alto teor de óleo. *Pioneer 3069* é um híbrido simples de ciclo super-precoce, enquanto o cultivar *AS-3430* (Agroeste) é um híbrido triplo, de ciclo precoce, porte médio/alto, apresentando grãos duros de cor avermelhada.



### 3.2 Coleta e preparo das amostras

Para cada variedade, amostras de grãos (50g, peso seco) foram trituradas em moinho de laboratório (Cyclone Sample Mill - modelo 3010/019), utilizando-se peneira de 0,1mm. Além das amostras de grãos inteiros (endosperma e gérmen), grãos das mesmas variedades foram degerminados manualmente com o auxílio de um alicate de corte e em seguida triturados. Após a moagem, as amostras de grãos degerminados foram lavadas com hexano (3x, 15 minutos) para remoção de lipídeos. As amostras de grãos inteiros e grãos degerminados foram imediatamente submetidas aos procedimentos experimentais de interesse, ou embaladas em sacos plásticos, sob vácuo, e mantidas a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### 3.3 Determinação do conteúdo de glucose e açúcar redutor nas amostras de farinha

A extração de glucose e açúcar redutor nas amostras de farinha (500 mg) se deu pela adição de água destilada-deionizada (10 mL) e aquecimento ( $35^{\circ}\text{C}$ ), por um período de 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas e o volume ajustado para 10 mL. O conteúdo de glucose foi determinado no filtrado pelo método enzimático usando um kit comercial (Labtest<sup>®</sup>/Lote 6001/2006 – Lagoa Santa-MG). O protocolo de análise baseou-se nas orientações do fabricante do kit e, para efeitos de cálculo do conteúdo de glucose, utilizou-se uma curva padrão daquele monossacarídeo (Sigma/St Louis – MO, USA - 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mg/mL –  $r^2 = 0,999$  e  $y = 2,4126x$ ). As leituras dos valores de absorvância (505 nm) das amostras foram realizadas em triplicatas, em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1203).

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado através do método descrito por MILLER (1959), com a utilização do ácido 3,5-dinitrossalicílico. Para tal, coletou-se uma alíquota (5 mL) do filtrado utilizado para a determinação do conteúdo de glucose, sendo o valor do conteúdo de açúcares totais calculado através da leitura da absorvância das amostras (540 nm - Shimadzu UV-1203), com o auxílio de uma curva padrão de glucose (Sigma/St Louis – MO, USA - 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,4 mg/mL;  $r^2 = 0,997$ ;  $y = 0,5646x$ )

### 3.4 Extração e fracionamento dos componentes amídicos amilose e amilopectina

A uma alíquota de farinha (3g/variedade) adicionaram-se 200mL de água destilada/deionizada, seguido de agitação (20 min) e refluxo ( $80^{\circ}\text{C}$ , 1h). As amostras foram

centrifugadas (30 min, 2500 rpm) e o sobrenadante precipitado com álcool etílico para a remoção da FAM (96°GL, 5V - 12h, 4°C). O etanol foi removido por aspiração e a FAM mantida em estufa (55°C) até peso constante. O material precipitado após a centrifugação, contendo a FAP, foi seco em estufa (55°C) até peso constante e posteriormente tamisado (80 mesh). A 200 mg da FAP bruta foram adicionados 6 mL de água destilada/deionizada, seguido de diálise da solução contra água destilada-deionizada (membrana de acetato de celulose, *cut-off* 10.000-12.000 MW, Sigma/St Louis – MO, USA) por um período de 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.5 Caracterização estrutural química das amostras de farinhas e das frações ricas em amilose e em amilopectina por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR)**

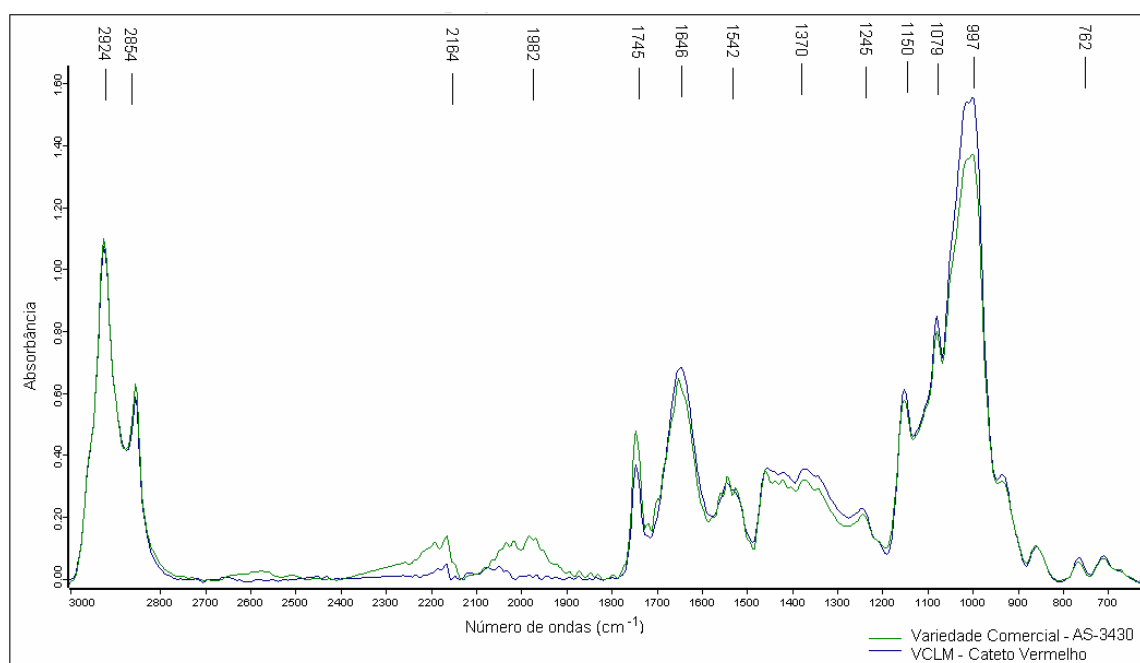
As análises das amostras de farinha (grãos inteiros e degerminados), das FAMs e FAPs das VCLM e dos cultivares comerciais e de padrões comerciais de amilose (Sigma A-7043) e amilopectina (Fluka 10120), ambos extraídos de milho, por espectroscopia vibracional de FT-IR utilizaram equipamento Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), coletando-se 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 500 a 4000 ondas.cm<sup>-1</sup> e com resolução de 4 ondas.cm<sup>-1</sup>. O processamento dos espectros obtidos foi realizado manualmente com o auxílio do programa OPUS (Bruker Biospin, versão 5.0) e considerou a delimitação da janela espectral de interesse (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>), a correção da linha de base, a normalização e a diminuição da relação sinal/ruído (*smoothing*). Subsequentemente, o conjunto de dados totais dos espectros processados foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs), com auxílio do pacote estatístico Unscrambler 9.1.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização estrutural da farinha de grãos inteiros e degerminados por espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR) e análise quimiométrica**

Nos espectros adquiridos para as amostras de farinha de grãos inteiros foram observados 19 picos majoritários na região entre 3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup>, embora sinais de fraca intensidade tenham sido encontrados na região entre 2770 – 1790 ondas.cm<sup>-1</sup>, conforme demonstrado na **Figura 1**.

A análise dos espectros de FT-IR das amostras revelou a existência de semelhança estrutural dos componentes das farinhas estudadas. Tal afirmação leva em conta o fato de que nos espectros de FT-IR um aumento nos valores de absorbância reflete a posição e a intensidade das bandas relativas aos grupamentos funcionais de uma determinada classe de compostos, permitindo a sua identificação e a análise comparativa de amostras (CERNÁ *et al.*, 2003).



**FIGURA 1** - Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha de grãos inteiros da variedade comercial AS-3430 e da variedade local Cateto Vermelho.

Na **Tabela 1** estão apresentados os principais sinais espectrais (onda.cm<sup>-1</sup>) detectados nas amostras de farinha e os grupos funcionais dos constituintes respectivos.

De maneira geral, os carboidratos mostram um aumento nos valores de absorbância na faixa espectral de infravermelho entre 1200 – 950 ondas.cm<sup>-1</sup>, sendo esta região considerada uma região de *fingerprint* daquela classe de metabólitos primários (CERNÁ *et al.*, 2003).

**TABELA 1-** Sinais espectrais de FT-IR (onda.cm<sup>-1</sup>) das amostras de farinhas de grãos inteiros de VCLM e comerciais e seus respectivos grupamentos.

<i>Sinal</i>	<i>Grupo Funcional</i>
2924	deformação axial e angular do grupo metil (-CH <sub>3</sub> ) e/ou metileno (CH <sub>2</sub> )
2854	deformação axial e angular do grupo metil (-CH <sub>3</sub> ) e/ou metileno (CH <sub>2</sub> )
1743	deformação axial do grupo C=O de ácidos ou acetil
1645	deformação axial do grupo C=O de aminas
1542	deformação angular do grupo NH <sub>2</sub> de aminas
1456	deformação axial de grupos CH <sub>3</sub>
1419	deformação angular do grupo OH de ácidos carboxílicos ou de C-H
1366	deformação angular do grupo C-H
1340	deformação simétrica da ligação C-CH <sub>3</sub>
1243	deformação da ligação C-OH
1149	deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1076	deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C (ligação glicosídica)
1012	deformação axial do grupo C-O e deformação angular do grupo OH
997	deformação axial do grupo C-O e deformação angular do grupo OH
930	deformação da ligação C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
856	deformação da ligação C-H (carbono anomérico α da D-glucose)
762	vibração simétrica do anel dos açúcares
706	deformação da ligação =CH de compostos aromáticos

Fonte: LAMBERT et al. (2001)

Já os constituintes protéicos são identificados por esta técnica através dos sinais em 1650 e 1550 ondas.cm<sup>-1</sup>, relativos às aminas I e II, respectivamente (LAMBERT, 2001). A presença de grupos carboxílicos, associada à deformação axial do grupo funcional C=O, tipicamente encontrados em ácidos graxos, por exemplo, pode ser detectada pelo sinal em 1740 ondas.cm<sup>-1</sup> (SILVERSTEIN, 1994). A presença de ácidos graxos também pode ser constatada pelos sinais entre 3000-2800 ondas.cm<sup>-1</sup> como mostrado na **Tabela 1** (LAMBERT, 2001; YANG *et al.*, 2005). Além disso, a existência simultânea de bandas entre 690-900 ondas.cm<sup>-1</sup> e 1700-2000 ondas.cm<sup>-1</sup> sugere a presença de compostos com anéis

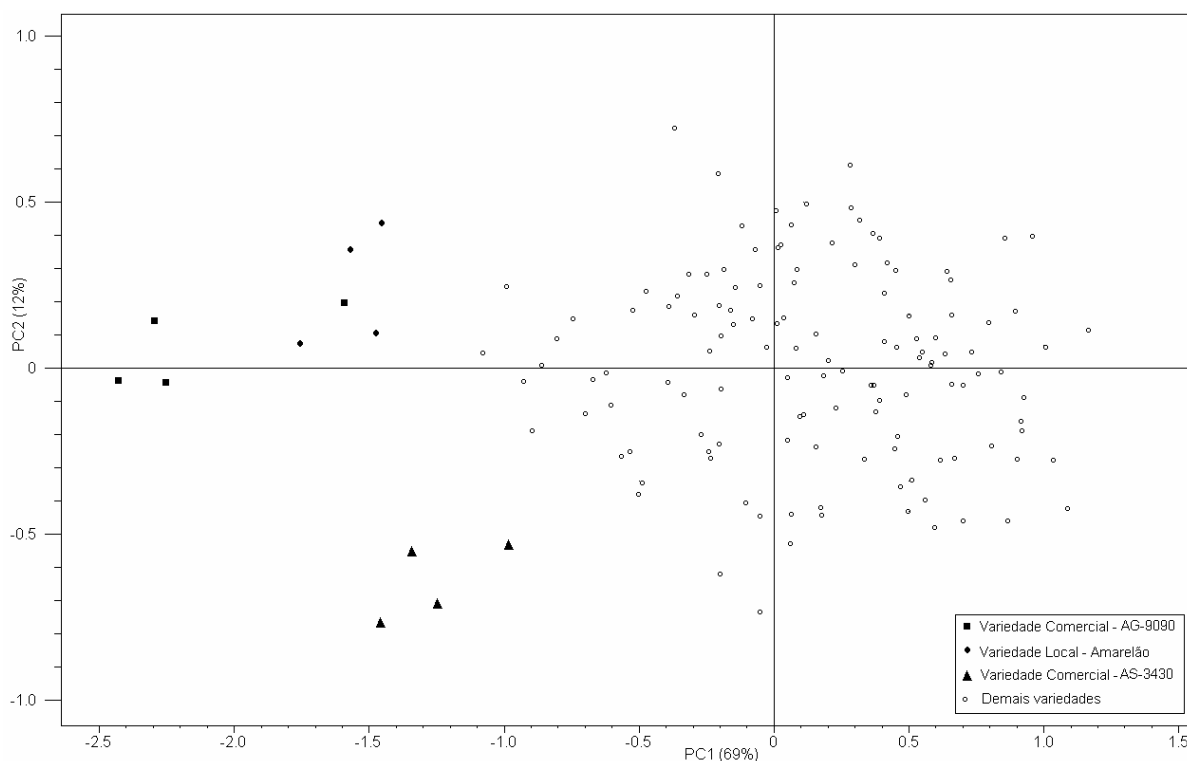
aromáticos em sua estrutura, tais como os de origem (poli)fenólica (LAMBERT, 2001; XU *et al.*, 2005).

A despeito das semelhanças estruturais claramente observadas através da análise visual dos perfis espectrais de FT-IR das amostras de farinha de grãos inteiros em estudo, notadamente aquelas indicadoras da presença de carboidratos, proteínas, ácidos graxos e (poli)fenóis naquelas matrizes, sinais de menor intensidade (ou a ausência destes) podem não ser facilmente identificados, reduzindo a confiabilidade dos resultados obtidos no que se refere à similaridade de características estruturais químicas.

Em processos de análise comparativa de amostras de matrizes complexas, discrepâncias mínimas nos perfis espectrais poderão ser significativas na discriminação dos materiais de interesse. Portanto, a análise do conjunto de perfis espectrais requer estratégias que permitam maximizar a extração de informações a partir dos dados coletados (espectros de FT-IR), não implicando, obviamente, no uso de técnicas de grande demanda de tempo e/ou custos. Neste contexto, ferramentas estatísticas de análise multivariada de dados, através da determinação dos componentes principais (PCA) do conjunto de dados espectrais, por exemplo, têm sido frequentemente utilizadas com sucesso.

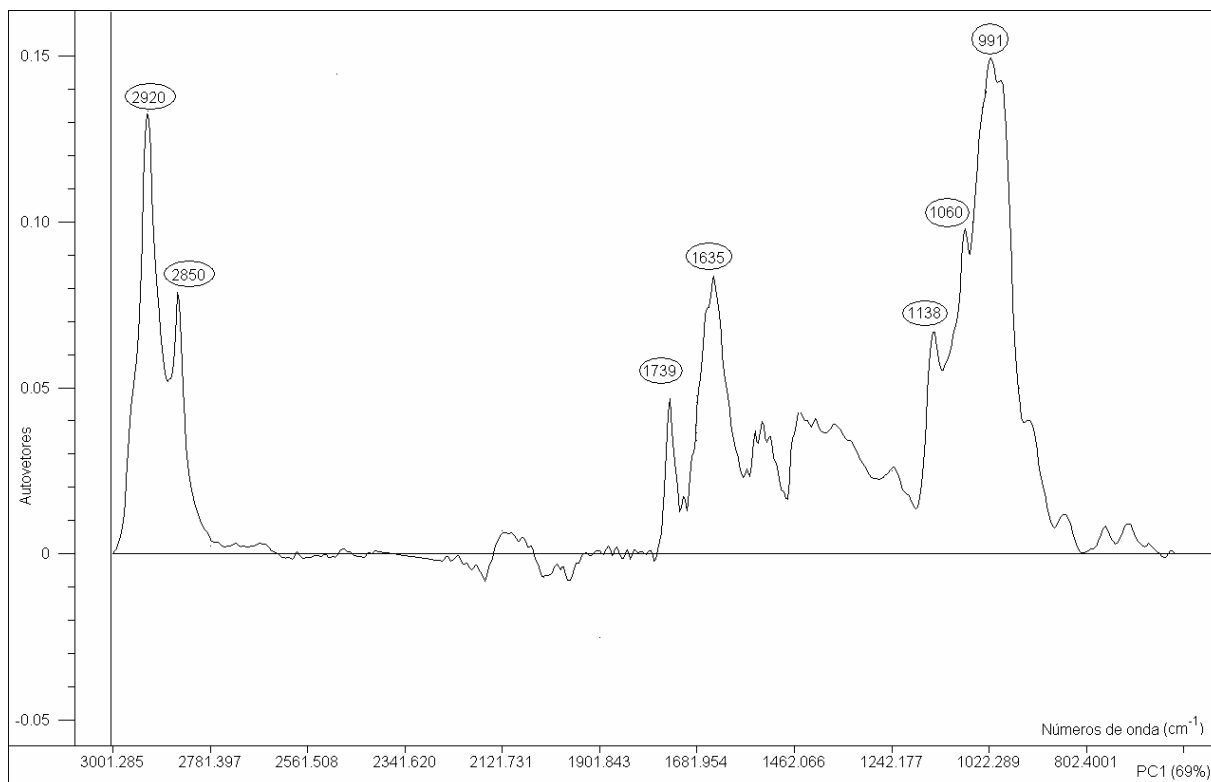
No presente estudo, os efeitos de regiões do espectro (*bucket analysis*) foram testados de modo a otimizar a classificação e o agrupamento das amostras, sendo que a primeira região testada compreendeu a janela espectral situada entre 3000-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Para tal, a matriz de dados espectrais foi normalizada em seus componentes lineares, enquanto as colunas foram centralizadas. A **Figura 2** apresenta a dispersão das variáveis em estudo (farinha de grãos inteiros), segundo a determinação de PCA da matriz de dados obtida a partir dos espectros de FT-IR. Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 81% a variância presente nos dados.

A análise da **Figura 2** não revela uma clara separação das amostras em grupos, mas sim uma dispersão das amostras estudadas por todos os quadrantes do gráfico de distribuição fatorial, embora 3 das variedades estudadas tenham se destacado das demais, a saber: os cultivares comerciais AG-9090 e AS-3430 (PC1 +) e a variedade local Amarelão (PC2 -).



**FIGURA 2** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha de grãos inteiros de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

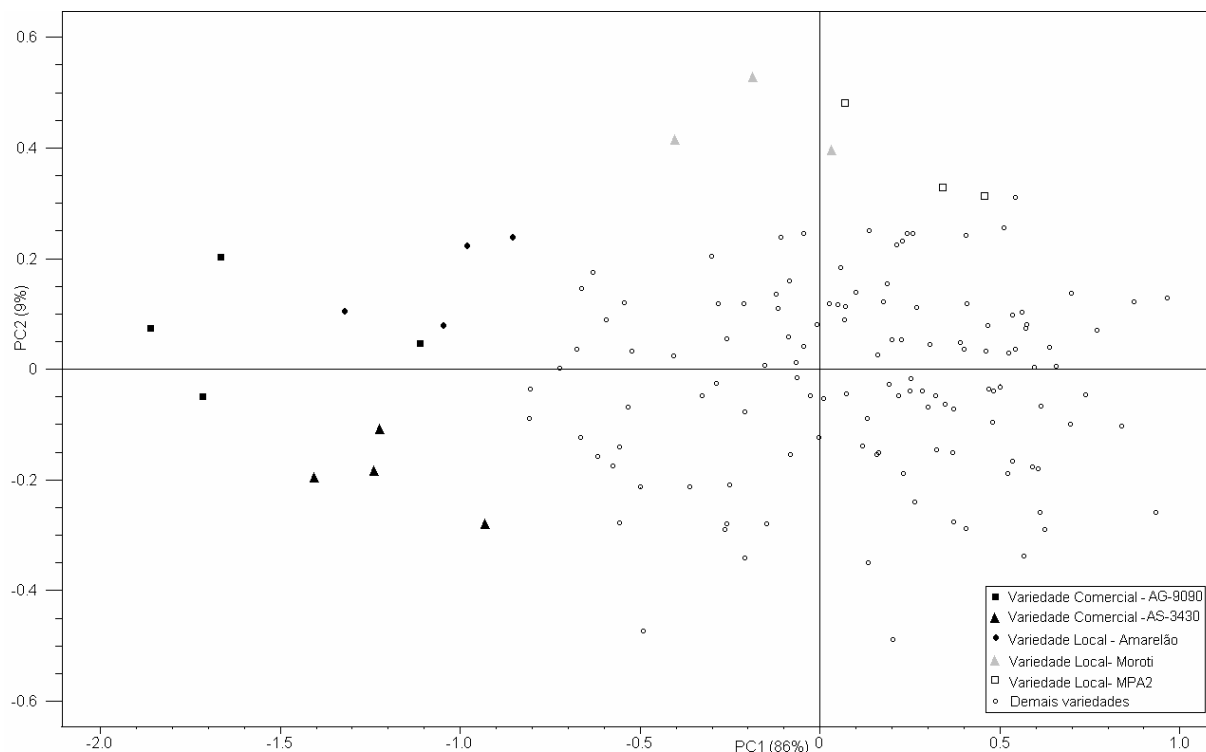
A análise do perfil espectral de FT-IR dos dados agrupados em PC1 mostra que os sinais que mais contribuíram para a dispersão das amostras ao longo desse eixo foram 2920, 2850, 1739, 1635, 1138, 1060 e 991 ondas.cm<sup>-1</sup>, o que indica que as farinhas das variedades estudadas possuem constituição química diferenciada, comparativamente as demais do universo amostral em estudo. As classes de compostos que corroboram para esta classificação são os ácidos graxos (2920, 2850, 1739 ondas.cm<sup>-1</sup>), as proteínas (1635 ondas.cm<sup>-1</sup>) e os carboidratos (1138, 1060, 991 ondas.cm<sup>-1</sup> - **Figura 3**). Um segundo procedimento experimental para a determinação dos componentes principais foi realizado, no qual considerou-se a região entre 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup> do espectro, a qual tipicamente caracteriza os carboidratos.



**FIGURA 3** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>).

A **Figura 4** demonstra que os componentes principais PC1 x PC2 dessa região espectral explicaram em 95% a variância existente, porém, novamente, não foi possível constatar uma clara separação das amostras analisadas. As amostras de farinha com maior discrepância de composição química foram as das variedades comerciais AG-9090 e AS-3430 e as VCLM Amarelão, MPA2 e Moroti. Os sinais que contribuíram para a classificação das amostras em PC1 foram 1149, 1076, 1014, 995 e 933 ondas.cm<sup>-1</sup> como mostrado na **Figura 5**.

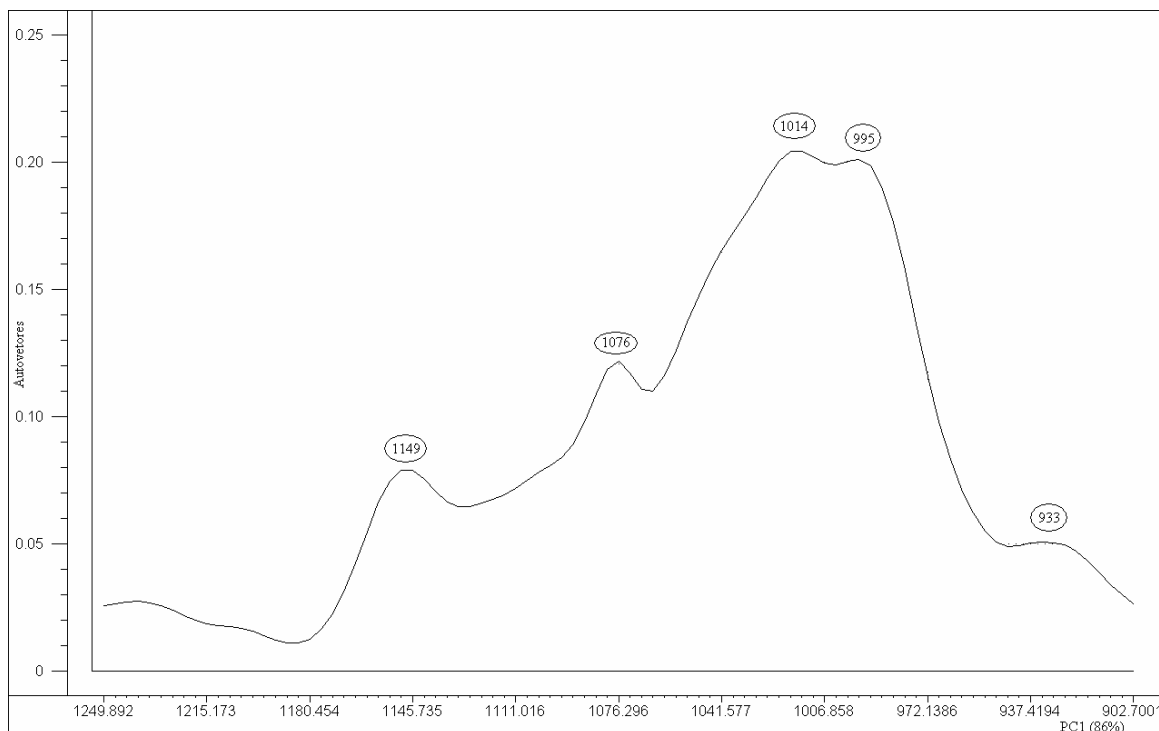
Os resultados quimiométricos dos dois procedimentos experimentais, usando duas regiões distintas dos espectros de FT-IR (3000-600 e 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>), mostraram o mesmo padrão de dispersão das amostras (farinha de grãos de milho), o que sugere que as mesmas têm constituições químicas diferenciadas no que diz respeito às classes de compostos detectados nas janelas espectrais acima referidas. Dessa forma, o não agrupamento das amostras possivelmente resultou de diferenças estruturais conferidas pela presença de compostos químicos específicos às variedades.



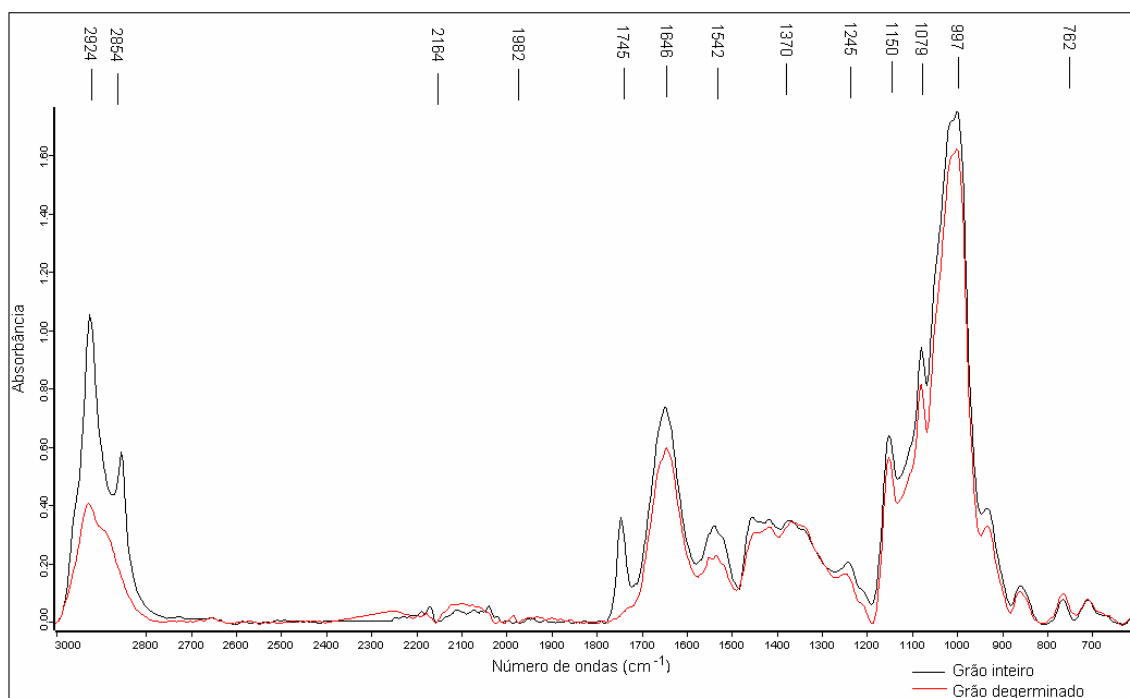
**FIGURA 4** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) de amostras de farinha de grãos inteiros de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

Espectros de FT-IR de amostras de grãos das mesmas variedades, porém degerminados foram adquiridos para melhor caracterização das frações protéica e polissacarídica presentes exclusivamente no endosperma. Para tal, os compostos apolares majoritários foram previamente removidos das amostras de farinha com a utilização de hexano. Os perfis espectrais da farinha de grãos inteiros e degerminados da variedade Mato Grosso estão mostrados na **Figura 6**. Pequenas diferenças no perfil espectral de grãos inteiros e degerminados foram visualmente observadas em algumas regiões do espectro, como na região de *fingerprint* para carboidratos (**Figura 7**).

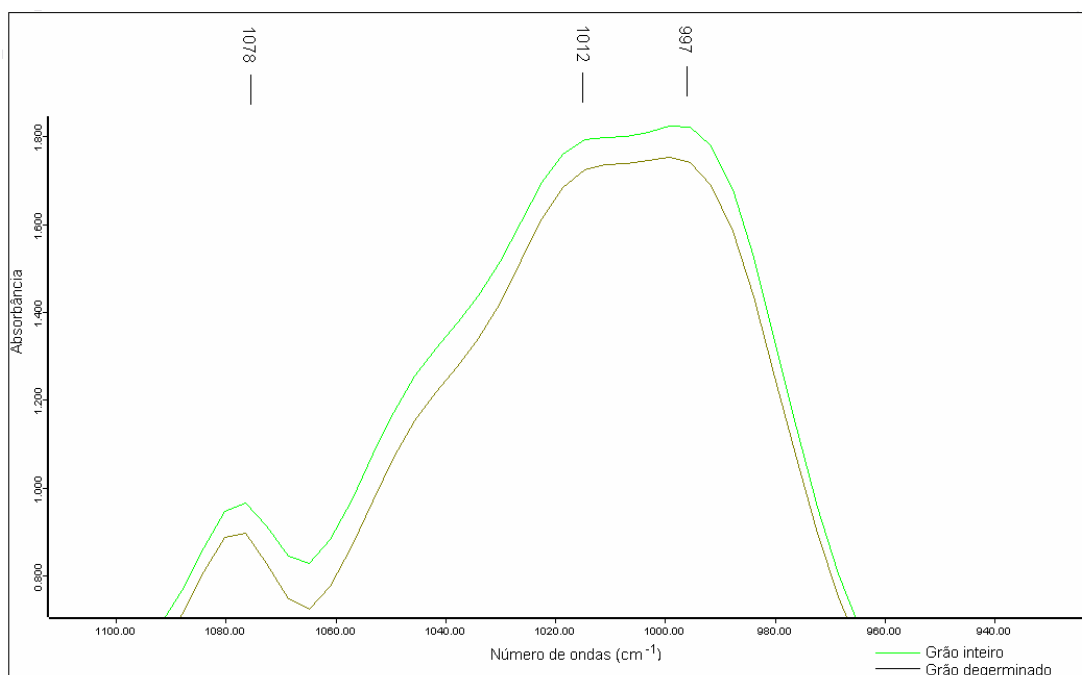




**FIGURA 5** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR na região espectral de 1200 a 950 ondas.cm<sup>-1</sup>.



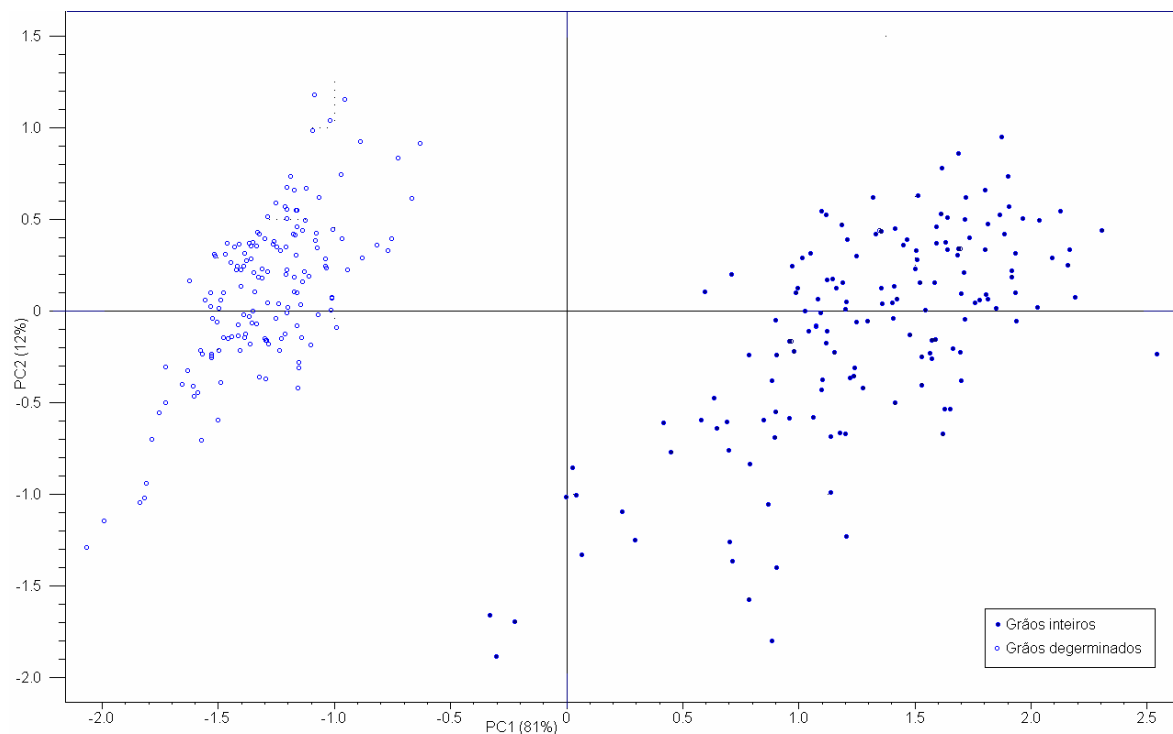
**FIGURA 6**- Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados da variedade local Mato Grosso.



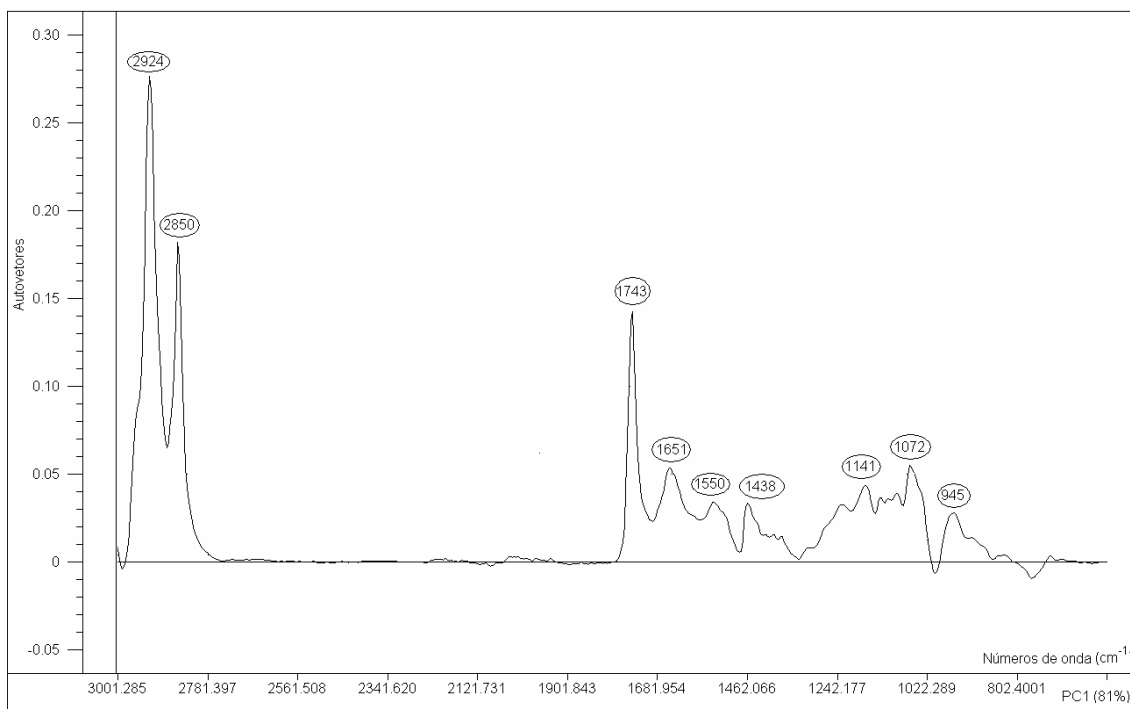
**FIGURA 7-** Espectros de FT-IR (1100-940 cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados da variedade local Mato Grosso.

A determinação dos componentes principais dos dados espectrais de FT-IR para comparação do grau de similaridade das amostras de grãos inteiros e degerminados está mostrada na **Figura 8**. Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 93% a variância presente nos dados, sendo possível observar uma clara separação das amostras em dois grupos, correspondendo às amostras de grãos degerminados (PC1 +) e às amostras de grãos inteiros (PC -).

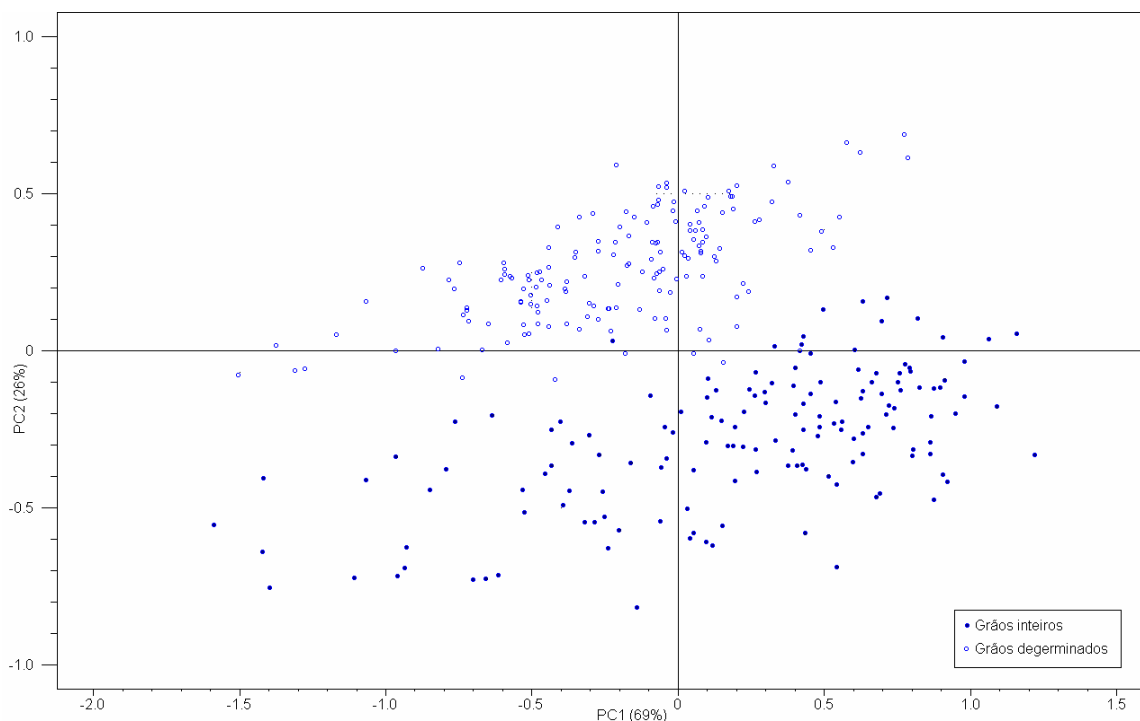
Pode-se observar que os grupos apresentaram-se distintos quando analisados separadamente, principalmente para as amostras de grãos inteiros, possivelmente em função de diferenças na composição química conferidas pela presença do gérmen. A análise do perfil espectral de FT-IR dos dados de PC1 (**Figura 9**) confirma que os principais sinais responsáveis pela separação de grãos inteiros e degerminados são 2924, 2850 e 1743 ondas.cm<sup>-1</sup>.



**FIGURA 8** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR na janela espectral de 3000 a 600 ondas. $\text{cm}^{-1}$  de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais.



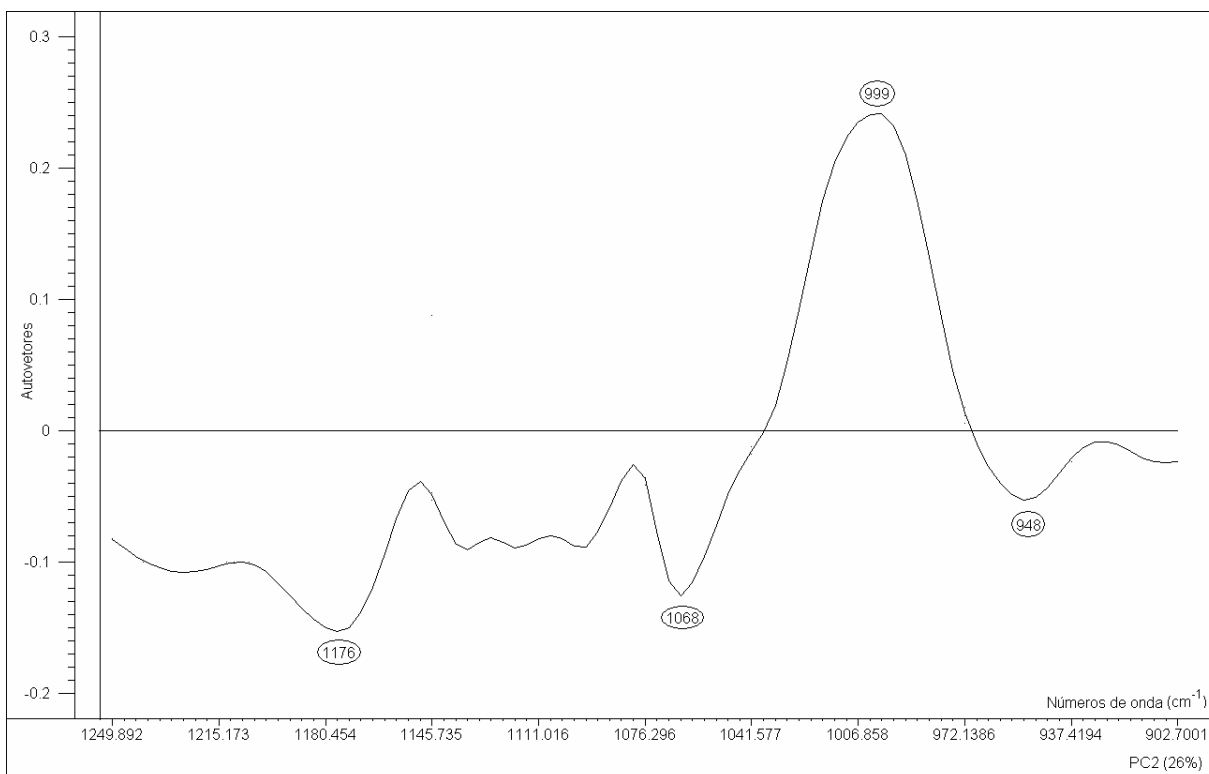
**FIGURA 9**- Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas. $\text{cm}^{-1}$ ).



**FIGURA 10** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR nas janelas espectrais de 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup> de amostras de farinha de grãos inteiros e de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

Entretanto, a clara separação de grãos inteiros e degerminados foi também observada, como mostrado na **Figura 10**, quando se utilizou a faixa espectral entre 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>, sendo 95% da variância dos dados explicados pelos componentes principais 1 e 2.

As amostras foram separadas em função do componente principal PC2, onde o grupo que reúne os grãos inteiros ficou agrupado na região positiva, enquanto as amostras de grãos degerminados agruparam-se em PC negativo. Novamente, é possível observar claramente que a presença do gérmen nas farinhas contribui para a maior dispersão das amostras, indicando uma constituição de carboidratos diferenciada para as mesmas, conforme demonstrado na **Figura 10**.

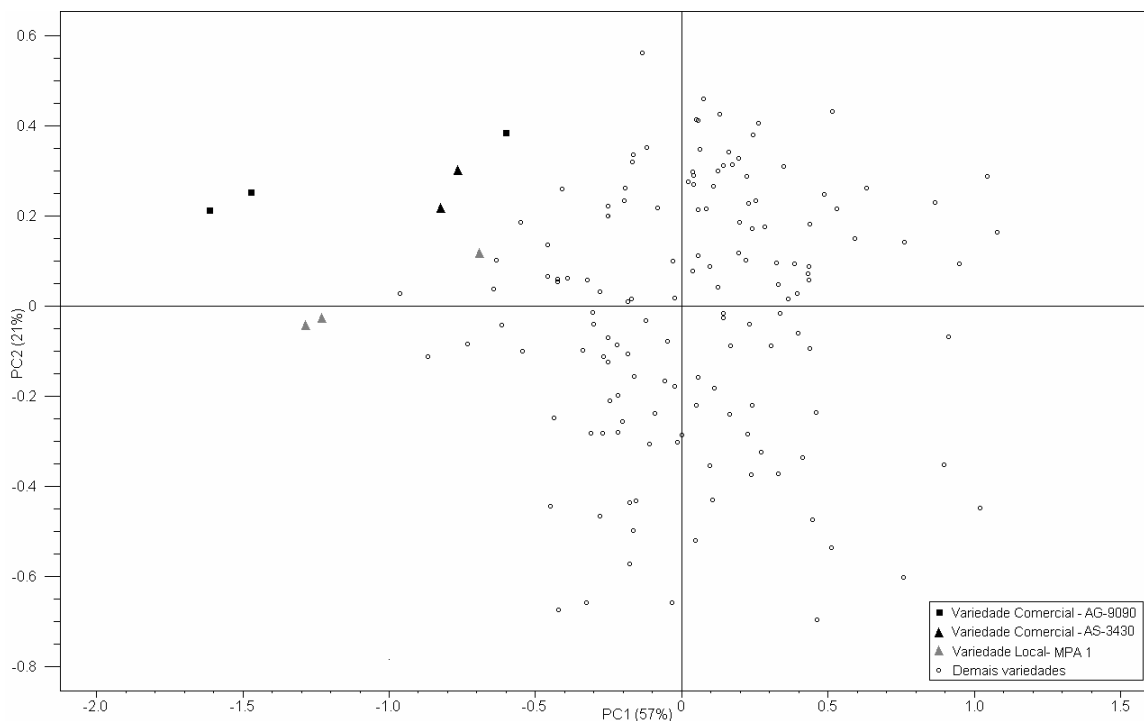


**FIGURA 11** - Contribuição fatorial de PC2 das amostras de farinha de grãos inteiros e degerminados para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>).

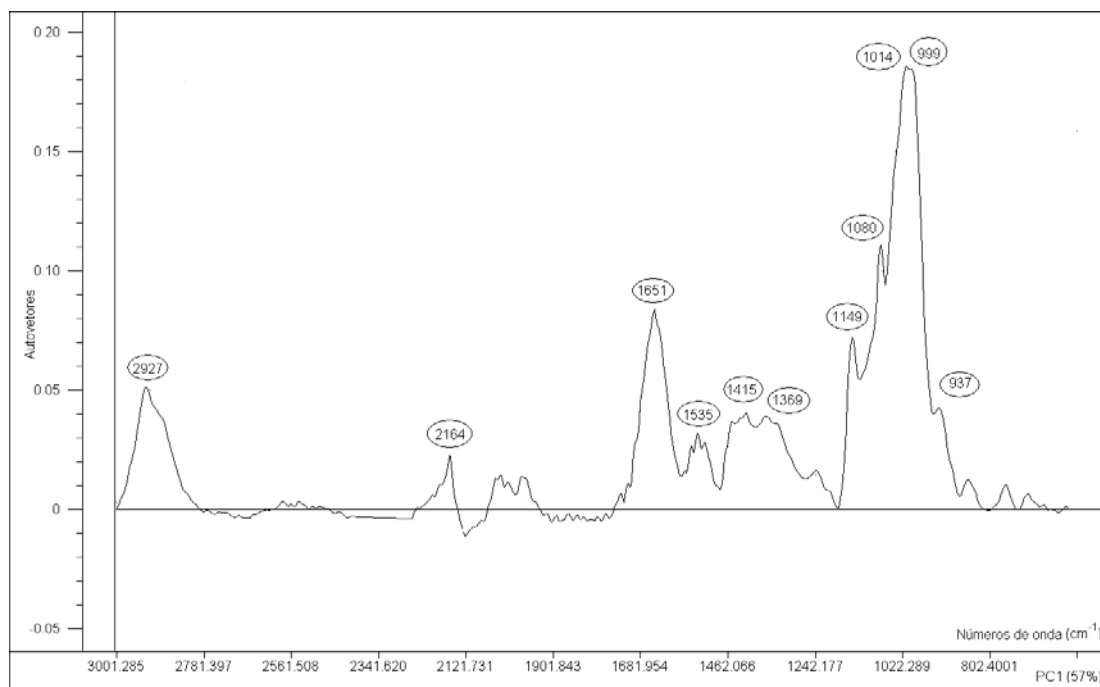
A análise do perfil espectral de PC2 revelou que o sinal que agrupou as amostras (grãos degerminados) na porção positiva foi 999 ondas.cm<sup>-1</sup>, enquanto para as amostras de grãos inteiros (PC -) as bandas em 1176, 1068 e 948 ondas.cm<sup>-1</sup> apresentaram as maiores contribuições fatoriais (**Figura 11**).

As amostras de farinha de grãos degerminados também foram analisadas isoladamente por PCA para a região entre 3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>, a fim de confirmar os resultados mostrados nas **Figuras 8 e 10**, que indicam constituição química similar entre as mesmas.

A **Figura 12** mostra a classificação desse conjunto de dados, onde PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 79% a variância dos mesmos. A análise do gráfico de distribuição fatorial das amostras em estudo revela novamente que as variedades comerciais AG-9090 e AS-3430 se diferenciam em alguma extensão das demais, assim como a VCLM MPA 1 (**Figura 13**).



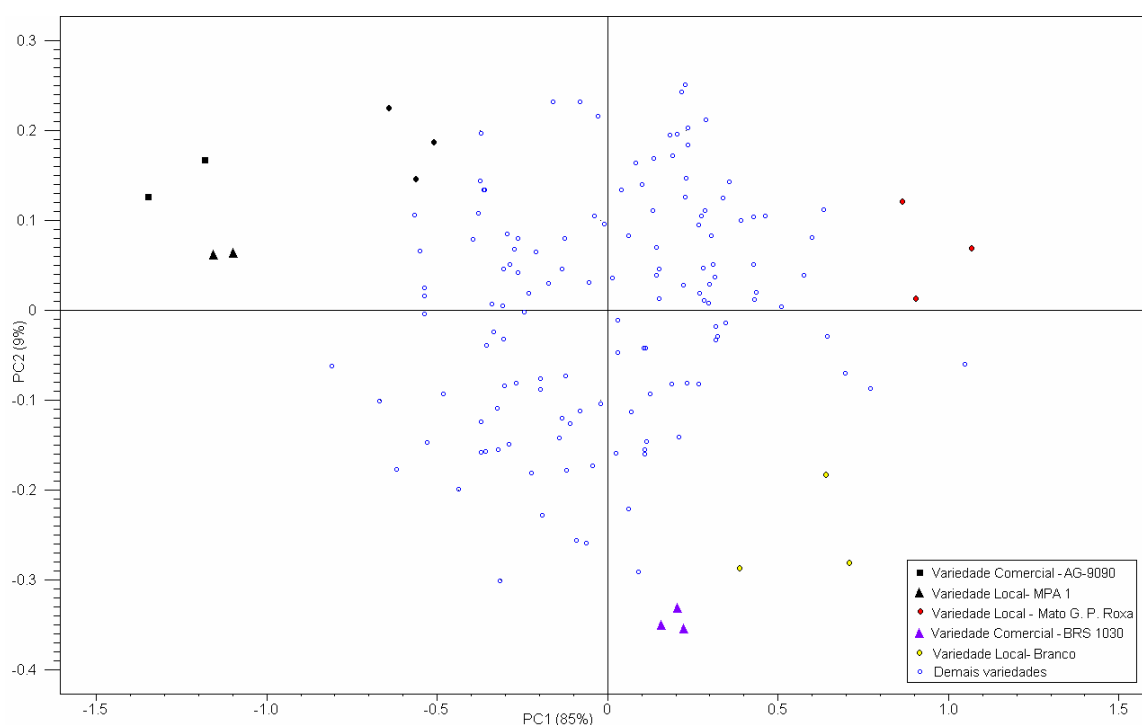
**FIGURA 12** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.



**FIGURA 13** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos degerminados para os dados espectrais de FT-IR (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>).

Vários sinais espectrais de FT-IR (2927, 2164, 1651, 1535, 1415, 1369, 1149, 1080, 1014 e 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) contribuíram para a classificação das amostras (grãos degerminados) ao longo do eixo PC1, como pode ser observado na **Figura 13**.

Uma classificação similar das amostras (farinha de grãos degerminados) foi observada quando se analisou a região do espectro compreendida entre 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$  (**Figura 14**). As bandas que mais contribuíram para a dispersão das amostras ao longo do eixo componente principal 1 (PC1) (**Figura 14**) foram 1145, 1076, 1014 e 999  $\text{ondas.cm}^{-1}$  como mostra a **Figura 15**.

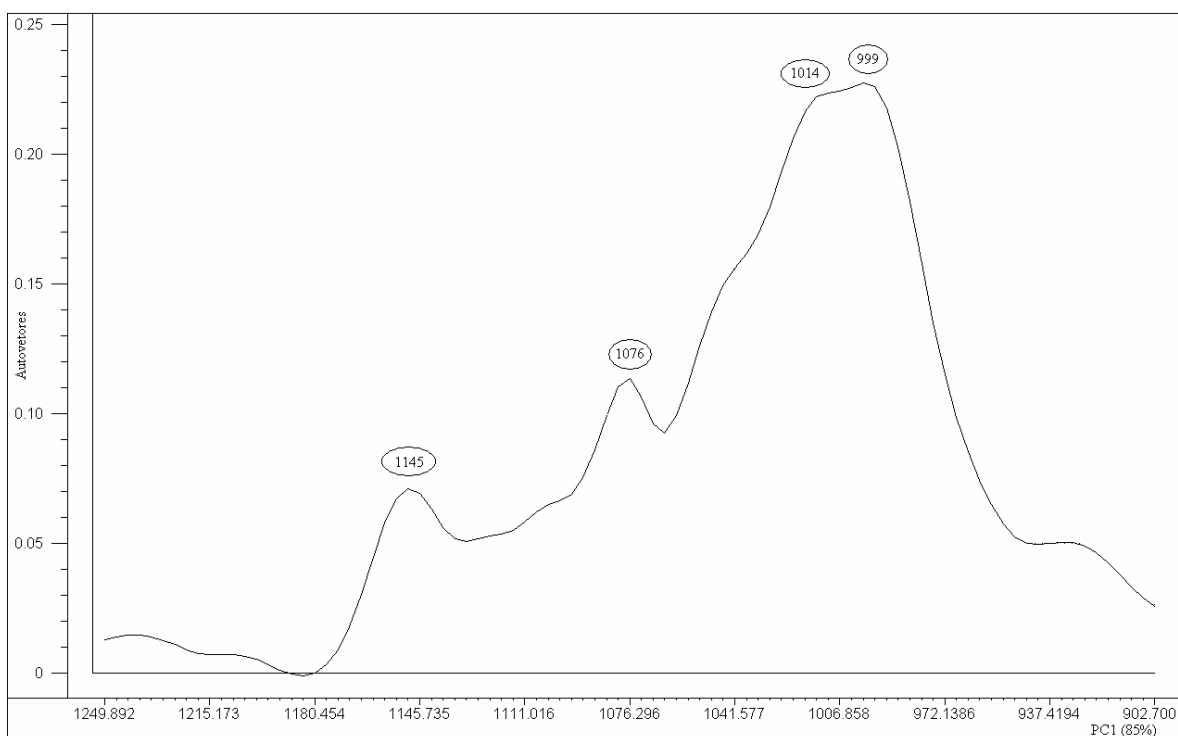


**FIGURA 14-** Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1250-900  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) de amostras de farinha de grãos degerminados de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

As variedades apresentaram uma dispersão ampla, ocupando os quadrantes do gráfico de distribuição fatorial, sendo que as amostras mais discrepantes do grupo principal foram as VCLM MPA1, Mato Grosso Palha Roxa e Branco e as variedades comerciais AG-9090 e BRS-1030. Esses resultados apontam para uma constituição de carboidratos localizados no endosperma parcialmente distinta entre variedades, sejam crioulas ou comerciais. A

classificação das variedades via análise dos componentes principais e usando a região de *fingerprint* para carboidratos sugere diferenças associadas às proporções amilose: amilopectina naquelas biomassas.

Dessa forma, visando maior detalhamento da constituição química da fração amídica e compostos associados, testou-se um protocolo rápido e simples de extração e fracionamento da amilose e amilopectina das VCLM e dos cultivares comerciais. As frações obtidas foram analisadas por FT-IR e os perfis espectrais comparados através de PCA.



**FIGURA 15-** Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos degerminados para os dados de FT-IR na região espectral compreendida entre 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ .

#### 4.2 Rendimento da extração das FAMS e FAPs de farinhas das VCLM e dos cultivares comerciais

Os resultados de rendimento do processo de extração e fracionamento do amido em amilose e amilopectina das 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo estão apresentados na **Tabela 2**.



**TABELA 2** – Conteúdo médio\* (g/100g, peso seco) das frações ricas em amilose (FAM), amilopectina (FAP), glucose e de açúcares redutores em amostras farinhas de variedades crioulas e locais de milho e de cultivares comerciais.

	<i>Variedades</i>	<i>FAM</i>	<i>FAP</i>	<i>Total</i>	<i>Glucose</i>	<i>Açúcares redutores</i>
<b>Variedades Locais</b>	<i>Pires</i>	11,3±2,4	41,0±5,2	52,3	0,21±0,04	1,48±0,17
	<i>Roxo Emílio</i>	12,4±1,0	33,7±3,5	46,1	0,27±0,02	1,22±0,07
	<i>MPA 13</i>	14,3±1,5	34,7±19,8	49,0	0,27±0,01	1,52±0,15
	<i>Pixurum 6</i>	14,8±1,9	28,2±9	52,1	0,16±0,02	0,84±0,09
	<i>Pixurum 5</i>	16,4±0,8	24,7±6,9	43,6	0,23±0,01	0,94±0,01
	<i>Mato G. P. Roxa</i>	17,1±0,9	26,6±5,6	58,1	0,13±0,01	0,78±0,09
	<i>Cunha</i>	17,8±2,6	34,3±2,5	43,7	0,43±0,02	0,90±0,07
	<i>Roxo Valdecir</i>	17,8±2,3	33,2±4,7	51,0	0,29±0,03	0,91±0,05
	<i>Cateto Vermelho</i>	17,9±1,3	29,3±4,4	66,1	0,26±0,01	0,71±0,05
	<i>Rajado 8 C.</i>	18,0±4,0	33,4±2,1	47,2	0,22±0,04	1,22±0,06
	<i>MPA 1</i>	18,2±1,8	36,2±9,3	41,1	0,15±0,0	0,86±0,07
	<i>L. Papagaio</i>	18,3±2,3	29,8±3,8	51,0	0,32±0,03	1,88±0,04
	<i>Amarelão 3</i>	18,4±3,4	30,3±0,9	49,7	0,24±0,09	1,52±0,14
	<i>Palha R. Emílio</i>	18,5±1,9	31,2±5,1	48,1	0,25±0,02	1,72±0,1
	<i>Branco</i>	19,6±1,8	46,5±11,5	43,0	0,15±0,0	0,82±0,04
	<i>C. S. Luis</i>	19,6±1,7	31,4±1,0	53,3	0,31±0,03	1,77±0,14
	<i>Pixurum 7</i>	19,7±2,8	34,5±3,0	54,4	0,14±0,03	0,63±0,06
	<i>Moroti</i>	20,0±2,3	33,3±2,3	48,7	0,12±0,01	0,29±0,05
	<i>Pixurum 4</i>	20,6±1	37,5±1,6	51,4	0,17±0,01	0,86±0,03
	<i>MPA 2</i>	21,1±1,8	22,5±5,4	50,5	0,14±0,03	1,14±0,17
	<i>Pixurum 1</i>	21,2±0,8	27,3±4,1	47,8	0,25±0,02	0,81±0,02
	<i>Palha Roxa 2</i>	21,3±6,4	26,5±3,4	57,0	0,13±0,01	0,81±0,10
	<i>Rosado</i>	21,7±2,9	35,3±2,7	54,2	0,26±0,04	1,62±0,20
<i>Asteca</i>	21,9±4,6	28,6±9,4	48,5	0,27±0,03	1,18±0,12	
<i>Cateto</i>	22,3±8,6	19,7±0,3	42,0	0,21±0,01	1,31±0,12	
<i>Mato Grosso</i>	25,4±0,1	19,9±1,2	45,3	0,16±0,02	1,20±0,15	
<b>Variedades Comerciais</b>	<i>BRS 1030</i>	15,2±2,5	16,2±5,3	31,4	0,11±0,02	0,43±0,06
	<i>AS-3430</i>	19,9±0,2	12,9±1,6	32,8	0,18±0,01	0,36±0,02
	<i>Pioneer 3069</i>	20,8±1,1	13,5±4,2	34,3	0,16±0,02	0,29±0,03
	<i>BR106</i>	21,7±1,4	12,2±1,5	33,9	0,11±0,05	0,32±0,1
	<i>AG-9090</i>	22,8±1,3	13,8±135	36,6	0,15±0,02	0,35±0,05

\* dados médios de 3 extrações independentes

Os conteúdos das frações amídicas para as variedades em análise foram bastante distintos, com uma amplitude de valores de 11,3g amilose/100g e 25,4g amilose/100g para as variedades Pires e Mato Grosso, respectivamente.

Para a FAP, o conteúdo variou entre 19,9 g/100g e 46,5 g/100g para as variedades Mato Grosso e Branco. De forma comparativa, os cultivares comerciais apresentaram uma menor amplitude de valores de concentração de FAM, isto é, 15,2 g/100g (*BRS-1030*) a 22,8 g/100g (*AG-9090*) e FAP 12,2 g/100g (*BR-106*) a 16,2 g/100g (*BRS-1030*). O somatório do conteúdo de ambas as frações obtido para cada variedade apresentou uma ampla faixa de variação. Para as VCLM o conteúdo total das duas frações variou entre 66,1 g% e 41,1 g% para Branco e Pixurum 5, respectivamente, enquanto que para os cultivares comerciais em estudo, os valores variaram entre 31,4 g% e 36,6 g% (**Tabela 2**).

Esses resultados sugerem uma possível qualidade energética distinta para as amostras de farinha, em função da quantidade dos polissacarídeos presentes naquela biomassa. De acordo com WHITE (2001), os valores de rendimento para as VCLM encontrados no presente estudo estão de acordo com a literatura que aponta uma média de 66 g% para o conteúdo daqueles polissacarídeos em grãos de *Z. mays*. No entanto, ressalta-se o fato de que os menores valores encontrados foram detectados para os cultivares comerciais, corroborando a discussão de que os programas de melhoramento vegetal estão ocasionando na erosão genética nessa espécie, na medida em que privilegiam o aspecto produtividade em detrimento das demais características fenotípicas como, por exemplo, aquelas de caráter nutricional.

Além da determinação do conteúdo de amido presente nas farinhas, foram detectadas naquelas biomassas variações nos conteúdos de glucose e açúcar redutor (**Tabela 2**). Novamente as VCLM mostraram conteúdos superiores de glucose e açúcar redutor quando comparados aos dos cultivares comerciais. O conteúdo de glucose para as VCLM variou entre 0,12-0,43 g% para as variedades Moroti e Cunha, respectivamente e para os cultivares comerciais *BRS-1030* e *AS-3430* entre 0,11-0,18 g%. Já o conteúdo de açúcar redutor encontrado nas farinhas das VCLM variou entre 0,29-1,88 g% para as variedades Moroti e Língua de Papagaio.

Os cultivares comerciais apresentaram conteúdos de açúcar redutor entre 0,29-0,43 g%, para as variedades *Pionner 3069* e *BRS-1030*. Segundo TRACY (2001), o conteúdo médio de açúcares redutores é aproximadamente 3,9 g/100g, no milho normal, 22 dias após a

polinização. No presente estudo, valores inferiores e variáveis entre as variedades podem ter sido encontrados, uma vez que as espigas podem ter sido retiradas da planta em épocas diferentes.

Diversos fatores condicionam o uso de amidos na indústria alimentícia como, por exemplo, a relação entre os conteúdos de amilose e amilopectina. De fato, esta relação é determinante das propriedades reológicas dos amidos, sendo esta característica específica à variedade de milho. Como exemplo disto, DOMBRINK-KURTZMAN & KNUTSON (1997) verificaram que o conteúdo de amilose em grânulos de amido pode influenciar a dureza do endosperma, estando esta característica relacionada ao maior conteúdo desse constituinte amiláceo. No presente estudo, verificou-se que a proporção entre as frações FAP/FAM das amostras de farinhas também apresentou grande amplitude de valores, com destaque para as variedades Pires (21,6% de amilose) e Mato Grosso (56,1% de amilose - **Tabela 2**). Os resultados apontam para a existência de constituições amídicas significativamente distintas, principalmente em relação à proporção dos polissacarídeos presentes em farinhas de VCLM, um aspecto com implicação direta nas suas propriedades funcionais. Grânulos de amido, quando aquecidos na presença de água, sofrem um processo denominado gelatinização, que é responsável pelo aumento da viscosidade do mesmo. Este processo caracteriza-se pelo desarranjo molecular do grânulo causado pela penetração da água e hidratação das cadeias de amilopectina. No entanto, após a gelatinização, sob condições de temperatura ambiente, inicia-se o fenômeno da retrogradação, onde verifica-se o rearranjo das moléculas através do restabelecimento de ligações do tipo pontes de hidrogênio, sendo este um fenômeno indesejável. Assim, tanto a gelatinização como a retrogradação são influenciadas pela razão amilopectina/amilose (MOORE *et al.*, 1984; FERGASON, 2001).

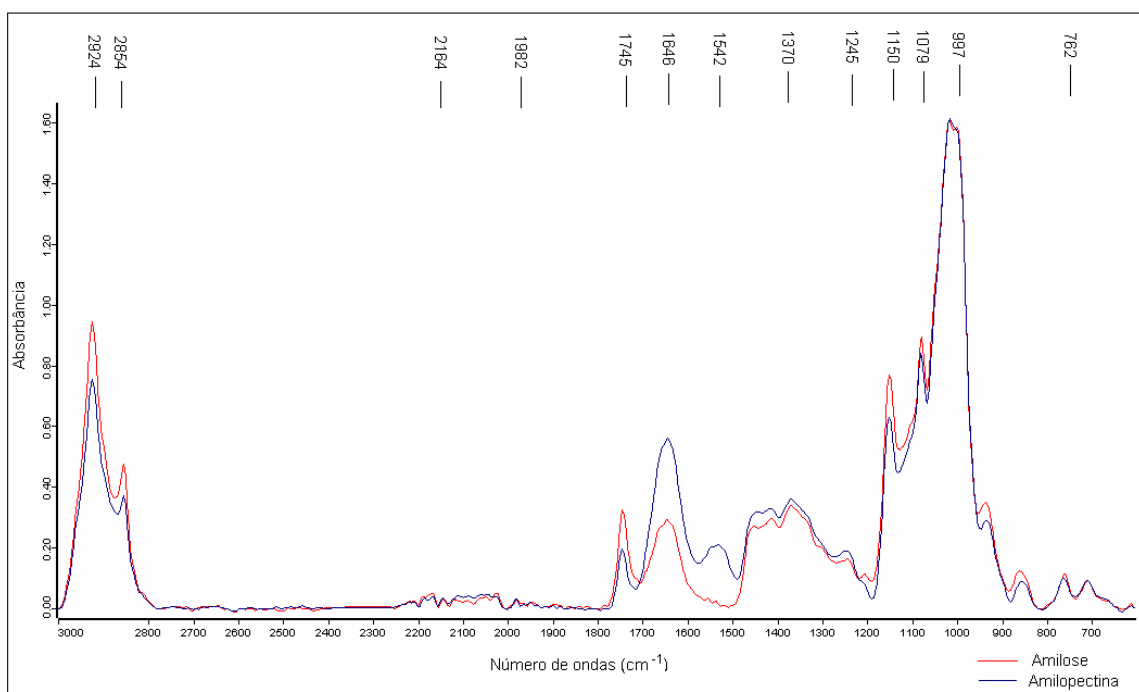
De fato, a análise dos dados de rendimento do fracionamento do amido para as diferentes variedades (**Tabela 2**) está de acordo com o que foi sugerido através da análise dos componentes principais, usando a região de *fingerprint* para carboidratos, uma vez que a análise quimiométrica revelou certo grau de distinção entre as amostras de farinhas, um fato possivelmente associado às diferenças nas proporções amilose: amilopectina naquelas biomassas.

Subseqüente à determinação dos valores de rendimento dos constituintes amiláceos das amostras de farinhas das VCLM, foram realizadas análises espectroscópicas (FT-IR) e quimiométrica das FAMs e FAPs.

### 4.3 Caracterização estrutural das FAMs e FAPs por espectroscopia vibracional de infravermelho (FT-IR) e análise quimiométrica

As frações amídicas (FAM e FAP) das 26 VCLM e dos cultivares comerciais foram analisadas por espectroscopia de FT-IR, visando a caracterização estrutural das mesmas.

Na **Figura 16** são mostrados os espectros adquiridos para as duas frações extraídas da variedade local Mato Grosso, onde pode-se observar os picos majoritários na região entre 3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup>.



**FIGURA 16** - Espectros de FT-IR (3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup>) das FAM e FAP da variedade local Mato Grosso.

A análise dos espectros das duas frações revela sinais de elevada intensidade associados à presença de lipídeos (2924, 2855, 1743 ondas.cm<sup>-1</sup>), proteínas (1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>), carboidratos (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>) e de compostos de origem aromática (sinais

entre 1700-2000 e 600-800  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ). Na região compreendida entre 2800-1750  $\text{ondas.cm}^{-1}$  foram detectados sinais de fraca ou média intensidade consoante à variedade.

Os sinais espectrais de FT-IR das amostras de FAM e FAP estão apresentados na **Tabela 3**.

**TABELA 3** - Sinais espectrais de FT-IR (3000 – 600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) das amostras de FAM e FAP\* de 26 VCLM e dos cultivares comerciais.

<i>FAM</i>	<i>FAP</i>	<i>Amilose commercial</i>	<i>Amilopectina comercial</i>
2924	2924	2927	2927
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2897	2888
2855	2854	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
1743	1743	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1682
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1669
1650	1645	1643	1649
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1637
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1574
1555	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1558
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1540
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1520
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1507
1450	1450	1453	1455
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1410	1419
1370	1370	1368	1361
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1336	1338
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1297	<i>n.d.</i>
1240	1240	1241	1244
1205	1205	1207	1207
1149	1149	1149	1148
1104	1105	1101	1105
1070	1076	1076	1077
1058	<i>n.d.</i>	1050	1043
1018	1014	1018	<i>n.d.</i>
999	995	999	996
933	933	933	930
860	853	860	860
<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	793	793
760	760	760	760
<i>n.d.</i>	706	709	709

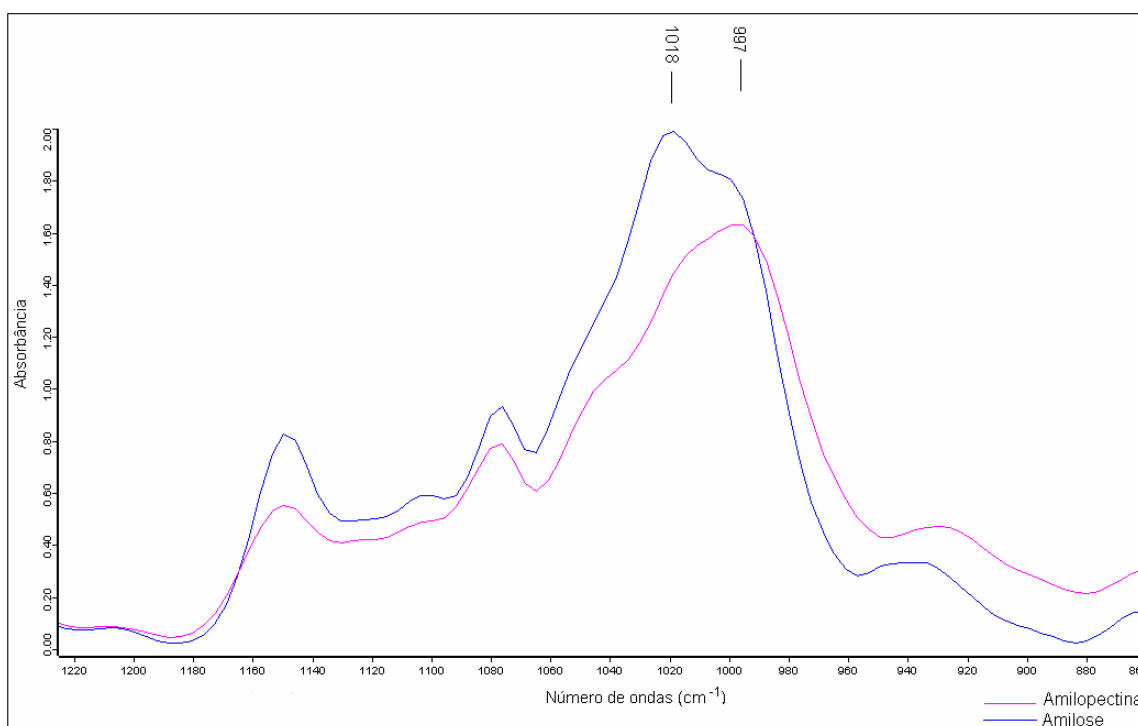
\* cinco espectros adquiridos/amostra; *n.d.*= não detectado

A análise comparativa da FAM entre as variedades revelou diferenças quanto à presença ou ausência dos sinais em todas as regiões do espectro. Foram encontradas no espectro da FAM da variedade local Cateto Vermelho, por exemplo, 66 bandas, enquanto apenas 23 sinais foram detectados para a variedade Amarelão. Por outro lado, a comparação dos perfis espectrais da FAP das variedades em estudo mostrou menor grau de distinção, tendo sido detectados 33 sinais no espectro da variedade local Pixurum 5, enquanto o cultivar comercial *Pioneer 3069* apresentou 23 bandas na mesma fração.

Um segundo aspecto importante decorrente da análise dos perfis espectrais de FT-IR das FAMs e FAPs refere-se à possibilidade de distinção destas duas frações amídicas. Para tal, espectros de FT-IR de um padrão de amilose (Sigma – MO – USA) e amilopectina (Fluka) foram obtidos e comparados aqueles das amostras. Os sinais encontrados nos padrões comerciais estão mostrados na **Tabela 3**, onde é possível verificar que as bandas 2927, 1650, 1450, 1370, 1240, 1205, 1149, 1105, 1076, 1050, 1018, 999, 933 e 860  $\text{ondas.cm}^{-1}$  estão presentes nas amostras de amilose e no padrão comercial. Para as amostras de amilopectina e o padrão comercial detectamos que, em comum, foram detectados os sinais 2927, 1650, 1450, 1370, 1240, 1205, 1149, 1105, 1076, 995, 930, 860, 760 e 709  $\text{ondas.cm}^{-1}$ .

Em um estudo similar, XIE *et al.* (2006), encontraram em perfis espectrais de FT-IR de amido as bandas 2931, 1350, 1150, 1080, 1022, 930, e 860  $\text{ondas.cm}^{-1}$  como sendo típicas daquele polissacarídeo, enquanto IRUDAYARAJ & YANG (2002) detectaram bandas em 2931, 1652, 1420, 1054, 930 e 857  $\text{ondas.cm}^{-1}$ .

Analisando a região de *fingerprint* para carboidratos (**Figura 17**), verifica-se que a banda em 1018  $\text{ondas.cm}^{-1}$  é característica do polissacarídeo amilose, enquanto aquela em 997  $\text{ondas.cm}^{-1}$  caracteriza a amilopectina.



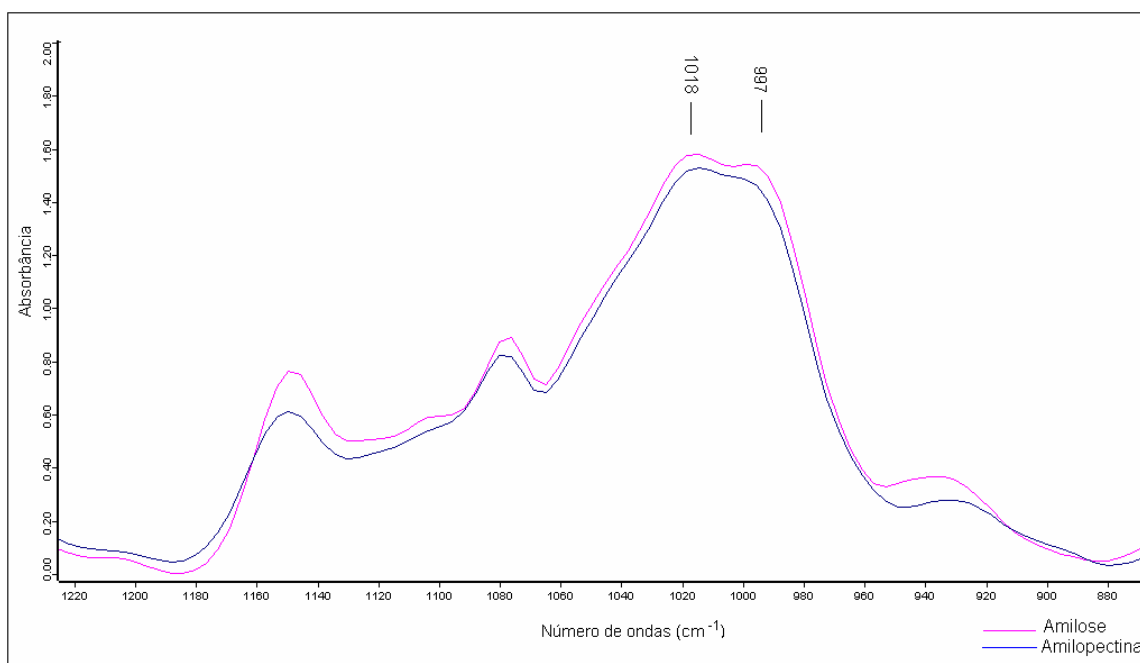
**FIGURA 17-** Espectros de FT-IR parciais (1230 – 860 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras comerciais de amilose (Sigma, MO – USA) (A) e amilopectina (Fluka).

Na FAM de todas as VCLM, exceto Cateto, Composto São Luis, Pixurum 1, Pixurum 6, Pires, Rosado e Roxo Valdecir, o perfil espectral do padrão de amilose comercial (Sigma, MO – USA) entre 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup> foi observado, com destaque à presença do sinal mais intenso em 1018 ondas.cm<sup>-1</sup>. Nas variedades citadas e nas amostras dos cultivares comerciais AS-3430, AG-9090 e *Pioneer* 3069 o perfil espectral da FAM foi similar ao observado para o padrão de amilopectina (Fluka). Esse resultado sugere o maior conteúdo do polímero amilopectina em relação à amilose na fração precipitada com etanol naquelas variedades.

A análise visual dos espectros das FAPs e o da amilopectina comercial (Fluka) revelou pequena semelhança entre os mesmos, onde o sinal em 997 ondas.cm<sup>-1</sup>, típico daquele polissacarídeo, foi detectado como a banda majoritária apenas para as variedades comerciais AS-3430, *Pioneer* 3069, AG-9090 e para as VCLM Branco, Cateto, Mato Grosso, Moroti, Pixurum 6, Pixurum 7, Palha Roxa 2 e Rosado. Entretanto, cabe ressaltar que o sinal em 1018 ondas.cm<sup>-1</sup> esteve presente em todas as amostras em menor intensidade, ou na mesma

intensidade que a banda indicadora de amilose ( $997 \text{ ondas.cm}^{-1}$ ). A presença de ambos os sinais nesses espectros permite sugerir que essa fração não se encontra pura no seu constituinte amiláceo, mas que a detecção simultânea dos mesmos é possível pela fácil distinção das bandas no espectro (**Figura 17**).

Os espectros da FAP das demais variedades (Amarelão, Asteca, Composto São Luis, Cunha, Cateto Vermelho, Língua de Papagaio, Mato Grosso Palha Roxa, MPA1, MPA2, MPA13, Pixurum 1, Pixurum 4, Pixurum 5, Pires, Palha Roxa do Emílio, Rajado 8 carreiras, Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir e dos cultivares comerciais *BR106* e *BRS-1030*) assemelharam-se ao perfil espectral da amilose comercial (Sigma, MO – USA), apresentando um sinal típico daquele polissacarídeo em  $1018 \text{ ondas.cm}^{-1}$  um pouco mais intensa do que a banda em  $997 \text{ ondas.cm}^{-1}$  (**Figura 18**). Esses resultados sugerem que nessas variedades o amido é constituído por um baixo conteúdo de amilopectina e que o protocolo de extração utilizado não foi suficientemente adequado à extração de toda a amilose.

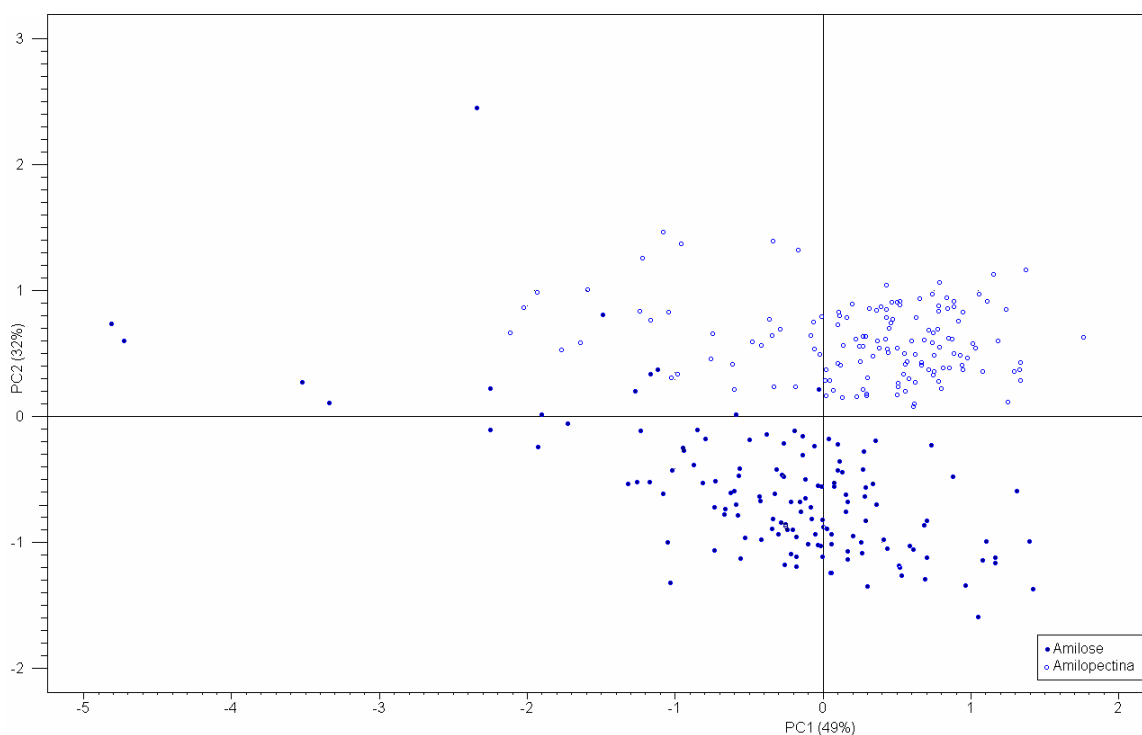


**FIGURA 18-** Espectros de FT-IR na região entre  $1230 - 800 \text{ ondas.cm}^{-1}$  de fração amilose e amilopectínica da variedade local Asteca.

De forma subsequente à interpretação dos espectros de FT-IR procedeu-se a determinação dos componentes principais (PCA) do conjunto de dados, visando maximizar a obtenção de informações. Esta técnica estatística é simples, rápida e de interesse à distinção



dos polímeros em estudo (amilose e amilopectina) em amostras de produtos derivados de milho. Portanto, com o objetivo de determinar o grau de similaridade das duas frações (amilose e amilopectina), foram calculados os componentes principais a partir do conjunto de dados da janela espectral entre 1800-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . A **Figura 19** mostra a dispersão das variáveis em estudo (amilopectina/amilose) ao longo dos eixos dos componentes principais 1 e 2, os quais contribuíram para explicar em 81% a variância presente nos dados. A análise da **Figura 19** revela a separação das amostras em dois grupos, com as amostras da FAM ocorrendo predominantemente em PC2 negativo, enquanto na região positiva do mesmo foram agrupadas as amostras da FAP. As amostras da FAM em PC2 + correspondem àquelas onde a distinção das bandas em 1018 e 997  $\text{ondas.cm}^{-1}$  não se assemelhou ao perfil do padrão comercial de amilose, quais sejam Mato Grosso, Rosado, Pixurum 5, Cateto Vermelho e BRS1030.

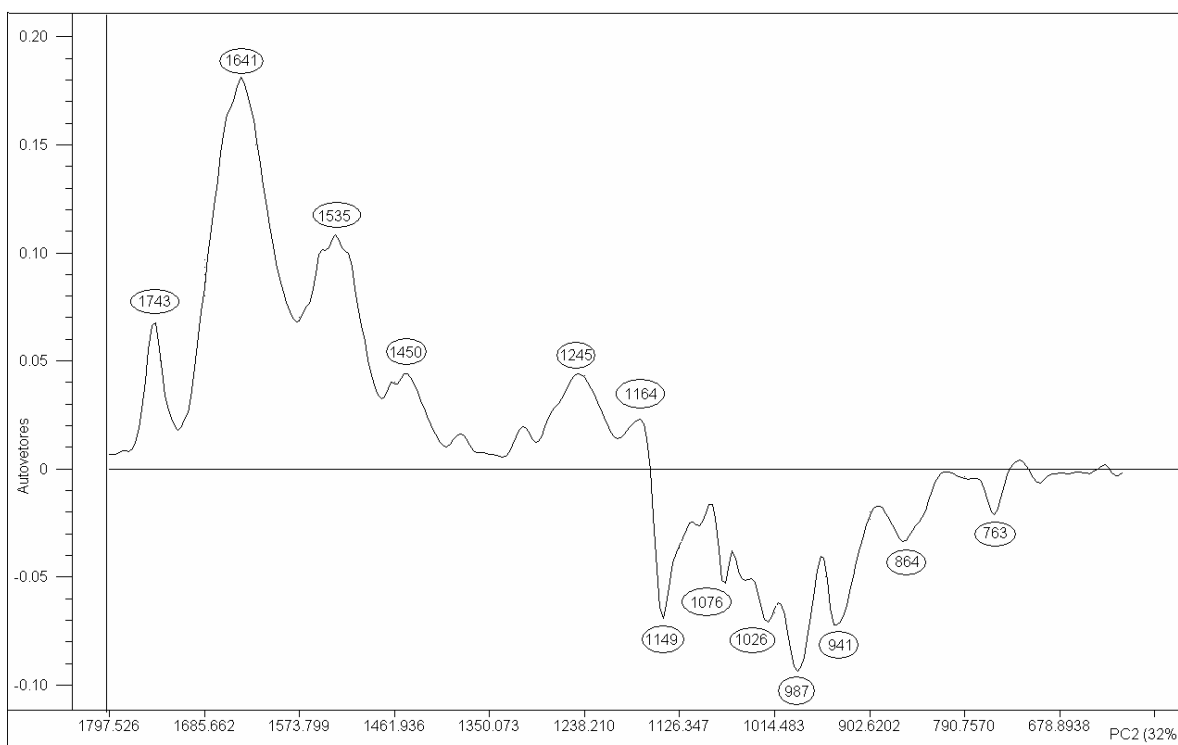


**FIGURA 19** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (1800-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) da FAM e da FAP de 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

No estudo realizado por DUPUY *et al.* (1997), a mesma estratégia analítica, isto é, espectroscopia de FT-IR associada à quimiometria, foi usada para classificar amostras de

amido modificados e não modificados. Os autores verificaram que a banda com maior contribuição à separação das amostras foi a 1014 ondas.cm<sup>-1</sup>.

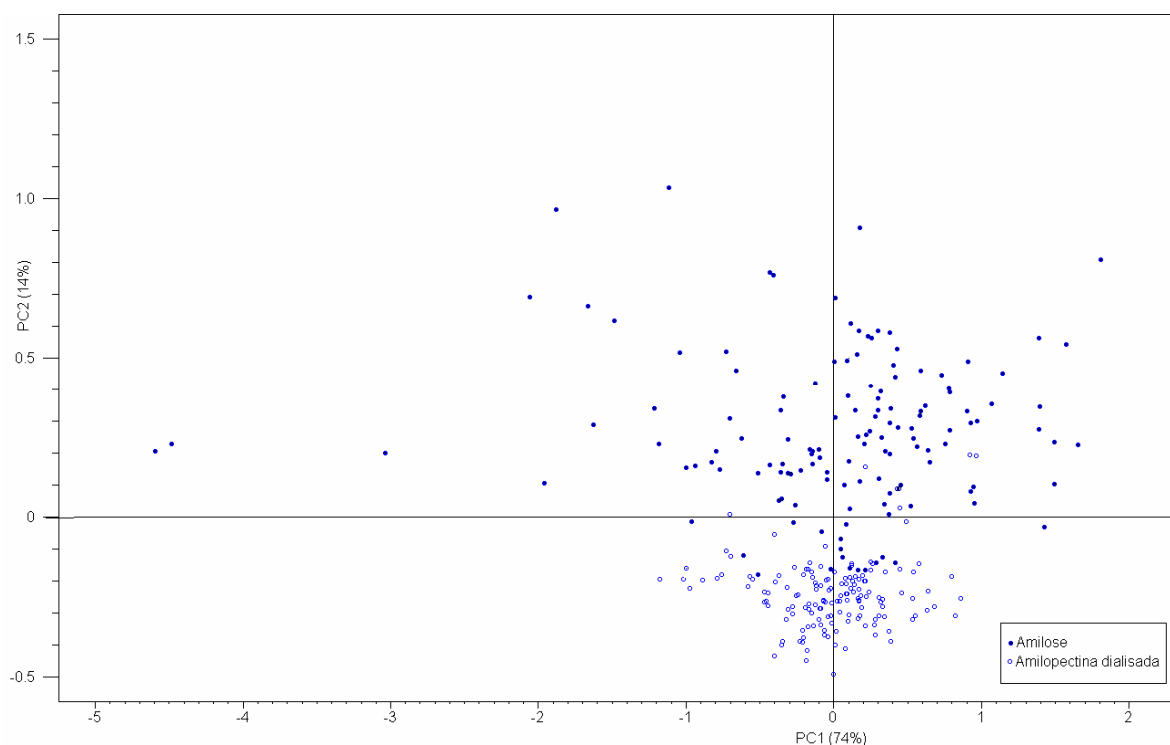
No presente estudo, a análise do perfil espectral de FT-IR dos dados agrupados em PC2 negativo (**Figura 20**) sugere que o primeiro grupo (FAP) foi agrupado pelos sinais característicos de carboidratos (1149, 1076, 1026, 987, 864 e 763 ondas.cm<sup>-1</sup>), enquanto o segundo grupo (FAM) principalmente pelos sinais característicos de compostos associados, como lipídeos e proteínas (1743, 1641, 1535, 1450, 1234 e 1164 ondas.cm<sup>-1</sup>). Portanto, um outro experimento foi realizado, onde as FAMs e FAPs foram comparadas via cálculo dos componentes principais para os dados espectrais da janela entre 1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>. Neste caso, não se detectou uma clara separação das duas frações (dados não mostrados), sugerindo que os compostos associados (contaminantes) foram determinantes à separação observada na **Figura 19**. Dessa forma, as amostras de amilopectina passaram por um processo de “*clean up*” para a retirada de compostos de baixo peso molecular fracamente associados aos polissacarídeos.



**FIGURA 20** - Contribuição fatorial de PC2 das FAMs e FAPs para os dados espectrais de FT-IR (1800-600 ondas.cm<sup>-1</sup>).

A comparação visual dos espectros de FT-IR para as amostras de amilopectina antes e após a diálise não revelou diferenças significativas quanto à presença ou ausência de sinais, embora as amostras tenham sido parcialmente separadas na análise por PCA para região espectral entre 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$  (dados não mostrados). Diante disso, procedeu-se subsequentemente a análise dos componentes principais dos dados espectrais da FAM e da FAP dialisada para a região de *fingerprint* de carboidratos.

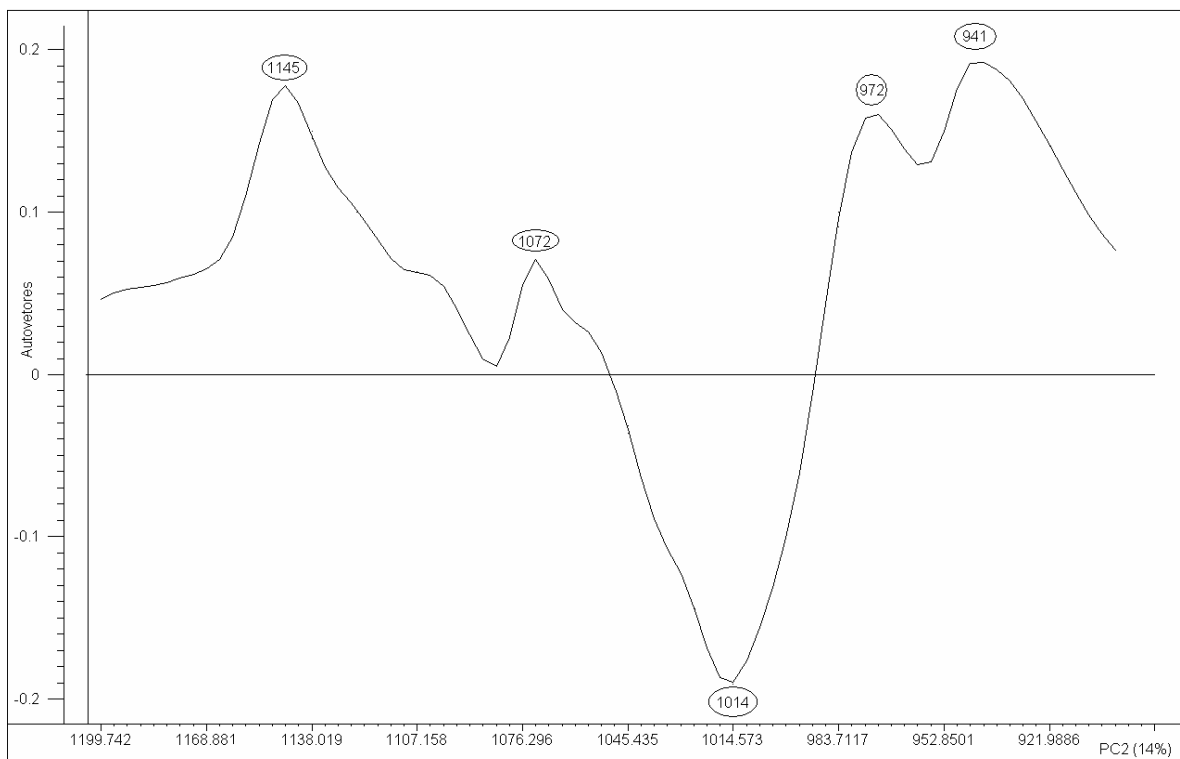
A **Figura 21** mostra a classificação dos componentes principais para esses dados, onde PC1 e PC2 contribuem em 88% para explicar a variância dos mesmos. A análise do gráfico de distribuição fatorial revela a existência de uma separação ainda mais acentuada das amostras (amilose/amilopectina) em dois grupos, comparativamente aos resultados mostrados na **Figura 19**.



**FIGURA 21** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR nas janelas espectrais de 1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$  da FAM e da FAP dialisada das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.

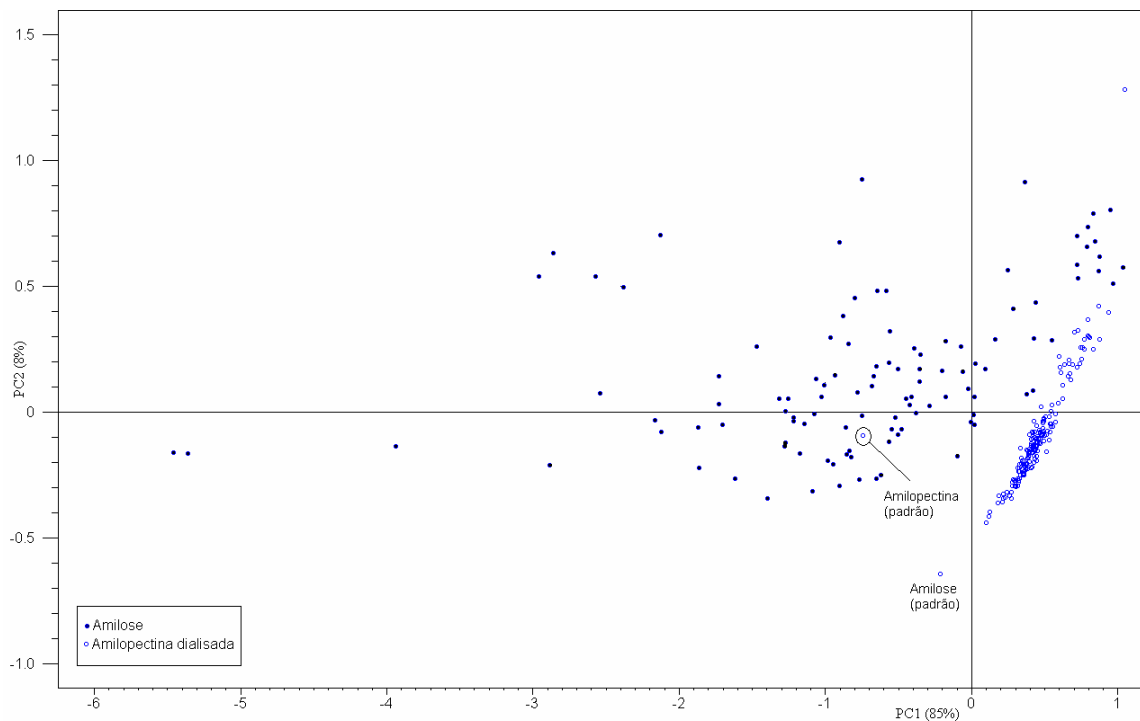
As amostras foram agrupadas ao longo do eixo de PC2, com a FAM situada em PC2 +, enquanto a FAP dialisada ocorreu em PC2 -. Observa-se ainda na **Figura 21** que os grupos (frações amídicas) distinguem-se em alguma extensão quando analisados separadamente, isto é, consoante às variedades em estudo, notadamente para as amostras de amilose, possivelmente em função de diferenças estruturais conferidas àquela macromolécula por constituintes associados (contaminantes). A análise da contribuição dos autovetores (**Figura 22**) indicou que o sinal em  $1014 \text{ ondas.cm}^{-1}$  caracterizou a amostra de FAP dialisada, enquanto a FAM foi melhor caracterizada pelas bandas em 1145, 1072, 972 e  $941 \text{ ondas.cm}^{-1}$ . Esse resultado não está de acordo com a interpretação dos espectros, onde foi possível observar uma banda majoritária em  $1018 \text{ ondas.cm}^{-1}$  e outra em  $997 \text{ ondas.cm}^{-1}$  para os padrões comerciais de amilose e amilopectina, respectivamente. Dessa forma, pode-se concluir que a presença de outros sinais na região de *fingerprint* para carboidratos detectados nas amostras obtidas a partir do fracionamento do amido modificaram o perfil espectral das mesmas. Sendo assim, o padrão de dispersão das amostras observado na **Figura 21** resultou em grande parte da presença desses outros compostos associados às frações amídicas.

Posteriormente, a análise dos componentes principais foi aplicada aos dados espectrais de FT-IR (janela espectral entre  $1200\text{-}950 \text{ ondas.cm}^{-1}$ ) com o intuito de se comparar as amostras de FAM e FAP dialisada extraídas das VCLM e dos cultivares comerciais com os padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka - **Figura 23**). Neste caso, a distribuição das amostras ocorreu principalmente pelo eixo PC1 que contribuiu para explicar em 85% a variância dos dados, enquanto PC2 contribuiu com 8%. As amostras de FAP dialisada, agrupadas em PC1 positivo e claramente separadas das amostras de FAM, revelaram elevado grau de similaridade entre si. Porém, tal estratégia analítica não logrou êxito no que se refere as amostras da FAP dialisada, a qual não se assemelhou a nenhum dos dois padrões comerciais de interesse.



**FIGURA 22-** Contribuição fatorial de PC2 das FAMs e FAPs dialisada para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>).

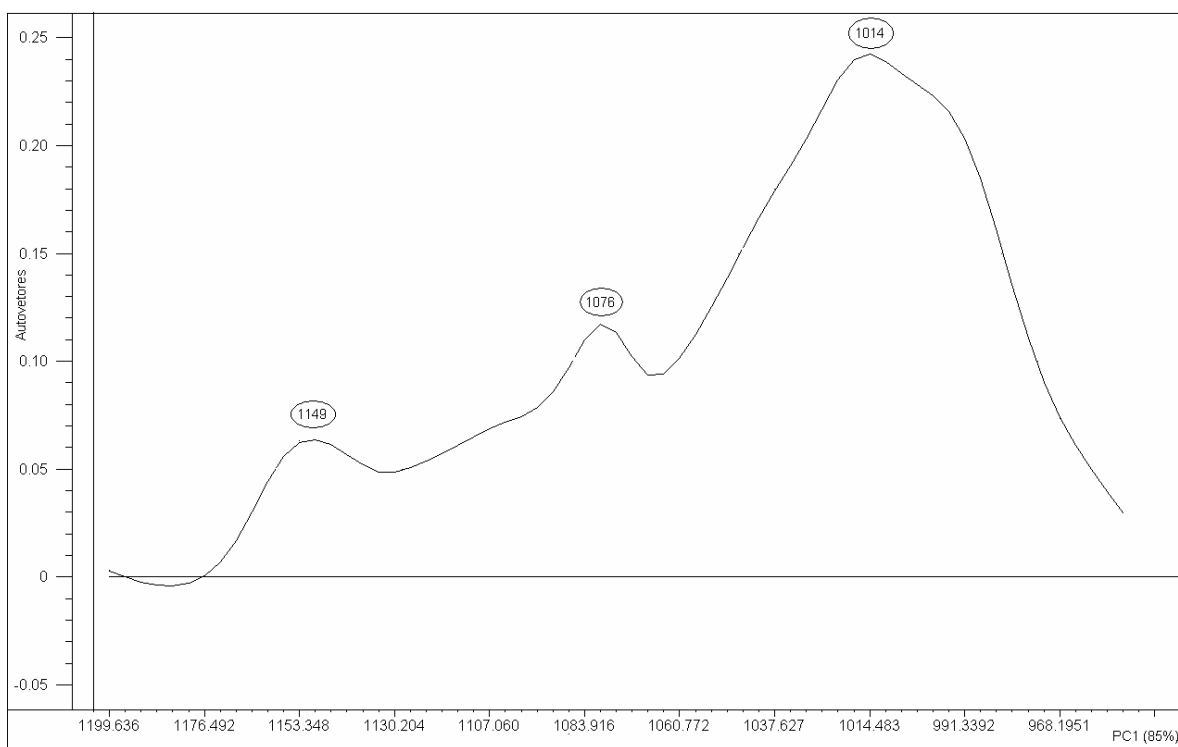
A distinção das amostras quando comparadas aos padrões comerciais pode ter ocorrido pela presença de outros carboidratos nessa fração, tais como celulose e pectinas, uma vez que os mesmos não foram retirados das amostras. Nesse contexto, o estudo realizado por COIMBRA *et al.* (1999), usando FT-IR e quimiometria para caracterização de polissacarídeos de parede celular de extratos de oliveira, revelou ser a banda em 1014 onda.cm<sup>-1</sup> predominantemente encontrada em polímeros de origem pécica.



**FIGURA 23** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>) da FAM e FAP dialisada de 26 VCLM, dos cultivares comerciais em estudo e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka).

Isso pode nos sugerir a presença de quantidades variáveis de polímeros de parede celular associados à FAP, uma vez que a remoção dos mesmos pela diálise, neste caso, não é efetiva. Além disso, a análise da **Figura 23** revela novamente a maior dispersão das amostras da FAM, com uma predominância das mesmas em PC1 negativo. Já o padrão comercial de amilose (Sigma), usando essa abordagem de análise, localizou-se em PC2 negativo e não agrupado às amostras da FAM extraídas das VCLM e dos cultivares comerciais. A separação do padrão comercial (Sigma) pode ser resultado da associação de compostos químicos ao mesmo, fato este indicado pela <sup>1</sup>H-RMN (*Capítulo 2*). Dessa forma, o padrão comercial (amilose) utilizado no presente estudo não apresenta elevado grau de pureza, ao contrário do que foi observado para o padrão de amilopectina comercial (Fluka) que agrupou-se à algumas amostras de FAM das variedades em estudo em PC1 negativo. A semelhança entre as amostras da FAM e o padrão comercial de amilopectina (Fluka) pode indicar a presença desse polímero nesta fração para algumas variedades, possivelmente devido ao elevado conteúdo do mesmo componente amiláceo daquela variedade. As bandas que contribuíram de forma

significativa para a classificação das amostras ao longo de PC1 foram 1149, 1076 e 1014  $\text{ondas.cm}^{-1}$  como mostrado na **Figura 24**.



**FIGURA 24-** Contribuição fatorial de PC1 das FAMs e FAPs dialisada das VCLM em estudos e dos padrões comerciais para os dados espectrais de FT-IR (1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo usando a espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), associada à análise de PCA, apontaram para a possibilidade do uso das mesmas na classificação de amostras de farinha de grãos inteiros ou degerminados e provenientes de diferentes variedades de milho. Por ser uma técnica rápida e simples, sugere-se a sua utilização no *screening* de farinhas com constituição química diferenciada, bem como em estudos que visam a investigação da diversidade química.

Da mesma forma, a associação de FT-IR com o PCA também demonstrou ser uma ferramenta de alto potencial e aplicabilidade em análises da estrutura química das frações

amídicas de VCLM. A análise dos espectros de FT-IR das mesmas mostrou que com o protocolo utilizado para extrair e fracionar o amido foram obtidas frações com constituição química diferenciada, sugerindo um aprofundamento na investigação das mesmas.

Tal abordagem analítica permitiu detectar perfis de maior similaridade estrutural para as FAPs em estudo, comparativamente às FAMs. De fato, a FAM das VCLM parece apresentar um perfil de variação estrutural superior ao observado para a FAP daquele germoplasma, sendo decorrente da associação daqueles polímeros com contaminantes e também pela proporção dos dois polissacarídeos que constituem a fração amídica no germoplasma em questão, ou ainda pela presença de polímeros de tamanho intermediário.

Além disso, a possibilidade de distinção dos polissacarídeos amiláceos via FT-IR, como demonstrado no presente estudo, é de interesse porque abre a perspectiva de quantificação desses constituintes em produtos derivados do milho, através da construção de uma curva padrão usando tal metodologia. Dessa forma, tornar-se-á possível a realização de estudos qualitativos e quantitativos de produtos derivados daquele cereal, tais como a identificação de amostras de farinha com características químicas para usos específicos de forma simples, rápida e com um custo não muito elevado.

Quando tomados em conjunto, os resultados do presente estudo apontaram para o potencial de aplicação do amido das VCLM no ramo industrial, ainda que estudos mais aprofundados sobre as características reológicas da farinha sejam necessários, como estratégia de detalhamento do potencial de uso daquela biomassa nesse setor.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOYER, C.D.; HANNAH, C. Kernel mutants of corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD- ROM.

BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho – Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, SP, 1993.

CERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; ROCHA, S.M.; DELGADILLO, I.; COPÍKOVÁ, J.; COIMBRA, M.A. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383–389, 2003.



COIMBRA, M.A.; BARROS, A.; RUTLEDGE, D.N.; DELGADILLO, I.; FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. **Carbohydrate Research**, v. 317, p. 145-154, 1999.

CUEVAS-RODRIGUEZ, E.O.; VERDUGO-MONTOYA, N.M.; ANGULO-BEJARANO, P.I.; MILAN-CARRILLO, J.; MORA-ESCOBEDO, R.; BELLO-PEREZ, L.A.; GARZON-TIZNADO, J.A.; REYES-MORENO, C. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 1072–1079, 2006.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, p. 129–136, 2003.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; KNUTSON, C.A. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 776-780, 1997.

DOWMEY, G. Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 418-424, 1998.

DUPUY, N.; WOJCIECHOWSKI, C.; TA, C.D.; HUVENNE, J.P.; LEGRAND, P. Mid-infrared spectroscopy and chemometrics in corn starch classification. **Journal of Molecular Structure**, v. 410-411, p. 551-554, 1997.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 347–354, 2005.

IRUDAYARAJ, J.I.; YANG, H. Depth profiling of a heterogeneous food-packaging model using step-can Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 25-33, 2002.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p., 2001.

LOZANO-ALEJO, N.; CARILLO, G.V.; PIXLEY, K.; PALACIOS-ROJAS, N. Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. **Innovative Food Science & Emerging Technology**, v. 8, p. 385-389. 2007.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOORE, C.O.; TUSCHHOFF J.V.; HASTINGS, C. W.; SCHANEFELT, R. V. Applications of starches in foods. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E.F. (Eds.). **Starch: Chemistry and Technology**. 2<sup>a</sup> ed., New York: Academic Press, p. 249-274, 1984.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.S.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.

POZO-INSFRAN, D.D.; BRENES, C.H.; SALDIVAR, S.S; TALCOTT, S.T. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. **Food Research International**, v. 39, p. 696–703, 2006.

RIDOUT, M.J.; GUNNING, A.P.; PARKER, R.H.; MORRIS, V.J. Using AFM to image internal of starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 123-132, 2002.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 387p., 1994.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p. 151-165, 2004.

TRACY, W.F. Sweet Corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed., London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD ROM.

VAIDYANATHAN, S.; GOODACRE, R. Proteome and metabolome analyses for food authentication. In: LEES, M. (Ed.). **Food authenticity and traceability**. Boca Raton, CRC Press, 2000. CD ROM.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J.R. Molecular Structure of Starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E.F. (Eds.). **Starch: Chemistry and Technology**. 2<sup>a</sup> ed., New York: Academic Press, p. 249-274, 1984.

WHITE, P.J. Properties of corn starch. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed., London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD ROM.

XIE, X.S.; LIU, Q.; CUI, S.W. Studies on the granular structure of resistant starches (type 4) from normal, high amylase, and waxy corn starch citrates. **Food Research International**, v. 39, p. 332-341, 2006.

XU, F.; SUN, R.C.; SUN, J.X.; LIU, C.F.; HE, B.H.; FAN, J.S. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

YANG, L.; XU, Y.; SU, Y.; WU, J.; ZHAO, K.; CHEN, J.; WANG, M. FT-IR spectroscopy study on variations of molecular structures of some carboxyl acids induced by free electron laser. **Spectrochimica Acta A**, v. 62, p. 1209-1265, 2005.

YOUNG, A.S. Fractionation of Starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E.F. (Eds.). **Starch: Chemistry and Technology**. 2<sup>a</sup> ed., New York: Academic Press, p. 249-274, 1984.

## *Capítulo 2*

## ANÁLISE DA FRAÇÃO AMÍDICA (AMILOSE E AMILOPECTINA) POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE $^{13}\text{C}$ ( $^{13}\text{C}$ -RMN) E DE $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ -RMN) E QUIMIOMETRIA

### 1 RESUMO

Os polissacarídeos amilose e amilopectina, principais constituintes dos grânulos de amido, possuem diversas aplicações no setor industrial, principalmente na área de alimentos, de papel e têxtil, embora suas propriedades funcionais possam variar com a fonte botânica. Devido à importância dessas macromoléculas para aquele setor, tem-se observado o crescente interesse na busca de novas tecnologias, bem como, de amidos diferenciados. No presente estudo, as características estruturais de amidos fracionados em amilose e amilopectina, através de uma metodologia rápida e simples, obtidos de 26 variedades crioulas e locais de milho (VCLM), de 5 cultivares comerciais e de 2 padrões comerciais (amilose-Sigma- e amilopectina – Fluka) foram investigadas utilizando a  $^1\text{H}$ -RMN e a  $^{13}\text{C}$ -RMN, associadas à análise dos componentes principais (PCA). Nos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fração sobrenadante rica em amilose (FAM) e do padrão comercial (Sigma) foram identificados os carbonos C1 a C6 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucose. Observou-se também, nos espectros das frações, deslocamentos químicos de intensidade variável (18 e 56 ppm) atribuídos a presença de lipídeos. A análise de PCA dos dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN revelou que as amostras se diferenciaram em função dos teores de lipídeos. Por outro lado, as ressonâncias em 100,9; 79,5 e 61,0 ppm mostraram-se características da amilopectina comercial (Fluka), não tendo sido as mesmas detectadas na fração do *pellet* rica em amilopectina (FAP), em função da baixa resolução espectral obtida. Os prótons dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucose foram detectados nas FAM e no padrão comercial, assim como, a ressonância associada à ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) que diferiu em intensidade. Através da análise de PCA ficou demonstrado que a FAM possui constituição química distinta, no que diz respeito à presença de contaminantes. A comparação dos perfis espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN da FAP com o padrão comercial (Fluka) revelou várias diferenças, principalmente na região de compostos alifáticos e aromáticos. No entanto, a análise de PCA desta fração revelou maior similaridade de composição química entre as mesmas quando comparadas à FAM. De modo geral, a  $^{13}\text{C}$ -RMN mostrou-se eficiente na elucidação estrutural das frações amídicas e a  $^1\text{H}$ -RMN constituiu-se em uma ferramenta analítica adequada à análise de amostras que possuem maior potencial de uso no setor industrial.

## 2 INTRODUÇÃO

O endosperma das sementes de milho é constituído majoritariamente por amido, um polissacarídeo de reserva fonte de energia para o desenvolvimento do embrião durante a germinação. Apesar da ampla distribuição desse polissacarídeo no Reino Vegetal, poucas plantas são usadas para a obtenção comercial do mesmo (WHITE, 2001). Nesse sentido, o milho destaca-se pela sua importância, sendo responsável por cerca de 80% da produção mundial (JOBILING, 2004).

O amido compreende dois homopolímeros de  $\alpha$ -D-glucose, a amilose e a amilopectina. A amilose é uma molécula linear, onde ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) são responsáveis pela união de seus monômeros. A amilopectina, por sua vez, é um polímero que possui várias ramificações, unidas à cadeia principal por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (JAMES *et al.*, 2003). A proporção dos polissacarídeos amilose e amilopectina na constituição do grânulo de amido varia com a origem botânica da espécie, com efeito determinante na reologia do mesmo (TESTER *et al.*, 2004).

Atualmente, o amido é o principal carboidrato encontrado na dieta dos seres humanos e de outros animais, sendo matéria-prima com diversas aplicações industriais, tanto no setor alimentício como no de adesivos (WHITE, 2001). A amilose, por exemplo, é um importante aditivo usado como espessante de pudins, massa de tomate e de outros alimentos processados, proporcionando formato e integridade aos mesmos. Da mesma forma, o emprego da amilopectina tem como finalidade conferir características de textura adequada como, por exemplo, a maciez e cremosidade aos alimentos enlatados e laticínios, ou melhorar a estabilidade de alimentos congelados e a aparência de alimentos secos (JOBILING, 2004; WHITE, 2001). No entanto, tendo em vista que o emprego do amido nativo pela indústria é limitado por este não apresentar as propriedades funcionais necessárias, é de grande interesse a descoberta de amidos que não necessitem de modificação. Dessa forma, germoplasmas que não tenham sido submetidos aos programas de melhoramento convencional e que vêm sendo cultivados por pequenos agricultores constituem um campo adequado de investigação, como observado no Município de Anchieta – região extremo-oeste do Estado de Santa Catarina. Neste município variedades de milho com características agrônomicas e nutricionais diferenciadas vem sendo desenvolvidas, em função do modelo de agricultura familiar adotado, já tendo sido identificadas cerca de 30 variedades crioulas e locais de milho (VCLM - OGLIARI & ALVES, 2006). Além disso, o uso de um protocolo de extração de grânulos de

amido e/ou de seus constituintes (amilose e amilopectina) que não necessite de solventes orgânicos, tal como o butanol, é de interesse pelo menor impacto ambiental causado (YOUNG, 1984).

Dessa forma, o presente estudo objetivou a proposição de uma metodologia rápida, simples e limpa de fracionamento dos grânulos de amido em amilose e amilopectina, obtidos de germoplasmas crioulos e locais de milho, cultivados no Município de Anchieta, e de variedades híbridas comerciais. Para a comparação das características estruturais das frações polissacarídicas utilizou-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , associada à análise dos componentes principais (PCA) dos dados espectrais.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção do material vegetal**

##### **3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM)**

Amostras de grãos de 26 VCLM foram resgatadas junto aos pequenos agricultores do município de Anchieta (região extremo oeste de SC) pelo Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar (SINTRAF) e repassadas ao grupo do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*-UFSC). As variedades Roxo do Valdecir, Rajado 8 carreiras, Palha Roxa 02, Rosado, Cateto Vermelho, Cateto, Pires, Palha Roxa 1 do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 07, MPA 13, Branco do Aldanir, Pixurum 04, Mato Grosso, Pixurum 06, Composto São Luis, Asteca, MPA 02, Pixurum 01, Cunha 01, MPA 01, Pixurum 05, Roxo do Emílio, Amarelão 03, Moroti e Língua de Papagaio foram utilizados no presente estudo.

##### **3.1.2 Cultivares Comerciais**

Amostras de grãos de cultivares comerciais recomendadas para a região Sul do Brasil foram utilizadas para efeitos de análise comparativa, a saber: *BRS1030*; *BR-106*; *AG-9090*; *Pioneer 3069* e *AS-3430*.

O cultivar *BRS1030* (Embrapa), um híbrido simples, é de ciclo precoce, com florescimento em 61 dias, de porte baixo, com grãos semi-duros de cor alaranjada. O cultivar *AG-9090* (Agrocere) é de ciclo precoce, com florescimento em 72-80 dias, com grãos semidentados, de cor alaranjada e com alto teor de óleo. *Pioneer 3069* é um híbrido simples,

de ciclo super-precoce. AS-3430 (Agroeste) é um híbrido triplo, de ciclo precoce, porte médio/alto que apresenta grãos duros de cor avermelhada.

### **3.2 Coleta e preparo das amostras**

Para cada variedade, amostras de grãos (50 g, peso seco) foram trituradas em moinho de laboratório (Cyclone Sample Mill - modelo 3010/019), utilizando-se peneira de 0,1mm. Após a moagem, as amostras de grãos foram imediatamente submetidas aos procedimentos experimentais de interesse, ou embaladas em sacos plásticos, sob vácuo, e mantidas a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **3.3 Extração e fracionamento do componente amídico em amilose e amilopectina**

A uma alíquota de farinha (3 g/variedade) foram adicionados 200 mL de água destilada/deionizada, seguido de agitação (20 min) e refluxo ( $80^{\circ}\text{C}$ , 1 h). As amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 30 min) e o sobrenadante precipitado com álcool etílico (96°GL, 5V – 12 h,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para a remoção da fração rica em amilose (FAM). O etanol foi removido por aspiração e a FAM mantida em estufa ( $55^{\circ}\text{C}$ ) até peso constante. O material precipitado após a centrifugação, contendo a fração rica em amilopectina (FAP), foi seco em estufa ( $55^{\circ}\text{C}$ ) até peso constante e, posteriormente, tamisado (80 mesh). A 200 mg da FAP bruta foram adicionados 6 mL de água destilada/deionizada, seguido de diálise da solução contra água destilada-deionizada (membrana de acetato de celulose, *cut-off* 10.000-12.000 MW, Sigma) por um período de 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.4 Determinação do conteúdo de proteínas associadas às FAMs**

A 40 mg de amostra foi adicionado 1 mL de água destilada/deionizada, seguido de incubação em banho-maria ( $45^{\circ}\text{C}$ , 4h). Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas (12.000 rpm, 15 min) e uma alíquota (300  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante foi utilizada para a determinação do conteúdo de proteínas, usando o método de BRADFORD (1976). Para efeitos de cálculo, utilizou-se uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA – 1 mg/mL – 0,025 mg/mL,  $r^2 = 0,93$ ;  $y = 2,1041x$ ).

### **3.5 Caracterização das FAMs e FAPs por ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ e análise quimiométrica**

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de RMN, no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (SP). Foram



obtidas medidas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  das amostras da FAM e de  $^1\text{H}$  das amostras da FAP das VCLM e dos cultivares comerciais, bem como dos padrões comerciais de amilose (Sigma A-7043) e de amilopectina (Fluka 10120), ambos extraídos e purificados de milho. Para tal, as amostras (50 mg) foram solubilizadas em  $\text{DMSO}-d_6$  (0,6 mL), e transferidas para tubos de RMN (5mm  $\varnothing$  interno). Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em equipamento Bruker DRX-400, operando em frequência de ressonância de 400,13/100,03 MHz (9,4 Tesla) de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , com um tempo de relaxação de 6,57s ( $^1\text{H}$ ) e 693ms ( $^{13}\text{C}$ ), 8/2000 varreduras ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , respectivamente), coletando-se 64.000 ( $^1\text{H}$ ) e 32.000 ( $^{13}\text{C}$ ) pontos para efeitos de processamento, a  $28^\circ\text{C}$ . Tetrametil-silano (TMS) foi usado como padrão interno. Uma função de multiplicação exponencial, com um fator de alargamento de linha (lb) de 0,3Hz ( $^1\text{H}$ ) e 3Hz ( $^{13}\text{C}$ ) foi aplicada ao FID, previamente à transformação de Fourier (MARASCHIN *et al.*, 2003). Os espectros foram processados utilizando-se o software XWin-NMR (versão 3.1, Bruker-Biospin – Rheinsteten, Germany) e analisados com o auxílio do software Topspin (versão 1.3). A análise dos componentes principais das amostras foi aplicada ao conjunto total de ressonâncias dos espectros ( $^1\text{H}$ , 0 - 12,471ppm e 0 - 234,391ppm -  $^{13}\text{C}$ ), utilizando-se o software The Unscramble (versão 9.1).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 $^{13}\text{C}$ -RMN

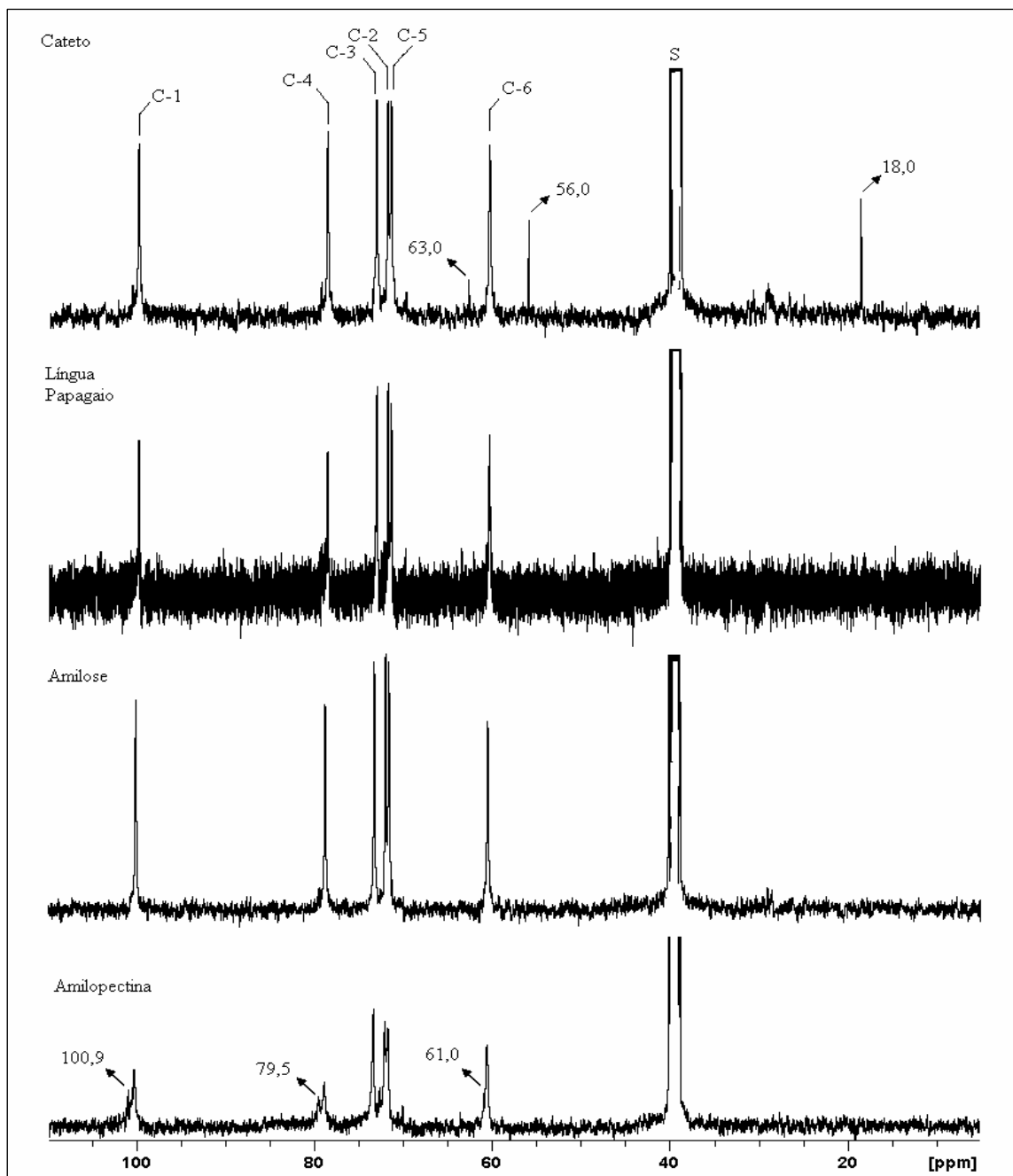
Os espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN das amostras da FAM das VCLM e dos cultivares comerciais, assim como, dos padrões comerciais, mostraram sinais bem resolvidos e com deslocamentos químicos que estão de acordo com as informações descritas na literatura e disponíveis em bancos de dados para aquela macromolécula (DEBET & GIDLEY, 2006; [www.aist.go.jp/RIODB/SDBS](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS)). Como mostrado na **Tabela 1**, para todas as amostras, foram detectadas 6 ressonâncias relacionadas aos carbonos dos polissacarídeos que constituem o amido. O carbono anomérico da  $\alpha$ -D-glucose (C-1), por exemplo, foi detectado em 100,1 ppm, enquanto um sinal típico de C-6 foi observado em campo mais alto, 60,1 ppm. Os demais sinais encontrados, entre 71 ppm e 79 ppm, correspondem aos carbonos C-4 (79,2 ppm), C-3 (73,7 ppm), C-2 (72,4 ppm) e C-5 (72,1 ppm), constituintes do anel piranosídico da  $\alpha$ -D-glucose (GORIN, 1981; QIT *et al.*, 2003 - **Tabela 1**).

A **Figura 1** mostra as ressonâncias de  $^{13}\text{C}$  detectadas nas amostras analisadas, consoante à posição estrutural daquele núcleo nos resíduos de  $\alpha$ -D-glucose.

**TABELA 1** - Deslocamentos químicos (ppm) de  $^{13}\text{C}$  das frações rica em amilose (FAM) extraídas de amostras de grãos de variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e de padrões daqueles polissacarídeos.

	<i>VARIETADES</i>	$\text{CH}_3\text{C}$	$\text{CH}_3\text{O} / \text{CH}(\text{NH})$	<i>C-1</i>	<i>C-4</i>	<i>C-3</i>	<i>C-2</i>	<i>C-5</i>	<i>C-6</i>
<i>Variedades Locais</i>	<i>Pixurum 06</i>	19,06	56,55	100,54	79,22	73,71	72,42	72,06	60,95
	<i>Pixurum 04</i>	19,05	56,56	100,52	79,20	73,71	71,62	72,04	60,95
	<i>Amarelão 03</i>	18,60	56,13	100,08	78,70	73,27	71,97	71,62	60,51
	<i>Composto São Luis</i>	18,60	56,10	100,10	78,79	73,26	71,98	71,62	60,51
	<i>Asteca</i>	18,60	56,11	100,09	78,78	73,27	71,97	71,61	60,52
	<i>MPA02</i>	18,61	56,10	100,09	78,78	73,25	71,99	71,61	60,51
	<i>Pixurum 01</i>	18,50	—	99,97	78,66	73,14	71,86	71,50	60,39
	<i>MPA01</i>	18,49	56,00	99,97	78,67	73,14	71,86	71,50	60,39
	<i>Cunha</i>	19,05	56,55	100,53	79,21	73,71	72,42	72,05	60,94
	<i>Pixurum 05</i>	18,60	56,10	100,09	78,78	73,26	71,97	71,61	60,50
	<i>Mato Grosso</i>	18,60	56,10	100,08	78,78	73,26	71,98	71,62	60,56
	<i>Cateto</i>	19,05	56,55	100,50	79,23	72,43	72,07	70,37	60,95
	<i>MPA13</i>	18,61	56,09	100,09	78,79	73,27	71,98	71,61	60,52
	<i>Moroti</i>	18,50	56,07	100,04	78,75	73,22	71,93	71,56	60,46
	<i>Pixurum 07</i>	18,61	56,10	100,09	78,79	73,27	71,99	71,62	60,51
	<i>Branco</i>	18,59	56,10	100,09	78,79	73,27	71,98	71,61	60,50
	<i>Cateto Vermelho</i>	18,59	56,11	100,08	78,77	73,25	71,97	71,6	60,49
	<i>Rosado</i>	—	—	100,08	78,77	73,26	71,97	71,61	60,5

<i>Variedades Locais</i>	<i>Pires</i>	18,48	56	99,97	78,65	73,14	71,85	71,49	60,39
	<i>Palha Roxa do Emílio</i>	19,06	56,54	100,5	79,22	73,7	72,42	72,05	60,94
	<i>Língua de Papagaio</i>	—	—	100,06	78,76	73,21	71,94	71,57	60,47
	<i>Mato Grosso P. Roxa</i>	19,05	56,55	100,5	79,23	73,7	72,43	72,06	60,95
	<i>Palha Roxa 02</i>	19,05	56,55	100,55	79,22	73,71	72,41	72,06	60,95
	<i>Rajado 8 carreiras</i>	19,06	56,54	100,52	79,21	73,69	72,42	72,05	60,92
	<i>Roxo do Valdecir</i>	—	—	100,08	78,78	73,25	71,96	71,59	60,48
	<i>Roxo do Emílio</i>	—	—	100,09	78,77	73,26	71,97	71,6	60,5
<i>Variedades comerciais</i>	<i>BRS1030</i>	18,6	56,09	100,09	78,79	73,26	71,97	71,61	60,51
	<i>BR106</i>	18,53	56,04	100,04	78,73	73,21	71,94	71,56	60,43
	<i>Pioneer 3069</i>	18,62	56,25	100,22	78,91	73,38	72,06	71,71	60,64
	<i>AG-9090</i>	18,55	56,06	100,05	78,76	73,23	71,95	71,58	60,47
	<i>AS-3430</i>	18,54	56,04	100,05	78,74	73,22	71,92	71,57	60,43
<i>Padrões</i>	<i>Amilose (Sigma)</i>	—	—	100,06	78,78	73,24	71,97	71,60	60,49
	<i>Amilopetina (Fluka)</i>	—	—	100,24	78,83	73,34	72,06	71,69	60,57



**FIGURA 1** – Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C da fração rica em amilose (FAM) das VCLM Cateto e Língua de Papagaio e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka) mostrando os sinais de maior intensidade. Os deslocamentos químicos associados aos carbonos da  $\alpha$ -D-glucose estão indicados como C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6. S = solvente (DMSO- $\delta_6$  39,5 ppm).

As amostras padrões (amilose e amilopectina comerciais) evidenciaram pequenas diferenças de perfis espectrais determinadas pelo efeito de ramificação do polissacarídeo amilopectina. Ressalta-se que as diferenças de resolução dos espectros dos padrões comerciais decorreram da dificuldade de solubilização da amilopectina, ainda que diversos solventes [ $D_2O$  – temperatura ambiente e  $45^{\circ}C$ ,  $D_2O$  e  $DMSO-\delta_6$  (70:30, v/v) e  $DMSO-\delta_6$ ] tenham sido testados. A melhor solubilização daquele polímero ocorreu em  $DMSO-\delta_6$ , permitindo a detecção dos sinais característicos de  $\alpha$ -D-glucose (100,1 ppm; 79,2 ppm; 73,7 ppm; 72,4 ppm; 72,1 ppm e 60,1 ppm). No entanto, para aquele polissacarídeo foram observadas outras ressonâncias além daquelas relacionadas a  $\alpha$ -D-glucose. Um sinal em 100,9 ppm, próximo ao sinal do C-1 (100,1 ppm) foi detectado, provavelmente originário do C-1 do resíduo de  $\alpha$ -D-glucose envolvido na ligação  $\alpha(1\rightarrow6)$  nos pontos de ramificação. Um perfil de  $^{13}C$  RMN similar a este foi observado em amostras de glicogênio hepático de coelho, o qual apresentou um grau de ramificação superior ao da amilopectina de cereais (GORIN, 1981). Foram detectados ainda, no padrão comercial de amilopectina, sinais em 61,00 ppm e 79,5 ppm, provavelmente relacionados ao C-6 de  $\alpha$ -D-glucose no ponto da ramificação do polímero relacionado e ao C-4 nas extremidades não redutoras (final das ramificações), respectivamente.

Analisando os espectros da FAM das VCLM e dos cultivares comerciais, verificou-se que os deslocamentos químicos que caracterizaram o padrão comercial de amilopectina (100,1 ppm; 79,5 ppm e 61,0 ppm) não foram detectados nas mesmas, o que nos permite sugerir que nenhuma das variedades analisadas possui teores deste polissacarídeo (amilopectina) detectáveis por  $^{13}C$ -RMN, considerando o protocolo de extração utilizado. Nessas amostras, além das ressonâncias características do resíduo de  $\alpha$ -D-glucose foram detectados deslocamentos químicos de intensidade variável entre 18 ppm e 31 ppm, 56 ppm e 62-63 ppm. Estas ressonâncias relacionam-se à presença de outros compostos associados à fração amídica como, por exemplo, a presença de compostos contendo grupamentos metila ( $-CH_3$ , 18 ppm), sugerindo a contaminação das FAM das VCLM com ácidos graxos e lipídeos (PERLIN & CASU, 1982). Além disto, as diferenças de intensidade detectadas para a ressonância em 18 ppm estão associadas, possivelmente, a ocorrência de lipídios em conteúdos distintos nos grãos do germoplasma em análise, os quais foram facilmente detectados visualmente durante o processo de extração. A presença de compostos de origem lipídica nessas amostras foi

também detectada nos espectros de FT-IR (*Capítulo 1*) e nos de  $^1\text{H}$ -RMN, como será descrito mais adiante (**Figura 2**). Tal fato é de interesse, por revelar uma característica importante das amostras das VCLM e por ter implicações diretas no uso do polímero pela indústria alimentícia. Isto porque, sabe-se que a associação de ácidos graxos ao grânulo de amido modifica seu comportamento reológico, retardando a gelatinização do grânulo (DEBET & GIDLEY, 2006; RAPHAELIDES & GEORGIADIS, 2006). É importante ressaltar que a gelatinização do grânulo de amido é um dos fatores de maior influência sobre as suas propriedades funcionais, incluindo melhorias na palatabilidade e aspectos sensoriais (D'APPOLONIA & MORAD, 1981). Estudos que visam à remoção dos componentes não glicídicos de amostras de amido vêm sendo desenvolvidos, recomendando o uso de tratamentos químicos a base de surfactantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS - DEBET & GIDLEY, 2006). Porém, cabe destacar que nas amostras das variedades Rosado, Língua de Papagaio, Roxo do Valdecir e Roxo do Emílio as ressonâncias em 18 ppm e 56 ppm não foram detectadas, sugerindo um maior grau de pureza para as mesmas.

Os outros deslocamentos químicos detectados nessa mesma região do espectro apresentaram fraca intensidade (24-32 ppm), tendo sido observados em todas as amostras analisadas e estando provavelmente associados à presença de ácidos orgânicos, tais como o ácido acético ( $\beta$ -CH<sub>3</sub>: 24,1 ppm - FAN, 1996) e o ácido propiônico ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>: 31,5 ppm - FAN, 1996). Esses resultados foram subsequentemente confirmados por  $^1\text{H}$ -RMN, porém, as ressonâncias que indicam a presença do grupo ácido carboxílico (COOH: 182,2 ppm e COOH: 185,7 ppm - FAN, 1996) nos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN não foram detectadas nos mesmos, indicando um baixo conteúdo de tais compostos nas amostras da FAM.

Os dados espectrais de  $^{13}\text{C}$ -RMN ainda sugerem a presença de contaminantes de origem protéica ou lipídica nas amostras da FAM, considerando a ressonância em 56 ppm observada em todas as amostras, a exceção das variedades Pixurum 01, Rosado, Língua de Papagaio, Roxo do Valdecir e Roxo do Emílio (**Tabela 1** e **Figura 1**). Essa ressonância está associada à presença de compostos contendo grupamentos CH-NH ou -OCH<sub>3</sub>, comumente encontrados em proteínas e lipídeos, respectivamente (PERLIN & CASU, 1982). Buscando elucidar tal aspecto, procedeu-se a extração e a quantificação de proteínas eventualmente associadas à FAM. A extração aquosa, a 40<sup>0</sup>C, revelou que as frações possuem conteúdos

distintos de proteínas associados ao polissacarídeo (**Tabela 2**), com uma amplitude de valores de 2,50 mg/g (Roxo do Valdecir) a 8,25 mg/g (Pixurum 1).

Os resultados da quantificação protéica na FAM não corroboraram a hipótese de que a ressonância em 56 ppm resulta da presença de proteínas ligadas à amilose, uma vez que nas variedades Roxo do Emílio, Língua de Papagaio, Rosado e Pixurum 1 o conteúdo de tais compostos não pode ser associado à ausência da ressonância nos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Portanto, assume-se que os deslocamentos químicos em 18 ppm e 56 ppm devem estar relacionados a compostos lipídicos associados à FAM.

De fato, a correlação dos resultados de  $^{13}\text{C}$ -RMN com a espectroscopia de FT-IR (*Capítulo 1*) indica a existência de compostos lipídicos nas amostras em análise, além de ácidos orgânicos, devido à presença de bandas de intensidade moderada na região de 1700  $\text{ondas.cm}^{-1}$  (deformação axial do grupo C=O). Além disso, a ausência de ressonâncias com intensidades elevadas em 175 ppm a 185 ppm nos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN reforça a hipótese de que a contaminação da FAM é principalmente de origem lipídica e não de ácidos orgânicos, uma vez que aquele deslocamento está associado ao carbono do grupo carboxila dos ácidos.

Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN da FAP das VCLM e dos cultivares comerciais também foram adquiridos, porém de difícil interpretação dada à baixa resolução observada, isto é, baixa relação sinal:ruído (dados não mostrados).

Esse resultado decorreu em função da dificuldade de solubilização dessa fração em solvente adequado à aquisição dos espectros, da mesma forma que para a amilopectina comercial (Fluka). Para aquelas amostras, apenas os carbonos referentes ao resíduo da  $\alpha$ -D-glucose foram detectados, resultado este que não exclui a presença da amilopectina nas mesmas (reação positiva ao teste de lugol, dados não mostrados), porém indica o baixo conteúdo do mesmo em relação aos demais compostos químicos.

**TABELA 2** - Conteúdo médio\* de proteínas (mg/g) nas frações rica em amilose (FAM) de amostras de grãos das variedades crioulas e locais e dos cultivares comerciais de milho.

	<i>VARIEDADES</i>	<i>FAM</i>
<b>Variedades Locais</b>	<i>Roxo Valdecir</i>	2,50±0,44
	<i>MPA 2</i>	3,22±0,29
	<i>Cateto</i>	3,64±0,14
	<i>MPA 13</i>	4,06±0,21
	<i>Asteca</i>	4,11±0,46
	<i>Mato Grosso</i>	4,32±0,52
	<i>L. Papagaio</i>	4,51±0,59
	<i>Palha Roxa</i>	4,64±0,75
	<i>Branco</i>	4,72±0,89
	<i>Pixurum 4</i>	4,81±0,24
	<i>Cateto Vermelho</i>	4,87±0,61
	<i>Rosado</i>	4,88±0,26
	<i>Palha R. Emílio</i>	4,94±0,15
	<i>MPA 1</i>	5,01±1,12
	<i>Pixurum 6</i>	5,05±0,25
	<i>C. S. Luis</i>	5,09±0,38
	<i>Moroti</i>	5,96±3,29
	<i>Pixurum 7</i>	5,97±0,25
	<i>Pixurum 5</i>	6,03±0,19
	<i>Mato Grosso P. Roxa</i>	6,58±0,04
	<i>Rajado 8 C.</i>	6,80±0,65
	<i>Pires</i>	6,84±0,30
	<i>Roxo Emílio</i>	7,22±0,97
	<i>Cunha</i>	7,44±0,26
	<i>Amarelão 3</i>	7,50±0,04
	<i>Pixurum 1</i>	8,25±0,17
<b>Variedades Comerciais</b>	<i>Pioneer 3069</i>	4,35±0,17
	<i>AG-9090</i>	4,37±0,22
	<i>AS-3430</i>	5,16±0,25
	<i>BR106</i>	6,46±0,47
	<i>BRS 1030</i>	6,57±0,01

\* Resultado médio de 2 extrações independentes



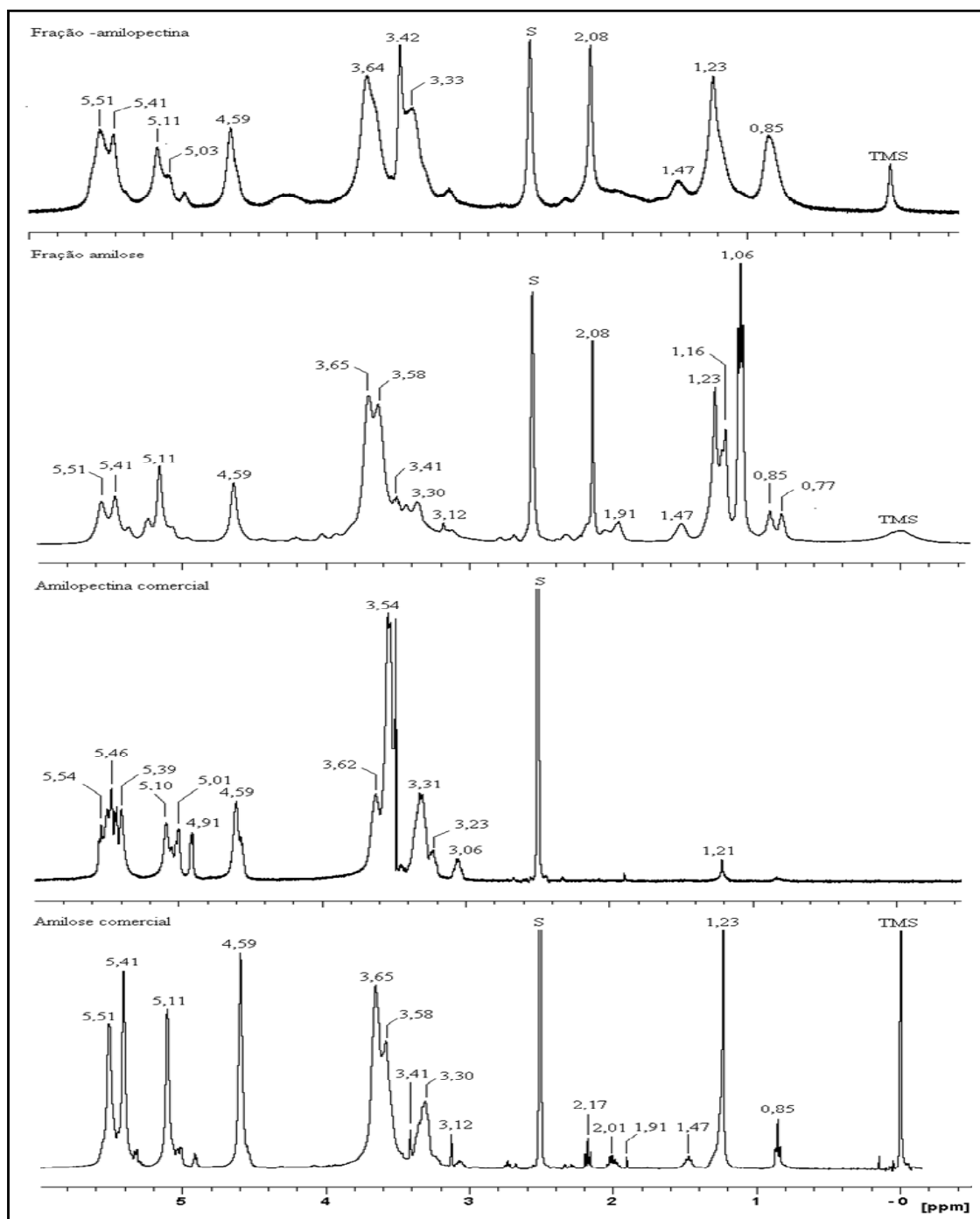
## 4.2 <sup>1</sup>H-RMN

Similaridades de perfis espectrais de <sup>1</sup>H-RMN foram observadas entre as amostras das frações amídicas em estudo, tanto para a amilose como para a amilopectina. No padrão comercial de amilose (Sigma) foram detectadas 15 ressonâncias bem resolvidas, de modo similar ao observado nas amostras da FAM das VCLM e dos cultivares comerciais (**Figura 2**).

Entre as amostras da FAM, as principais diferenças nos perfis espectrais ocorreram na região alifática (0,5 ppm a 3,0 ppm), principalmente no que se refere à presença ou à intensidade dos sinais detectados em 0,77 ppm, 1,06 ppm (triplete), 1,16 ppm e 2,08 (singleto) ppm. Neste caso, o triplete e o singleto dos deslocamentos químicos em 1,06 ppm e 2,08 ppm, respectivamente, indicaram a provável ocorrência dos ácidos propiônico e acético nas amostras (FAN, 1996), um fato decorrente, em alguma extensão, da contaminação microbiana dos polissacarídeos durante o período de armazenamento que antecedeu as análises.

Por outro lado, foram detectadas diferenças entre os perfis espectrais dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka) (**Figura 2**). Para a janela espectral de ocorrência de compostos alifáticos (0 - 3 ppm) um único sinal (s, 1,21 ppm) foi encontrado no padrão de amilopectina, enquanto o padrão de amilose apresentou 6 ressonâncias (0,85 ppm; 1,23 ppm; 1,47 ppm; 1,91 ppm; 2,01 ppm e 2,17 ppm), sugerindo a presença de compostos não amídicos associados aquele polímero. Os prótons dos resíduos de  $\alpha$ -D-glucose foram detectados, nos dois padrões comerciais, entre 3 e 5 ppm, através das ressonâncias em 5,1 ppm (H<sub>1</sub>), 3,54 ppm (H<sub>2</sub>), 3,68 (H<sub>3</sub>) e 3,41 ppm (H<sub>4</sub>) (KAJIWARA & MIYAMOTO, 1998).

Os <sup>1</sup>H envolvidos na ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 foram associados aos deslocamentos químicos em 5,41 ppm e 5,51 ppm, detectadas em ambos os padrões comerciais. Uma típica ressonância em 4,91 ppm, associada aos núcleos de <sup>1</sup>H envolvidos na ligação  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 (JODELET *et al.*, 1998), foi detectada na amostra do padrão comercial de amilopectina (Fluka) e também, com menor intensidade, na amostra comercial de amilose (Sigma), indicando que a amostra padrão deste último polissacarídeo não se encontra pura.



**FIGURA 2-** Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H da fração rica em amilose (FAM), e rica em amilopectina (FAP) (0 ppm a 5,7 ppm) da variedade Cateto e dos padrões comerciais de amilose (Sigma) e amilopectina (Fluka). S= solvente (DMSO- $\delta_6$  2,5 ppm).

Cabe destacar que nas amostras da FAM das VCLM e dos cultivares comerciais, a ressonância associada às ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (4,91 ppm) também foi detectada, porém apresentando intensidade variável consoante à amostra.

Em estudo similar, JODELET *et al.* (1998), constataram mudanças de perfis de <sup>1</sup>H-RMN na janela espectral entre 5,31 e 5,41 ppm de  $\alpha$ -dextrinas, as quais estavam associadas ao grau distinto de ramificação de amostras de amilopectina de milho.

No presente estudo, um perfil espectral distinto para essa mesma região também foi observado, comparativamente aos dois padrões comerciais, tendo sido detectadas 7 ressonâncias no espectro do padrão comercial de amilopectina e apenas 2 no padrão da amilose comercial.

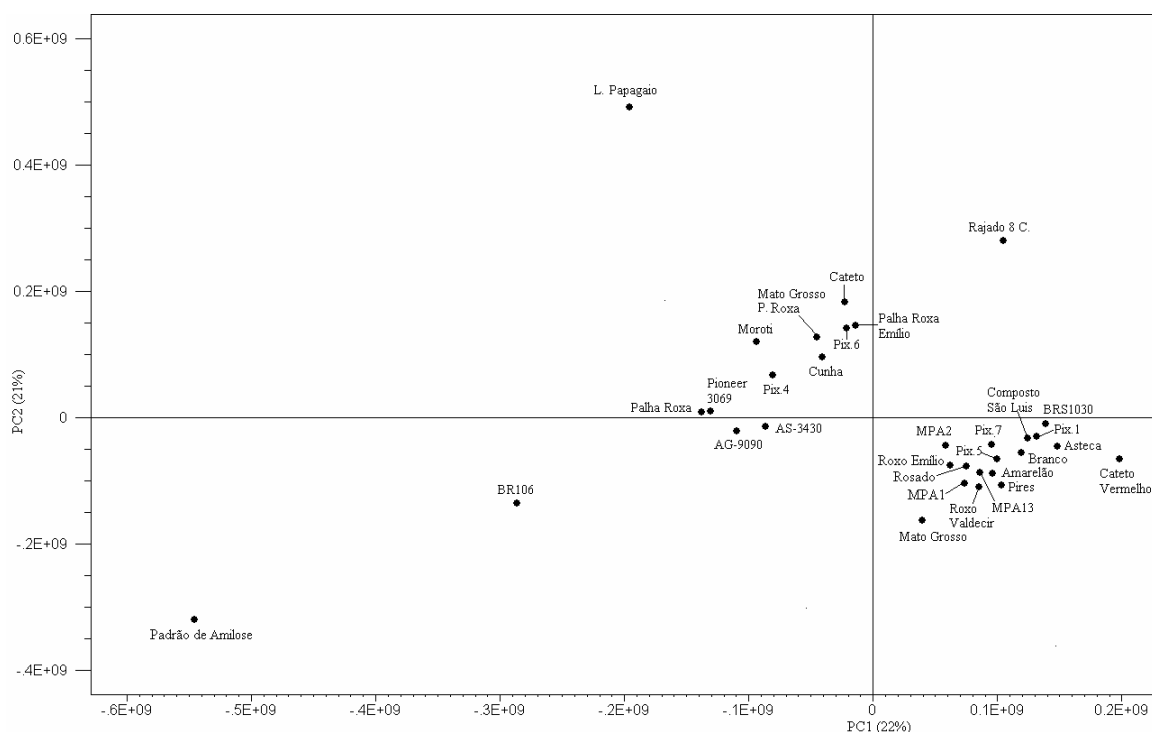
A FAP extraída das VCLM e dos cultivares comerciais mostrou um perfil espectral de <sup>1</sup>H-RMN parcialmente distinto do encontrado para o padrão comercial (Fluka), principalmente na região entre 5,41 e 5,51 ppm (**Figura 2**). De qualquer forma, esse resultado não exclui a presença da amilopectina na fração analisada, mas sugere um conteúdo elevado de outros constituintes químicos. Cabe ressaltar que outros polímeros de natureza protéica, hemicelulósica e compostos de baixo peso molecular (isto é, pigmentos) podem estar associados a esta fração, uma vez que tratamentos para a remoção dos mesmos não foram realizados. Ressonâncias em 6,63 ppm, 6,79 ppm, 7,02 ppm e 7,23 ppm (dados não mostrados) foram detectadas em todas as amostras da FAP, sugerindo a presença de compostos aromáticos que podem ser encontrados em proteínas e alguns pigmentos. Além disso, a ressonância em 2,08 ppm (CH<sub>3</sub> – FAN, 1996), associada ao ácido acético, também foi detectada nessas amostras, sugerindo sua eventual contaminação microbiana.

### **4.3 Análise quimiométrica – PCA**

#### **4.3.1 <sup>13</sup>C-RMN**

Subseqüente à análise dos perfis espectrais de <sup>13</sup>C-RMN e de forma similar ao tratamento estatístico aplicado aos dados obtidos com a utilização da espectroscopia de FT-IR (*Capítulo 1*), a semelhança estrutural química das FAMs das VCLM, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilose (Sigma) foi avaliada, utilizando-se a análise de componentes principais (PCA). Para essa análise procedeu-se a retirada, na matriz de dados,

dos sinais associados ao solvente utilizado para a solubilização das amostras e daqueles relativos aos ácidos orgânicos (24 ppm a 32 ppm). A **Figura 3** mostra a dispersão das variáveis em estudo segundo a determinação dos componentes principais (PCA) da matriz de dados obtida a partir dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

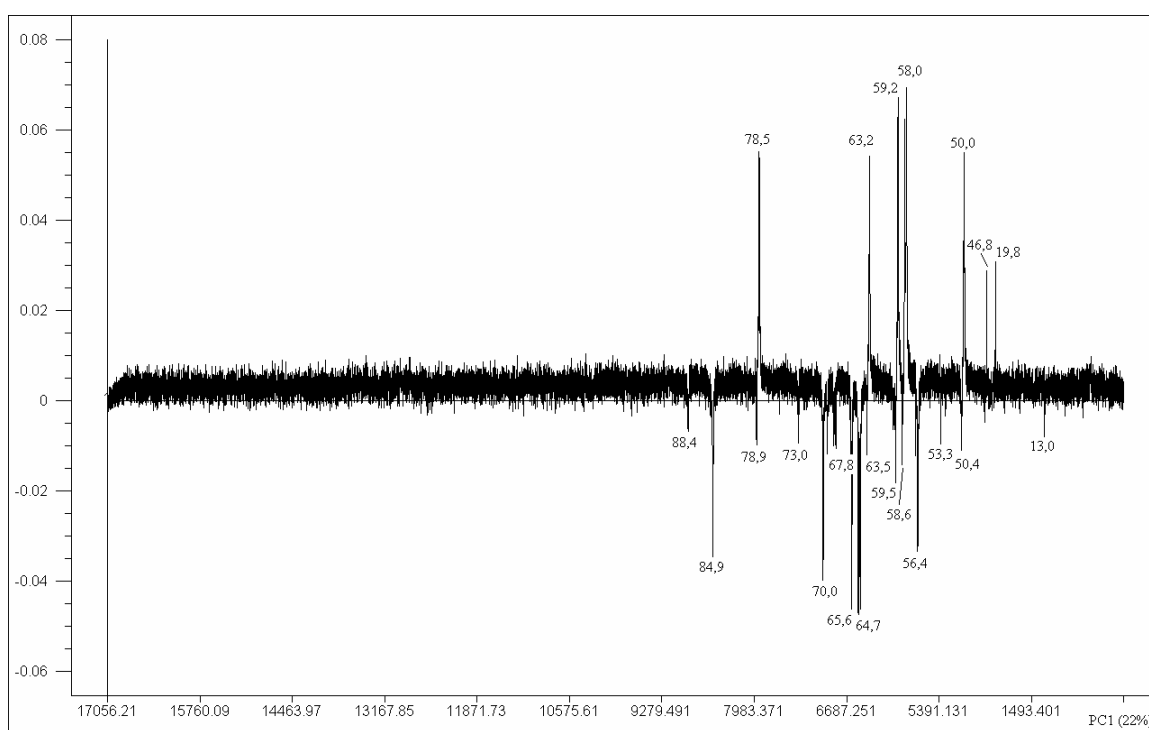


**FIGURA 3** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN (2 ppm a 200 ppm), da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilose (Sigma).

A análise do gráfico de distribuição fatorial (**Figura 3**) mostra que os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 43% a variabilidade encontrada nos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN, assim como revela a separação das amostras em dois grupos principais, em função de PC1 e de PC2. Um dos grupos localizou-se na região positiva dos eixos PC1 e PC2, enquanto o outro situou-se na região negativa de ambos.

Pode-se observar ainda na **Figura 3** que o padrão comercial de amilose (Sigma) ficou nitidamente separado de qualquer um dos grupos, possivelmente em função da ausência dos deslocamentos químicos presente nas demais amostras, principalmente em 18 e 56 ppm. Cabe destacar que a FAM das VCLM Língua de Papagaio e Rajado 8 carreiras e do cultivar comercial BR-106 não agruparam-se junto às demais amostras, sendo que a primeira

localizou-se em PC1 negativo e PC2 positivo, a segunda em PC1 e PC2 positivo e a terceira em PC1 positivo e PC2 negativo. A análise dos autovetores calculados a partir dos dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN revelou que a separação das amostras da FAM e do padrão comercial (Sigma) ocorreu em função de vários deslocamentos químicos (**Figura 4**). Dessa forma, as ressonâncias em 19,8; 46,8; 50,0; 58,0; 63,2 e 78,5 ppm agruparam parte das amostras em PC1 positivo, enquanto as ressonâncias em 13,0; 50,4; 53,3; 56,4; 58,6; 59,5; 63,5; 64,7; 65,6; 67,8; 70,0; 73,0; 78,9; 84,9 e 88,4 ppm contribuíram para o agrupamento das amostras em PC1 negativo, assim como o padrão comercial de amilose (Sigma).

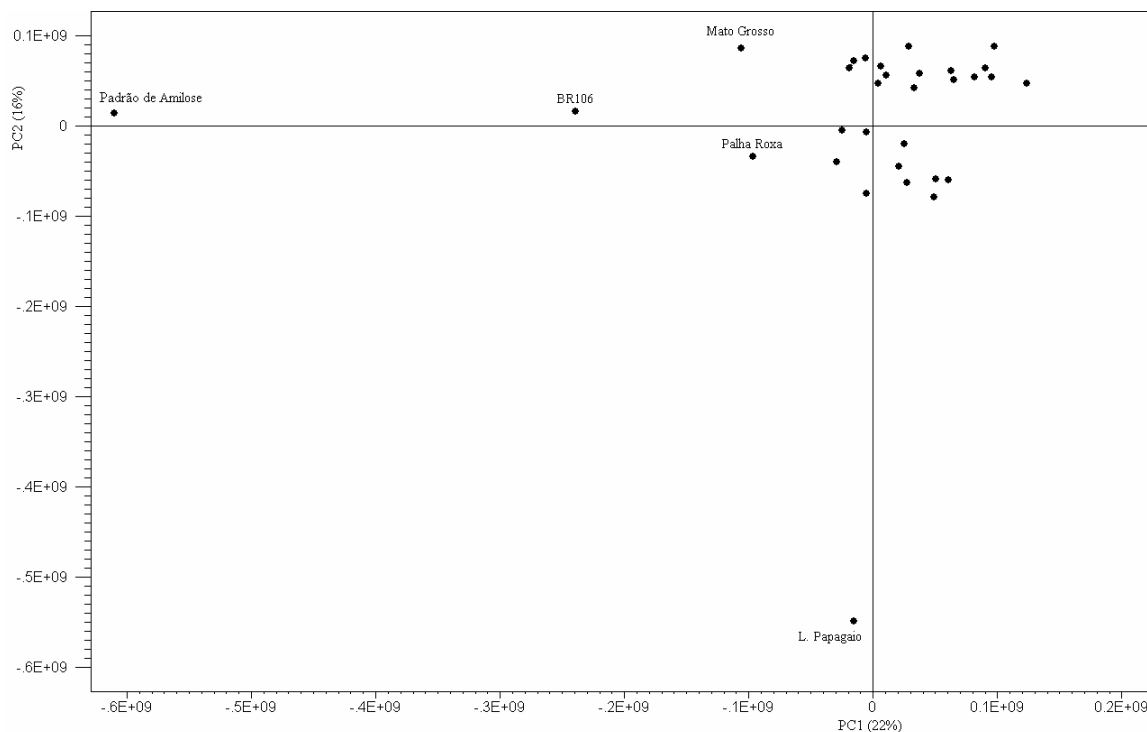


**FIGURA 4-** Contribuição fatorial de PC1 das amostras da fração rica em amilose (FAM) e do padrão comercial de amilose (Sigma), calculada a partir dos dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN para a região espectral compreendida entre 2 ppm e 200 ppm.

Apesar da contribuição fatorial destacar a participação de várias ressonâncias na separação das amostras, sugere-se que o padrão de distribuição observado na **Figura 3** está, provavelmente, correlacionado principalmente à presença e a intensidade dos deslocamentos químicos em 18 ppm e 56 ppm, originários de compostos lipídicos. Esta hipótese baseou-se no fato de ter-se observado durante o processo de extração diferenças proeminentes no conteúdo

de lipídeos entre as amostras (análise visual), o que de certa forma reflete os distintos teores de óleos nos grãos das VCLM e dos cultivares comerciais.

Com o objetivo de confirmar a importância da presença e da intensidade das ressonâncias em 18 e 56 ppm na separação das amostras (**Figura 3**), realizou-se um segundo procedimento experimental de PCA retirando-se aquelas ressonâncias da planilha de dados, o que resultou em um novo padrão de classificação das amostras (**Figura 5**).

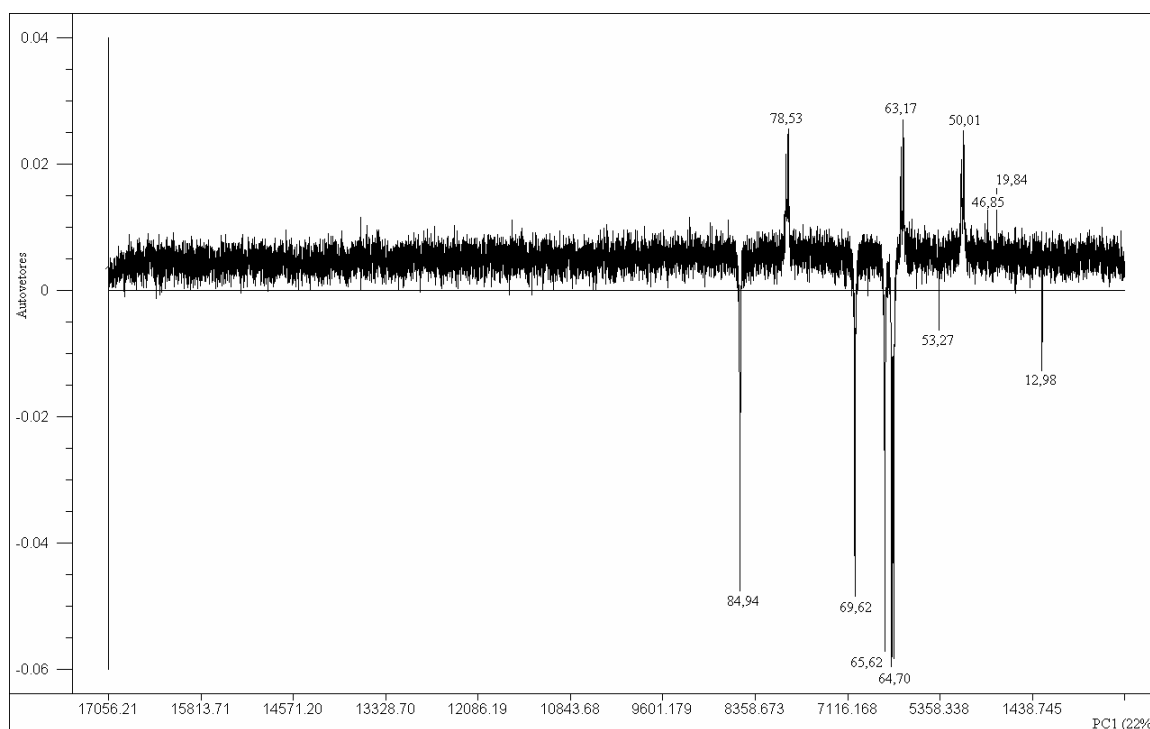


**FIGURA 5** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN obtida a partir dos dados espectrais da janela entre 2 ppm a 200 ppm, subtraída das ressonâncias em 18 ppm e 56 ppm, da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilo (Sigma).

Nesse caso, os eixos PC1 e PC2 contribuíram para explicar apenas 38% a variância total dos dados. Apesar disso, o padrão de classificação das amostras utilizando as contribuições dos componentes 3 (PC3 -13%), 4 (PC4 -11%) e 5 (PC5 - 7%) foi idêntico ao observado na **Figura 5**. Analisando a **Figura 5** verificamos que o padrão comercial de amilose (Sigma) distanciou-se das amostras da FAM extraídas das VCLM e dos cultivares comerciais, assim como observado na **Figura 4**, segundo o eixo PC1, localizando-se na região negativa do mesmo. A separação do padrão comercial de amilose (Sigma) ocorreu possivelmente pela ausência de sinais de baixa intensidade, principalmente na região entre 60 e 65 ppm,

detectados nas demais amostras. Todas as amostras das VCLM e dos cultivares comerciais agruparam-se em PC1 positivo e negativo, com exceção das amostras das variedades Língua de Papagaio que localizou-se em PC2 negativo e *BR-106* que distanciou-se do grupo formado pelas amostras em PC1 negativo.

Os resultados de autovetores (**Figura 6**) mostraram que a localização do padrão comercial de amilose (Sigma) e das variedades Palha Roxa, Mato Grosso, Moroti, Pixurum 4, Pires, Roxo do Valdecir, MPA1, *BR-106*, *AG-9090* e *AS-3430* em PC1 negativo ocorreu pela presença das ressonâncias em 12,98; 53,27; 64,70; 65,62; 69,62 e 84,94 ppm. Já as demais amostras reuniram-se em PC1 positivo por causa dos sinais em 19,84; 46,85; 50,01; 63,17 e 78,53 ppm. Como discutido anteriormente, possivelmente esses são deslocamentos químicos associados à presença de contaminantes em baixa concentração nas amostras da FAM.



**FIGURA 6-** Contribuição fatorial de PC1 para as amostras da fração rica em amilose (FAM) e do padrão comercial de amilose (Sigma), calculada a partir dos dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN (janela espectral 2 ppm a 200 ppm) após a retirada das ressonâncias em 18 ppm e 56 ppm.

Os resultados obtidos a partir da abordagem quimiométrica dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN reforçam a hipótese de que a fração amídica correspondente à amilose das variedades

analisadas possuem constituição química distinta no que diz respeito aos compostos lipídicos associados, uma vez que após a remoção dos mesmos nos espectros observou-se elevada similaridade entre as mesmas.

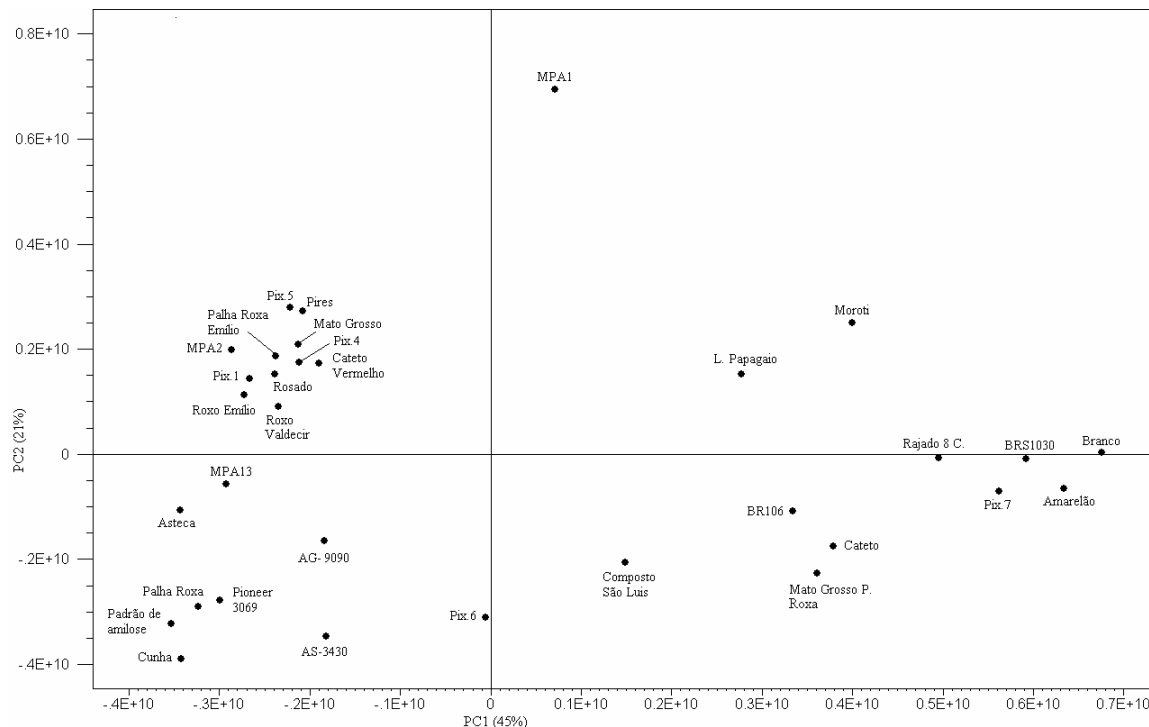
Nesse sentido, a FAM das VCLM Cateto Vermelho, Asteca, Branco, Amarelão, Pires, MPA1, MPA2, MPA13, Roxo do Valdecir, Roxo do Emílio, Mato Grosso, Rosado, Pixurum 1, Pixurum 5, Pixurum 7, Composto São Luis e o cultivar comercial *BRS1030* possuem maior semelhança na composição química em relação as demais (**Figura 3**). Assim, a partir do protocolo de extração e fracionamento do amido proposto neste estudo, foram obtidos polissacarídeos que distinguem-se em alguma extensão em suas características estruturais, um fato que sugere a necessidade de estudos mais detalhados quanto ao potencial diferenciado de uso destas macromoléculas na indústria alimentícia, por exemplo. Para tal, recomenda-se estudos posteriores destas biomassas relativos à investigação de seus comportamentos reológicos.

#### 4.3.2 1H-RMN

Os resultados da análise quimiométrica (PCA) dos espectros de 1H-RMN da FAM reforçaram a hipótese de constituição química distinta para as mesmas observada inicialmente a partir dos dados de 13C-RMN. Previamente à análise quimiométrica dos espectros de 1H-RMN (**Figura 7**), foram retirados da matriz de dados os sinais associados ao solvente (DMSO- $\delta_6$ , 2,05 ppm) e aqueles relativos aos ácidos orgânicos (propiónico - 1,06 ppm e acético - 2,08 ppm).

Na **Figura 7** pode-se notar que os componentes principais PC1 e PC2 explicam em 66% a variabilidade encontrada nos dados espectrais de 1H-RMN, havendo uma clara separação das amostras ricas em amilose (FAM) em três grupos. O grupo com maior semelhança química segundo essa abordagem incluiu as amostras das variedades Pixurum 1, Pixurum 4, Pixurum 5, Pires, Mato Grosso, Cateto Vermelho, Rosado, Roxo do Valdecir, Roxo do Emílio, MPA2 e Palha Roxa do Emílio, localizadas em PC1 negativo e PC2 positivo.

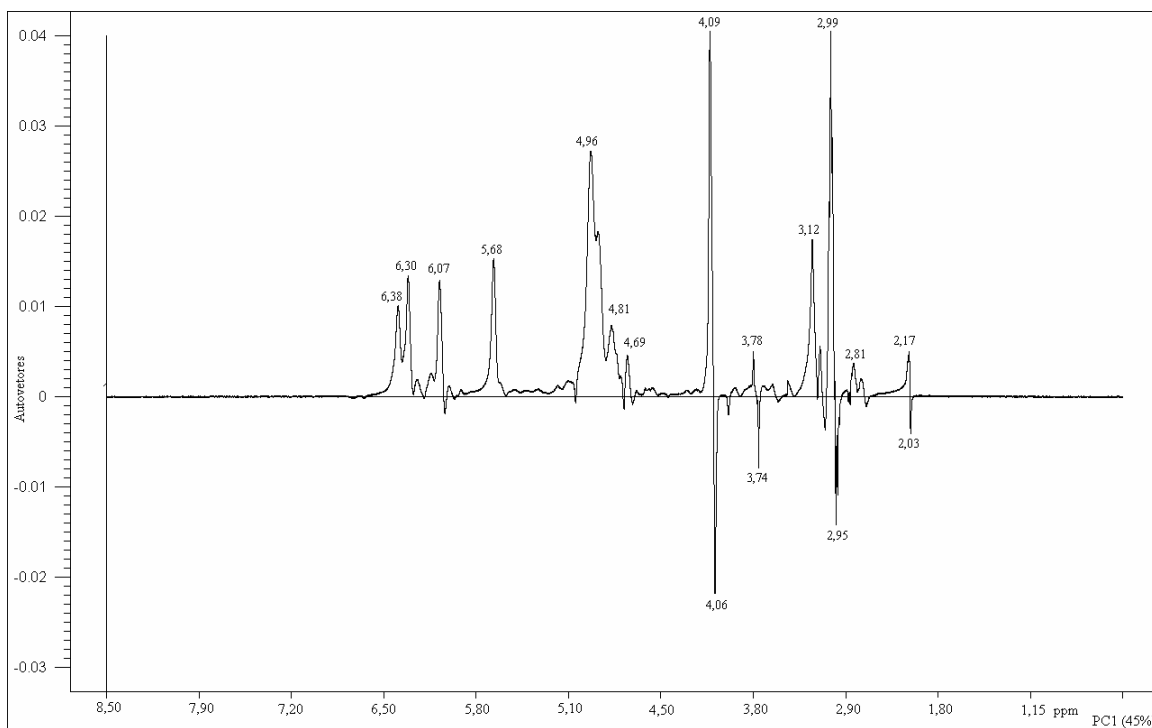




**FIGURA 7** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de 1H-RMN, para a janela espectral compreendida entre 0,5 ppm a 8,5 ppm da fração rica em amilose (FAM) das 26 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial (Sigma).

Por sua vez, um segundo grupo situado na região positiva de PC1 mostrou maior heterogeneidade, o que pode ser evidenciado pela dispersão das amostras (Branco, Amarelão, Pixurum 7, Rajado 8 carreiras, Cateto, Moroti, Língua de Papagaio, Mato Grosso Palha Roxa, Composto São Luis, BRS1030 e BR-106). Além disso, a FAM da variedade MPA1 comportou-se como um *outlier*, separando-se de todas as demais, enquanto as amostras das VCLM MPA13, Asteca, Pixurum 6, Palha Roxa, Cunha e dos cultivares comerciais *Pioneer* 3069, AG-9090, AS-3430 e do padrão comercial (Sigma) ficaram nitidamente separadas, agrupando-se em PC1 e PC2 negativo.

Os autovetores que resultaram na dispersão das variáveis segundo o eixo PC1 (**Figura 7**) estão mostrados na **Figura 8**, onde pode-se verificar que as ressonâncias em 2,17; 2,81; 2,99; 3,12; 3,78; 4,09; 4,81; 4,96; 5,68; 6,07; 6,30 e 6,38 ppm foram as responsáveis pela localização das amostras na região positiva do eixo, enquanto 2,03; 2,95; 3,74 e 4,06 contribuíram em maior extensão à região negativa.

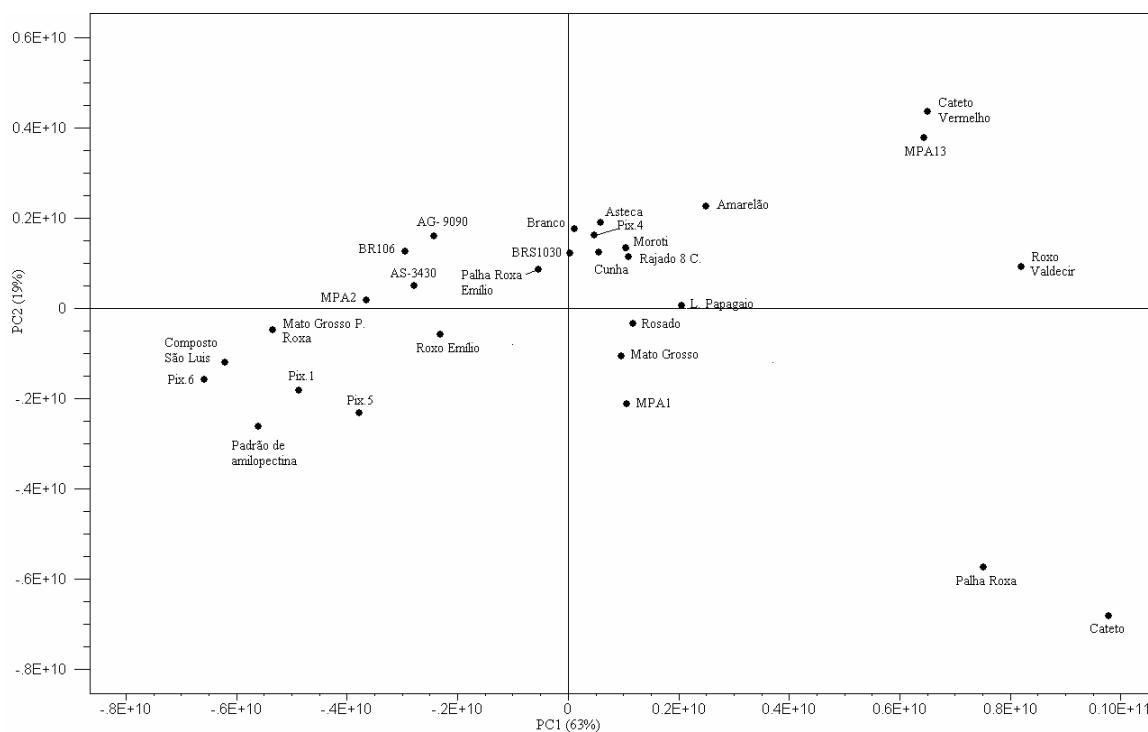


**FIGURA 8-** Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral: 0,3 ppm a 8,5 ppm) de amostras da fração rica em amilose (FAM) de VCLM e do padrão comercial de amilose (Sigma).

Esses deslocamentos químicos são atribuídos principalmente a compostos químicos contaminantes do material amostral, o que evidencia a importância dos mesmos na classificação das amostras. Portanto, a similaridade entre algumas amostras (Cunha, Palha Roxa, Asteca, MPA13, Pixurum 6, *Pionner*3069, AS-3430 e AG-9090) e o padrão comercial (Sigma) ocorreu pelo menor conteúdo de compostos químicos, isto é contaminantes, associados às mesmas. O menor conteúdo de contaminantes nessas amostras, provenientes de VCLM e de cultivares comerciais, pode indicar a utilização das mesmas pela indústria alimentícia, o que poderá ser confirmado a partir de estudos de reologia em andamento.

De maneira geral, o resultado da análise quimiométrica usando os dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN da FAM diferiu daquele obtido para  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Figura 3** e **Figura 7**), em função do maior número de ressonâncias detectadas nos primeiros, fato este resultante do maior número de  $^1\text{H}$  em relação a  $^{13}\text{C}$  nas amostras. A maior sensibilidade da primeira técnica justifica o seu uso, associada à quimiometria, em estudos que visem o *screening* de frações amídicas com constituição química diferenciada, voltada para um uso específico. A  $^1\text{H}$ -RMN tem ainda como vantagem o menor tempo de aquisição dos espectros, o que acarreta em um custo muito menor em relação à  $^{13}\text{C}$ -RMN.

A análise quimiométrica dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN da FAP resultou em um padrão de classificação distinto (**Figura 9**) ao observado para a FAM (**Figura 7**), evidenciando uma menor dispersão das amostras. Esse resultado sugere elevada similaridade entre as FAPs extraídas das diferentes variedades de milho no que diz respeito à sua composição química, exceto para as variedades Cateto e Palha Roxa que separaram-se das demais, localizando-se em PC1 positivo e PC2 negativo e para Roxo do Valdecir, MPA13 e Cateto Vermelho que localizaram-se no quadrante positivo destes eixos.



**FIGURA 9** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de  $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral entre 0,1 ppm a 7,5 ppm) da fração rica em amilopectina de 24 variedades crioulas e locais de milho, dos cultivares comerciais e do padrão comercial de amilopectina (Fluka).

Cabe destacar que as amostras Pixurum 7 e *Pioneer* 3069 não entraram nessa análise pela impossibilidade de solubilização de suas fração ricas em amilopectina em DMSO- $\delta_6$ . A espectroscopia de FT-IR (*Capítulo 1*) também revelou maior similaridade entre as FAPs do que entre as FAM, principalmente quando se utilizou para a análise quimiométrica apenas a região de *fingerprint* para polissacarídeos.

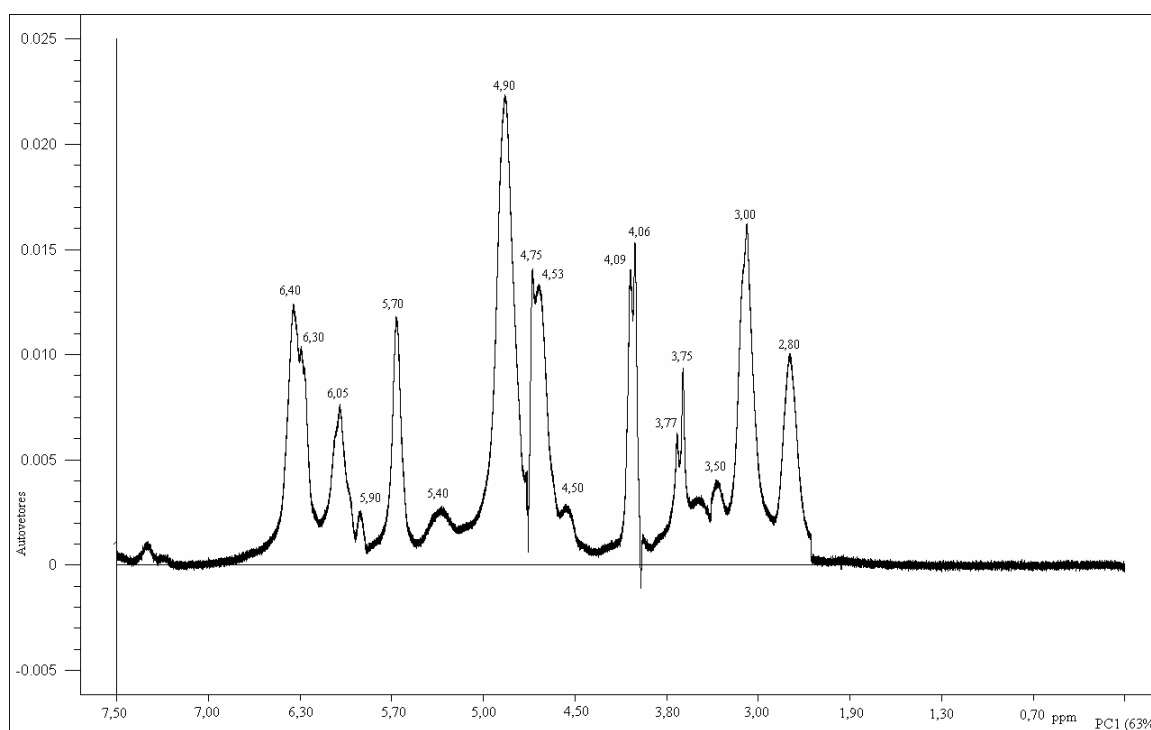
Além disso, a FAP das variedades Pixurum 1, Pixurum 5, Pixurum 6, Roxo do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa e Composto São Luis mostraram um perfil espectral semelhante ao do padrão comercial de amilopectina (Fluka), o que foi evidenciado pelo agrupamento das mesmas em PC1 e PC2 negativo (**Figura 9**).

Esses resultados podem sugerir um maior conteúdo deste polissacarídeo constituindo o amido nessas variedades, um aspecto a ser confirmado em estudos subseqüentes. A proporção amilose/amilopectina dos grânulos de amido tem influência direta sobre propriedades reológicas de elevada importância para a indústria alimentícia, tais como a gelatinização e a retrogradação. A gelatinização caracteriza-se pelo desarranjo molecular sofrido pelo amido quando este é aquecido na presença de água, permitindo a penetração daquele solvente e a hidratação dos segmentos lineares da amilopectina. (TESTER & MORISSON, 1990). Após a gelatinização do amido, normalmente sob condições de temperatura ambiente, inicia-se o fenômeno da retrogradação, que se caracteriza pelo rearranjo das moléculas através do restabelecimento de ligações do tipo pontes de hidrogênio (MUNHOZ *et al.*, 2004). Deve-se levar em consideração que a retrogradação das cadeias de amilose (JANE & ROBYT, 1984), assim como a re-agregação das cadeias de amilopectina, fenômeno denominado re-cristalização (CHANG *et al.*, 2004), conferem aos géis de amido mudanças estruturais que a longo prazo são indesejáveis, gerando características texturais indesejáveis aos alimentos que contêm aqueles polissacarídeos.

A separação das amostras ao longo de PC1 resultou da presença e intensidade de vários deslocamentos químicos como mostrado no gráfico de contribuição fatorial (**Figura 10**), não sendo possível atribuir a somente uma classe de compostos, ou a uma única região do espectro, o padrão de agrupamento observado. Isto se deve, provavelmente, ao fato da FAP ter uma estrutura química de maior complexidade, bem como estar associada a uma diversidade de compostos ainda maior, comparativamente à FAM. A maior diversidade de contaminantes na FAP era esperada, uma vez que esta fração consistiu do *pellet* obtido a partir da

centrifugação, após a etapa de extração aquosa do amido da farinha, muito provavelmente contendo além de proteínas, outros polissacarídeos de natureza estrutural, isto é, parede celular.

Além disso, é importante destacar que as frações amídicas dos cultivares comerciais não se diferenciaram das VCLM na análise de PCA a partir dos dados de  $^1\text{H}$ -RMN ou de  $^{13}\text{C}$ -RMN, revelando a aplicabilidade destas técnicas, independente da origem botânica do amido em análise.



**FIGURA 10-** Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados de  $^1\text{H}$ -RMN (janela espectral: 0,1 ppm a 7,5 ppm) de amostras da fração rica em amilopectina (FAP) e do padrão comercial de amilopectina (Fluka).

## 5 CONCLUSÕES

De maneira geral, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, especialmente a  $^1\text{H}$ -RMN, mostrou-se eficiente na detecção das diferenças de composição química de frações contendo amilose e/ou amilopectina extraídas de VCLM e de cultivares comerciais. O emprego de tais técnicas, associadas à análise de PCA, demonstrou que a fração rica em amilose (FAM) das variedades Cunha, Palha Roxa, Asteca, MPA13, Pixurum 6, AG-9090 e

AS-3430 é similar ao padrão comercial de amilose (Sigma). Tal resultado é de grande interesse, pois revela o potencial de uso das mesmas pela indústria alimentícia. De maneira similar, as amostras da fração rica em amilopectina (FAP) das variedades Composto São Luis, Pixurum 6, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 1, Pixurum 5 e Roxo Emílio se assemelharam ao padrão comercial de amilopectina (Fluka). Dessa forma, sugere-se o potencial de aplicação dessas variedades na indústria alimentícia, ainda que estudos mais aprofundados sobre as características reológicas sejam necessários, como estratégia de detalhamento do potencial de uso daquela biomassa nesse setor. Esses são resultados de grande interesse porque valorizam a diversidade genética do milho mantida pelos pequenos agricultores do extremo oeste de Santa Catarina e porque sugerem a possibilidade do uso dessa ferramenta analítica (RMN) no *screening* de polissacarídeos pela indústria.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANG, Y.H.; LIM, S.T.; YOO, B. Dynamic rheology of corn starch–sugar composites. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 521–527, 2004.

D'APPOLONIA, B.L.; MORAD, M.M. Bread staling. **Cereal Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 186-190, 1981.

DEBET, M.R.; GIDLEY, M.J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 452-465, 2006.

FAN, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy**, v. 28, p. 161-219, 1996.

GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. In: TIPSON, S.; HORTON, D. (Eds.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, v. 38, 13-104 p., 1981.

JAMES, M.G.; DENYER, K.; MYERS, A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 215-222, 2003.

JANE, J.L.; ROBYT, J.F. Structures studies of amylose V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylase, a new method for preparing amyloextrins. **Carbohydrates Research**, v. 132, p. 105-110 1984.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 210-218, 2004.

JODELET, A.; RIGBY, N.M.; COLQUHORIN, I.J. Separation and NMR structural characterization of singly branched  $\alpha$ -dextrins wich differ in the location of the branch point. **Carbohydrate Research**, v. 312, p. 139-151, 1998.

KAJIWARA, K.; MIYAMOTO, T. Progress in structural characterization of functional polysaccharides. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharides**. New York, Marcel Dekker Inc., p.1-40, 1998.

MARASCHIN, R.P.; IANSEN, C.; ARSEGO, J.A.; CAPEL, L. S.; DIAS, P.F.; CIMADON, A.M.A.; ZANUS, C.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. **Solid-phase extraction and 1H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wines – A chemical composition correlation study**. In: **Magnetic resonance in food science – latest developments**. In: BELTON, P.S. (Ed.), Cambridge, Royal Society of Chemistry, p. 255-260, 2003.

MUNHOZ, M.P.; WEBER, F.H.; CHANG, Y.K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 403-406, 2004.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.S.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.

PERLIN, A.S.; CASU, B. Spectroscopic methods. In: ASPINALL, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**, New York: Academic Press Inc., v. 1, p.133-186, 1982.

QI, X.; TESTER, R.F.; SNAPE, C.E.; ANSELL, R. Molecular Basis of the Gelatinisation and Swelling Characteristics of Waxy Rice Starches Grown in the Same Location During the Same Season. **Journal of Cereal Science**, v. 37, p. 363-376, 2003.

RAPHAELIDES, S.N.; GEORGIADIS, N. Effect of fatty acids on the rheological behaviour of maize starch dispersions during heating. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 81–92, 2006.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

TESTER, R.F.; MORRISON, W.R. Swelling and gelatinisation of cereal starches. II. Waxy rice starches. **Cereal Chemistry**, v. 67, p. 558–563, 1990.

WHITE, P.J. Properties of corn starch. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed., London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD-ROM.



## *Capítulo 3*

## **ANÁLISE QUANTITATIVA, ESPECTROSCÓPICA (FT-IR) E QUIMIOMÉTRICA DA FRAÇÃO PROTÉICA DE GRÃOS DE VARIEDADES LOCAIS E COMERCIAIS DE MILHO (*Zea mays*)**

### **1 RESUMO**

As proteínas, classificadas segundo sua solubilidade em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, são o segundo componente químico majoritário encontrado no endosperma dos grãos de milho. A investigação da composição protéica de germoplasma crioulo de milho é de grande interesse, tendo em vista o elevado consumo desse cereal no mundo. Dessa forma, o presente estudo se propôs a quantificar as proteínas dos grãos de variedades crioulas e locais de milho (VCLM) e caracterizá-las usando a espectroscopia de FT-IR, associada à quimiometria, nas amostras de farinha. O conteúdo de proteínas totais variou de 43,92 a 69,90 mg/g, sendo as prolaminas as proteínas majoritárias, seguido das glutelinas, globulinas e albuminas para a maioria das amostras analisadas. No que diz respeito às frações protéicas foram encontrados conteúdos significativamente distintos ( $P < 0,01$ ). A proporção de cada uma das frações também variou de acordo com o germoplasma (prolaminas: 29 a 63%; glutelinas: 12 a 52%; globulina+albumina: 15 a 32%). A variável glutelina (PC1) contribuiu em 69,5% para a explicação da variância total dos dados, seguido da variável zeína I (PC2) (29,4%) na análise dos componentes principais (PCA) dos dados relativos ao conteúdo das 5 frações protéicas. O padrão de distribuição das amostras, segundo os eixos PC1 e PC2, permitiu a rápida distinção do germoplasma com elevado conteúdo de glutelina e zeína I das demais. Da mesma forma, na análise de PCA dos dados espectrais de FT-IR (1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>) observou-se a dispersão das amostras de farinhas, indicando constituição protéica distinta para as mesmas. Esses resultados permitem concluir que a variabilidade genética das VCLM resultou na diversidade protéica detectada nos grãos, sugerindo um potencial a ser explorado em programas de melhoramento genético dedicados à obtenção de variedades com valor nutricional superior.

## 2 INTRODUÇÃO

A cultura do milho, em função do seu potencial nutritivo e da composição química, tem grande importância na economia mundial, sendo responsável por 7% da energia consumida no mundo (FAO, 2007). No que diz respeito ao aspecto nutricional, o grão de milho é uma importante fonte de proteína e energia na dieta humana e de animais, apresentando níveis elevados de amido, fibras, ácidos graxos poli-insaturados e açúcares (BOYER & HANNAH, 2001, CUEVAS-RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

As proteínas constituem o segundo componente químico majoritário nos grãos de milho, sendo encontradas principalmente no endosperma (INGLETT, 1997; SHUKLA & CHERYAN, 2001). Tais macromoléculas podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com a sua solubilidade: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em solução salina), prolaminas (solúveis em solução alcoólica forte) e glutelinas (solúveis em álcalis) (INGLETT, 1977; LANDRY & MOUREAUX, 1970; VASAL, 2001).

As prolaminas constituem as proteínas de reserva do grão e são encontradas majoritariamente no endosperma, enquanto as demais, denominadas metabolicamente ativas, ocorrem no gérmen e endosperma. As primeiras estão relacionadas à dureza do grão, uma importante característica relacionada à qualidade dos mesmos, uma vez que os grãos duros são menos suscetíveis aos danos durante o plantio, cultivo e colheita (DOMBRINK-KURTZMAN & KNUTSONM 1997). Por outro lado, as proteínas que estão no gérmen são superiores em quantidade e qualidade, comparativamente àquelas do endosperma. Embora este cereal represente a base da alimentação nos países pobres, a qualidade nutricional das proteínas do milho é considerada baixa, devido à deficiência dos aminoácidos essenciais L-lisina e L-triptofano (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Além das técnicas convencionais de quantificação, a análise espectroscópica vibracional de infravermelho (FT-IR), associada a técnicas estatísticas multivariadas, vem sendo empregada em estudos como, por exemplo, na avaliação da composição de polissacarídeos de plantas (COIMBRA *et al.*, 1998; COIMBRA *et al.*, 1999), devido à sua elevada sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade. Os sinais detectados em um espectro de FT-IR estão correlacionados com os diversos grupos funcionais de uma determinada classe de compostos químicos (DÉLÉRIS & PETIBOIS, 2003). Em função disto, a análise por FT-

IR de uma matriz complexa (amostras de farinha de milho, por exemplo) permite inferir sobre sua constituição química e detectar eventuais alterações de perfil químico entre amostras de interesse, considerando o perfil espectral total, ou apenas uma região específica (*fingerprint*) como a de proteínas.

O estudo da composição protéica de variedades de milho é de grande interesse para programas de melhoramento, bem como para a determinação de potenciais de uso domésticos ou industriais. Nesse sentido, em algumas regiões do País, como no Município de Anchieta (Santa Catarina) são cultivadas variedades de milho com características agronômicas e nutricionais diferenciadas, em função do modelo de agricultura familiar adotado. Naquela localidade, observou-se a retomada do cultivo de sementes próprias (variedades crioulas e locais de milho - VCLM), num regime de subsistência ou semi-subsistência, tendo sido já identificadas mais de 30 VCLM (OGLIARI & ALVES, 2006). Em função disto, este trabalho analisou o conteúdo das frações protéicas globulina, albumina, prolamina e glutelina de amostras de farinhas de grãos inteiros (gérmen + endosperma) de 26 VCLM e de cinco variedades comerciais e comparou o perfil espectral de FT-IR do material amostral para a região de *fingerprint* para proteínas, via análise de componentes principais (PCAs).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção do material vegetal**

##### **3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM)**

As 26 VCLM utilizadas nesse estudo foram obtidas junto aos pequenos agricultores do município de Anchieta, localizado no extremo oeste catarinense, pelo Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar (SINTRAF). Amostras de grãos deste germoplasma foi repassado ao grupo do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da UFSC, a saber: Roxo do Valdecir, Rajado 8 Carreiras, Palha Roxa 02, Rosado, Cateto Vermelho, Cateto, Pires, Palha Roxa 1 do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 07, MPA 13, Branco do Aldanir, Pixurum 04, Mato Grosso, Pixurum 06, Composto São Luis, Asteca,

MPA 02, Pixurum 01, Cunha 01, MPA 01, Pixurum 05, Roxo do Emílio, Amarelão 03, Moroti e Língua de Papagaio.

### 3.1.2 Cultivares comerciais

Amostras de grãos de cultivares comerciais recomendados para a região Sul do Brasil foram utilizadas no presente estudo para efeitos de análise comparativa, são eles: *BRS-1030*; *BR-106*; *AG-9090*; *Pioneer 3069* e *AS-3430*.

O cultivar *BRS1030* (Embrapa), um híbrido simples, é de ciclo precoce, com florescimento em 61 dias, de porte baixo, com grãos semi-duros de cor alaranjada. O cultivar *AG-9090* (Agrocere) é de ciclo precoce, com florescimento em 72-80 dias, com grãos semidentados, de cor alaranjada e com alto teor de óleo. *Pioneer 3069* é um híbrido simples de ciclo super-precoce de cor alaranjada, enquanto *AS-3430* (Agroeste) é um híbrido triplo, de ciclo precoce, porte médio/alto, com grãos duros de cor avermelhada.

### 3.2 Coleta e preparo das amostras

Para cada variedade, amostras de grãos (50g, peso seco) foram trituradas em moinho de laboratório (Cyclone Sample Mill - modelo 3010/019), utilizando-se peneira de 0,1mm. Após a moagem, os compostos lipossolúveis foram removidos por tratamento das amostras em hexano (1:10, p/v - 15min), seguido de centrifugação (1.500g, 15min, 3x). As amostras foram então embaladas em sacos plásticos, sob vácuo, e mantidas a  $-18^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### 3.3 Caracterização da composição química das farinhas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises das amostras de farinha das VCLM e dos cultivares comerciais por espectroscopia vibracional de FT-IR utilizaram equipamento Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), coletando-se 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 500 a 4000  $\text{ondas.cm}^{-1}$ , e com resolução de 4  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Os espectros foram processados com auxílio do programa OPUS versão 5.0 (Bruker GmbH), sendo que o conjunto de dados espectrais para a região de *fingerprint* para proteínas (1650-1500  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos

métodos de componentes principais (PCAs), com auxílio do pacote estatístico Unscrambler 9.1.

### **3.4 Determinação do conteúdo de proteínas nas amostras de farinha (grãos inteiros)**

A extração das frações protéicas foi realizada através de centrifugações sequenciais, em tubos *Eppendorf*, utilizando o precipitado da extração anterior (12000g, 5min) como matéria para a extração seguinte. As frações albumínica e globulínica foram extraídas com água destilada-deionizada (4<sup>o</sup>C, 2x, 15 min) e NaCl 0,5M (4<sup>o</sup>C, 2x, 30min), respectivamente. A extração da fração prolaminica utilizou uma solução de 2-propanol 55% (v/v), contendo 0,6% de 2-mercaptoetanol (2-ME, v/v – 2x, 30min e 1x, 15min, 25<sup>o</sup>C), para a obtenção das proteínas do tipo Zeína I. Uma solução de NaCl 0,5M (pH 10), contendo 0,6% de 2-ME (v/v), foi utilizada para a extração das prolaminas do tipo Zeína II (2x, 30min, temperatura ambiente). As glutelinas foram extraídas com uma solução de dodecil sulfato de sódio 0,5% (p/v, pH 10), contendo 0,6% de 2-ME (v/v, 2x, 30min e 1x, 15min, temperatura ambiente). Os experimentos foram realizados em triplicata. O conteúdo de proteína total para cada fração foi determinado conforme descrito previamente (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) para a construção da curva-padrão, de acordo com a solução de extração (globulinas: 0,7 a 0,01mg/mL – r<sup>2</sup> 0,96; albuminas: 0,1 a 0,01mg/mL - r<sup>2</sup> 0,99; prolaminas: 1 a 0,01mg/mL - r<sup>2</sup> 0,94; glutelinas: 1 a 0,1mg/mL - r<sup>2</sup> 0,97).

Os conteúdos médios das frações protéicas foram inicialmente comparados através da análise de variância (ANOVA), com o auxílio do programa Statistica<sup>®</sup> 6.0. Subseqüentemente, esses mesmos resultados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), visando determinar o grau de similaridade entre as mesmas, com o auxílio do programa Fitopac<sup>®</sup> 1.6.4. Todas as análises foram realizadas sem a padronização dos dados, uma vez que o efeito de unidade (escala) foi suprimido com a medição das variáveis em mesma escala.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo protéico total nas amostras de farinhas das VCLM apresentou uma variação entre 4,39% (43,92 mg/g) (variedade Rosado) e 6,99% (69,90 mg/g) (Língua de Papagaio) e de 3,93% (39,35 mg/g) (BR106) a 5,47% (54,72 mg/g) (AS-3430) para os cultivares comerciais (**Tabela 1**). Tais valores são inferiores aos descritos na literatura para milho que relatam uma variação entre 8 e 13% de proteínas, o que vem a reforçar a elevada diversidade existente nos genótipos em estudo. Variações no conteúdo protéico dos grãos têm sido relatadas e estão principalmente relacionadas ao tipo de milho (ZUBBER & DARRAH, 1987). Como exemplo, BAJAJ (1990) verificou em sementes de variedades com alto teor de óleo (“high oil”) um conteúdo médio de proteína de cerca de 8,8%, enquanto variedades de milho dentado apresentaram teores algo superiores (~ 10%). Além disso, fatores tais como o tipo de solo, o uso de fertilizantes e as condições climáticas podem alterar a composição química do milho (SCHONHAUS, 1980), o que pode explicar em alguma extensão o menor conteúdo de proteínas encontrado nos grãos das variedades analisadas no presente estudo. Cabe destacar que o modelo de agricultura adotado pelos agricultores de Anchieta é de subsistência, pouco tecnificado e nem sempre recorrem ao uso de insumos. Além disto, diversas propriedades adotam práticas de cultivo orgânico daquele cereal (KIST, 2006).

O protocolo de extração e fracionamento das proteínas do milho, descrito inicialmente por OSBORNE & MENDEL (1914), e posteriormente modificado por LANDRY & MOUREAUX (1970), permitiu verificar que as proteínas da fração prolamina são predominantes nas farinhas de todas as variedades estudadas (**Tabela 1**). Estes resultados estão de acordo com a classificação descrita por LOOKHART (1991), que aponta a classe das prolaminas como a mais abundante para o endosperma de milho.

A segunda classe de proteínas em predominância foi a das glutelinas, exceto para as VCLM Rosado, Rajado 8 Carreiras, Amarelão 3, MPA2 e Roxo do Emílio, onde as globulinas ocorrem em maior concentração.

No que diz respeito à fração prolamina (Zeína I + Zeína II), verificou-se uma amplitude de valores entre 28,43 mg/g (variedade Amarelão 3) a 13,47 mg/g (variedade Pixurum 6).

**TABELA 1** - Conteúdo médio\* (média  $\pm$  desvio padrão, mg/g) das quatro frações protéicas (globulina, albumina, prolamina e glutelina) encontradas nos grãos inteiros de variedades crioulas e locais de milho e nos cultivares comerciais.

	<i>Prolamina</i>						
	<i>Variedade</i>	<i>Globulina</i>	<i>Albumina</i>	<i>Zeína I</i>	<i>Zeína II</i>	<i>Glutelina</i>	<i>Total</i>
<b>Variedades Locais</b>	<i>Rosado</i>	11,87 $\pm$ 0,96	1,10 $\pm$ 0,29	14,60 $\pm$ 1,17	5,75 $\pm$ 0,20	10,60 $\pm$ 1,18	43,92
	<i>Cateto</i>	10,10 $\pm$ 0,39	0,56 $\pm$ 0,04	13,96 $\pm$ 1,81	5,03 $\pm$ 0,39	14,31 $\pm$ 5,13	43,97
	<i>Rajado 8 C.</i>	10,83 $\pm$ 0,32	0,91 $\pm$ 0,04	21,12 $\pm$ 0,59	3,64 $\pm$ 0,61	8,02 $\pm$ 2,50	44,52
	<i>Pixurum 4</i>	8,94 $\pm$ 0,77	1,08 $\pm$ 0,18	18,90 $\pm$ 0,50	4,67 $\pm$ 0,15	10,96 $\pm$ 0,31	44,55
	<i>Amarelão 3</i>	10,14 $\pm$ 0,05	1,15 $\pm$ 0,30	26,26 $\pm$ 1,52	2,17 $\pm$ 0,56	5,57 $\pm$ 2,88	45,30
	<i>Pixurum 6</i>	10,20 $\pm$ 0,74	1,06 $\pm$ 0,32	8,85 $\pm$ 1,57	4,62 $\pm$ 0,10	22,01 $\pm$ 2,88	46,74
	<i>Mato Grosso</i>	9,74 $\pm$ 0,39	1,05 $\pm$ 0,13	17,15 $\pm$ 1,97	5,24 $\pm$ 0,85	13,77 $\pm$ 6,29	46,94
	<i>MPA02</i>	12,10 $\pm$ 0,34	1,03 $\pm$ 0,03	22,89 $\pm$ 2,06	2,65 $\pm$ 0,14	10,14 $\pm$ 0,78	48,81
	<i>Moroti</i>	12,35 $\pm$ 1,13	1,67 $\pm$ 0,39	18,71 $\pm$ 1,22	3,27 $\pm$ 0,23	13,04 $\pm$ 3,46	49,04
	<i>Mato G. P.R.</i>	11,08 $\pm$ 0,14	0,88 $\pm$ 0,10	19,90 $\pm$ 4,16	3,32 $\pm$ 0,23	14,04 $\pm$ 5,06	49,21
	<i>Pixurum 7</i>	9,85 $\pm$ 0,56	0,91 $\pm$ 0,04	20,73 $\pm$ 2,61	4,04 $\pm$ 0,27	14,95 $\pm$ 4,11	50,47
	<i>Palha Roxa 2</i>	10,51 $\pm$ 0,43	1,23 $\pm$ 0,20	18,96 $\pm$ 0,93	4,16 $\pm$ 0,17	16,03 $\pm$ 3,31	50,90
	<i>C. S. Luis</i>	10,76 $\pm$ 0,75	1,18 $\pm$ 0,13	23,29 $\pm$ 0,48	3,47 $\pm$ 0,92	13,32 $\pm$ 2,86	52,02
	<i>Pixurum 1</i>	10,67 $\pm$ 0,50	1,22 $\pm$ 0,11	20,97 $\pm$ 0,53	3,81 $\pm$ 0,20	15,94 $\pm$ 2,47	52,61
	<i>Cunha</i>	10,82 $\pm$ 0,75	1,21 $\pm$ 0,16	22,93 $\pm$ 2,33	4,73 $\pm$ 1,21	13,04 $\pm$ 6,53	52,72
	<i>Roxo Valdecir</i>	11,56 $\pm$ 0,28	0,91 $\pm$ 0,17	14,83 $\pm$ 0,41	3,24 $\pm$ 0,12	22,55 $\pm$ 8,81	53,09
	<i>Pixurum 5</i>	12,77 $\pm$ 0,57	1,42 $\pm$ 0,37	11,69 $\pm$ 1,41	4,23 $\pm$ 0,17	24,18 $\pm$ 2,84	54,29
	<i>Palha R. Em.</i>	10,93 $\pm$ 0,29	0,73 $\pm$ 0,17	23,88 $\pm$ 0,86	3,48 $\pm$ 0,34	15,31 $\pm$ 4,18	54,33
	<i>Roxo Emílio</i>	12,56 $\pm$ 0,79	1,36 $\pm$ 0,15	24,16 $\pm$ 0,98	4,33 $\pm$ 0,81	12,14 $\pm$ 3,32	54,55
	<i>MPA 1</i>	9,50 $\pm$ 0,28	0,75 $\pm$ 0,05	13,17 $\pm$ 0,56	2,80 $\pm$ 0,20	28,71 $\pm$ 7,67	54,94
	<i>Asteca</i>	12,10 $\pm$ 1,56	1,06 $\pm$ 0,05	23,71 $\pm$ 1,34	5,00 $\pm$ 1,79	13,59 $\pm$ 4,23	55,46
	<i>MPA 13</i>	13,06 $\pm$ 2,00	1,27 $\pm$ 0,13	15,08 $\pm$ 0,75	3,02 $\pm$ 0,10	23,37 $\pm$ 6,12	55,80
	<i>C. Vermelho</i>	11,54 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,11	22,49 $\pm$ 1,69	4,78 $\pm$ 0,11	16,85 $\pm$ 0,38	56,61



	<i>Branco</i>	10,74 ± 0,38	1,03 ± 0,03	22,45 ± 2,19	4,38 ± 0,39	20,74 ± 2,34	59,36
	<i>Pires</i>	12,69 ± 0,36	0,87 ± 0,06	19,74 ± 1,20	3,91 ± 0,32	23,82 ± 2,93	61,04
	<i>L. Papagaio</i>	10,53 ± 0,18	0,94 ± 0,16	23,43 ± 0,45	4,01 ± 0,25	30,98 ± 3,34	69,90
	<i>BR106</i>	11,10 ± 0,36	1,52 ± 0,15	8,39 ± 0,64	5,03 ± 0,14	13,32 ± 2,62	39,35
Variedades Comerciais	<i>BRS1030</i>	10,15 ± 1,10	0,96 ± 0,31	14,41 ± 0,84	5,34 ± 0,15	10,24 ± 3,26	41,09
	<i>Pioneer 3069</i>	8,55 ± 0,53	0,78 ± 0,09	20,37 ± 2,87	3,69 ± 0,16	12,50 ± 0,98	45,90
	<i>AG-9090</i>	6,35 ± 0,14	0,54 ± 0,21	12,83 ± 0,55	3,49 ± 0,27	22,92 ± 2,72	46,12
	<i>AS-3430</i>	8,09 ± 0,08	0,60 ± 0,13	14,16 ± 0,20	3,52 ± 0,32	28,35 ± 1,23	54,72

\* Resultado médio de 3 extrações independentes.

As VCLM Cunha, Língua de Papagaio e Cateto Vermelho também apresentaram elevado conteúdo de prolaminas (~27 mg/g), o que indica um menor valor nutricional para as três variedades. Isto porque, embora as prolaminas sejam quantitativamente as proteínas de maior importância do milho, o valor nutricional destas é baixo, em função de sua composição em aminoácidos. Nessa fração protéica, os aminoácidos L-glutamina, L-leucina e L-prolina são os majoritários, enquanto L-lisina e L-triptofano estão praticamente ausentes. No milho, o conteúdo total de L-lisina não ultrapassa 1,8% e de L-triptofano 0,35% (PAIVA *et al.*, 1991).

Nesse sentido, estudos prévios constataram que a diminuição do conteúdo de prolaminas no grão é uma das formas mais eficientes para otimizar o valor nutritivo da proteína do milho. Isto porque, as demais frações protéicas possuem um conteúdo maior dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano. Nos programas de melhoramento em que se elevou o conteúdo de proteína total, não foi observado um aumento na qualidade nutricional dos grãos, uma vez que este é acompanhado por um aumento proporcional de prolaminas e pela diminuição do conteúdo das demais frações protéicas (LANDRY, 2002; GIBBON & LARKINS, 2005). Dessa forma, as VCLM com maior valor nutricional para proteínas nesse estudo são Pixurum 6, Pixurum 5 e MPA1 e os cultivares comerciais BR106 e AG-9090, considerando seus menores conteúdos de prolamina (13,47; 15,92; 15,97, 13,42 e 16,32 mg/g, respectivamente), comparativamente aos demais.

Por outro lado, um conteúdo elevado de prolaminas está correlacionado com a maior dureza dos grãos, uma vez que essas são proteínas de reserva utilizadas durante o desenvolvimento do embrião, sendo armazenadas no endosperma em corpúsculos protéicos que auxiliam na manutenção da integridade do mesmo (DOMBRINK-KURTZMAN & KNUTSONM, 1997; CHANDRASHEKAR & MAZHAR, 1999). Sendo assim, as VCLM Amarelão 3, Cunha, Língua de Papagaio e Cateto Vermelho e o cultivar comercial *Pioneer 3069* são os que possuem os grãos de maior dureza e, portanto, os menos suscetíveis a danos durante o plantio, cultivo e colheita.

De forma similar, uma amplitude significativa de valores de concentração foi observada para a fração glutelina para as variedades estudadas (5,57 mg/g a 30,98 mg/g - VCLM e 10,24 mg/g a 28,35 mg/g - cultivares comerciais). As glutelinas constituem a fração protéica do milho de menor solubilidade, em função de sua conformação espacial conferida, em grande extensão, pelo elevado número de resíduos de cistina (WALL, 1964; PAULIS & WALL, 1985). No âmbito nutricional, essas macromoléculas têm como principal característica favorável um maior conteúdo de L-lisina e L-triptofano, quando comparadas às prolaminas (LANDRY & MOUREAUX, 1970). Assim, para o universo amostral em estudo, as variedades Língua de Papagaio (30,98 mg/g), MPA1 (28,71 mg/g) e o cultivar comercial AS-3430 (28,35 mg/g) destacam-se dos demais em função de seu maior conteúdo de glutelinas, sugerindo um maior valor nutricional.

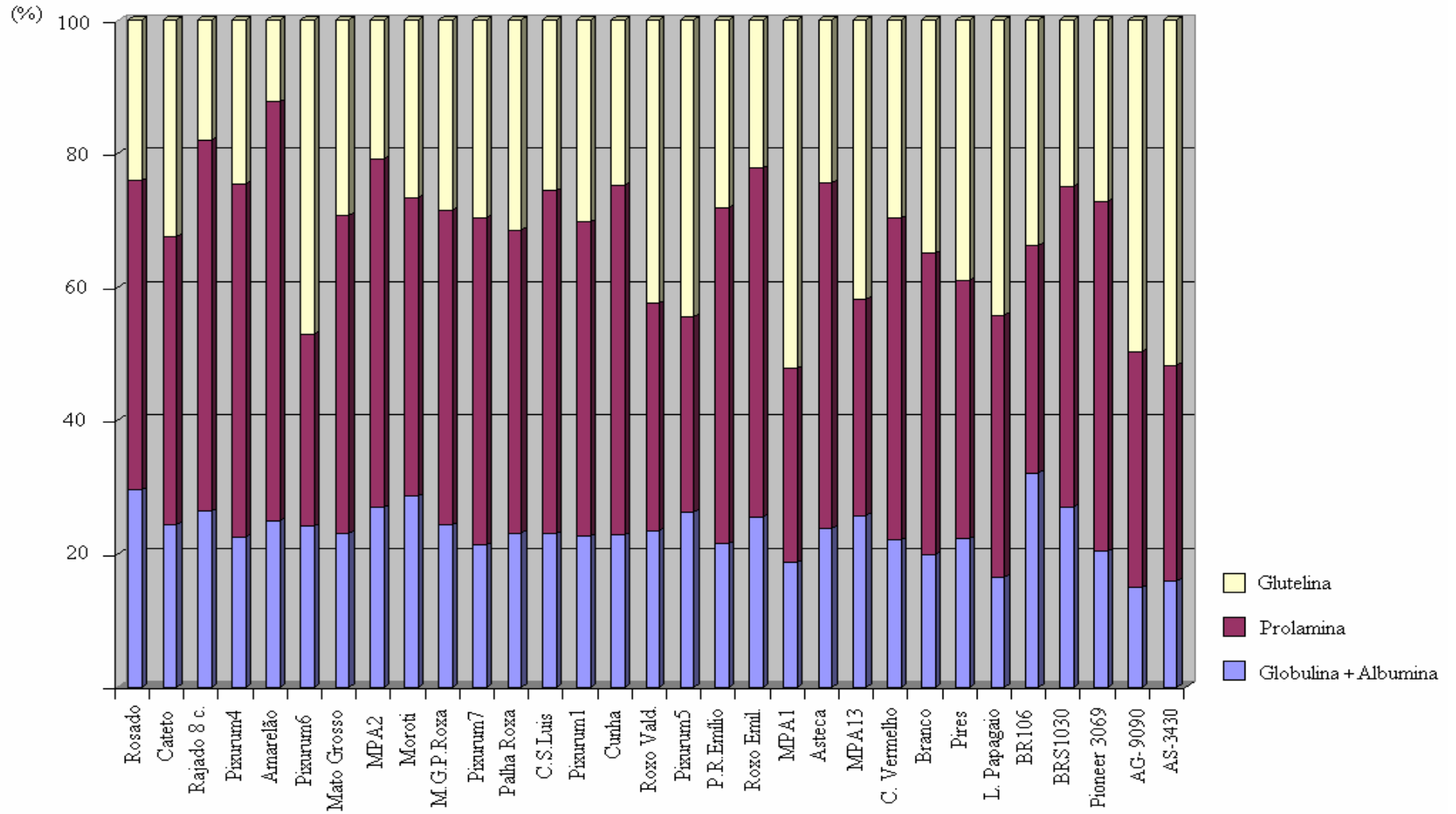
De forma contrária ao observado para as demais frações proteicas, uma amplitude inferior de valores de concentração foi observada para as frações protéicas salino-solúveis (globulina + albumina) para as VCLM (10,02 mg/g a 14,33 mg/g) e os cultivares comerciais (6,88 mg/g a 12,62 mg/g). Essas frações protéicas exercem funções enzimáticas, estruturais e como hidrocolóides durante a germinação da semente (WALL, 1964). A característica mais importante ligada a essas duas frações protéicas é o seu perfil de aminoácidos, caracterizado por conteúdos elevados de resíduos básicos, sulfurados e L-triptofano, bem como o baixo teor de ácido glutâmico, L-prolina e L-leucina (MISRA *et al.*, 1976). Os resultados de composição das frações salino-solúveis indicam que as VCLM MPA13, Pixurum 5 e Moroti e o cultivar comercial BR106 possuem um valor nutricional superior às demais pelo seu maior conteúdo em globulina e albumina (14,33; 14,19; 14,02 e 12,62 mg/g, respectivamente).

No que diz respeito à proporção entre as frações protéicas, BOYER & HANNAH (2001) comentam que em média os grãos de milho são constituídos por 7% de albumina, 5% de globulina, 52% de prolamina e 25% de glutelina. No entanto, a proporção das frações protéicas pode apresentar variações entre as amostras consoantes ao genótipo do milho. No presente estudo, por exemplo, a proporção de prolamina (Zeína I + Zeína II) variou entre aproximadamente 63% (Amarelão 3) a 29% (MPA1 - **Figura 1**). Além disto, destaca-se que além da variedade MPA1, outros 20 germoplasma apresentaram uma proporção inferior a 50% dessa fração protéica, a saber: Rosado, Cateto, Pixurum 6, Mato Grosso, Moroti, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 7, Palha Roxa, Pixurum 1, Roxo do Valdecir, Pixurum 5, MPA13, Cateto Vermelho, Branco, Pires, Língua de Papagaio, Pixurum 1, Cunha, Roxo do Emílio, MPA1, Branco, Língua de Papagaio e os cultivares comerciais BR106, BRS1030, AG-9090 e AS-3430. Esses resultados reforçam a importância de se conservar as VCLM pela diversidade química encontrada nas mesmas e apontam para o potencial de uso de algumas delas em programas de melhoramento genético que visem, por exemplo, produzir grãos de maior dureza e, portanto, menos suscetíveis aos danos pós-colheita.

A análise da Figura 1 permite verificar que as variedades onde a diminuição da proporção de prolaminas foi bastante acentuada, MPA1, Pixurum 5, Pixurum 6 e Roxo do Valdecir, um concomitante aumento da fração de glutelinas foi observado, sugerindo um maior valor nutricional para este germoplasma.

No que diz respeito à fração glutelina, a proporção variou de 12,30% (Amarelão) a 52,27% (MPA1) considerando todas as VCLM em estudo. Naquelas variedades onde detectou-se uma menor proporção de prolaminas e um aumento de glutelinas (MPA1, Pixurum 5, Pixurum 6 e Roxo do Valdecir) e nas variedades MPA13 e Língua de Papagaio, a percentagem dessa fração esteve acima de 40%, sendo este valor bem superior aos 25% sugerido por BOYER & HANNAH (2001). Nos grãos dos cultivares comerciais AG-9090 e AS-3430 também detectou-se uma proporção de glutelinas acima de 40%.

A proporção para a fração protéica salino-solúvel (globulina + albumina) entre as variedades analisadas não apresentou grande amplitude de valores como para as outras frações (~16% a 29% para as VCLM e 15% a 32% para os cultivares comerciais).



**Figura 1-** Distribuição percentual das classes de proteínas salino-solúveis (globulina e albumina), prolamina (zeína I e zeína II) e glutelina em amostras de farinhas das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.

No entanto, a proporção detectada nos grãos das variedades Rosado, Rajado 8 Carreiras, MPA2, Moroti, Pixurum 5, Roxo do Emílio e MPA13 e para os cultivares comerciais BR106 e BRS1030 foi acima de 25%, sendo essa proporção o dobro da sugerida por BOYER e HANNAH (2001). Assim, esses resultados sugerem um valor nutricional superior para estas variedades em função de seus conteúdos de globulina e albumina.

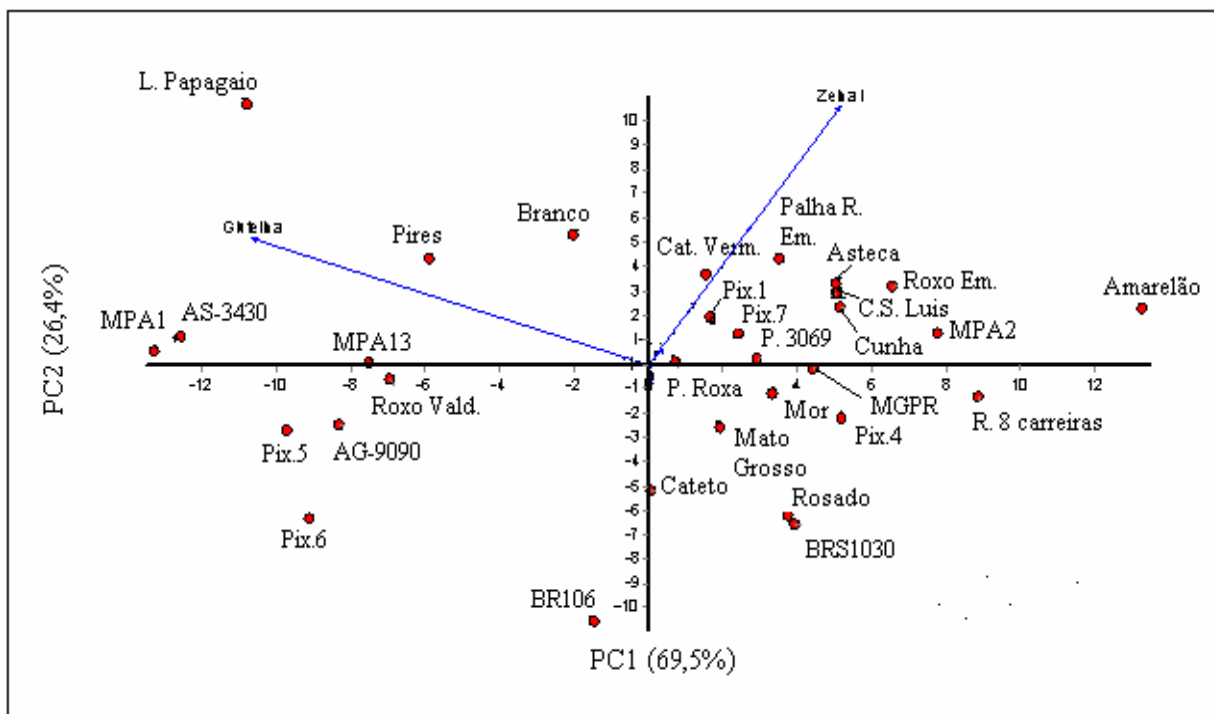
Diferenças altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre as médias dos 31 tratamentos foram observadas para as cinco variáveis analisadas (globulina, albumina, zeína I, zeína II e glutelina). O resumo da análise estatística univariada está mostrado na **Tabela 2**

**TABELA 2** - Resumo da análise de variância das variáveis globulina, albumina, zeína I, zeína II e glutelina determinadas na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.

Fonte de variação	Globulina	Albumina	Zeína I	Zeína II	Glutelina
Anova ( <i>QM Tratamentos</i> )	6,50**	0,21**	69,21**	2,22**	123,31**
Média	10,72	1,03	18,52	4,03	16,62
Desvio padrão	1,57	0,30	4,92	0,96	7,07
CV (%)	6,57	17,78	8,46	13,25	22,95

\*\*  $P < 0,01$  - teste Tukey.

Os valores de conteúdos médios para os 5 tratamentos foram utilizados para cálculo dos componentes principais (PCAs), visando o agrupamento das variedades em função da similaridade de constituição protéica. A dispersão das variáveis (variedades) projetada na forma bidimensional nos eixos cartesianos de PC1 e PC2 é mostrada na **Figura 2**. O componente principal 1 (PC1) apresenta a amplitude de valores para a fração glutelina, sendo o componente de maior contribuição à explicação da variância total dos dados (69,50%). O eixo componente principal PC2, que corresponde à fração zeína I, explicou em 29,4% a variância dos resultados. Dessa forma, as variedades com os maiores conteúdos de glutelina (Língua de Papagaio, Pires, Branco, AS3430, MPA1, MPA13, Roxo do Valdecir, AG9090, Pixurum 5 e Pixurum 6) agruparam-se em PC1 negativo, sendo que as três primeiras variedades se diferenciaram das demais, com agrupamento em PC2 positivo, por apresentarem em decorrência de seu elevado conteúdo de zeína I.



**FIGURA 2** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de glutelina e zeína I encontrados nas amostras de farinha (grãos inteiros) das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.

De forma contrária, as VCLM Cateto Vermelho, Palha Roxa do Emílio, Asteca, Pixurum 1, Pixurum 7, Roxo do Emílio, Composto São Luis, Cunha, MPA2 e Amarelão, bem como, o cultivar comercial *Pioneer 3069*, devido ao baixo conteúdo de glutelina e elevado conteúdo de zeína I, formaram um grupo em PC1 e PC2 positivos. Adicionalmente, ressalta-se que a variedade Amarelão diferiu das demais em decorrência de seu menor conteúdo de glutelina. Por último, as VCLM Palha Roxa, Moroti, Mato Grosso Palha Roxa, Rajado 8 Carreiras, Pixurum 4, Mato Grosso, Rosado e o cultivar comercial *BRS1030* agruparam-se em PC1 positivo e PC2 negativo em função de seus menores teores de glutelina e zeína I. As amostras das variedades Cateto e *BR106* localizaram-se, no gráfico das contribuições fatoriais, próximas à região negativa de PC2, indicando que o seu conteúdo de zeína I é relativamente baixo quando comparado aos demais genótipos.

Os resultados de autovalores, as porcentagens de variância e os autovetores (coeficientes de ponderação das variáveis) estão mostrados na **Tabela 3**.

**TABELA 3** – Componentes principais (PC) calculados a partir dos dados quantitativos das frações protéicas (globulina, albumina, zeína I, zeína II e glutelinas) de amostras de farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.

<i>Componente Principal</i>	<i>Variância (Autovalor)</i>	<i>Explicação da variância total (%)</i>	<i>Variância acumulada (%)</i>	<i>Coefficientes de ponderação das variáveis (Auvetor)</i>				
				<i>Globulina</i>	<i>Albumina</i>	<i>Zeína I</i>	<i>Zeína II</i>	<i>Glutelina</i>
PC1	45,14	69,50	69,50	0,0344	0,0098	0,4362	0,0077	-0,8991
PC2	17,13	26,37	95,87	0,0492	-0,0088	0,8953	-0,0799	0,4355
PC3	2,04	3,14	99,01	0,9897	0,1111	-0,0536	0,0713	0,0136
PC4	0,60	0,93	99,94	-0,0663	-0,0173	0,0724	0,9942	0,0408
PC5	0,04	0,06	100,00	-0,1117	0,9936	0,0109	0,0086	0,0119

Observa-se que as variáveis glutelina e zeína I apresentaram os maiores autovetores em valor absoluto nos componentes de maior autovalor (maior proporção de variação explicada) sendo, portanto, consideradas de maior importância para explicar a variabilidade das frações protéicas das amostras em estudo. Além disto, pode-se verificar que a variância acumulada nos dois primeiros autovetores foi bastante elevada, aproximadamente 96%, sendo esse um resultado considerado bastante satisfatório.

A perspectiva de uso da análise dos componentes principais (PCA) para discriminar amostras de grãos em função do seu conteúdo protéico parece ser uma ferramenta bastante útil à seleção fácil e rápida de germoplasma de interesse nutricional. Considerando que os resultados quantitativos associados à quimiometria mostraram-se promissores, propôs-se a investigação da seleção de amostras de farinha de milho com constituição protéica diferenciada, via aplicação da espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e análise multivariada (PCA) dos dados espectrais.

A vantagem de tal metodologia baseia-se no fato de que as amostras de farinhas são analisadas *in natura*, dispensando eventuais protocolos de extração e fracionamento de compostos, contribuindo para a redução do erro experimental e do custo das análises.

A análise de FT-IR das farinhas das VCLM e dos cultivares comerciais revelou uma típica absorção de deformação axial do grupo funcional C=O e a deformação angular do grupo NH<sub>2</sub> da amina (1650 e 1550 onda.cm<sup>-1</sup>), relativos às aminas I e II das proteínas (LAMBERT, 2001). A partir destes resultados adotou-se, para efeitos de classificação das variedades de milho através do cálculo dos PCAs segundo sua composição protéica, apenas a região espectral acima mencionada. Além disto, a matriz de dados espectrais foi normalizada em seus componentes lineares e as colunas centralizadas.

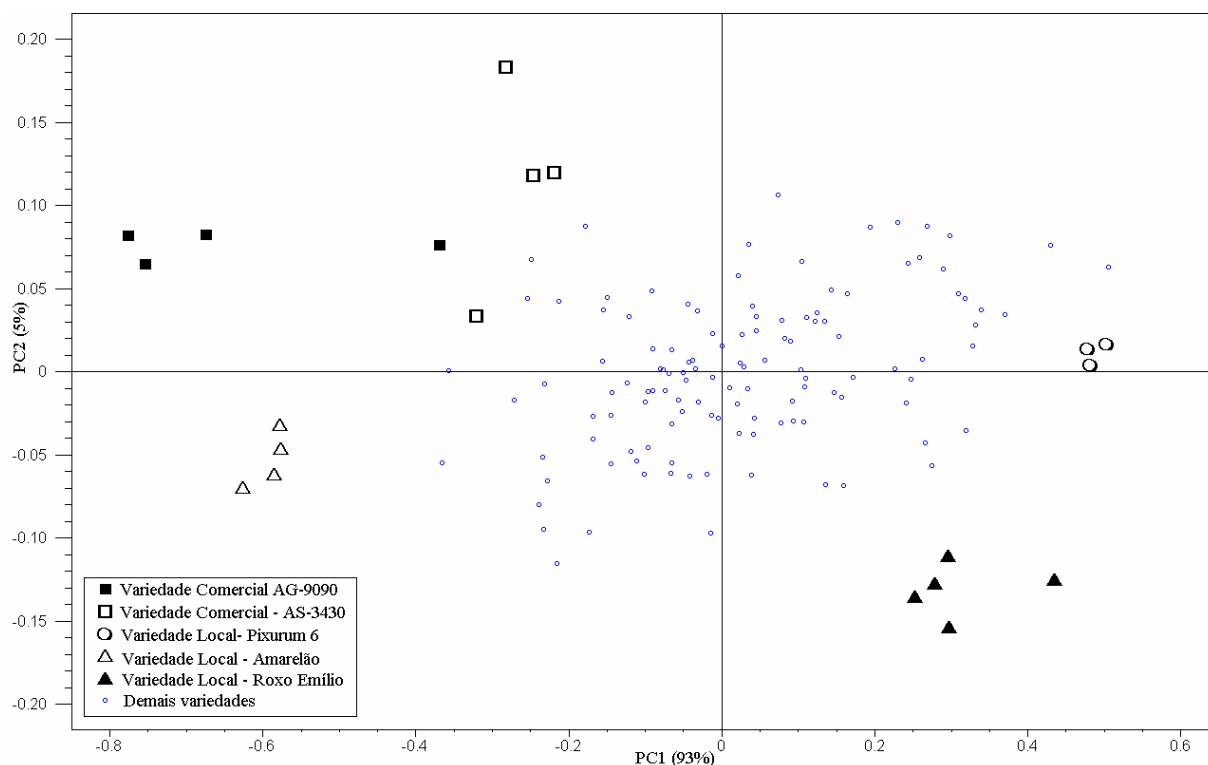
A **Figura 3** mostra a dispersão das variáveis em estudo (variedades), segundo a determinação dos componentes principais (PCAs) da matriz de dados obtida a partir dos espectros de FT-IR.

Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 98% a variância presente nos dados espectrais de FT-IR. A análise da **Figura 3** revela a dispersão das amostras em estudo, sem uma clara separação das mesmas, com exceção às variedades Pixurum 6, Roxo do Emílio, Amarelão e os cultivares comerciais AG-9090 e AS-3430.



A dispersão das variáveis (amostras de farinha – **Figura 3**) indica que as mesmas possuem certo grau de distinção espectral (FT-IR) na região compreendida entre 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>, sendo essas diferenças provavelmente relacionadas à constituição protéica. De fato, FABIAN & MANTELE (2002) destacam que é possível observar uma forte correlação entre algumas bandas no espectro de FT-IR de um polipeptídeo e sua estrutura secundária ( $\alpha$ -helice e  $\beta$ -pregueada, por exemplo).

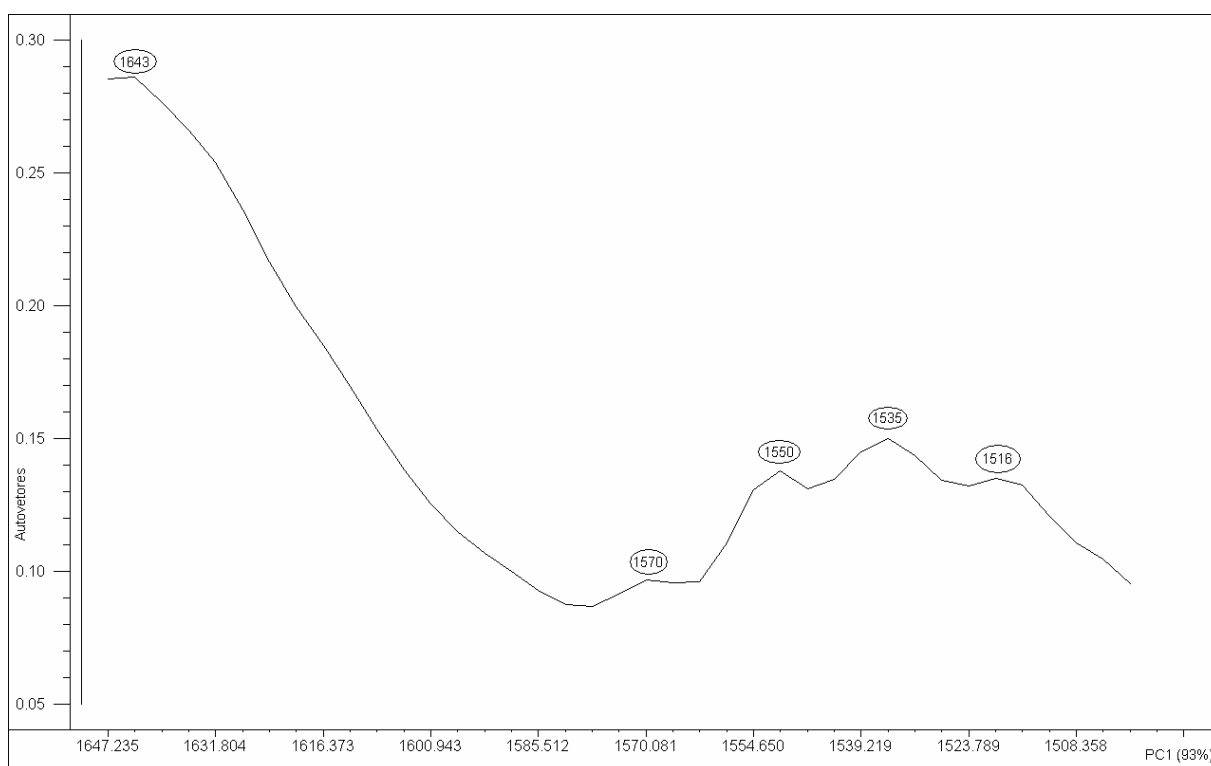
Portanto, esses resultados sugerem que as proteínas presentes nas farinhas das VCLM possuem conformação distinta, o que em alguma extensão pode ser resultado das diferentes proporções de globulina, albumina, prolaminas e glutelinas encontradas nas mesmas.



**FIGURA 3** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (janela espectral de 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de farinha (grãos inteiros) das 26 VCLM e dos cultivares comerciais em estudo.

Além disso, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a aplicação da técnica de FT-IR associada à quimiometria no *screening* de farinhas com constituição protéica diferenciada ou para um uso específico.

Os resultados de distribuição fatorial (**Figura 3**) demonstram, adicionalmente, que as amostras dos cultivares comerciais AG-9090 e AS-3430 localizaram-se em PC1 negativo e PC2 positivo, separando-se das demais amostras em análise, o que sugere maior similaridade quanto à constituição protéica para estas variedades. Essa hipótese é reforçada pelos resultados mostrados na **Figura 1**, onde é possível verificar que as farinhas destes cultivares comerciais têm a mesma proporção de globulina, albumina, prolamina e glutelina, com predominância desta última fração, um aspecto não observado para os demais cultivares comerciais. Um padrão de distribuição similar foi também observado para a distribuição fatorial dos dados quantitativos (**Figura 2**), com o agrupamento destas variedades híbridas no quadrante correlacionado ao maior conteúdo de glutelinas.



**FIGURA 4** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de farinha de grãos inteiros para os dados de FT-IR na região espectral compreendida entre 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>.

Por outro lado, as amostras de farinha das VCLM que mais se destacaram das demais (Pixurum 6, Amarelão e Roxo do Emílio – **Figura 3**) não formaram um grupo a parte, ocorrendo de forma dispersa entre os quadrantes formados pelos os eixos dos

componentes principais. Este resultado sugere uma constituição protéica diferenciada para as mesmas. A variedade Amarelão também se destacou das demais no gráfico de distribuição fatorial (PCA) dos dados quantitativos mostrado na **Figura 2**, o que de certa forma indica que as diferenças na proporção das classes protéicas estão sendo detectadas nos espectros das amostras de farinha.

Os autovetores que determinaram a distribuição fatorial mostrada na **Figura 3** foram 1643, 1570, 1550, 1535 e 1516  $\text{ondas.cm}^{-1}$  (**Figura 4**). A detecção das bandas em 1570 e 1550  $\text{ondas.cm}^{-1}$  relaciona-se ao grupamento de amidas II encontrado nas proteínas, enquanto a banda em 1516  $\text{ondas.cm}^{-1}$  indica, segundo BEEKES *et al.* (2007) a presença do aminoácido “tirosina” e 1643  $\text{ondas.cm}^{-1}$  a conformação das proteínas em  $\alpha$ -hélice (LOKSZTEJN *et al.*, 2007).

Os resultados encontrados no presente estudo podem ser futuramente utilizados na identificação de farinhas que possuam um perfil desejado para esta classe de compostos, através da comparação de amostras-teste com amostras de referência, isto é, que tenham uma constituição protéica conhecida. Assim, os resultados obtidos são considerados de reconhecido interesse à indústria alimentar, porque a abordagem analítica utiliza técnicas rápidas, sensíveis e reprodutíveis, podendo ser empregada em estudos de seleção de farinhas com constituição química diferenciada, principalmente por dispensar as etapas de extração protéica, um processo demorado, trabalhoso e propenso a erro.

## 5 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados encontrados sugerem que a variabilidade genética existente nas populações de milho analisadas contribui, em alguma extensão, para a variabilidade de composição química daquele germoplasma, aqui representada pelo componente protéico. Além disso, verificou-se que as variedades Língua de Papagaio, MPA1, Pires, Branco e AS-3430 apresentaram um potencial a ser explorado em programas de melhoramento genético dedicados à obtenção de variedades com valor nutricional superior, bem como de otimização da alimentação de populações humanas, principalmente em regiões economicamente menos favorecidas. Porém, é importante considerar que em diversos programas de melhoramento de *Z. mays* a dificuldade observada não foi a de

incremento do conteúdo das frações protéicas não-prolaminas, mas do conteúdo de aminoácidos essenciais em termos absolutos (VASAL, 2001). Assim, buscando um maior detalhamento da caracterização protéica das VCLM, estudos deverão ser conduzidos no sentido de quantificar os aminoácidos lisina e triptofano no germoplasma local e crioulo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, J.S. Biotechnology in nutrition improvement of wheat. In: BAJAJ YPS (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. New York, Springer Verlag, p. 615-643, 1990.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) Spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 305–319, 2007.

BOYER, C.D.; HANNAH, C. Kernel mutants of corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2° ed, London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD-ROM.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANDRASHEKAR, A.; MAZHAR, H. The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. **Journal of Cereal Science**, v. 30, n. 3, p. 193-207, 1999.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza, Acribia, 346 p., 1989.

COIMBRA, M.A.; BARROS, A.; BARROS, M.; RUTLEDGE, D.; DELGADILLO, I. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy, **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 241-248, 1998.

COIMBRA, M.A.; BARROS, A.S.; RUTLEDGE, D.N.; DELGADILLO, I. FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp-cell wall polysaccharide extracts. **Carbohydrate Research**, v. 317, p. 145-154, 1999.

CUEVAS-RODRÍGUEZ, E.O.; VERDUGO-MONTOYA, N.M.; ANGULO-BEJARANO, P.I.; MILÁN-CARRILLO, J.; MORA-ESCOBEDO, R.; BELLO-PÉREZ, L.A.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; REYES-MORENO, C. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 1072–1079, 2006.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational spectroscopy**, v. 32, p. 129–136, 2003.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; KNUTSON, C.A. A study of maize endosperm hardness in relation to amylose content and susceptibility to damage. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 776-780, 1997.

FABIAN, H.; MÄNTELE, W. Infrared spectroscopy of proteins. In: CHALMERS, J.M.; GRIFFITHS, P.R. (Eds.). **Handbook of vibrational spectroscopy**. UK, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.

FAO. Statistical Database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/346/default.aspx>. Acesso em: 10/11/2007.

GIBBON, B.C.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, v. 21, p. 227-233, 2005

KIST, V. **Seleção Recorrente de Famílias de Meio-irmãos em população composta de milho (*Zea mays* L.) procedente de Anchieta-SC**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic structural spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 2001.

LANDRY, J. A linear model for quantitating the accumulation of zeins and their fractions

( $\alpha+\delta$ ,  $\beta&\gamma$ ) in developing endosperm of wild-type and mutant maizes. **Plant Science**, v. 163, p. 111-115, 2002.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneite des glutelines du grain de maïs: Extraction selective et composition em acides amines dès trois fraction isolees. **Bulletin of Society Chimica Biology**, v. 52, p. 1021-1037, 1970.

LOKSZTEJN, A.; DZWOLAK, W.; KRYSIŃSKI, P. Tyrosine side chains as an electrochemical probe of stacked  $\beta$ -sheet protein conformations. **Bioelectrochemistry**, doi:10.1016/j.bioelechem.2007.07.004, 2007.

LOOKHART, G.L. Cereal Proteins: composition of their major fractions and methods for identification. In: LORENZ, K.J.; KULP, K.K. (Eds.). **Handbook of cereal science and technology**, Marcel Dekker, New York, p. 441-468, 1991.

MISRA, P.S.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D.V. Studies on corn proteins. X. Polypeptides molecular-weight distribution Landry-Moureaux fractions of normal and mutant endosperms. **Cereal Chemistry**, v. 53, p. 705, 1976.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: De BOEF, W.S.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.

OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 18, p. 1-6, 1914.

PAIVA, E.; KRIZ, A.L.; PEIXOTO, M.J.V.D.; WALLACE, J.C.; LARKINS, B.A. Quantitation and distribution of  $\gamma$ -zein in the endosperm of maize kernel. **Journal of Cereal Chemistry**, v. 68, p. 276-279, 1991.

PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Fractionation and characterization of alcohol-soluble reduced endosperm glutelin proteins. **Cereal Chemistry**, v. 54, p. 1223-1228, 1985.

SCHONHAUS, I. **Composição e valor biológico das proteínas de quarto variedades de**

**milho (*Zea mays* L.) em dois estágios de maturação.** Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, 1980.

SHUKLA R, CHERYAN M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 171-192, 2001.

VASAL, S.K. High quality protein corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>o</sup> ed. London, Boca Raton, CRC Press, 2001. CD-ROM.

WALL, J.S. Cereal Proteins. In: SCHULTZ, H.W.; ANGLEMIER, A.F. (Eds.). **Proteins and their reactions**. Westport, Conn: AVI Publ. Co., p. 315-341, 1964.

INGLETT, G. E. Cereal Proteins. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. (Eds.). **Food proteins**. Westport, AVI Publ. Co., p. 267-289, 1977.

ZUBBER, M.S.; DARRAH, L.L. Breeding, genetic and seed corn production. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn, chemistry and technology**. St. Paul, Minesota, American Association of Cereal Chemists, Inc., 1987.

## *Capítulo 4*



## **CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS CAROTENOÍDICOS, ANTOCIÂNICOS E (POLI)FENÓLICOS NAS FARINHAS DE VARIEDADES CRIOULAS E LOCAIS DE MILHO ORIGINÁRIAS DO EXTREMO OESTE DE SANTA CATARINA E DE CULTIVARES COMERCIAIS**

### **1 RESUMO**

Atualmente, tem-se sugerido os grãos de milho como alimento funcional, uma vez que estes contêm diversas substâncias benéficas à saúde, podendo existir, entre as variedades, diferenças qualitativas e quantitativas, no que diz respeito as principais classes de compostos. Em função disto, o presente estudo propôs-se a determinar o perfil fitoquímico dos grãos de 26 variedades crioulas e locais de milho (VCLM) e de 5 variedades híbridas comerciais, com ênfase aos compostos carotenoídicos, (poli)fenólicos e antociânicos. Os tecidos constituintes do pericarpo de grãos de coloração branca a roxa de 7 VCLM mostraram ter constituição química diferenciada quando analisados por espectroscopia vibracional de FT-IR associada à análise de PCA (3000–650 ondas.cm<sup>-1</sup>). Subsequentemente, a extração de pigmentos da farinha de todas as variedades, usando butanol-HCl (70:30, v/v), com tempo de incubação de 1 h, revelou serem os flobafenos ou as antocianinas os flavonóides majoritários, consoante à VCLM em análise. No mesmo extrato organossolvente verificou-se ainda elevada amplitude de valores de (poli)fenóis totais (variação de 321 a 1.132µg/g) entre os genótipos. Os principais ácidos (poli)fenólicos detectados por CLAE foram os ácidos protocatecuico, gálico e *t*-cinâmico e quantidade menores dos ácidos clorogênico, caféico, cumárico e ferúlico também foram observadas. O conteúdo de todos os ácido (poli)fenólicos diferiu significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as variedades, sugerindo o maior valor nutricional de algumas VCLM, comparativamente aos cultivares comerciais. No que concerne à quantificação de carotenóides, uma amplitude de valores também foi observada (~ 2 a 26 µg/g), tendo sido os maiores conteúdos detectados nos cultivares comerciais. As xantofilas zeaxantina e luteína foram identificadas como os pigmentos majoritários nas amostras em estudo através da CLAE, além de pequenas quantidades de β-caroteno, β-criptoxantina e α-caroteno. Devido à importância crescente destes pigmentos no setor industrial e/ou farmacêutico, estabeleceu-se um protocolo de purificação destes metabólitos secundários

via técnicas cromatográficas e espectroscópicas, obtendo-se frações com grau de pureza satisfatório (88% - 93%) para zeaxantina e luteína. Estes resultados sugerem algumas VCLM, assim como alguns cultivares comerciais, como fontes potenciais à extração de diversos tipos de compostos de interesse à saúde humana, caracterizando o milho como alimento funcional.

## 2 INTRODUÇÃO

Diversas evidências sugerem uma relação inversa entre o consumo de produtos de origem vegetal e a incidência de doenças degenerativas em humanos. Isto se deve à presença de compostos bioativos nesses alimentos, tais como as vitaminas A, C e E, os (poli)fenóis e os pigmentos denominados carotenóides e antocianinas que exercem efeitos importantes na prevenção de algumas doenças (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

Dentre os pigmentos naturais, os carotenóides são os mais importantes em função de sua ampla distribuição e sua diversidade estrutural. Estes pigmentos são relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, degeneração macular e catarata (FAULKS & SOUTHON, 2001; CHEW *et al.*, 2003; AHMED *et al.*, 2005). As antocianinas, por sua vez, compreendem um grupo de pigmentos pertencentes à classe dos flavonóides, sendo responsáveis pela coloração de tecidos de frutas, flores e folhas (ESCRIBANO-BAILÓN *et al.*, 2004). Diversas funções biológicas também têm sido atribuídas a esses compostos, tais como anti-mutagênica, anti-carcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória (YOSHIMOTO *et al.*, 2001, HAGIWARA *et al.*, 2001; CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; ROSSI *et al.*, 2003). Da mesma forma, os compostos (poli)fenólicos são amplamente distribuídos no Reino Vegetal, desempenhando atividades biológicas importantes no metabolismo humano como antioxidante, anti-inflamatória e anti-carcinogênica (OWEN *et al.*, 2000; ADOM & LIU, 2002).

Neste contexto, diversos estudos vêm sendo realizados visando à investigação de alimentos que contenham compostos químicos de naturezas distintas, geralmente resultantes do metabolismo secundário das plantas, que possam ser usados como alimentos funcionais, ou na produção de suplementos alimentares. Atualmente, a

preocupação com a ingestão de alimentos que possam trazer algum benefício à saúde é um tema em crescente expansão. Cerca de 50% dos casos de doenças cardiovasculares e um terço dos casos de câncer podem ser atribuídos aos hábitos alimentares inadequados (FRANCO, 2006). Dentre os alimentos funcionais que vêm sendo estudados, podemos destacar os grãos de milho porque, a despeito de sua constituição majoritária em amido e proteínas, contém diversas substâncias benéficas a saúde, provenientes do metabolismo secundário, tais como (poli)fenóis, carotenóides e antocianinas (WHITE, 2001). O consumo desse alimento é um hábito bastante antigo na América Latina, principalmente na elaboração de alimentos locais, como tortilhas (México), arepas (Venezuela e Colômbia), cuscuz (Brasil) e polenta (América do Sul) (SERNA-SALDIVAR *et al.*, 2001). O uso do milho como alimento em uma determinada localidade está relacionado às características nutricionais da variedade empregada e também ligado a fatores culturais. No Peru, por exemplo, o milho roxo é amplamente utilizado na fabricação de “Chicha Morada”, uma bebida local bastante popular e com reconhecidos benefícios à saúde humana (BRACK-EGG, 1999). De forma similar, no sul do Brasil, e mais especificamente na região extremo oeste do Estado de Santa Catarina, alguns municípios – Anchieta, Guaraciaba, Novo Horizonte, por exemplo – têm no milho uma cultura de grande importância econômica e sócio-cultural. Naquela região, foram identificadas cerca de 30 variedades crioulas e locais de milho (VCLM) com características diferenciadas, como variações na coloração dos grãos (brancos, amarelos, vermelhos e roxos), por exemplo (OGLIARI & ALVES, 2006). Tal diversidade genética pode estar correlacionada a grande diversidade química presente nos tecidos e órgãos daquele cereal, um aspecto de reconhecida importância em estudos da análise do potencial de biomassas como fonte de compostos de interesse à saúde humana, como por exemplo, alimentação, profilaxia, terapêutica e cosmética. Desse modo, a caracterização química das VCLM pode aprofundar o conhecimento sobre suas singularidades metabólicas, contribuindo desta maneira para uma melhor caracterização e avaliação do germoplasma atualmente disponível. Os dados gerados nesta linha de investigação possibilitarão, em alguma extensão, a otimização do uso corrente, a proposição de novos usos e de novos produtos derivados das biomassas do milho. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi determinar o perfil fitoquímico de grãos de 26 VCLM cultivadas no município de

Anchieta e de 5 variedades híbridas comerciais, com ênfase aos compostos carotenóidicos, (poli)fenólicos e antociânicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção do material vegetal**

##### **3.1.1 Variedades crioulas e locais de milho (VCLM)**

As 26 VCLM utilizadas nesse estudo foram obtidas junto aos pequenos agricultores do município de Anchieta (SC), pelo Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar (SINTRAF). As amostras de grãos foram repassadas ao Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da UFSC e consideraram as variedades Roxo do Valdecir, Rajado 8 Carreiras, Palha Roxa 02, Rosado, Cateto Vermelho, Cateto, Pires, Palha Roxa 1 do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa, Pixurum 07, MPA 13, Branco do Aldanir, Pixurum 04, Mato Grosso, Pixurum 06, Composto São Luis, Asteca, MPA 02, Pixurum 01, Cunha 01, MPA 01, Pixurum 05, Roxo do Emílio, Amarelão 03, Moroti e Língua de Papagaio (**Figura 1**).

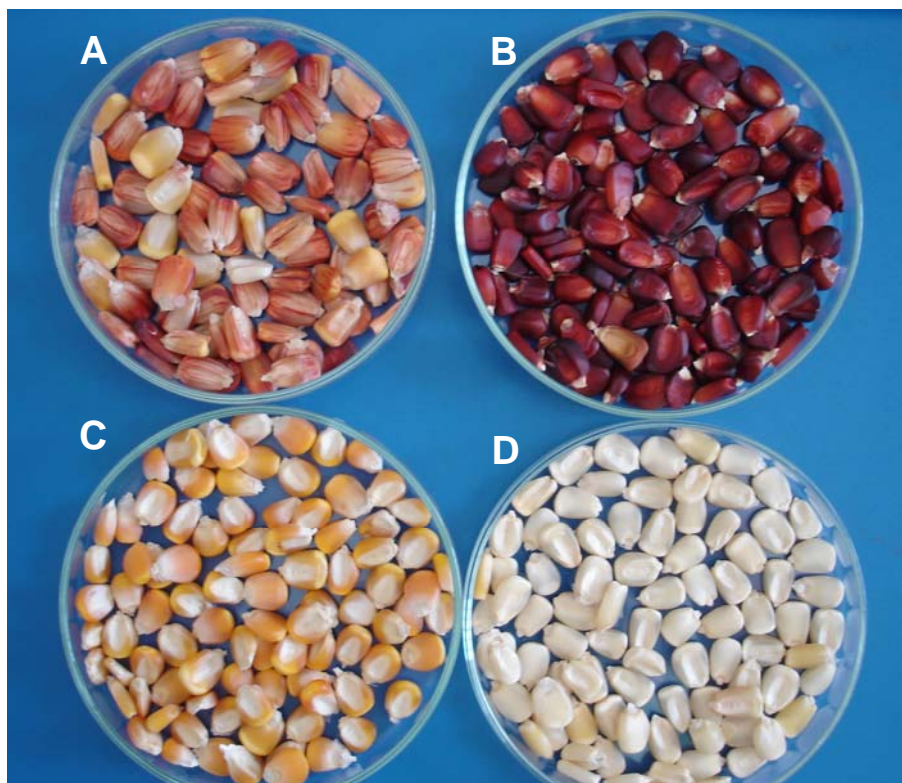
##### **3.1.2 Cultivares híbridos**

Amostras de grãos de cultivares comerciais recomendadas para a região Sul do Brasil foram utilizadas no presente estudo para efeitos de análise comparativa, a saber: *BRS1030*; *BR106*; *AG-9090*; *Pioneer 3069* e *AS-3430*.

O cultivar *BRS1030* (Embrapa) é um híbrido simples, de ciclo precoce, com florescimento em 61 dias, de porte baixo, com grãos semi-duros de cor alaranjada. O cultivar *AG-9090* (Agrocere) é de ciclo precoce, com florescimento em 72-80 dias, com grãos semidentados, de cor alaranjada e com alto teor de óleo. *Pioneer 3069* é um híbrido simples de ciclo super-precoce de cor alaranjada, enquanto *AS-3430* (Agroeste) é um híbrido triplo, de ciclo precoce, porte médio/alto, com grãos duros de cor avermelhada.

#### **3.2 Coleta e preparo das amostras**

Para cada variedade, amostras de grãos (50 g, peso seco) foram trituradas em moinho de laboratório (Cyclone Sample Mill - modelo 3010/019), utilizando-se peneira de 0,1 mm. Após a moagem, as amostras foram imediatamente submetidas aos procedimentos experimentais de interesse, ou embaladas em sacos plásticos, sob vácuo, e conservadas em *freezer* ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) para posterior análise.



**FIGURA 1** - Detalhe da coloração dos grãos das variedades crioulas e locais de milho em estudo. **A** - Rosado, **B** – Roxo do Valdecir, **C** – MPA01, **D** - Branco do Aldanir.

### **3.3 Caracterização do pericarpo dos grãos das VCLM por espectroscopia vibracional na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e análise quimiométrica**

Devido à maior concentração de pigmentos no pericarpo dos grãos de algumas das VCLM, procedeu-se à retirada do pericarpo dos grãos de amostras das variedades: Roxo do Valdecir, Composto São Luis, Mato Grosso Palha Roxa, Branco, Roxo do Emílio, Rajado 8 Carreiras, MPA01, Cateto Vermelho e Língua de Papagaio.

Posteriormente, as amostras de pericarpo foram trituradas, tamisadas (80 mesh) e analisadas (~10 mg, peso seco) por espectroscopia vibracional de FT-IR, em equipamento Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), programado para coletar 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 500 a 4000  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e com resolução de 4  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Os espectros foram processados com auxílio do programa OPUS versão 5.0 (Bruker GmbH). O processamento dos espectros considerou a delimitação da janela espectral a ser analisada (3000-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ), a correção da linha de base, a normalização e a diminuição da razão sinal/ruído. Posteriormente, o conjunto de dados totais dos espectros foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCA), com auxílio do pacote estatístico Unscrambler 9.1.

### **3.4 Estabelecimento do protocolo de extração para a determinação do conteúdo antociânico de sementes de milho**

Amostras de grãos previamente triturados (1 g, peso fresco) da variedade Roxo do Valdecir (grãos com elevado grau de pigmentação), foram extraídas com soluções (20 mL) de metanol-HCl 1% (v/v, 0°C, 30 min), ou butanol-HCl (70:30, v/v, temperatura ambiente, 1 h), conforme descrito por BODDU *et al.* (2004). Os extratos organosolventes foram recuperados por filtração sob vácuo e caracterizados através de espectrofotometria de varredura UV-visível, considerando-se as absorbâncias lidas em janela espectral de 240 nm a 750 nm (Shimadzu 2301).

Posteriormente, foram realizados dois ensaios para determinação do intervalo de tempo para extração otimizada de compostos antociânicos de amostras de farinha (pericarpo) das VCLM, utilizando butanol-HCL (70:30, v/v – 20 mL) como solução extratora, devido à sua maior eficiência. No primeiro procedimento, os compostos alvo foram exaustivamente extraídos de uma mesma amostra (n = 3), durante 6 horas ( $t_{\text{zero}}$ ,  $t_{0,5h}$ ;  $t_{1h}$ ;  $t_{2h}$ ;  $t_{3h}$ ;  $t_{4h}$ ;  $t_{5h}$  e  $t_{6h}$ ). O segundo procedimento compreendeu a extração dos compostos antociânicos do pericarpo da variedade Roxo do Emílio, usando diferentes intervalos de tempo de incubação: 30 min, 1 h, 4 h, 6 h e 15 h. A eficiência de extração das antocianinas nestes ensaios foi monitorada através da determinação dos valores de absorbância na janela espectral entre 240 nm a 750 nm (Shimadzu 2301).

### **3.5 Caracterização e classificação dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de amostras de farinhas das VCLM e cultivares comerciais por espectrofotometria UV-visível associada à quimiometria**

A obtenção do extrato butanol-HCl (70:30, v/v) das farinhas em estudo considerou a incubação de 1 g farinha/amostra (peso seco) na presença de 20 mL daquela solução extratora (temperatura ambiente, 1 h). Após esse período, as amostras foram centrifugadas (2.500 rpm, 15 min) e o sobrenadante monitorado por espectroscopia UV-visível (240 nm a 750 nm). Os extratos organosolventes das amostras foram agrupados, via análise dos componentes principais (PCA), utilizando-se a matriz de covariância dos valores de absorbância, com o auxílio do software Unscrambler 9.1.

### **3.6 Determinação do conteúdo de (poli)fenóis totais**

Uma alíquota (2 mL) do extrato butanol-HCl (70:30, v/v) obtido conforme descrito no *item 3.5* foi evaporada usando N<sub>2</sub> gasoso e ressuspensa em 1,5 mL água: EtOH (70:30, v/v). Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi usada para a determinação do conteúdo de (poli)fenóis totais, na presença do reativo de Folin-Ciocalteu, conforme descrito previamente (SINGLETON & ROSSI, 1965). A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão (ácido gálico - 50 µg/mL - 800 µg/mL -  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,358x$ ) e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

### **3.7 Identificação de compostos (poli)fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Para a identificação dos (poli)fenóis no extrato butanol-HCl (70:30, v/v), uma alíquota de 10 µL da amostra (vide *item 3.6*) foi analisada em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C<sub>18</sub> (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 280 nm. A eluição utilizada consistiu de H<sub>2</sub>O:AcOH:η-BuOH (350:1:10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e a identificação dos compostos de interesse foi feita com base nos tempos de retenção obtidos a partir da análise de amostras padrões [ácido protocatecuico (Sigma P-5630), ácido gálico (Sigma G-7384), ácido *t*-cinâmico (Fluka 96340), ácido siríngico (Fluka 86230), ácido caféico (Sigma C-0625) - 100 µg/mL), sob as mesmas condições

experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita utilizando-se uma curva padrão externa de ácido gálico (100 µg/mL – 2,5 µg/mL;  $r^2 = 0,91$ ;  $y = 1589,9x$ ) e ácido caféico (100 µg/mL - 1µg/mL;  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 532,83x$ ) tomando como base a intensidade dos sinais. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, a partir de análises realizadas em triplicata.

Os conteúdos médios de (poli)fenóis foram inicialmente comparados através da análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software SAS<sup>®</sup> 9.1. Subseqüentemente, esses mesmos resultados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), visando determinar o grau de similaridade entre as mesmas, com o auxílio do programa Fitopac<sup>®</sup> 1.6.4.

### **3.8 Extração e dosagem de carotenóides**

Amostras (1 g, peso seco) de grãos das 26 VCLM e dos cultivares híbridos foram maceradas na presença de 2 volumes de solução de hexano:acetona (v/v), contendo 100 mg/L de hidroxitolueno butilado (BHT). As amostras foram filtradas sob vácuo, centrifugadas por 10 minutos (5.000 rpm) e o solvente evaporado em fluxo de nitrogênio. O extrato concentrado foi ressuspenso em 3 mL de hexano, lavado com 9 mL de água destilada-dionizada (3x) e, posteriormente, submetido à espectrofotometria UV-visível (Shimadzu 2301) para a determinação do teor de carotenóides, através da leitura da absorbância a 450 nm (AMAN *et al.*, 2001). A concentração de carotenóides totais foi calculada usando a fórmula de Lambert-Beer, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ( $A_{1cm}^{1\%} = 2300$ , hexano) conforme previamente descrito por BRITTON (1982). As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.9 Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As amostras de carotenóides obtidas conforme descrito no *item* 3.8 foram analisadas por CLAE. Para tal, o solvente foi evaporado em fluxo de N<sub>2</sub> e o extrato ressuspenso em 300 µL de hexano. Alíquotas (10 µL) de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 25 cm x 4,6 mm Ø interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e



detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH:Acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos de interesse ( $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina) foi feita com base nos tempos de retenção determinados a partir da análise de amostras padrões [luteína (Sigma X-6250), zeaxantina,  $\beta$ -caroteno (Sigma C-0126) – 100  $\mu$ g/mL] sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides utilizou curva-padrão externa de luteína (0,05  $\mu$ g/mL a 55  $\mu$ g/mL,  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 12575x$ ) e considerou a intensidade dos picos de interesse para efeitos de cálculo, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, a partir de análises realizadas em triplicata.

Os conteúdos médios de carotenóides foram comparados através da análise de variância (ANOVA, SAS<sup>®</sup> 9.1). Os mesmos resultados também foram submetidos à análise de componentes principais (PCA, Fitopac<sup>®</sup> 1.6.4).

### **3.10 Purificação e caracterização estrutural dos carotenóides extraídos de sementes de milho por técnicas cromatográficas**

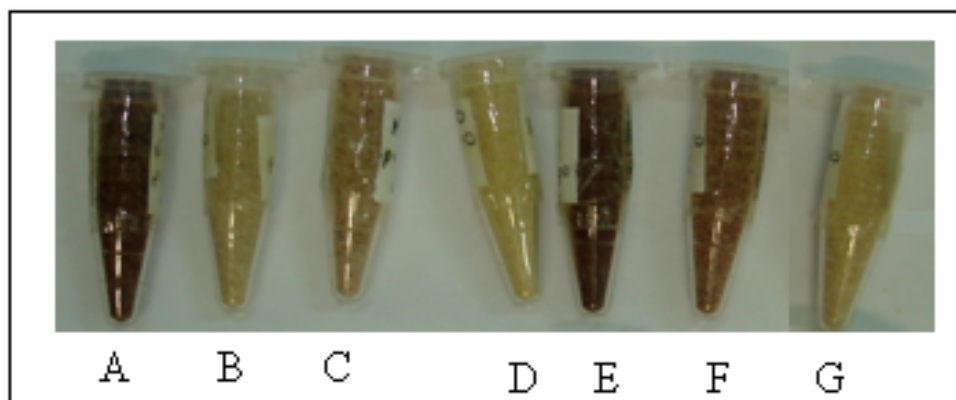
Extratos organosolventes dos pigmentos carotenóidicos da variedade MPA01 e da cultivar híbrida BRS1030 foram obtidos e purificados por cromatografia líquida em coluna (CLC), seguido de análise das frações de interesse por espectrofotometria UV-visível e CLAE.

Os compostos carotenóidicos de amostras de sementes de milho (5 g) foram extraídos, conforme descrito anteriormente no *item 3.8*, aplicados em coluna de alumina (18,3 mL) e eluídos sequencialmente com éter de petróleo, éter de petróleo:éter etílico (1:1, v/v), éter etílico e éter etílico:álcool etílico (1:1, v/v). As frações coletadas para cada um dos solventes orgânicos foram reunidas e monitoradas utilizando-se espectrofotometria UV-visível (Shimadzu 2301), através da leitura da absorbância em janela espectral de 350 nm a 750 nm. Posteriormente, as frações organosolventes da CLC foram analisadas via CLAE, utilizando-se a metodologia descrita no *item 3.9*.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 Análise do pericarpo por FT-IR e quimiometria

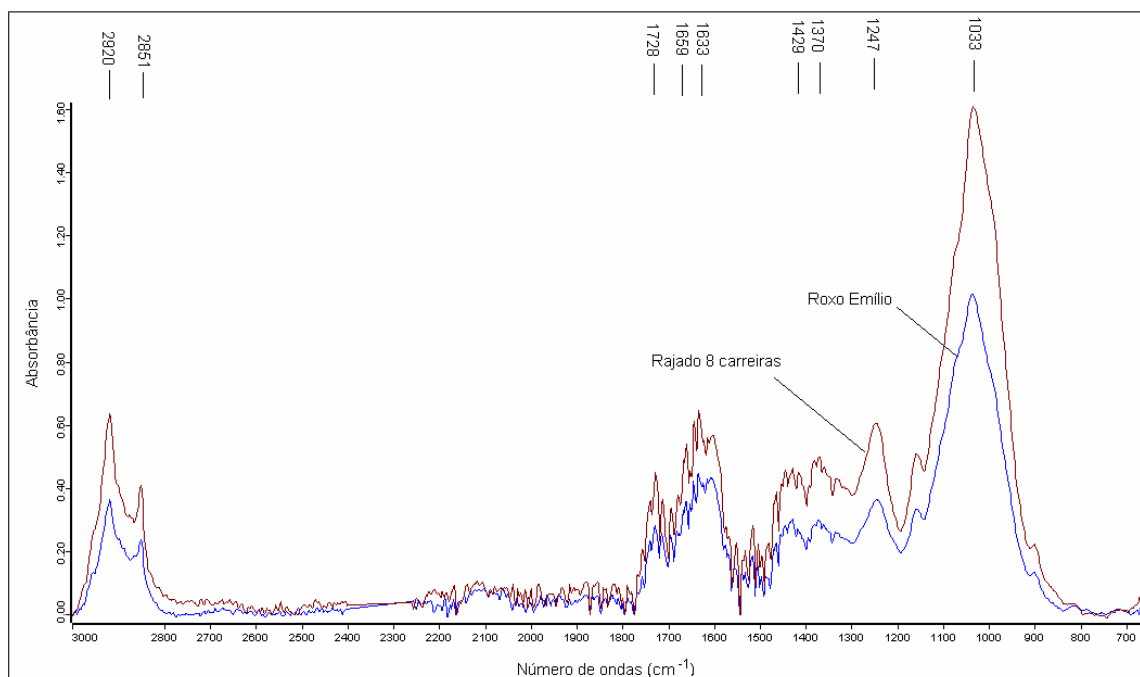
O isolamento do pericarpo dos grãos de algumas VCLM (Roxo do Valdecir, Roxo do Emílio, Composto São Luis, Mato Grosso Palha Roxa, Rajado 8 Carreiras, Língua de Papagaio e Branco - **Figura 2**) foi efetuado visando à investigação de possíveis diferenças de composição química entre aquele germoplasma, usando a espectroscopia de FT-IR associada à análise de PCA.



**FIGURA 2** – Detilhe da coloração das amostras de pericarpos isolados e tamisados dos grãos das variedades Roxo do Valdecir (A), Composto São Luis (B), Mato Grosso Palha Roxa (C), Branco (D), Roxo do Emílio (E), Rajado 8 Carreiras (F) e Língua de Papagaio (G).

Os espectros de FT-IR do pericarpo das VCLM Roxo do Emílio e Rajado 8 Carreiras estão mostrados na **Figura 3**, onde se pode observar os picos majoritários encontrados para a janela espectral compreendida entre 3000-650 ondas.cm<sup>-1</sup>.

A análise dos espectros revelou que para a região de *fingerprint* de carboidratos (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>) as amostras são bastante semelhantes, destacando-se duas bandas em 1150 e outra em 1033 ondas.cm<sup>-1</sup>. Estes sinais possivelmente relacionam-se à presença de polissacarídeos estruturais nas amostras, tais como hemicelulose, pectina e celulose. Além disso, dois sinais típicos de hidrocarbonetos alifáticos (2920 e 2851 ondas.cm<sup>-1</sup>) com elevada intensidade foram detectados em todas as amostras. Esses estão também possivelmente relacionados à presença de ácidos graxos ou lipídeos, uma vez que indicam a deformação axial e angular do grupo metil (-CH<sub>3</sub>) e/ou metileno (CH<sub>2</sub>) (LAMBERT, 2001).

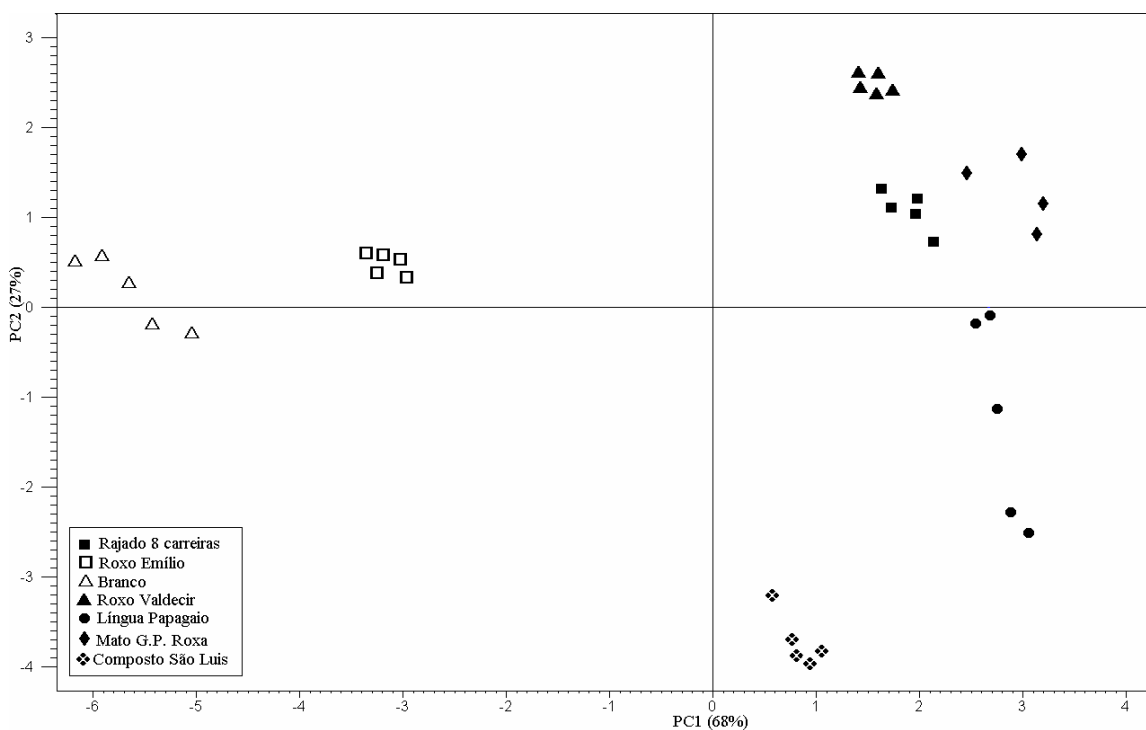


**FIGURA 3** - Espectros de FT-IR ( $3000 - 650 \text{ ondas.cm}^{-1}$ ) de amostras de pericarpos isolados e tamisados das variedades Roxo do Emílio e Rajado 8 Carreiras.

Entretanto, na região espectral compreendida entre  $2200$  e  $1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$ , foram detectadas diferenças para as amostras de pericarpo das VCLM devido à presença de diversos sinais de baixa, média e elevada intensidade. A presença de sinais de fraca intensidade na região entre  $2000-1700 \text{ ondas.cm}^{-1}$  caracteriza a presença de compostos aromáticos, de acordo com SILVERSTEIN (1994) e LAMBERT (2001). As diferenças detectadas para essa região do espectro para as amostras reforçam a hipótese de que a composição de flavonóides presentes no pericarpo dos grãos das VCLM estudadas possui algum grau de distinção.

Tendo em vista as diferenças observadas nos espectros de FT-IR das VCLM, foram calculados os componentes principais (PCA) como estratégia de análise para a detecção de similaridades de composição química do material amostral. A região analisada por PCA compreendeu os sinais detectados entre  $3000-650 \text{ ondas.cm}^{-1}$ , sendo que a matriz de covariância de dados espectrais foi normalizada em seus componentes lineares, enquanto as colunas foram centralizadas.

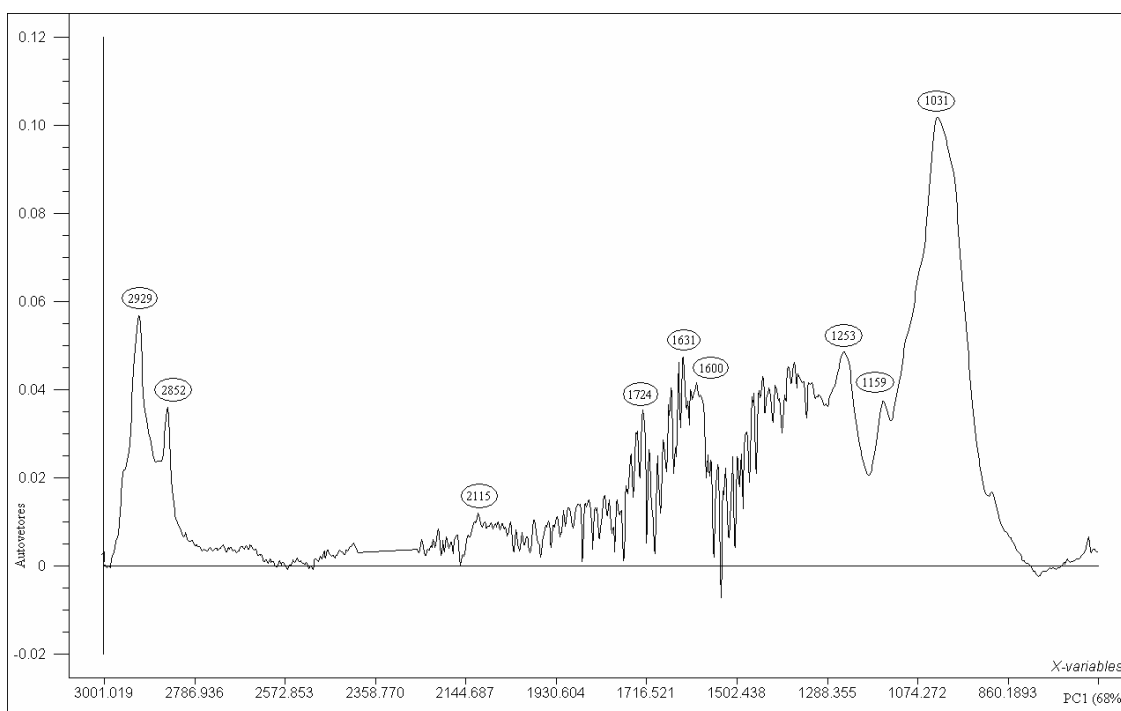
A **Figura 4** mostra a dispersão das variedades em estudo, segundo a determinação dos componentes principais (PCA) da matriz de dados obtida a partir dos espectros de FT-IR para a região compreendida entre 3000-650  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 95% a variância presente nos dados.



**FIGURA 4** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (3000-650  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) de amostras de pericarpos isolados de grãos de 7 variedades crioulas e locais de milho.

A análise do gráfico de distribuição fatorial dos dados de FT-IR revelou que as amostras de pericarpo das 7 VCLM diferiram entre si, principalmente em função do eixo componente PC1. As amostras das variedades Roxo do Emílio e Branco localizaram-se em PC1 negativo, formando dois grupos distintos. Nesta estratégia de análise, as variedades de grãos roxos (Roxo do Emílio e Roxo do Valdecir) evidenciaram uma constituição química distinta, no que diz respeito aos tecidos mais externos de seus grãos (pericarpo). A variedade Roxo do Valdecir agrupou-se às variedades Rajado 8 Carreiras e Mato Grosso Palha Roxa, separado das demais, em PC1 e PC2 (+), apesar das diferenças de coloração de seus grãos. A VCLM Rajado 8 Carreiras possui grãos

variegados e Mato Grosso Palha Roxa alaranjado a avermelhado. As amostras de pericarpo da variedade Língua de Papagaio, que possui grãos roxos e amarelos na mesma espiga, formaram um grupo a parte em PC1 ( + ) e PC2 ( - ), enquanto as amostras da variedade de grãos amarelos Composto São Luis destacaram-se das demais, localizando-se em PC2 negativo. Diversas bandas do espectro de FT-IR contribuíram para a separação das amostras ao longo de PC1, conforme demonstrado pelos valores de contribuição fatorial (**Figura 5**).



**FIGURA 5** - Contribuição fatorial de PC1 para os dados de FT-IR (3000-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) das amostras de pericarpos isolados de grãos das VCLM.

Conclui-se, em função disto, que a técnica de FT-IR associada à análise quimiométrica dos dados constitui uma estratégia eficiente para a detecção de similaridades de composição das amostras de grãos, em função da presença de pigmentos determinantes de seus padrões de cor observados visualmente (brancos, amarelos, alaranjados, vermelhos, variegados e roxos). De forma interessante, estas duas

ferramentas analíticas (FT-IR e PCA) revelaram que as similaridades de coloração dos grãos, detectadas visualmente, não estão necessariamente correlacionadas a uma composição química semelhante.

Estes resultados sugerem que o tecido do pericarpo dos grãos das VCLM possui constituição química distinta no que se refere às diversas classes de compostos detectados por FT-IR. Dessa forma, procedeu-se à investigação dessas diferenças realizando a extração dos pigmentos e caracterizando-os através do perfil espectral UV-visível.

#### **4.2 Extração e caracterização das antocianinas**

As antocianinas, pigmentos responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de vários tecidos vegetais pertencem à família dos flavonóides, têm despertado o interesse da indústria de alimentos pela sua comprovada atividade antioxidante, por exemplo, e como potenciais substitutos de corantes sintéticos (CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; KONG *et al.*, 2003; EINBOND *et al.*, 2004). Em algumas variedades de milho roxo, como as cultivadas nos Andes peruanos, tais compostos vêm sendo estudados como corantes naturais, havendo inclusive diversos registros de seu uso pelas civilizações Incas (ESCRIBANO-BAILÓN *et al.*, 2004; CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2004; CORTÉS *et al.*, 2006). No entanto, para o germoplasma brasileiro, trabalhos dessa natureza são escassos ou inexistentes, apesar do potencial que algumas variedades possuem, dada à intensa pigmentação de seus grãos. Dessa forma, o presente estudo propôs-se a realizar uma investigação preliminar daqueles compostos presentes nos grãos de algumas das VCLM, cultivadas no município de Anchieta (SC), com ênfase à seleção de um método de extração e caracterização usando a espectroscopia de UV-visível.

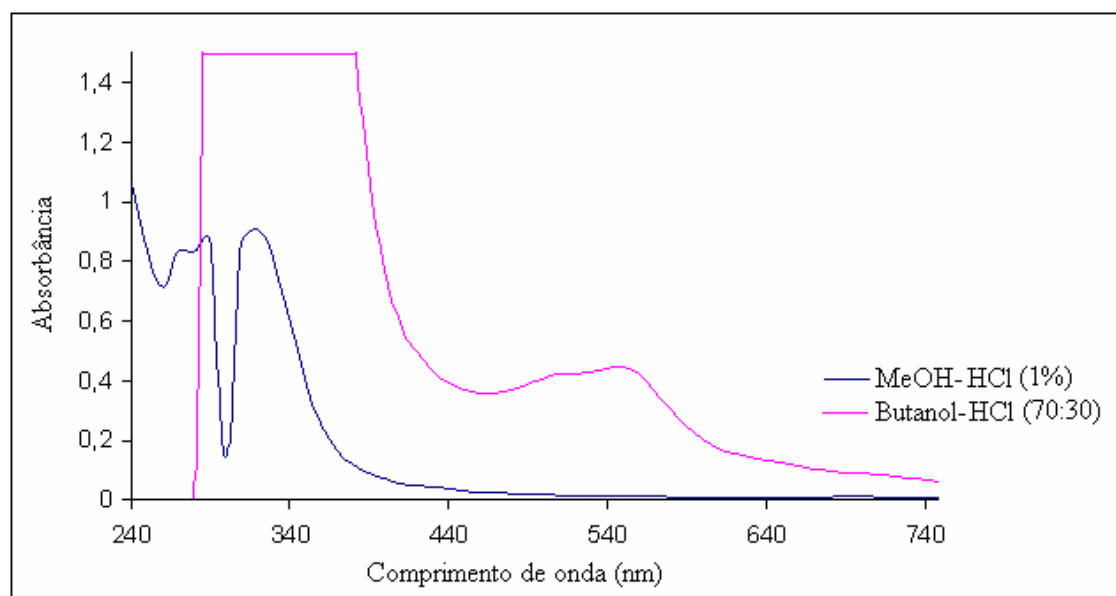
Para caracterizar os pigmentos antociânicos de qualquer tecido vegetal, o primeiro passo, é a seleção de um método de extração adequado. Usualmente, são empregados água, acetona, clorofórmio, metanol ou etanol com a adição de pequenas quantidades de ácido clorídrico ou ácido fórmico, como solventes (GIUSTI & WROLSTAD, 2001). Para o milho roxo dos Andes, o metanol, a água e o ácido trifluoracético (TFA) foram empregados com êxito no processo de extração das antocianinas da farinha

(CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2004; CORTÉS *et al.*, 2006, AOKI *et al.*, 2001). No entanto, cabe ressaltar que em cereais como o milho e o sorgo, além da síntese das 3-hidroxi-antocianinas (cianidina e pelargonidina, por exemplo) uma segunda via, regulada de forma independente, produz as 3-desoxi-antocianinas (apigenidina e luteolinidina), de ocorrência bem mais restrita (GROTEWOLD *et al.*, 1998). Esses compostos têm sido denominados de fitoalexinas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992), e estão relacionados à via de síntese dos flobafenos que são pigmentos insolúveis de coloração vermelha, resultantes da condensação de luteoferol e apiferol (4-flavanóis) (STAFFORD, 1998). Tendo em vista que a caracterização dos pigmentos responsáveis pela coloração dos grãos das VCLM do município de Anchieta é um trabalho inédito, fez-se necessário o emprego de um protocolo de extração eficiente para a remoção dos mais diversos pigmentos. Dessa forma, utilizou-se o protocolo descrito por GROTEWOLD *et al.* (1998), usando butanol-HCl (70:30, v/v) que tem-se mostrado adequado para remoção dos 4-flavanóis.

A **Figura 6** mostra o perfil espectral de extratos de grãos da variedade Roxo do Valdecir (coloração de grãos roxa – **Figura 1**) obtido com a utilização de MeOH-HCl (1%, v/v) e butanol-HCl (70:30, v/v). Analisando a **Figura 6**, verificou-se que o solvente MeOH-HCl (1%, v/v) não se mostrou adequado à extração dos pigmentos flavonoídicos de grãos da variedade Roxo do Valdecir, em função dos baixos valores de absorbância na faixa espectral característica daqueles compostos, isto é, 400 e 560 nm.

De outra forma, o protocolo descrito para a extração de 4-flavanóis utilizando solução de butanol-HCl (70:30, v/v - GROTEWOLD *et al.*, 1998), revelou na região espectral característica dos pigmentos flavonoídicos (400-560 nm), um aumento significativo nos valores de absorbância. Além disto, um valor máximo de absorbância para aquela janela espectral foi detectado em 550 nm, sugerindo a presença de 4-flavanóis e flobafenos nesse extrato, em concordância do descrito por STAFFORD (1998) e GROTEWOLD *et al.* (1998). É importante considerar que a completa elucidação da estrutura dos flobafenos ainda não foi concluída, mas que os mesmos são produto da polimerização não enzimática dos 4-flavanóis (STYLES & CESKA, 1989).

Tendo em vista os resultados superiores obtidos com a utilização da solução extratora de butanol-HCl (70:30, v/v), um novo experimento foi realizado para otimizar o tempo de incubação das amostras para a obtenção daqueles pigmentos.



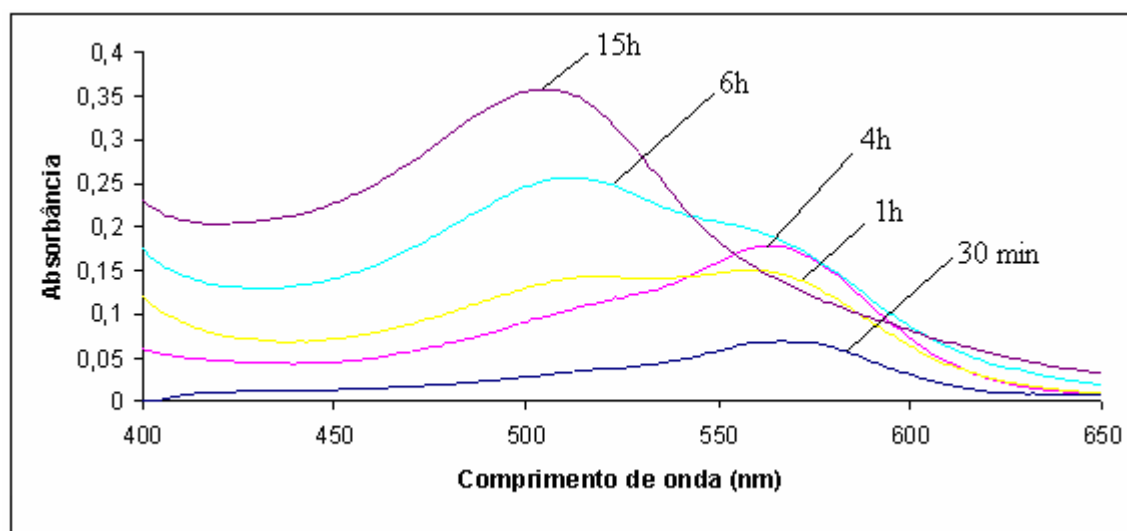
**FIGURA 6** - Perfis de absorbância UV-visível dos extratos MeOH-HCl (1%, v/v) e butanol-HCl (70:30, v/v) das amostras de grãos da variedade Roxo do Valdecir, para a janela espectral de 240 a 750 nm.

Para tanto, amostras de pericarpo (10 mg) da variedade Roxo do Emílio foram extraídas, à temperatura ambiente, e monitoradas usando espectrofotometria UV-visível (400 a 650 nm) por períodos de 30 minutos a 15 horas - **Figura 7**. Com períodos de incubação das amostras de 30 minutos e 1 h detectou-se nos extratos um valor máximo de absorbância para os pigmentos em 566 nm. Entretanto, a partir de 4 h percebeu-se uma mudança no perfil espectral, embora os valores de absorbância tenham sido superiores aos tempos de 30 min e 1h, indicando a oxidação dos compostos durante período de extração. O valor máximo de absorbância ocorreu em 507 nm com 15 h de extração, enquanto picos de máximas foram detectados em 566 nm e 507 nm com 4h e 6h de extração, respectivamente.

Esses resultados sugerem que possivelmente os pigmentos extraídos começaram a sofrer oxidação em função da exposição do extrato ao ambiente atmosférico, o que pode



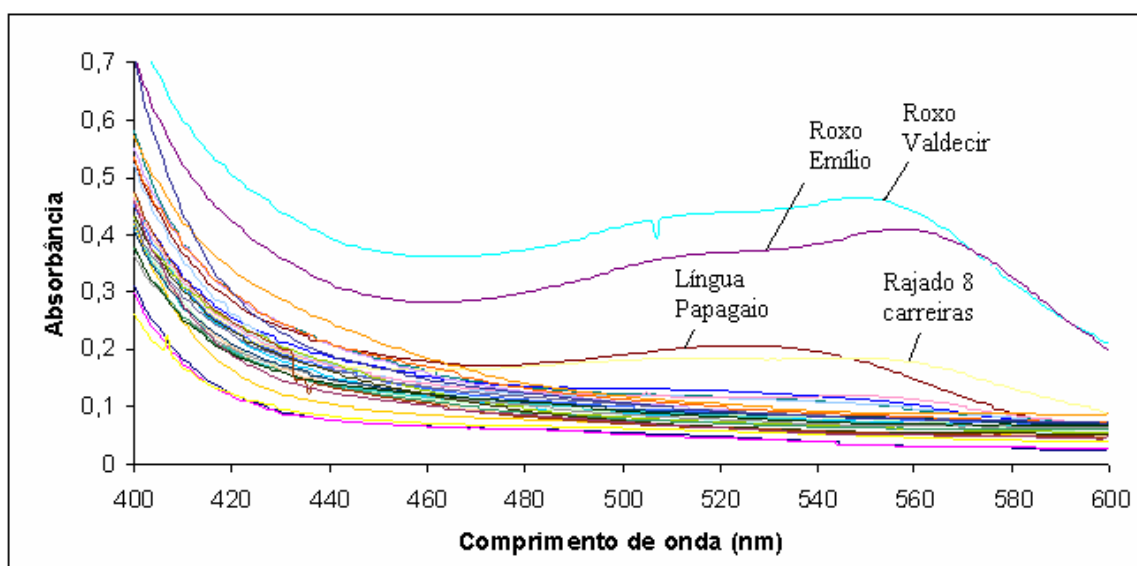
ser evidenciado pela mudança no valor máximo de absorbância para 507 nm (efeito hipocrômico).



**FIGURA 7** – Perfil de absorbância UV-visível (400 a 650 nm) de extratos butanol-HCl (70, 30%, v/v) de amostras de pericarpo da variedade Roxo do Emílio, segundo o tempo de incubação.

Portanto, com o objetivo de comparar os perfis espectrais dos extratos butanol-HCl (70: 30, v/v) dos grãos das 26 VCLM e dos 5 cultivares comerciais, adotou-se o tempo de extração 1 h. A **Figura 8** mostra o perfil espectral desses extratos para uma janela entre 400 e 750 nm. O gráfico mostra que o perfil espectral entre as variedades são bastante semelhantes, exceto para as variedades Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir, Rajado 8 Carreiras e Língua de Papagaio, com valores de absorbância superiores às demais entre 440 e 580 nm. O perfil espectral na região entre 400 e 600 nm dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) dos grãos das duas variedades intensamente pigmentadas, Roxo do Emílio e Roxo do Valdecir, foi bastante semelhante. A variedade Roxo do Valdecir apresentou os maiores valores de absorbância em 547-550 nm, enquanto para Roxo do Emílio este comportamento foi detectado na faixa de 553-562 nm. Esses resultados sugerem a presença dos pigmentos flobafenos como os responsáveis pela coloração dos grãos nas duas variedades roxas, com destaque para a variedade Roxo do Valdecir, conforme mostrado na **Figura 8**. O extrato da variedade Rajado 8 Carreiras, por sua vez, mostrou valores de absorbância superiores entre 510 e 551 nm, o que possivelmente

indica a presença de outros pigmentos de origem antociânica além dos flobafenos, em maiores concentrações em relação a estes últimos metabólitos secundários. O extrato da variedade Língua de Papagaio revelou um perfil espectral distinto em relação aos demais, uma vez que os maiores valores de absorbância foram detectados entre 516 e 533 nm, sugerindo um menor teor de flobafenos e a predominância das antocianinas. O perfil espectral dos cultivares comerciais visualmente se assemelhou ao das VCLM com coloração de grãos semelhante (amarelo-alaranjado).

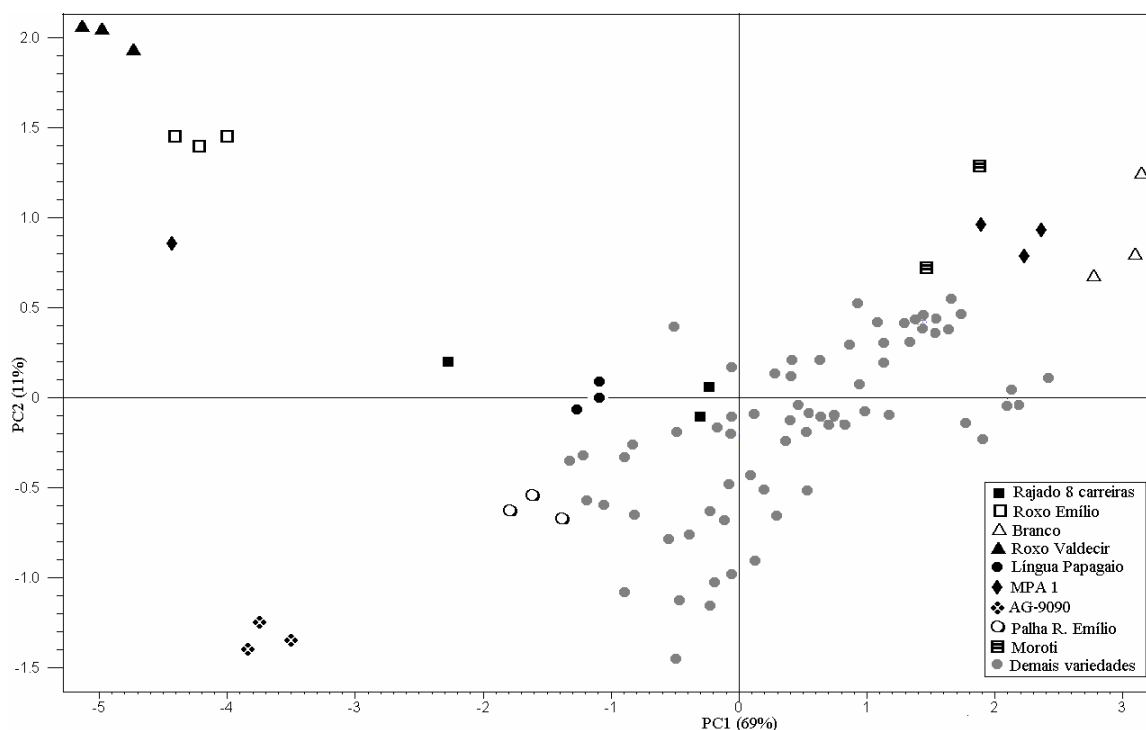


**FIGURA 8** – Perfil de absorbância UV-visível dos extratos butanol-HCl (70, 30%, v/v) de amostras de grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais, para uma janela espectral entre 400 a 600 nm.

É importante considerar que esses resultados são de caráter preliminar, porém sugerem uma constituição de flavonóides distinta para as VCLM. Ressalta-se que os pigmentos dos grãos de algumas VCLM, tais como Rosado, Cateto Vermelho, Palha Roxa do Emílio e Mato Grosso Palha Roxa, não foram extraídos com a solução de butanol-HCl (70:30, v/v), corroborando a hipótese de que a pigmentação observada não é decorrente dos mesmos pigmentos.

Posteriormente, os dados espectrais de UV-visível foram submetidos à determinação dos componentes principais (PCA), com o objetivo de classificar os extratos butanólico dos grãos das VCLM e dos cultivares comerciais.

A **Figura 9** apresenta a separação das amostras, para a janela espectral entre 289-750 nm, segundo os eixos componentes PC1 e PC2, que explicaram em 80% a variabilidade total dos dados.

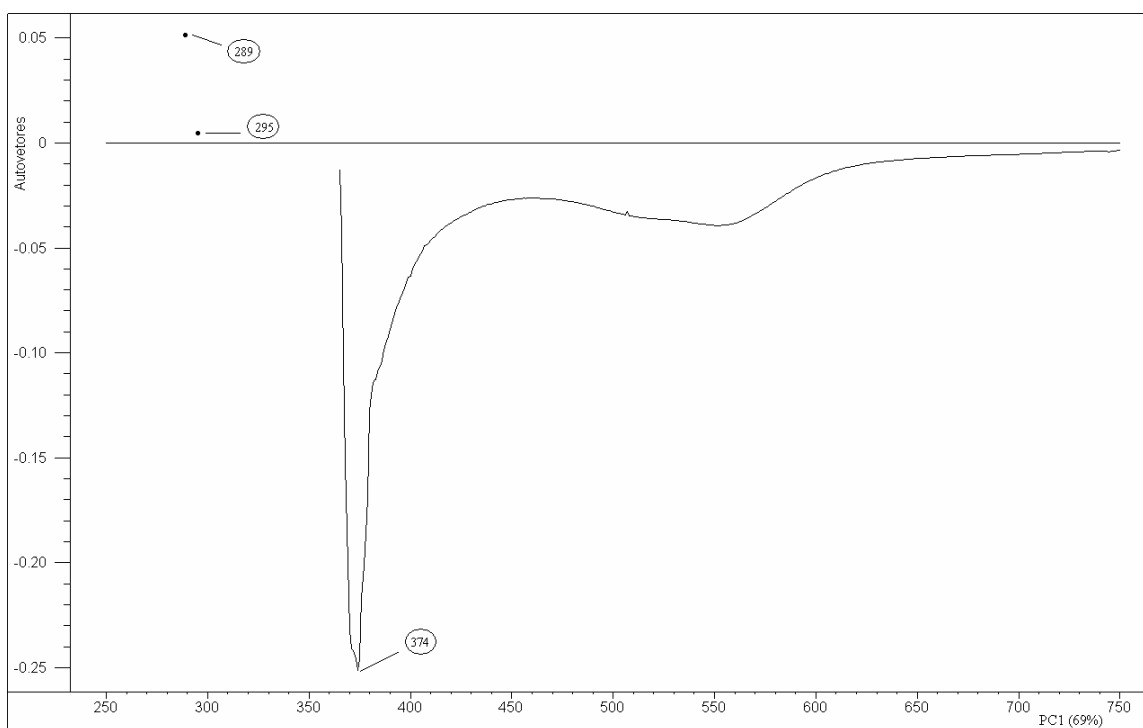


**FIGURA 9** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os valores de absorvância (289-750 nm) dos extratos butanol-HCL (70:30, v/v) de grãos das 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais em estudo.

As duas variedades roxas (Roxo do Valdecir e Roxo do Emílio) agruparam-se em PC1 (-) e PC2 (+), enquanto o cultivar comercial AG-9090 destacou-se das demais em PC1 e PC2 (-). O extrato butanólico da variedade Branco, um germoplasma de reduzida pigmentação de grãos, (**Figura 1**) também localizou-se distante das demais, em PC1 e PC2 (+). O agrupamento observado na **Figura 9** pode ser atribuído aos comprimentos de onda em 289 nm e 295 nm (PC1+0 e 374 nm (PC1 negativo), consoante aos valores das contribuições fatoriais (**Figura 10**).

Um segundo procedimento experimental de PCA foi realizado para o mesmo conjunto de dados, porém considerando apenas a região espectral compreendida entre

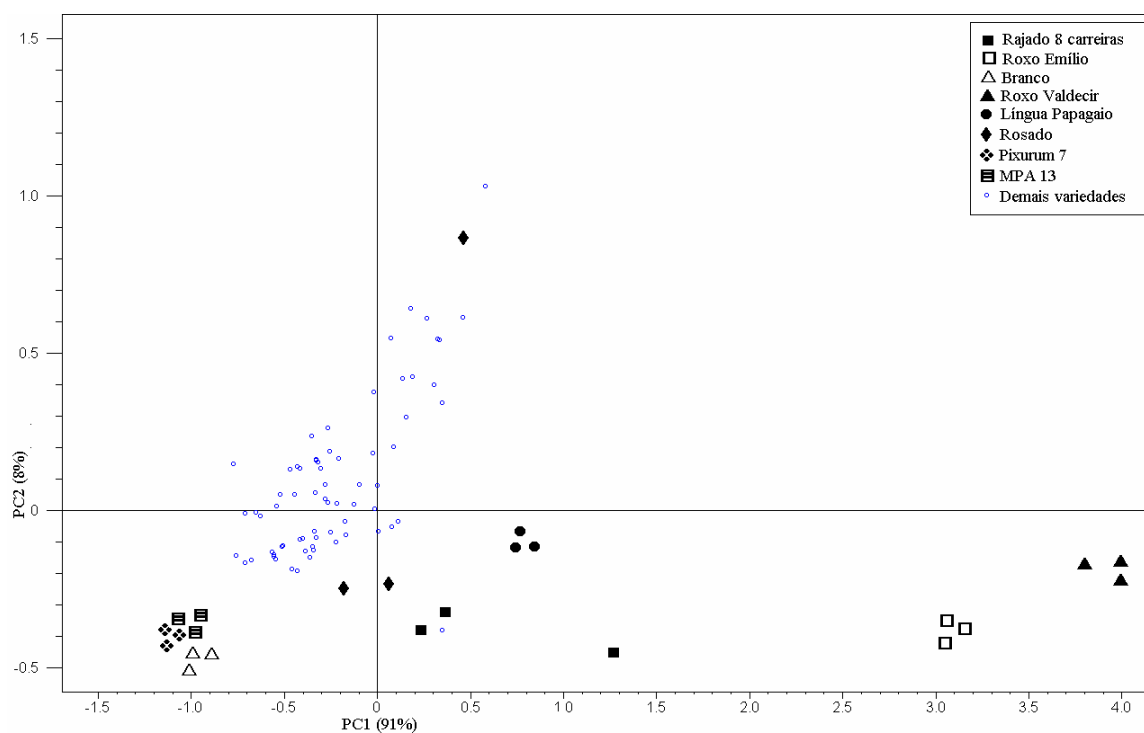
400-600nm, que é característica para os pigmentos antociânicos e flobafenos (**Figura 11**).



**FIGURA 10** - Contribuição fatorial de PC1 das absorbâncias (400 - 600 nm) dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de grãos de 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.

O padrão de agrupamento observado para a região espectral considerada foi bastante semelhante ao observado na **Figura 9**, com 98% da variabilidade total dos dados sendo explicada por PC1 e PC2. Os extratos das variedades roxas apresentaram ocorrência distinta (PC1 + e PC2 -) em relação aos demais. As variedades Língua de Papagaio e Rajado 8 Carreiras não agruparam-se próximas das roxas (PC1 + e PC2 -). Esses resultados corroboram a hipótese de que os grãos das VCLM em estudo possuem constituição química distinta quanto aos compostos pertencentes à classe dos flavonóides. Além disso, analisando a **Figura 11** verifica-se que através dessa técnica foi possível agrupar, em PC1 e PC2 negativos, as variedades com grãos brancos (Branco, Pixurum 7 e MPA13), as quais revelaram um perfil de composição química distinto em relação às demais.

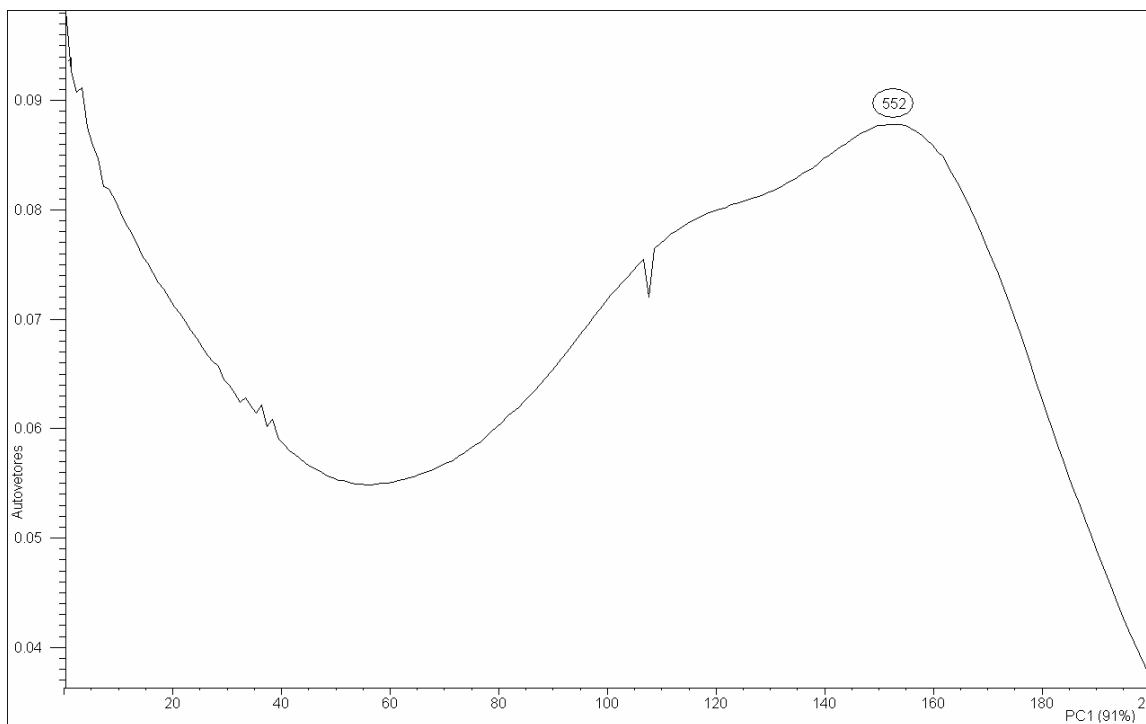
A contribuição fatorial (**Figura 12**) calculada para os dados espectrais em análise (400-600 nm) revelou, novamente, que a presença de flobafenos nos grãos das variedades roxas foi responsável pela separação das mesmas, uma vez que o comprimento de onda próximo a 550 nm é característico para essa classe de compostos (STAFFORD, 1998 e GROTEWOLD *et al.*, 1998).



**FIGURA 11** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os valores de absorvância na janela espectral de 400 a 600nm dos extratos butanol-HCL (70:30, v/v) de grãos das 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.

Cabe destacar que os cultivares comerciais agruparam-se às demais VCLM, indicando composição química similar no que diz respeito aos compostos extraídos com butanol-HCl (70:30, v/v). Dessa forma, os resultados encontrados até o presente momento sugerem fortemente a presença de pigmentos flobafenos nos grãos de algumas das VCLM como os responsáveis pela pigmentação do pericarpo. Sugere-se um aprofundamento da análise empregando ferramentas analíticas que possam identificá-los

de forma inequívoca, tais como a espectrometria de massa e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.



**FIGURA 12** - Contribuição fatorial de PC1 das absorvâncias (400 - 600 nm) dos extratos butanol-HCl (70:30, v/v) de grãos de 26 variedades crioulas e locais de milho e cultivares comerciais.

### 4.3 Extração e Caracterização dos (poli)fenóis

A correlação entre o consumo de grãos inteiros e a redução do risco de doenças crônicas em seres humanos, tais como o câncer e doenças cardiovasculares (JACOBS *et al.*, 1995; JACOBS *et al.*, 1998), justifica a necessidade de estudos de caracterização dos constituintes fitoquímicos nesses alimentos. No entanto, são escassos na literatura os trabalhos realizados com grãos, comparativamente ao grande número de estudos realizados com frutas e vegetais, apesar da predominância daqueles na alimentação humana. Dentre as moléculas candidatas a exercerem benefícios à saúde humana, destacam-se os (poli)fenóis pela sua comprovada ação antioxidante (ADOM & LIU, 2002), entre outras atividades biológicas.

No presente estudo, a extração dos compostos (poli)fenólicos não antociânicos das farinhas de milho, foi realizada utilizando-se a solução extratora de butanol-HCl (70:30, v/v). No entanto, a detecção daqueles metabólitos secundários no extrato bruto não foi possível sem a realização de um “*clean-up*” das amostras, devido à presença de múltiplos compostos interferentes. Portanto, após a evaporação do solvente de extração, as amostras foram solubilizadas (2 mL) em mistura de EtOH: H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) como estratégia para remoção dos contaminantes.

O conteúdo médio de (poli)fenóis totais nos extratos EtOH: H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) das amostras de farinhas de milho foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965) e os resultados estão apresentados na **Tabela 1**. Pode-se observar que os valores de conteúdo médio para essa classe de compostos apresentaram grande amplitude para as amostras em estudo, isto é, 516,29 µg (poli)fenóis totais/g farinha a 1.132,04 µg (poli)fenóis totais/g farinha para as variedades Mato Grosso e Rosado, respectivamente. Dentre as VCLM analisadas, teores apreciáveis desses metabólitos secundários foram ainda identificados nas amostras Roxo do Emílio (988 µg/g), Roxo do Valdecir (988 µg/g) e Rajado 8 Carreiras (908 µg/g). Por outro lado, os menores conteúdos de (poli)fenóis foram detectados em farinhas dos grãos das variedades MPA1 e Cateto Vermelho, cerca de 545 µg/g e 585 µg/g, respectivamente. Entre os cultivares comerciais, conteúdos inferiores de (poli)fenóis foram observados em relação às VCLM, porém com uma significativa amplitude - 321,63 µg/g (AG-9090) a 789,96 µg/g (BR106). Os resultados quantitativos para algumas das VCLM foram similares aos encontrados em amostras de grãos roxos de variedades de milho cultivados no Andes peruanos (1.328 µg/g a 1.903 µg/g) (CEVALLOS-CASALS & CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007) e superiores aos determinados para o milho doce comercializado nos EUA (250 µg/g a 470 µg/g) (DEWANTO *et al.*, 2002).

**TABELA 1** - Concentração média\* ( $\mu\text{g/g}$ , média  $\pm$  desvio padrão) de (poli)fenóis totais \*\*, ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *t*-cinâmico e ácido ferúlico \*\*\* em amostras de grãos de variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.

	<i>Variedade</i>	<i>Total**</i>	<i>Ácido</i>	<i>Ácido</i>	<i>Ácido</i>	<i>Ácido</i>	<i>Ácido t-</i>	<i>Ácido</i>
			<i>Protocatecuico</i>	<i>Gálico</i>	<i>Clorogênico</i>	<i>Caféico</i>	<i>Cinâmico</i>	<i>Ferúlico</i>
	<i>Rosado</i>	516,29 $\pm$ 124,68	142,93 $\pm$ 18,65	156,35 $\pm$ 9,77	32,94 $\pm$ 9,81	<i>n.d.</i>	172,33 $\pm$ 4,98	<i>n.d.</i>
	<i>MPA 1</i>	545,92 $\pm$ 47,69	120,31 $\pm$ 5,64	122,74 $\pm$ 5,60	36,77 $\pm$ 9,50	<i>n.d.</i>	188,00 $\pm$ 10,26	<i>n.d.</i>
	<i>Cateto Vermelho</i>	585,41 $\pm$ 31,76	196,26 $\pm$ 4,29	148,91 $\pm$ 2,88	<i>n.d.</i>	6,85 $\pm$ 5,24	299,29 $\pm$ 5,74.	6,24
	<i>Moroti</i>	593,88 $\pm$ 176,65	202,25 $\pm$ 2,14	198,73 $\pm$ 17,28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	175,30 $\pm$ 14,09	<i>n.d.</i>
	<i>Cateto</i>	598,11 $\pm$ 50,49	146,73 $\pm$ 14,63	151,26 $\pm$ 24,15	24,15 $\pm$ 0,88	<i>n.d.</i>	228,93 $\pm$ 14,66	3,09 $\pm$ 2,92
	<i>Pires</i>	617,86 $\pm$ 40,37	193,88 $\pm$ 11,19	180,19 $\pm$ 11,38	<i>n.d.</i>	5,52 $\pm$ 6,27	191,28 $\pm$ 13,04	<i>n.d.</i>
<b>Variedades Locais</b>	<i>Composto São Luis</i>	663,00 $\pm$ 96,53	205,33 $\pm$ 27,92	154,63 $\pm$ 18,60	33,30 $\pm$ 3,68	<i>n.d.</i>	228,36 $\pm$ 28,58	4,61 $\pm$ 0,38
	<i>Pixurum 4</i>	664,41 $\pm$ 27,75	97,24 $\pm$ 4,75	113,89 $\pm$ 3,61	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	117,97 $\pm$ 9,65	<i>n.d.</i>
	<i>Branco</i>	683,45 $\pm$ 62,84	171,79 $\pm$ 64,16	224,48 $\pm$ 58,16	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	111,14 $\pm$ 38,60	<i>n.d.</i>
	<i>MPA 2</i>	691,21 $\pm$ 95,23	156,87 $\pm$ 25,38	138,69 $\pm$ 23,37	<i>n.d.</i>	13,03 $\pm$ 1,60	222,46 $\pm$ 39,23	<i>n.d.</i>
	<i>MPA 13</i>	691,21 $\pm$ 38,17	224,62 $\pm$ 23,25	182,76 $\pm$ 21,89	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	198,61 $\pm$ 17,55	8,42 $\pm$ 0,27
	<i>Pixurum 6</i>	692,62 $\pm$ 20,00	190,70 $\pm$ 9,04	200,47 $\pm$ 32,69	<i>n.d.</i>	12,30 $\pm$ 2,82	218,23 $\pm$ 13,90	<i>n.d.</i>
	<i>Asteca</i>	710,96 $\pm$ 58,18	141,65 $\pm$ 8,77	126,26 $\pm$ 7,39	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	257,87 $\pm$ 16,48	5,18 $\pm$ 0,29
	<i>Mato Grosso P. Roxa</i>	733,53 $\pm$ 21,30	134,68 $\pm$ 18,63	146,49 $\pm$ 12,93	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	224,27 $\pm$ 29,75	8,33 $\pm$ 2,20
	<i>Palha R. do Emílio</i>	736,35 $\pm$ 77,23	174,54 $\pm$ 11,62	265,14 $\pm$ 16,20	4,38 $\pm$ 2,48	<i>n.d.</i>	163,28 $\pm$ 16,02	<i>n.d.</i>
	<i>Língua de Papagaio</i>	737,76 $\pm$ 216,50	150,48 $\pm$ 16,64	161,39 $\pm$ 22,58	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	184,31 $\pm$ 15,73	4,48 $\pm$ 0,98
	<i>Cunha</i>	747,64 $\pm$ 56,20	177,72 $\pm$ 47,80	245,78 $\pm$ 47,99	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	103,48 $\pm$ 28,86	<i>n.d.</i>



	<i>Pixurum 1</i>	761,74 ± 21,99	226,80 ± 12,00	178,68 ± 9,85	<i>n.d.</i>	13,85 ± 0,05	231,92 ± 12,34	9,72 ± 1,57
	<i>Palha Roxa</i>	780,08 ± 72,97	127,27 ± 21,07	126,37 ± 15,17	<i>n.d.</i>	5,63 ± 1,24	208,44 ± 30,16	<i>n.d.</i>
	<i>Pixurum 7</i>	788,55 ± 97,64	190,24 ± 7,90	152,70 ± 5,19	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	179,00 ± 6,88	<i>n.d.</i>
	<i>Pixurum 5</i>	835,10 ± 175,98	163,36 ± 33,35	161,17 ± 30,85	5,43 ± 0,99	<i>n.d.</i>	141,44 ± 25,49	<i>n.d.</i>
	<i>Amarelão 3</i>	839,33 ± 64,64	188,12 ± 10,29	201,47 ± 9,67	37,41 ± 6,60	14,47 ± 0,61	283,75 ± 14,70	<i>n.d.</i>
	<i>Rajado 8 Carreiras</i>	908,45 ± 79,88	190,19 ± 25,25	176,92 ± 27,31	<i>n.d.</i>	14,66 ± 3,45	227,11 ± 4,48	13,33 ± 8,65
	<i>Roxo do Valdecir</i>	998,73 ± 62,34	177,71 ± 6,93	204,27 ± 14,62	<i>n.d.</i>	33,70 ± 6,56	234,34 ± 9,68	<i>n.d.</i>
	<i>Roxo do Emílio</i>	988,73 ± 7,33	134,24 ± 7,89	204,35 ± 6,04	38,35 ± 7,44	14,94 ± 2,60	192,36 ± 10,36	4,96 ± 1,13
	<i>Mato Grosso</i>	1132,04 ± 397,99	168,42 ± 10,07	158,09 ± 7,68	<i>n.d.</i>	43,47 ± 1,33	280,16 ± 30,97	<i>n.d.</i>
	<i>AG-9090</i>	321,63 ± 11,97	422,89 ± 40,64	187,67 ± 4,77	25,44 ± 8,09	<i>n.d.</i>	310,00 ± 7,85	10,24 ± 3,46
<b>Variedades Comerciais</b>	<i>BRS 1030</i>	462,69 ± 27,21	129,63 ± 0,98	156,60 ± 4,65	<i>n.d.</i>	9,16 ± 0,00	158,84 ± 3,74	5,63 ± 0,11
	<i>AS-3430</i>	675,69 ± 25,86	116,15 ± 7,97	137,82 ± 8,09	2,25 ± 0,11	<i>n.d.</i>	121,62 ± 10,36	<i>n.d.</i>
	<i>Pioneer 3069</i>	774,44 ± 36,89	185,54 ± 16,80	174,39 ± 14,40	30,66 ± 4,92	16,07 ± 1,67	282,63 ± 24,03	17,88 ± 0,88
	<i>BR106</i>	789,96 ± 118,22	338,05 ± 65,93	189,41 ± 29,52	9,12 ± 4,56	<i>n.d.</i>	214,04 ± 36,98	13,61 ± 8,65

\* Média de 3 extrações ± SD (desvio padrão da média);

\*\* Determinado por espectrofotometria UV-visível (SINGLETON & ROSSI, 1965)

\*\*\* Determinado por CLAE (280nm) e conteúdo de (poli)fenóis calculados através da intensidade do pico de interesse – média de 3 injeções.

Para as variedades onde se encontrou um maior conteúdo de (poli)fenóis (Mato Grosso, Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir e Rajado 8 Carreiras) sugere-se, além do valor nutricional superior para a farinha, um pericarpo com maior resistência, uma vez que polissacarídeos de parede celular estão unidos por ácidos (poli)fenólicos (KROON & WILLIAMSON, 1999).

Dessa forma, os grãos dessas variedades, eventualmente, são menos susceptíveis ao ataque de patógenos, além de apresentarem uma textura diferenciada, uma característica que pode interferir no tempo de cozimento dos grãos. Nesse sentido, POZO-INSFRAN *et al.* (2006) sugeriram que o maior tempo de cozimento para o milho branco, comparativamente ao milho roxo dos Andes, está associado ao maior conteúdo de (poli)fenóis deste último.

Subsequentemente à quantificação dos compostos (poli)fenólicos totais, procedeu-se a identificação dos mesmos por CLAE. Os perfis de eluição cromatográfica revelaram a existência de 3 picos majoritários em todas as amostras analisadas, os quais foram identificados pela comparação dos tempos e retenção ( $R_t$ ) com compostos padrões, como sendo ácido protocatecuico ( $R_t = 4,53$  min), ácido gálico ( $R_t = 5,95$  min) e ácido *t*-cinâmico ( $R_t = 18,82$  min). Foram detectados ainda quantidades menores de ácido clorogênico ( $R_t = 11,79$  min), ácido caféico ( $R_t = 16,50$  min), ácido *m*-cumárico ( $R_t = 28,74$  min) e ácido ferúlico ( $R_t = 32,01$  min) em algumas amostras, sendo esses possivelmente os compostos (poli)fenólicos livres. Isto porque, aproximadamente 85% dos (poli)fenóis dos grãos de milho encontram-se ligados aos polissacarídeos de parede celular (ADOM & LIU 2002). No presente estudo, o uso de butanol-HCl (70:30, v/v) como solução de extração foi um procedimento suficientemente severo para liberar os (poli)fenóis ligados à parede celular do pericarpo dos grãos, como mostrado na **Figura 6**. Sugerimos que esses estão representados pelo pico com tempo de retenção em 18,82 min e que, portanto, este não se refere a um composto isolado, mas aos ácidos hidroxicinâmicos, tais como *p*-cumárico, caféico e ferúlico e seus derivados que estão presos aos polissacarídeos da parede celular (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). A identificação desses ácidos hidroxicinâmicos liberados durante a extração dos polissacarídeos de parede celular não foi possível usando as condições cromatográficas descritas anteriormente. Para isso, seria necessário realizar a hidrólise alcalina das amostras como foi realizado no estudo de PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS (2007).

Os resultados referentes à análise dos compostos (poli)fenólicos por CLAE nas amostras de farinhas das VCLM e cultivares comerciais são apresentados na **Tabela 2**. As

principais diferenças foram observadas quanto à presença de (poli)fenóis livres. Nesse sentido, o ácido clorogênico foi detectado apenas nas VCLM Rosado, Cateto, Composto São Luis, Palha Roxa do Emílio, Pixurum 5, Amarelão 3 e Roxo do Emílio, com teores variando entre 5,43 µg/g a 38,35 µg/g. Na farinha dos cultivares comerciais, detectou-se ácido clorogênico em todas as amostras (2,25 µg/g a 30,66 µg/g), exceto para a *BRS1030*. O conteúdo de ácido caféico variou entre 5,52 µg/g a 43,47 µg/g nas variedades Cateto Vermelho, Pires, MPA2, Pixurum 6, Pixurum 1, Palha Roxa, Amarelão, Rajado 8 Carreiras, Roxo do Valdecir, Roxo do Emílio e Mato Grosso. Nos cultivares comerciais apenas *BRS1030* (9,16 µg/g) e *Pioneer 3069* (16,07 µg/g) apresentaram esse metabólito secundário. O ácido ferúlico livre foi detectado nas VCLM Cateto Vermelho, Cateto, Composto São Luis, MPA13, Asteca, Mato Grosso Palha Roxa, Língua de Papagaio, Pixurum 1, Rajado 8 Carreiras e Roxo do Emílio (3,09 µg/g a 13,33 µg/g) e em todos os cultivares comerciais (5,63 µg/g a 17,88 µg/g), exceto *AS-3430*. Esses são resultados de interesse, uma vez que alguns desses compostos (por exemplo os ácidos ferúlico e caféico) são encontrados em quantidades significativas apenas em grãos, como o milho, o trigo e o arroz. O ácido ferúlico é reconhecido por apresentar atividade antioxidante, protegendo as membranas celulares (SRINIVASAN *et al.*, 2006), anti-mutagênica (MURAKAMI *et al.*, 2002) e por preventiva de doenças como o câncer (SRINIVASAN *et al.*, 2006) e aterogênese (RUKKUMANI *et al.*, 2004).

O ácido gálico, um (poli)fenol simples (variação de 113,89 µg/g - 265,14 µg/g para as VCLM e 137,82 µg/g - 189,41 µg/g para os comerciais), e o ácido protocatecuico (variação de 97,27 µg/g - 224,62 µg/g para as VCLM e 116,15 µg/g - 422,89 µg/g para comerciais), importantes constituintes do chá verde, foram, juntamente com o ácido hidroxicinâmico (variação de 103,48 µg/g a 299,29 µg/g –VCLM- e 121,62 µg/g a 310,00 µg/g – comerciais), os compostos mais abundantes na maioria das amostras. Tal resultado apresenta significância dada à comprovada atividade anti-carcinogênica (KATIYAR & MUKHTAR, 1996; LANDRAULT *et al.*, 2001) daqueles metabólitos.

No milho amarelo, diversos estudos mostraram serem os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, protocateíco, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico os (poli)fenóis livres mais importantes (ADOM & LIU, 2002; GUELDNER *et al.*, 1992; HEDIN & CALLAHAN, 1990; SNOOK *et al.*, 1995; SOSULSKI *et al.*, 1982). No entanto, diferenças de composição

(poli)fenólica entre variedades também se devem ao local de cultivo, uma vez que a síntese desses compostos está fortemente correlacionada às condições ambientais.

Diferenças altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre as médias dos 31 tratamentos foram observadas para as seis variáveis analisadas (ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *t*-cinâmico e ácido ferúlico). O resumo da análise estatística univariada (ANOVA) está mostrado na **Tabela 2**, porém as diferenças detectadas entre as variedades não foram indicadas pela dificuldade de apresentação do grande número de resultados obtidos (diferenças). Sendo assim, adotou-se a estratégia de comparação dos resultados quantitativos também através de PCA, visando o agrupamento das variedades em função dos conteúdos de compostos (poli)fenólicos.

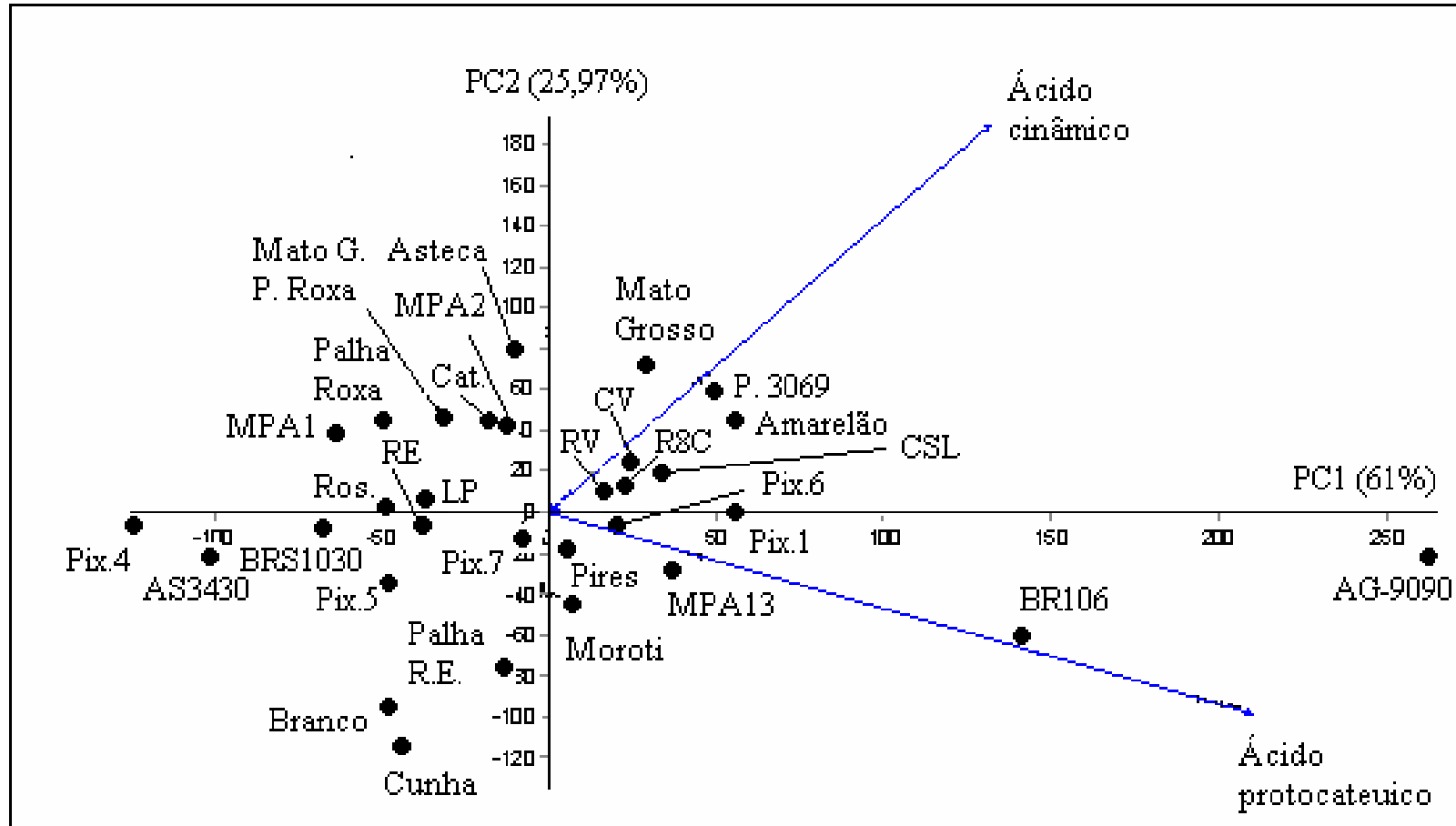
O cálculo dos componentes principais (PCA) foi realizado a partir da matriz de covariância dos dados cromatográficos dos 6 tratamentos. A dispersão das variáveis (variedades) segundo os eixos cartesianos PC1 e PC2 está apresentada na **Figura 13**.

**TABELA 2** - Resumo da análise de variância das variáveis ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *t*-cinâmico e ácido ferúlico determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.

Fonte de variação	Ácido protocatecuico	Ácido gálico	Ácido clorogênico	Ácido caféico	Ácido <i>t</i> -cinâmico	Ácido ferúlico
<i>Quadrado</i>	12000,04**	3760,91**	406,57**	213,87**	8153,21**	75,34**
<i>Médio (ANOVA)</i>						
Média	180,21	171,87	7,27	5,27	202,60	3,90
Desvio padrão	65,79	39,00	13,35	9,72	54,55	5,89
CV (%)	13,77	12,17	113,11	114,80	10,70	99,22

\*\*  $P < 0,01$  - teste Tukey.

O eixo PC1 apresenta a amplitude de valores para a variável ácido protocatecuico, sendo o componente de maior contribuição à explicação da variância total dos dados (61,0%). O eixo PC2, que corresponde ao ácido *t*-cinâmico, explicou em 25,97% a variância dos resultados, sendo que a variância acumulada nos dois primeiros autovetores correspondeu cerca de 87%. Os resultados de autovalores, as percentagens de variância e os autovetores (coeficientes de ponderação das variáveis) estão mostrados na **Tabela 3**.



**FIGURA 13** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de conteúdo médio de ácido protocateuico e ácido *t*-cinâmico encontrados nas amostras de farinha das 26 variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo. R8C = Rajado 8 carreiras, CV = Cateto Vermelho, RV = Roxo do Valdecir, Palha RE = Palha roxo do emílio; Ros. = Rosado, LP = Língua de Papagaio, RE = Roxo do Emílio, Cat. = Cateto.

**TABELA 3** – Componentes principais (PC) da análise de PCA dos dados quantitativos de (poli)fenóis (ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *t*-cinâmico e ácido ferúlico) determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.

<i>Componente Principal</i>	<i>Variância (Autovalor)</i>	<i>Explicação da variância total (%)</i>	<i>Variância acumulada (%)</i>	<i>Coefficientes de ponderação das variáveis (Auvetor)</i>					
				<i>Protocatecuico</i>	<i>Gálico</i>	<i>Clorogênico</i>	<i>Caféico</i>	<i>t-Cinâmico</i>	<i>Feúlico</i>
PC1	4913,44	61,00	61,00	0,837	0,143	0,041	0,022	0,524	0,046
PC2	2091,41	25,97	86,97	-0,389	-0,516	0,076	0,092	0,752	0,032
PC3	791,65	9,83	96,80	-0,372	0,835	0,077	0,185	0,349	0,032
PC4	188,94	2,34	99,14	0,002	0,001	-0,951	0,284	0,067	-0,091

As variáveis ácido protocatecuico e ácido *t*-cinâmico apresentaram os maiores autovetores em valor absoluto nos componentes de maior autovalor (maior proporção de variação explicada) sendo, portanto, consideradas de maior importância para explicar a variabilidade na composição de (poli)fenóis.

Dessa forma, as variedades com os maiores conteúdos de ácido protocatecuico agruparam-se em PC1 ( + ) e com os maiores conteúdos de ácido *t*-cinâmico em PC2 (+). A análise do resultado de PCA indicou que as variedades com maior conteúdo de (poli)fenóis e portanto, de maior valor nutricional são as localizadas na região positiva de ambos os eixos, a saber Mato Grosso, Amarelão, Cateto Vermelho, Roxo do Valdecir, Rajado 8 carreiras, Composto São Luis e o cultivar comercial *Pionner 3069*. O cultivar *AG-9090* não se agrupou às demais variedades em função do elevado conteúdo de ácido protocatecuico detectado na mesma. Por outro lado, as variedades com menor conteúdo de ácido protocatecuico e ácido *t*-cinâmico foram Cunha, Branco e Palha Roxa do Emílio, localizando-se em PC 1 e PC2 ( - ).

O emprego dessa ferramenta estatística aos dados quantitativos mostrou-se bastante eficiente na visualização das diferenças entre variedades, permitindo a rápida detecção de farinhas com maior conteúdo de (poli)fenóis e portanto, maior valor nutricional.

Serão necessários estudos posteriores que forneçam um maior detalhamento da constituição (poli)fenólica nas amostras das VCLM, tendo em vista o crescente interesse nessa classe de compostos. É importante considerar que apesar do maior conteúdo (poli)fenólico, do milho, estar associado aos polissacarídeos de parede celular, estudos prévios mostraram que a microflora intestinal humana pode liberá-los, acarretando em um aumento da concentração dos mesmos no plasma sanguíneo (ANDREASEN *et al.*, 2001).

## **4.4 Carotenóides**

### **4.4.1 Identificação e quantificação**

Os valores de conteúdo médio de carotenóides totais, determinados por espectrofotometria UV-visível e a fórmula de Lamber-Beer, para os grãos das VCLM e

para os cultivares comerciais, conforme protocolo descrito por AMAN *et al.* (2005), estão apresentados na **Tabela 4**. Este método mostrou-se bastante adequado, dada à simplicidade, rapidez e elevada repetibilidade do protocolo, o que pode ser evidenciado pelos baixos valores de desvio padrão (**Tabela 4**). Tomando-se como referencial o conteúdo médio de 15  $\mu\text{g/g}$ , detectado na maioria das variedades comerciais em estudo, as VCLM revelaram menor potencial como fonte daqueles compostos.

Apenas as variedades Pixurum 06, MPA 2, Pixurum 04, Asteca, Pires, MPA 1 e Roxo do Emílio apresentaram valores superiores a 15  $\mu\text{g/g}$ . Esses resultados estão de acordo com os registros da literatura para carotenóides em grãos de milho, sendo que uma grande amplitude de conteúdos (0,5 – 23  $\mu\text{g/g}$ ) tem sido relatada, o que parece estar relacionado com o potencial de cada genótipo (MANGELS *et al.*, 1993). As VCLM MPA 01 e Roxo do Emílio, com as maiores concentrações de carotenóides totais (~19  $\mu\text{g/g}$ ), apresentam, portanto, um maior potencial de uso em programas de melhoramento genético local visando, por exemplo, incrementos de valor nutricional de grãos, conforme estudo em andamento (OGLIARI & KIST, 2007 - informação pessoal). De forma similar, estas variedades são de maior relevância às indústrias alimentar e farmacêutica, comparativamente às demais VCLM em estudo. É ainda interessante especular que estas seriam as variedades menos suscetíveis ao ataque de patógenos, uma vez que os carotenóides agem como um importante reservatório de moléculas sinalizadoras, muitas delas voláteis. A clivagem enzimática de carotenóides produz apocarotenóides que atuam nas interações de alelopatia e no sistema de defesa das plantas (BOUVIER *et al.*, 2005).

Com relação à pigmentação dos grãos, é importante destacar que algumas variedades com grãos vermelhos e roxos (Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir, Mato Grosso Palha Roxa e Palha Roxa do Emílio) apresentaram conteúdos elevados de carotenóides (~ 15  $\mu\text{g/g}$ ), sendo considerados genótipos com elevado potencial de uso pelo reservatório de metabólitos secundários de interesse presentes.



**TABELA 4** - Concentração média\* ( $\mu\text{g/g}$ , média  $\pm$  desvio padrão) de carotenóides totais\*\*, zeaxantina, luteína,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno\*\*\* em amostras de sementes de variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais.

	<i>Variedade</i>	<i>Total</i>	<i>Zeaxantina</i>	<i>Luteína</i>	<i><math>\beta</math>-criptoxantina</i>	<i><math>\beta</math>-caroteno</i>	<i><math>\alpha</math>-caroteno</i>
<b>Variedades Locais</b>	<i>MPA 13</i>	2,01 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,09	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	<i>Branco</i>	4,47 $\pm$ 0,62	0,07 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,05	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	<i>Rajado 8 carreira</i>	5,67 $\pm$ 1,03	0,30 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
	<i>Rosado (Rajado)</i>	6,73 $\pm$ 0,89	0,64 $\pm$ 0,13	0,35 $\pm$ 0,08	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00	<i>n.d.</i>
	<i>Palha Roxa 2</i>	7,30 $\pm$ 0,30	1,49 $\pm$ 0,28	0,63 $\pm$ 0,10	0,01 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Pixurum 07</i>	7,46 $\pm$ 0,46	0,08 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	<i>Moroti</i>	7,46 $\pm$ 0,35	0,07 $\pm$ 0,12	1,42 $\pm$ 0,33	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	<i>Cateto</i>	8,26 $\pm$ 1,38	1,88 $\pm$ 0,35	1,10 $\pm$ 0,19	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
	<i>Amarelão 3</i>	9,31 $\pm$ 1,95	1,18 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,05	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Pixurum 05</i>	9,33 $\pm$ 2,68	1,39 $\pm$ 0,22	0,65 $\pm$ 0,15	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
	<i>Cateto Vermelho</i>	9,68 $\pm$ 1,27	2,52 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Mato Grosso</i>	10,75 $\pm$ 0,30	2,37 $\pm$ 0,26	2,57 $\pm$ 0,08	0,05 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Composto São Luis</i>	11,14 $\pm$ 2,36	2,03 $\pm$ 0,32	1,44 $\pm$ 0,21	0,04 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Cunha 1</i>	11,79 $\pm$ 0,03	3,50 $\pm$ 0,89	0,48 $\pm$ 0,45	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
	<i>Língua de Papagaio</i>	11,79 $\pm$ 3,06	4,43 $\pm$ 0,35	0,61 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Pixurum 01</i>	12,80 $\pm$ 0,70	3,00 $\pm$ 0,18	1,35 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
	<i>Mato Grosso Palha Roxa</i>	13,20 $\pm$ 0,19	3,97 $\pm$ 0,27	2,52 $\pm$ 0,11	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00
	<i>Roxo do Valdecir</i>	13,45 $\pm$ 1,84	4,82 $\pm$ 0,15	1,86 $\pm$ 0,08	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<i>Palha Roxa 1 do Emílio</i>	14,41 $\pm$ 2,28	2,40 $\pm$ 0,67	0,84 $\pm$ 0,25	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	

	<i>Pixurum 06</i>	14,99 ± 2,44	4,26 ± 0,63	1,30 ± 0,23	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	<i>MPA 02</i>	16,19 ± 2,14	5,97 ± 1,29	2,76 ± 0,60	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	<i>Pixurum 04</i>	16,79 ± 0,70	4,49 ± 0,43	2,48 ± 0,17	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	<i>Asteca</i>	16,79 ± 1,79	3,90 ± 0,48	2,44 ± 0,26	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	<i>Pires</i>	17,15 ± 0,89	4,18 ± 0,09	2,36 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	<i>MPA 01</i>	18,88 ± 1,38	7,05 ± 1,17	3,69 ± 0,88	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	<i>Roxo do Emílio</i>	19,63 ± 2,22	10,70 ± 2,54	0,85 ± 0,08	0,10 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00
<b>Variedades Comerciais</b>	<i>BR106</i>	7,19 ± 0,03	1,30 ± 0,41	0,60 ± 0,17	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	<i>n.d.</i>
	<i>AG-9090</i>	14,01 ± 1,22	3,54 ± 0,60	<i>n.d.</i>	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	<i>Pioneer 3069</i>	18,68 ± 3,90	7,22 ± 1,61	<i>n.d.</i>	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00
	<i>BRS 1030</i>	23,13 ± 0,89	12,55 ± 0,23	1,34 ± 0,13	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00
	<i>AS-3430</i>	25,59 ± 0,79	9,09 ± 1,14	<i>n.d.</i>	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00

\* Média de 3 extrações ± SD (desvio padrão da média);

\*\* Determinado por espectrofotometria UV-visível (450nm) e ( $\epsilon$ ) de 2348 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>);

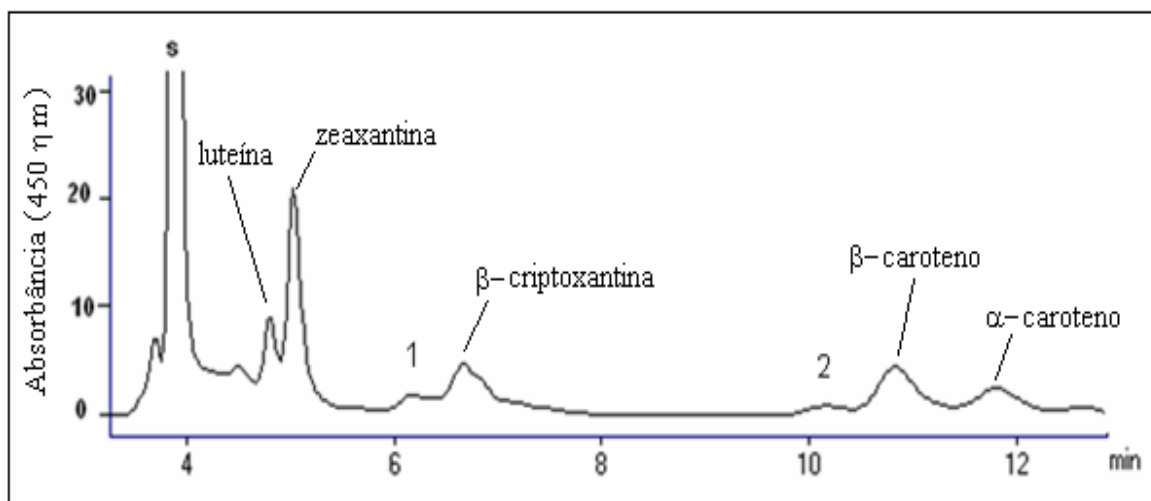
\*\*\* Determinado por CLAE (450nm) e conteúdo de carotenóides calculados através da intensidade do pico de interesse;

No entanto, os cultivares comerciais analisados apresentaram os valores médios de carotenóides totais mais elevados, destacando-se o cultivar AS-3430, com cerca de 25  $\mu\text{g/g}$ . Tal informação é de interesse, porque indica que os programas de melhoramento genético convencionais para milho utilizados no Brasil vêm selecionando genótipos com quantidades apreciáveis desses metabólitos secundários, um aspecto associado à maior aceitação desta característica pelo mercado nacional. De fato, segundo SERNASALDIVAR *et al.* (2001), no Brasil, os grãos de milho de cor amarela intensa são preferidos aos demais.

Após a quantificação dos carotenóides totais dos grãos de milho, procedeu-se à análise cromatográfica das amostras em estudo, visando à identificação e quantificação dos compostos de interesse. A CLAE revelou serem as xantofilas zeaxantina e luteína os carotenóides predominantes (**Figura 14**), sendo possível também a detecção de pequenas quantidades de  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno em algumas amostras em estudo (**Tabela 4**).

A identificação de zeaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno foi realizada através da comparação dos tempos de retenção detectados nos cromatogramas das amostras com os tempos de retenção de compostos padrões, enquanto  $\beta$ -criptoxantina e  $\alpha$ -caroteno foram identificados com base na comparação de perfis de eluição obtidos em trabalhos de estudos de identificação de carotenóides em sementes de milho em condições analíticas similares (SCOTT & ELDRIDGE, 2005; HULSHOF *et al.*, 2007).

Os perfis de eluição cromatográfica revelaram ainda a existência de outros 2 sinais (**Figura 14**), cuja identificação dos compostos ainda não foi possível. Pode-se observar na **Figura 14**, que os tempos de retenção para as xantofilas luteína e zeaxantina foram 4,41 min e 4,61 min, respectivamente, demonstrando a existência de um efeito de co-eluição, resultando em sobreposição parcial das áreas dos dois picos de interesse.



**FIGURA 14** - Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) presentes na fração organosolvente extraída de amostras de sementes da variedade Roxo do Valdecir. S = solvente; 1 e 2 = compostos não identificados.

Tal fato pode ser explicado levando-se em conta que estes compostos são isômeros de posição. A utilização de coluna de fase quiral para a separação destes compostos é indicada à otimização do perfil cromatográfico (MOROS *et al.*, 2002; HUSHOLF *et al.*, 2007), ainda que o perfil de eluição obtido tenha sido considerado satisfatório. Em função disto, para efeitos de quantificação destes compostos optou-se pela utilização da intensidade dos sinais de interesse, ao invés da integral da área dos mesmos.

Diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre o conteúdo médio dos 31 tratamentos foram observadas para todos os carotenóides identificados por CLAE, como mostrado de forma resumida na **Tabela 5**.

As análises quantitativas de zeaxantina e luteína (**Tabela 4**) detectaram amplitudes de concentração entre 10,7  $\mu\text{g/g}$  e 0,07  $\mu\text{g/g}$  para a xantofila zeaxantina, nos grãos das VCLM Roxo do Emílio e Branco, respectivamente, e 3,69  $\mu\text{g/g}$  e 0,03  $\mu\text{g/g}$  para a luteína nas variedades MPA01 e Branco. Para os cultivares comerciais o conteúdo de zeaxantina variou entre 12,55  $\mu\text{g/g}$  e 1,30  $\mu\text{g/g}$  para AS-3430 e BR106, respectivamente e de luteína entre 0,0  $\mu\text{g/g}$  (não detectado) para AG-9090, Pioneer 3069 e AS-3430 e 1,30  $\mu\text{g/g}$  para o cultivar BRS1030. Esses resultados estão em conformidade

ao descrito na literatura que relata conteúdos de luteína e zeaxantina nos grãos de milho variando entre 0,5 µg/g a 23 µg/g (MANGELS *et al.*, 1993).

**TABELA 5** - Resumo da análise de variância das variáveis zeaxantina, luteína, β-criptoxantina, β-caroteno e α-caroteno determinados na farinha dos grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais estudados.

Fonte de variação	Zeaxantina	Luteína	β-criptoxantina	β-caroteno	α-caroteno
<i>Quadrado</i>	29,43**	3,01**	0,002**	0,001**	0,0001**
<i>Médio (ANOVA)</i>					
Média	3,57	1,15	0,03	0,02	0,01
Desvio padrão	3,15	1,01	0,02	0,01	0,01
CV (%)	20,61	21,45	29,54	15,85	26,37

\*\* P < 0,01 - teste Tukey.

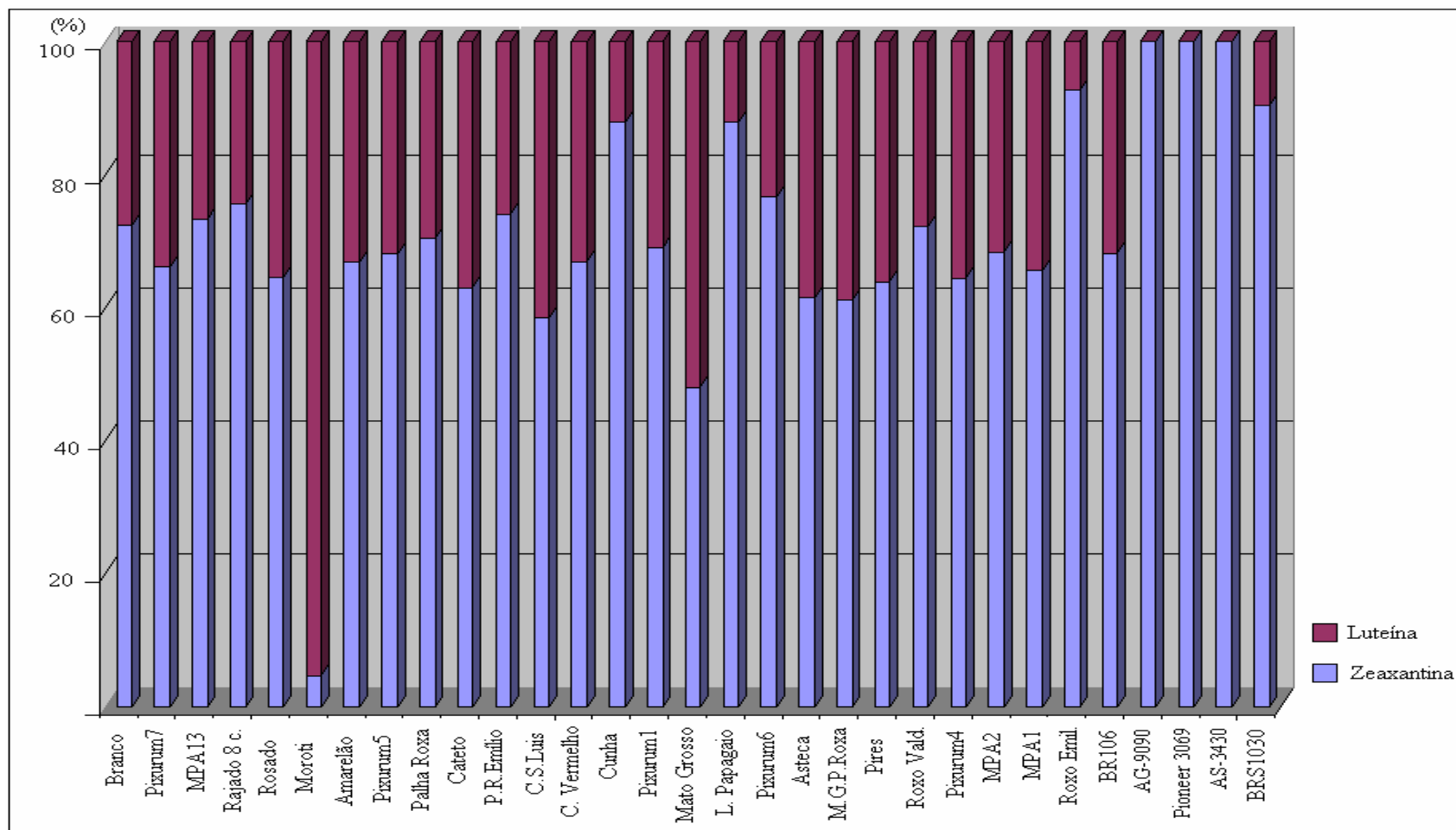
Os resultados quantitativos encontrados no presente estudo foram bastante satisfatórios quando comparados aos da literatura, considerando que o protocolo usado para a extração desses metabólitos não compreendeu etapas de saponificação e/ou de re-extração. Embora, tenha sido observado ao final da extração um resíduo (farinha) ainda com coloração amarela, possivelmente em decorrência da presença de pigmentos carotenóidicos, optamos por um protocolo rápido e simples, uma vez que MOROS *et al.* (2002), após 5 etapas de re-extração conseguiram aumentar o conteúdo desses pigmentos de 20,09 µg/g para apenas 22,81 µg/g. A baixa recuperação obtida após vários passos de re-extração pode ser pelo fato desses compostos estarem fortemente associados às proteínas zeínas do endosperma conforme sugerido por TSUI & CHERYAN (2007).

Por outro lado, baixos conteúdos de β-criptoxantina, β-caroteno e α-caroteno, foram observados nos grãos das VCLM e dos cultivares comerciais, comparativamente às xantofilas zeaxantina e luteína. Para as variedades locais de milho, Roxo do Emílio apresentou os maiores teores destes três carotenóides (0,10 µg/g; 0,04 µg/g e 0,03 µg/g para β-criptoxantina, β-caroteno e α-caroteno, respectivamente), enquanto os cultivares comerciais apresentaram conteúdos similares dos mesmos (0,05 µg/g; 0,04 µg/g e 0,02

$\mu\text{g/g}$  para  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno, respectivamente). Dessa forma, considerando os teores dos dois carotenos identificados ( $\beta$ - e  $\alpha$ -caroteno) e do monohidroxi-carotenóide ( $\beta$ -criptoxantina), assume-se que o germoplasma analisado não possui potencial de uso como alimento funcional ou como matéria prima para a extração dos mesmos. Conteúdos superiores destes compostos em cultivares de milhos comerciais, como por exemplo,  $9,8 \mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -criptoxantina,  $2,8 \mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno e  $3,90 \mu\text{g/g}$  de  $\alpha$ -caroteno foram registrados recentemente (BERARDO *et al.*, 2004; HULSHOF *et al.*, 2007).

Devemos ainda considerar, como observado na **Tabela 4**, que as diferenças detectadas na constituição carotenóidica dos grãos das VCLM de milho são principalmente de natureza quantitativa. Sendo assim, o perfil carotenóidico para os grãos das VCLM e dos cultivares comerciais, para as duas xantofilas majoritárias, está mostrado na **Figura 15**. Pode-se notar que para as VCLM, Roxo do Emílio, Língua de Papagaio e Cunha, o carotenóide zeaxantina foi o composto majoritário, representado aproximadamente 91,20%; 86,35% e 86,30% do conteúdo total de carotenóides, determinado por CLAE, respectivamente. A luteína, por sua vez, foi encontrada em maior proporção que os demais carotenóides nos grãos das variedades Moroti (94,91%), Mato Grosso (51,28%) e Composto São Luis (40,92%). Os demais carotenóides não representaram mais do que 3% do conteúdo total para todas as variedades estudadas.

Além disso, nos grãos de todos os cultivares comerciais observou-se um conteúdo bem superior da xantofila zeaxantina, representando 99,41; 99,31; 98,47; 89,61 e 67,04% do conteúdo total de carotenóides para AS-3430, *Pioneer 3069*, AG-9090, BRS1030 e BR106, respectivamente. De fato, os dados da literatura permitem constatar que os carotenóides zeaxantina e luteína estão presentes em todas as variedades de milho estudadas até o momento, e em alguns casos  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno. As diferenças no perfil quantitativo desses compostos, consoante ao processo de melhoramento genético utilizado para a obtenção do genótipo de interesse já vêm sendo observadas em estudos anteriores (MANGELS *et al.*, 1993; BERARDO *et al.*, 2004; SCOTT & ELDRIDGE, 2005; HULSHOF *et al.*, 2007).



**FIGURA 15** – Percentagem de luteína e zeaxantina sobre o conteúdo total de carotenóides determinado por CLAE (450nm) em grãos das variedades crioulas e locais de milho e dos cultivares comerciais em estudo.

#### 4.4.2 Purificação

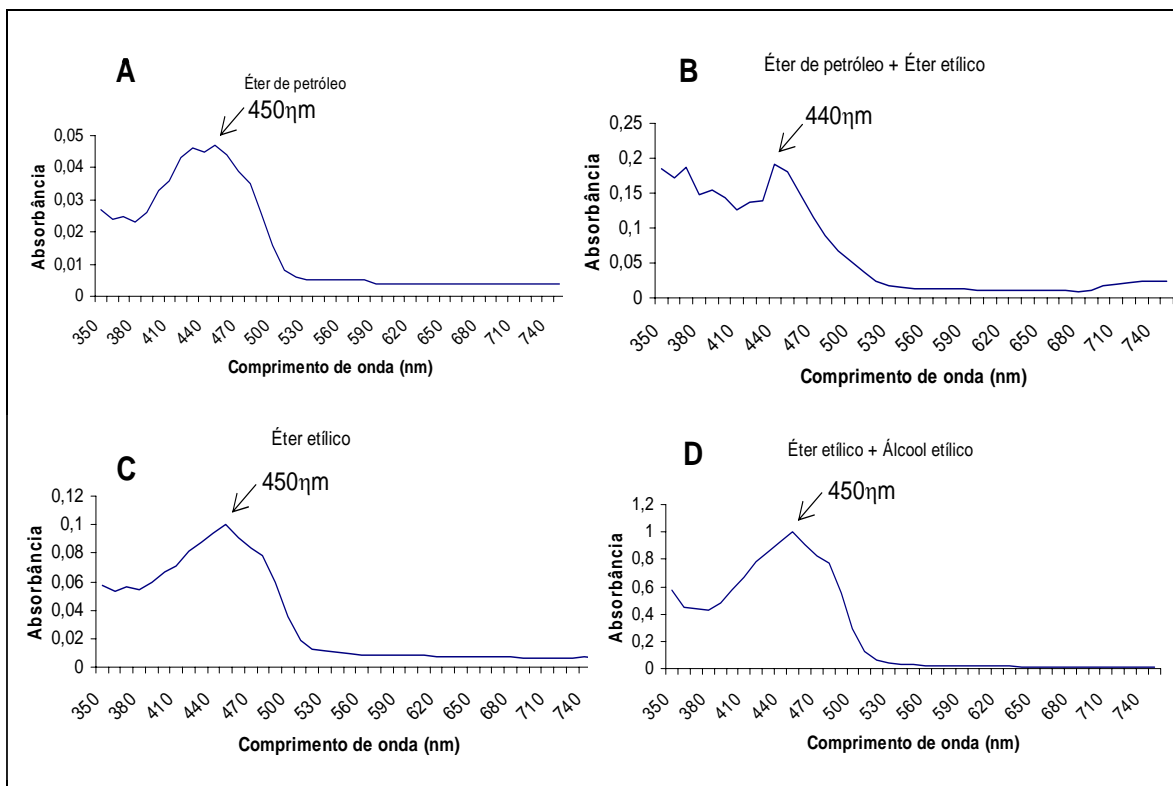
Os resultados obtidos por espectrofotometria UV-visível e CLAE revelaram que quantidades de interesse de carotenóides estão presentes nas farinhas de milho de algumas VCLM, assim como nos cultivares comerciais, caracterizando essas biomassas como uma importante matéria-prima para a elaboração de alimentos funcionais. Nesse contexto, diversos estudos têm sugerido que luteína e zeaxantina possuem efeito inibitório sobre o crescimento tumoral (PARK *et al.*, 1998) e estimulatório sobre a função imunológica em ensaios utilizando modelos de culturas celulares *in vitro* e em camundongos (CHEW & PARK, 2004). Dessa forma, tendo em vista o crescente interesse na obtenção de luteína ou zeaxantina para a produção de suplementos alimentares e alimentos funcionais (RODRIGUES & SHAO, 2004), variedades de milho que tenham conteúdos elevados destas xantofilas são de grande interesse para a indústria alimentícia, nutricional e farmacêutica. De fato, o alto teor de carotenóides mostra-se como uma característica particularmente importante para aumentar o valor comercial de grãos de milho de variedades específicas, bem como o uso destes genótipos em programas de melhoramento genético deste cereal. Portanto, são necessários estudos aprofundados de caracterização bem como de purificação dos mesmos a partir da biomassa de interesse, isto é, grãos de milho. Diante disso, extratos organosolventes destes pigmentos foram obtidos e purificados por cromatografia líquida em coluna (CLC), seguido de análise das frações de interesse por espectrofotometria UV-visível e CLAE.

Diversas fases estacionárias, tais como DEAE-Sepharose, celulose e MgO/Hiflosupercel são adequadas à purificação de compostos carotenóides (SCHOEFS, 2004). MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.* (2002) relatam o uso de celulose, sacarose, amido, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, carbonato de zinco, óxido de alumínio, hidróxido de cálcio, óxido de cálcio e sílica gel como fases estacionárias adequadas à separação de carotenóides em sistemas de CLC. A escolha de uma fase estacionária depende da polaridade dos carotenóides constituintes da amostra. Segundo MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.* (2002), os carotenos são separados mais eficientemente usando hidróxido de cálcio ou óxido de alumínio, enquanto para as xantofilas o emprego de uma fase estacionária de fraca adsorção, como a celulose, seria uma melhor opção. De forma similar, a seleção da fase móvel também está diretamente ligada à polaridade dos carotenóides a separar. Éter de



petróleo, hexano, ciclohexano, benzeno, tolueno, éter etílico, acetona, acetato de etila, diclorometano, álcool *tert*-butil, *n*-propanol, etanol, metanol e piridina são alguns dos solventes empregados como fase móvel descritos na literatura. Normalmente, misturas de éter etílico, benzeno ou acetona em éter de petróleo, ou etanol em éter etílico ou acetato de etila em benzeno são empregadas (MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 2002).

O método selecionado para purificar os carotenóides dos grãos de milho no presente estudo considerou o uso de coluna cromatográfica, tendo o óxido de alumínio como fase estacionária e a eluição das amostras com solventes orgânicos de polaridade crescente. Uma vez isoladas e purificadas, as frações carotenóidicas obtidas foram identificadas através de suas propriedades físico-químicas e espectroscópicas. Os perfis espectrais do UV-visível das frações obtidas através da CLC confirmaram serem os carotenóides os pigmentos predominantes nestas, revelando valores máximos de absorção entre 410 e 480 nm (**Figura 16**).

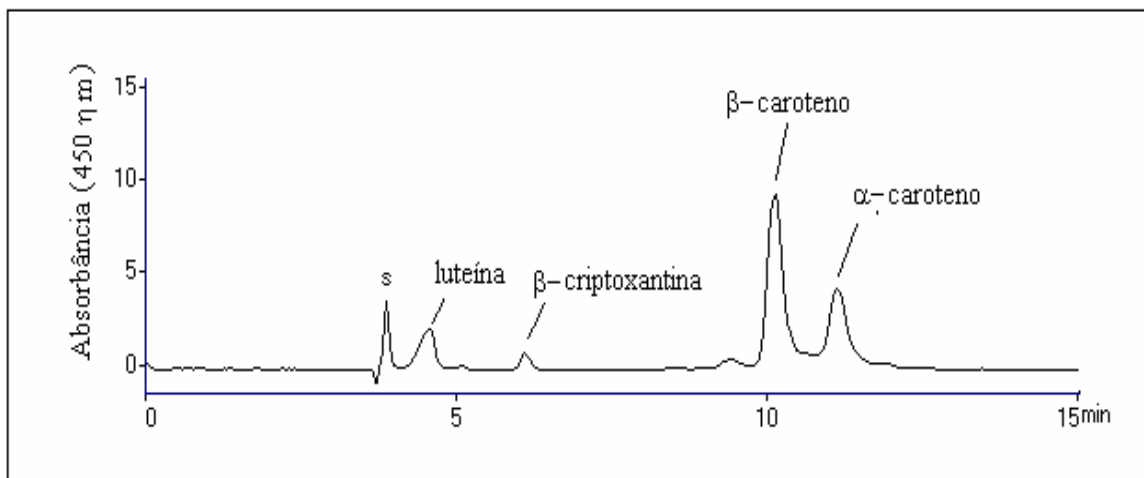


**FIGURA 16** - Perfil espectral de varredura (350-750 nm) das frações organosolventes purificadas de carotenóides de grãos de milho (VCLM MPA1), segundo a fase móvel utilizada na CLC. **A** – éter de petróleo; **B** – éter de petróleo: éter etílico (1:1, v/v); **C** - éter etílico; **D** - éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v). As setas indicam o comprimento de onda de absorção máxima para as respectivas frações.

Segundo MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.* (2002), os comprimentos de onda onde as máximas absorvâncias para o  $\beta$ -caroteno são observadas em 429, 452 e 478  $\eta\text{m}_{(\text{acetona})}$ . Para as xantofilas luteína e zeaxantina, as absorvâncias máximas são detectadas em 422, 445, 474  $\eta\text{m}_{(\text{etanol})}$  e 430, 452, 479  $\eta\text{m}_{(\text{acetona})}$ , respectivamente. Portanto, os resultados apresentados na **Figura 16** estão de acordo com a literatura, uma vez que o comprimento de onda aonde se detectou máxima absorção para as frações éter de petróleo, éter etílico e éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v) foi 450  $\eta\text{m}$  e para a fração éter de petróleo: éter etílico (1:1, v/v) foi 440  $\eta\text{m}$ .

As frações obtidas foram também caracterizadas usando CLAE, onde se observou que o  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides de mesma polaridade foram eluídos preferencialmente com a utilização da mistura de solventes éter de petróleo: éter etílico (1:1, v/v) na CLC. Na **Figura 17** é apresentado o cromatograma dessa fração rica em  $\beta$ -caroteno. De fato, a CLAE revelou ser aquele pigmento o metabólito majoritário naquela fração para as amostras em estudo, representando cerca de 50% do conteúdo carotenóidico total.

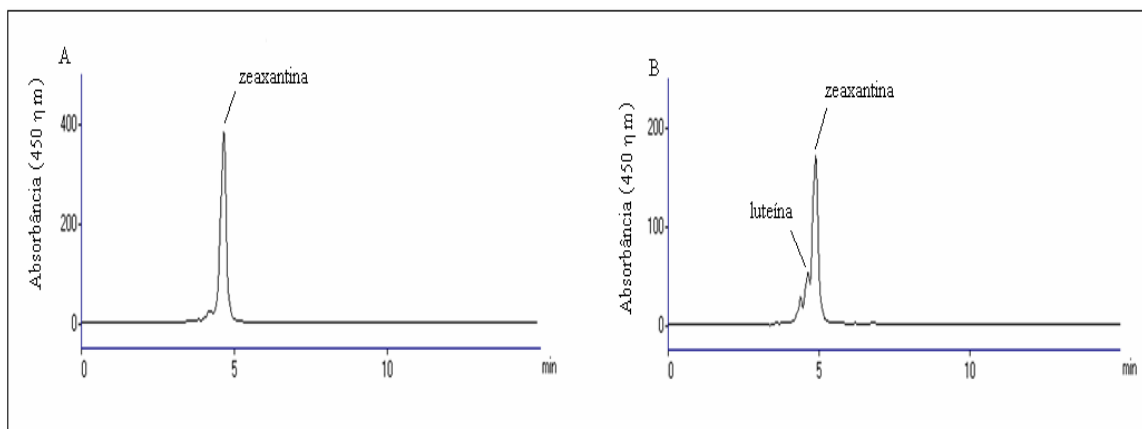
Adicionalmente, a análise dos perfis cromatográficos revelou que os compostos  $\beta$ -criptoxantina e  $\alpha$ -caroteno co-eluíram na fração éter de petróleo + éter etílico (50%, v/v), assim como uma pequena quantidade da xantofila luteína.



**FIGURA 17** - Perfil cromatográfico (CLAE, 450  $\eta\text{m}$ ) da fração eluída com éter de petróleo + éter etílico (50%, v/v) na CLC do extrato carotenóidico da variedade MPA1. S = solvente.

As xantofilas (zeaxantina e luteína), por sua vez, eluíram com a mistura de éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v), sendo o grau de pureza obtido para estes compostos dependente de suas quantidades na amostra. Isto porque, em processos de separação cromatográfica utilizando colunas de fase reversa, como no presente caso, a separação de zeaxantina e luteína é menos eficiente, comparativamente à utilização de coluna cromatográfica de fase quiral, porque os compostos são isômeros de posição. Apesar do uso de coluna de fase reversa nos experimentos, a purificação das xantofilas do cultivar *BRS1030* permitiu a obtenção de amostras de zeaxantina com um grau de pureza de 93%, por ser aquele pigmento sua xantofila majoritária, enquanto a variedade local *MPA01* apresentou um grau de pureza da mistura isomérica zeaxantina/luteína de 88% (**Figura 18**).

Os resultados obtidos sugerem que a estratégia de extração e de purificação dos carotenóides de milho usando CLC foi bastante eficiente para as xantofilas predominantes nos grãos do cereal estudado. Cabe ressaltar que esses pigmentos têm hoje, elevado valor de mercado, 1 mg de luteína (grau de pureza 98%) custa R\$ 264,00 (Sigma) e a disponibilidade de zeaxantina pura é bastante limitada. Dessa forma, algumas das VCLM e cultivares comerciais por apresentarem mais de 90% de seus carotenóides representados por zeaxantina são fonte em potencial para serem usadas como matéria-prima para extração dos mesmos.



**FIGURA 18** - Cromatograma (CLAE, 450 nm) da fração carotenóidica eluída com éter etílico: álcool etílico (1:1, v/v) de amostras de sementes do cultivar comercial *BRS1030* (A) e da variedade local *MPA01* (B).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo revelaram, nas amostras de algumas variedades, quantidades apreciáveis de metabólitos secundários com propriedades biológicas de crescente interesse na atualidade. A determinação dos perfis metabólicos realizada poderá ser utilizada futuramente para agregar valor às matérias-primas oriundas das variedades de forma diferenciada. Nesse sentido, a detecção de flobafenos nos grãos de duas variedades roxas está correlacionada com o maior potencial de defesa das mesmas contra herbívoros e/ou microorganismos patogênicos. Além disso, esses são compostos de alto valor agregado, uma vez que apresentam aplicação farmacológica e/ou industrial, podendo ser usados como antioxidantes, anti-sépticos e no desenvolvimento de sabor adstringente de bebidas. Da mesma forma, o elevado conteúdo de (poli)fenóis, detectado usando CLAE, nas farinhas das variedades Mato Grosso, Amarelão, Cateto Vermelho, Roxo do Valdecir, Rajado 8 carreiras, Compostos São Luis e *Pionner* 3069 sugere um maior valor nutricional para as mesmas pelo reconhecido papel antioxidante exercido por essa classe de compostos. Por outro lado, as farinhas das variedades comerciais possuem maior valor nutricional quando comparadas às VCLM, exceto para Pixurum 6, MPA2, Pixurum 4, Asteca, Pires, MPA1 e Roxo do Emílio, no que diz respeito ao conteúdo de carotenóides. Os resultados encontrados nos permitiram concluir que aquelas variedades podem ser usadas como matéria-prima para extração e obtenção dessa importante classe de compostos, como demonstrado a partir de um protocolo de purificação usando cromatografia em coluna aberta. Todos esses resultados reforçam o uso do milho como alimento funcional podendo ser na forma de alimentos funcionais ou na produção de suplementos alimentares.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHMED, S.S.; LOTT, M.N.; MARCUS, D.M. The macular xanthophylls. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, p. 183-93, 2005.

AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 99-105, 2005.

ANDREASEN, M.F.; KROON, P.A.; WILLIAMSON, G.; GARCIA-CONESA, M.T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 31, n. 3, p. 304-314, 2001.

AOKI, H.; KUZE, N.; KATO, Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). **Foods & Food Ingredients Journal of Japan**, v. 199, p. 63-65, 2002.

BERARDO, N.; BRENNNA, O.V.; AMATO, A.; VALOTI, P.; PISACANE, V.; MOTTO, M. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopic (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 393-398, 2004.

BODDU, J.; SVABEK, C.; IBRAHEEM, F.; JONES, D.; CHOPRA, S. Characterization of a deletion allele of a sorghum *myb* gene yellow seed1 showing loss of 3-deoxyflavonoids. **Plant Science**, v. 169, p. 542-552, 2005.

BOUVIER, F.; ISNER, J. C.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 187-194, 2005.

BRACK-EGG, A. *Zea mays* L. In: **Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú**, Cuzco, Peru: Imprenta del Centro Bartolomé de las Casas, p.537-538, 1999.

CEVALLOS-CASALS, B.A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and ref-fleshed sweet-potato. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 3313-3319, 2003.

CHEW, B.P.; BROWN, C.M.; PARK, J.S.; MIXTER, P.F. Dietary lutein inhibits mouse mammary tumor growth by regulating angiogenesis and apoptosis. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3333-39, 2003.

CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257-261, 2004.

CORTÉS, G.A.; SALINAS, M.Y.; MARTÍN-MARTINEZ, E.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F. Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 57–62, 2006.

DEWANTO, V.; WU, X.; LIU, R.H. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4959-4964, 2002.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; XIAO0DONG, L.; BASILE, M.J.; KENELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p.23-28, 2004.

ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C.R; Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p.129-141, 2004.

FAULKES, R.M.; SOUTHON, S. Carotenoids, metabolism and disease. In: WILDMAN, E.C. (Ed.). **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton, Washington, CRC Press. 2001. CD-ROM.

FRANCO. R.C. **Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais**. Dissertação apresentada a Universidade de São Paulo para obtenção do grau de mestre em Nutrição Humana Aplicada. São Paulo, 157 p., 2006.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Food Analytical Chemistry**, 2001.

GROTEWOLD, E.; CHAMBERLIN, M.; SNOOK, M.; SIAME, B.; BUTLER, L.; SWENSON, J.; MADDOCK, S.; CLAIR, G.S.T.; BOWEN. B. Engineering Secondary Metabolism in Maize Cells by Ectopic Expression of Transcription Factors. **Plant Cell**, v. 10, p. 721–740, 1998.

GUELDNER, R.C.; SNOOK, M.E.; WIDSTROM, N.W.; WISEMAN, B.R. TLC screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1211–1213, 1992.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, T.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, p. 17-25, 2001.

HEDIN, P.A.; CALLAHAN, F.E. 3,7-Di-O-methylquercetin 5-Oglucoside from *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1755-1757, 1990.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; WEST, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 655-61, 2007.

JACOBS Jr., D.R.; MARGUART, L.; SLAVIN, J.; KUSHI, L.H. Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. **Nutrition and Cancer**, v. 30, n. 2, p. 85-92, 1998.

JACOBS Jr., D.R.; SLAVIN, J.; MARGUART, L. Whole grain intake and cancer: a review of the literature. **Nutrition and Cancer**, v. 24, n. 3, p. 221-229, 1995.

KATIYAR, S.K.; MUKHTAR, H. Inhibition of phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acetate-caused inflammatory responses in SENCAR mouse skin by black tea polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1911-1916, 1996.

KONG, J.M.; CHIA, L.S.; GOH, N.K.; CHIA, T.F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.Y.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9B, p. 71S-88S, 2002.

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food : current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p., 2001.

LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDE, P.L. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3341-3348, 2001.

MANGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. **Journal of the American Diet Association**, v. 93, p. 284-296, 1993.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, J. (Ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC press, 2002. CD-ROM.

MOROS, E.E.; DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E.G.; JERRELL, J. Analysis of Xanthophylls in Corn by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5787 -5790. 2002.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; KOSHIMIZU, K.; TAKAHASHI, D.; MATSUMOTO, K.; HAIHARA, K.; TANIGUCHI, H.; NOMURA, E.; HOSODA, A.; TSUNO, T.; MARUTA, Y.; KIM, H.W.; KAWABATA, K.; OHIGASHI, H. FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. **Cancer Letters**, v. 180, p. 121,9. 2002.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369–89, 1992.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.S.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.

OWEN, R.W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1235-1247, 2000.

PARK, J.S.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. Dietary lutein absorption from marigold extracts is rapid in BALB/c mice. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1650-1656, 1998.



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

POZO-INSFRAN, D.D.; BRENES, C.H.; SERNA-SALDIVAR, S.O.; TALCOTT, S.T.; Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. **Food Research International**, v. 39, p. 696–703, 2006.

RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 57-83, 2004.

ROSSI, A.; SERRAINO, I.; DUGO, P.; Di PAOLA, R.; MONDELLO, L.; GENOVESE, T.; MORABITO, D.; DUGO, G.; SAUTEBIN, L.; CAPUTI, A.P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. **Free Radical Research**, v. 37, n. 8, p. 891-900, 2003.

ROSSI, A.; SERRAINO, I.; DUGO, P.; DIPAOLO, R.; MONDELO, L.; GENOVESE, T.; MORABITO, D.; DUGO, G.; SANTEBIN, L.; CAPUTI, A.; CUZZOCREA, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. **Free Radical Research**, v. 37, p. 891-900, 2003.

RUKKUMANI, R.; ARUNA, K.; VARMA, P.S.; MENON, V.P. Ferulic acid, a natural phenolic antioxidant modulates altered lipid profiles during alcohol and thermally oxidized sunflower oil induced toxicity, **Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods**, v. 4, n. 3/4, p.119-32. 2004.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371. 2004.

SCOTT, C.E.; ELDRIDGE, A.L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 18, p. 551-559. 2005.

SERNA-SALDIVAR, S.O.; GOMEZ, M.H.; ROONEY, L.W. Food Uses of Regular and Specialty Corns and Their Dry-Milled Fractions. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, London, 2001. CD-ROM.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 387 p., 1994.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–148, 1965.

SNOOK, M.E.; WIDSTROM, N.W.; WISEMAN, B.R.; BYRNE, P.F.; HARWOOD, J.S.; COSTELLO, C.E. New C-40 0-hydroxy derivatives of maysin and 30-methoxymaysin isolated from corn silks (*Zea mays*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2740–2745, 1995.

SOSULSKI, F.; KRYGIER, K.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereals and potato flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 337–340, 1982.

SRINIVASAN, M.; RAM-SUDHEER, A.; RAVEENDRAN-PILLAI, K.; RAGHUKUMAR, P.; SUDHAKARAN, P.R.; MENON, V.P. Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 228, p. 249-258, 2006.

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

STYLES, E.D.; CESKA, O. Pericarp flavonoids in genetic strains of *Zea mays*. **Maydica**, v. 34, p. 227-237. 1989.

TSUI, E.M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. **Journal of Food and Engineering**, v. 83, n. 4, p. 590-595. 2007.

WHITE, P.J. Properties of corn starch. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). **Specialty corns**. 2<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, London, 2001. CD-ROM.

YOSHIMOTO, M.; OKUNO, S.; YAMAGUCHI, M.; YAMAKAWA, O.; YAMADA, J. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins purple-fleshed sweetpotato, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 1652-1655, 2001

## *Capítulo 5*

## **CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO (ÊNFASE EM CAROTENÓIDES, POLIFENÓIS E ANTOCIANINAS) DE FLORES FEMININAS DE VARIEDADES CRIOULAS E LOCAIS DE MILHO (*Zea mays* L.).**

### **1 RESUMO**

Na medicina tradicional os estigmas/estiletes (flores femininas) de milho são usados, principalmente, no tratamento de desordens ligadas ao sistema urinário (diurético), hipertensão e constipação, podendo apresentar um potencial farmacológico distinto em função de sua composição química. No presente estudo foram determinados os perfis metabólicos com ênfase às frações antociânica, polifenólica e carotenoídica de 8 variedades crioulas e locais de milho (VCLM), originárias do extremo oeste de Santa Catarina, através de técnicas espectroscópicas como FT-IR, 1H-RMN, UV-visível associadas à estatística multivariada (análise dos componentes principais -PCA) e cromatográficas (CLAE). A análise dos tecidos florais liofilizados por FT-IR (3000-600; 1650-1500 e 1250-900 ondas.cm<sup>-1</sup>) e PCA revelou constituição química diferenciada para os mesmos. As antocianidinas pelargonidina e cianidina foram identificadas por MALDI-TOF, no extrato metanólico bruto (MeOH-HCl, 1%,v/v), de duas VCLM. As diferenças quantitativas e qualitativas nos perfis espectrais UV-visível (370 e 525 nm) dos extratos metanólicos das VCLM foram facilmente identificadas através de PCA. A 1H-RMN dos extratos brutos, associada à análise de PCA, resultou em um padrão de distribuição das amostras semelhante ao obtido por UV-visível, refletindo as diferenças na composição química. A determinação do conteúdo de antocianinas (460 e 525 nm) e (poli)fenóis totais no extrato MeOH-HCl (1%,v/v) revelou diferenças entre as VCLM e a variabilidade entre os indivíduos de uma mesma variedade. A partir da CLAE foram identificados os ácidos protocatecuico, gálico e *t*-cinâmico como sendo os compostos (poli)fenólicos majoritários do extrato metanólico, além de pequenas quantidades de ácido siríngico e caféico. O principal pigmento carotenoídico identificado por CLAE (extrato metanol-tolueno) das flores foi a luteína, seguido do β-caroteno, α-caroteno e zeaxantina. Esses resultados demonstram a elevada diversidade química existente entre as variedades cultivadas no extremo oeste de Santa Catarina e sugerem que as mesmas possuem um potencial fitoquímico a ser explorado.

## 2 INTRODUÇÃO

Vários estudos etnobotânicos relatam o emprego do milho como planta medicinal por povos com forte tradição cultural. O uso terapêutico mais citado para esta planta relaciona-se ao sistema urinário, seguido do tratamento da hipertensão e constipação (VELÁZQUEZ *et al.*, 2005). O produto fitoterápico Herbal Maydis Stigma (estigmas de flores de *Z. mays* desidratados e fragmentados), por exemplo, é uma das formas atuais de utilização terapêutica desta planta, sendo reconhecida pela medicina popular e pela alopatia tradicional como um diurético moderado, auxiliando na eliminação de cálculos renais. Adicionalmente, os stigmas de milho são utilizados contra a hiperplasia de próstata, cistite, gota, nefrite crônica e distúrbios similares (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; MAKSIMOSIĆ *et al.*, 2005). Apesar das diversas formas de uso referidas, os trabalhos relativos à caracterização química desse tecido são escassos, sugerindo a necessidade de um detalhamento maior, como subsídio à exploração racional daquela espécie como fonte de compostos bioativos de elevado valor de mercado.

Tal caracterização pode ser mais facilmente obtida adotando-se como estratégia de estudo uma abordagem adequada e dedicada à determinação do perfil metabólico (metaboloma) daquele germoplasma, apoiada em estratégias analíticas consolidadas, como, por exemplo, as espectroscopias UV-visível, vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e de ressonância magnética nuclear associadas à quimiometria (SUMNER *et al.*, 2003).

A caracterização do perfil metabólico das flores femininas de milho deve ainda levar em consideração as possíveis diferenças decorrentes da constituição genética das variedades. Isto porque as variedades são o resultado de centenas de anos de domesticação, realizada por diferentes povos e em localidades distintas. A adaptação de um dado germoplasma às condições ambientais distintas e a pressão de seleção a ele imposta contribuem para a heterogeneidade observada, por exemplo, na coloração dos mais diversos órgãos da planta, tais como folhas, flores, caule e raízes, o que reflete diferenças qualitativas e quantitativas no conteúdo de pigmentos, tais como os carotenóides, os polifenóis e as antocianinas. Nesse contexto, a região extremo oeste de Santa Catarina caracteriza-se por ser um campo estratégico para estudos dessa natureza, devido à ocorrência de mais de 30 variedades crioulas

e locais de milho (VCLM), como observado no município de Anchieta (OGLIARI & ALVES, 2006).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil metabólico de flores femininas de 8 VCLM cultivadas e desenvolvidas por pequenos agricultores do extremo-oeste do estado de Santa Catarina (município de Anchieta, Brasil). Tal abordagem enfatizou as frações carotenóidica, polifenólica e antociânica, como estratégia de exploração do potencial fitoquímico, visando gerar subsídios à agregação de valor daquelas biomassas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Sementes das VCLM Língua de Papagaio, Roxo do Valdecir, Roxo do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa, Palha Roxa 1 do Emílio, Rosado, Rajado 8 carreiras e Cateto Vermelho foram obtidas junto aos pequenos agricultores do município de Anchieta, localizado no extremo-oeste catarinense, pelo Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar (SINTRAF) e repassadas ao grupo do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (*NeaBio*) da UFSC.

As variedades foram plantadas em duas áreas experimentais em Florianópolis (Santa Catarina) para obtenção das flores femininas. As plantas ( $n = 8$ ) foram dispostas em espaçamento de 0,5 m x 0,5 m, procedendo-se a coleta das flores entre o 4º e o 7º dias após a emissão da inflorescência (**Figura 1**). As amostras de tecidos de estigmas/estiletos (biomassa variando entre 0,5 g a 5,0 g – peso fresco) foram coletadas e imediatamente congeladas ( $N_2$  líquido), sendo posteriormente divididas em duas sub-amostras. Uma sub-amostra foi imediatamente analisada quanto ao conteúdo dos compostos de interesse (polifenóis e antocianinas), enquanto a outra foi armazenada ( $-80^0$  C) e posteriormente liofilizada.



**FIGURA 1** - Detalhe das flores femininas das variedades Rosado (A) e Palha Roxa 1 do Emílio (B).

### **3.2 Caracterização da composição química do tecido floral por espectroscopia vibracional no infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e análise quimiométrica**

Análises de amostras de flores liofilizadas (30 mg/indivíduo;  $n = 6$ /variedade) das 8 VCLM por espectroscopia vibracional de FT-IR foram realizadas após a maceração dos tecidos florais em *graal* e subsequente tamização (80 mesh). A aquisição dos dados espectrais utilizou equipamento Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), programado para coletar 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 500 a 4000  $\text{ondas.cm}^{-1}$  e com resolução de 4  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Cinco espectros/amostra foram coletados, sendo processados com auxílio do programa OPUS versão 5.0 (Bruker GmbH). O processamento dos espectros considerou a delimitação da janela espectral de interesse (3000-600  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ), a correção da linha de base, a normalização dos dados e a otimização da razão sinal/ruído. Posteriormente, o conjunto de dados totais dos espectros foi submetido à

análise estatística multivariada, através do cálculo dos componentes principais (PCAs), utilizando-se o pacote estatístico Unscrambler 9.1.

### 3.3 Obtenção dos extratos florais

a) MeOH-HCl (1%, v/v): amostras de tecidos florais (1,0 g - peso fresco) foram maceradas na presença de metanol acidificado (HCl 1%, v/v – 10 mL), por 30 minutos, a 0°C, e os respectivos extratos filtrados em suporte de celulose (0,45 µm) e ajustados para o volume final de 10 mL.

b) MeOH-Tolueno (1:1, v/v): amostras de tecidos florais (1,0 g – peso fresco) foram maceradas com metanol: tolueno (1:1, v/v – 12 mL), durante 30 minutos, a temperatura ambiente e subsequentemente filtradas em suporte de celulose (0,45 µm). O volume final foi corrigido para 10 mL.

### 3.4 Caracterização espectroscópica do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) e análise quimiométrica

**3.4.1 Espectrofotometria UV-visível:** O perfil espectral UV-visível (370nm a 700nm) do extrato metanólico acidificado (3 mL) das flores femininas foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu 2301. Uma leitura para cada amostra foi efetuada, com resolução de 1 nm, sendo o conjunto total de dados espectrais submetido à análise estatística multivariada, para efeito de cálculo dos componentes principais (PCA).

**3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1H-RMN):** Para a obtenção dos espectros de 1H-RMN dos extratos metanólicos acidificados das flores, inicialmente procedeu-se à remoção do solvente orgânico em fluxo de N<sub>2</sub> gasoso. O extrato seco das amostras foi ressuspense em 600 µL de MeOH-δ<sub>6</sub> e transferido para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro interno. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em triplicata, em equipamento Bruker DRX-400, operando em frequência de ressonância de 400,13 MHz (9,4 Tesla) de 1H, com um tempo de relaxação de 6,57s, 16 varreduras, coletando-se 64.000 pontos para efeito de processamento a 28°C. Uma função de multiplicação exponencial, com um fator de alargamento de linha (lb) de 0,3Hz, foi aplicada



ao FID, previamente à transformação de Fourier. Os espectros foram processados utilizando-se o software XWin-NMR (versão 3.1, Bruker-Biospin – Rheinsteten, Germany) e analisados com o auxílio do software Amix-Aurelia (versão 3.0, Bruker-Biospin – Rheinsteten, Germany). A análise dos componentes principais das amostras foi aplicada ao conjunto total de ressonâncias de interesse dos espectros ( $^1\text{H}$  – 0,1 - 8,0 ppm), utilizando-se o software Unscramble (versão 9.1).

### 3.4.3 Determinação do conteúdo de fenóis totais

Alíquotas (1 mL/amostra) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) foram usadas para a determinação do conteúdo de fenóis totais utilizando-se a espectrofotometria UV-visível (Shimadzu 2301) e o reativo de Folin-Ciocalteu, conforme descrito previamente (SINGLETON & ROSSI, 1965). A quantificação dos compostos de interesse foi feita através de curva padrão (ácido gálico – 50  $\mu\text{g/mL}$  a 800  $\mu\text{g/mL}$ ,  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,358x$ ) e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico.

### 3.4.4 Identificação dos ácidos (poli)fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Análises prévias dos compostos (poli)fenólicos dos extratos metanólicos acidificados em estudo revelaram a necessidade de um pré-tratamento das amostras, em função do comprometimento da resolução cromatográfica (dados não mostrados). Para tal, uma alíquota (500  $\mu\text{L}$ ) da fração organossolvente foi concentrada na presença de  $\text{N}_2$  gasoso e ressuspensa em 100  $\mu\text{L}$  de álcool etílico. Subsequentemente, 400  $\mu\text{L}$  de acetato de etila foram adicionados às amostras, seguido de centrifugação a 5.000 rpm (10 min). Uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) da fração acetato de etila foi injetada em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna  $\text{C}_{18}$  (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm  $\varnothing$ ) e pré-coluna (Shim-Pack CLC-ODS, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm  $\varnothing$ ), termostatizador (40°C) e detector espectrofotométrico UV-visível (280 nm). A eluição utilizou  $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}:\eta\text{-BuOH}$  (350:1:10, v/v/v) como fase móvel, em fluxo de 0,8 mL/min e a identificação dos compostos baseou-se nos tempos de retenção, obtidos a partir da análise de amostras padrões [ácido protocatecuico (Sigma P-5630), ácido gálico (Sigma G-7384), ácido *t*-cinâmico (Fluka 96340), ácido siríngico (Fluka 86230), ácido caféico (Sigma

C-0625) – 100 µg/mL) sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita através do uso de curva-padrão externa de ácido gálico (2,5 µg/mL a 100 µg/mL,  $r^2 = 0,91$ ;  $y = 1589,9x$ ) e ácido caféico (1 µg/mL a 100 µg/mL,  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 532,83x$ ), considerando-se a intensidade dos sinais de interesse.

### **3.4.5 Análise do conteúdo de antocianinas totais**

O conteúdo de antocianinas foi determinado através da leitura da absorvância (460 nm e 525 nm - Shimadzu 2301) das soluções amostrais ( $\epsilon = 34300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e peso molecular de 449,2 g.mol<sup>-1</sup> (GIUSTI & WROLSTAD, 2001).

### **3.4.6 Caracterização estrutural das antocianinas usando MALDI-TOFF**

A caracterização estrutural das antocianinas foi feita usando um espectrômetro de massa de tempo de voo equipado com uma interface de desorção/ionização assistida por laser (MALDI-TOF – PerSeptive Biosystems Voyager), conforme descrito previamente (Maraschin *et al.*, 2001).

## **3.5 Caracterização espectroscópica (UV-vis) e cromatográfica (CLAE) do extrato MeOH-Tolueno (1:1 v/v)**

### **3.5.1 Espectrofotometria UV-visível**

O extrato foi analisado utilizando-se espectrofotometria UV-visível (Shimadzu 2301), através da leitura da absorvância em janela espectral de 270 nm a 750 nm, com resolução de 10 nm.

### **3.5.2 Identificação de carotenóides usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A identificação de carotenóides nas amostras em estudo considerou a saponificação destes, como previamente descrito por WANG *et al.* (2006). Para tal, uma alíquota do extrato (1,25 mL) foi seca a exaustão usando N<sub>2</sub> gasoso, seguido da adição de solução de isopropanol (1:1,5 p/v) e KOH 15% (5:3, v/v – 1 mL), com incubação por 12h, a 40°C. Posteriormente, o extrato foi diluído com água destilada (1:3, v/v) e particionado (3x) com acetato de etila (1:1).

A fração organossolvente foi coletada e filtrada com sulfato de sódio anidro. A amostra foi concentrada sob vácuo (40<sup>o</sup> C) e ressuspensa em acetona. Uma alíquota (10 µL/amostra) foi analisada em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 25cm x 4,6mm Ø interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm), termostatizador (40°C) e detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 450nm. A eluição utilizou MeOH:Acetonitrila (80:20, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 ml/min. A identificação dos compostos de interesse foi feita com base nos tempos de retenção determinados a partir da análise de amostras padrões [luteína (Sigma X-6250), zeaxantina, β-caroteno (Sigma, Saint Louis – MO, USA – 100 µg/mL)], sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides foi feita através de curva-padrão externa de luteína (0,05 µg/mL a 55 µg/mL,  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 12575x$ ) tomando como base a intensidade dos sinais dos compostos de interesse.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise do tecido floral liofilizado por FT-IR e quimiometria

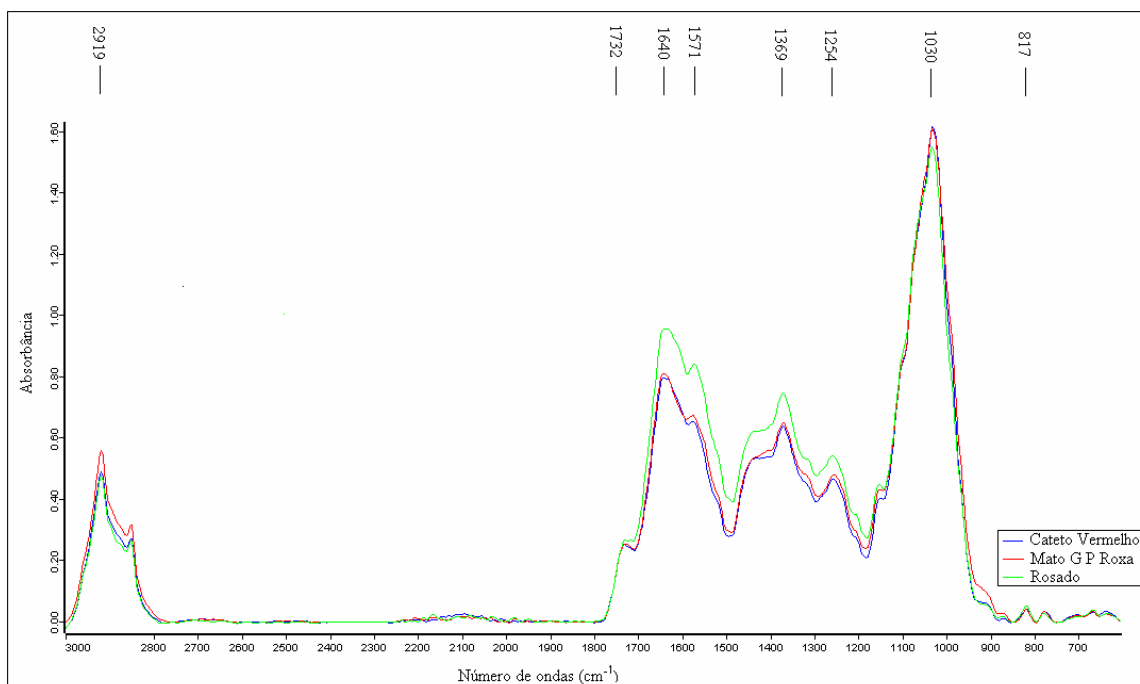
Foram identificados 21 bandas nos espectros de FT-IR, entre 3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup> das amostras de todas as variedades (**Tabela 1**). Os espectros dos tecidos florais femininos das VCLM Cateto Vermelho e Mato Grosso Palha Roxa, para a região compreendida entre 1800-600 ondas.cm<sup>-1</sup>, estão apresentados na **Figura 2**.

Algumas diferenças quanto à presença ou ausência de sinais foram detectadas entre as variedades, por exemplo, para a variedade Cateto Vermelho, foram encontradas 24 bandas, enquanto que para a variedade Roxo do Valdecir foram detectadas 31. Além das bandas indicadas na **Tabela 1** foram identificados outros sinais de menor intensidade, na região entre 2246-1939 ondas.cm<sup>-1</sup>, em todas as amostras analisadas.

**TABELA 1** - Bandas (ondas.cm<sup>-1</sup>) espectrais de FT-IR das amostras de tecido floral das VCLM em estudo com os seus respectivos grupos funcionais.

Bandas (ondas.cm <sup>-1</sup> )	<i>Grupo Funcional</i>
2919	Deformação axial e angular do grupo metil (-CH <sub>3</sub> ) e/ou metileno (CH <sub>2</sub> )
2850	Deformação axial e angular do grupo metil (-CH <sub>3</sub> ) e/ou metileno (CH <sub>2</sub> )
1732	Deformação axial do grupo C=O de ácidos, ou acetil
1640	Deformação axial do grupo C=O de aminas
1574	Deformação angular do grupo NH <sub>2</sub> de aminas
1519	Deformação do grupo -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
1440	Deformação do grupo CH <sub>2</sub>
1370	Deformação do grupo CH <sub>3</sub>
1315	Deformação da ligação C-N
1254	Deformação da ligação C-OH
1202	Deformação da ligação C-O-C de éteres cíclicos
1150	Deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C
1102	Deformação da ligação C-O-C
1072	Deformação axial da ligação C-O, C-C, C-O-C
1030	Deformação da ligação R-C-O
868	Deformação da ligação C-H
816	Deformação da ligação C-H
775	Vibração simétrica do anel piranosídico dos açúcares
701	Deformação da ligação =CH de compostos aromáticos
665	Deformação da ligação C-H
633	Deformação angular da ligação O-H

Fonte: LAMBERT *et al.* (2001)

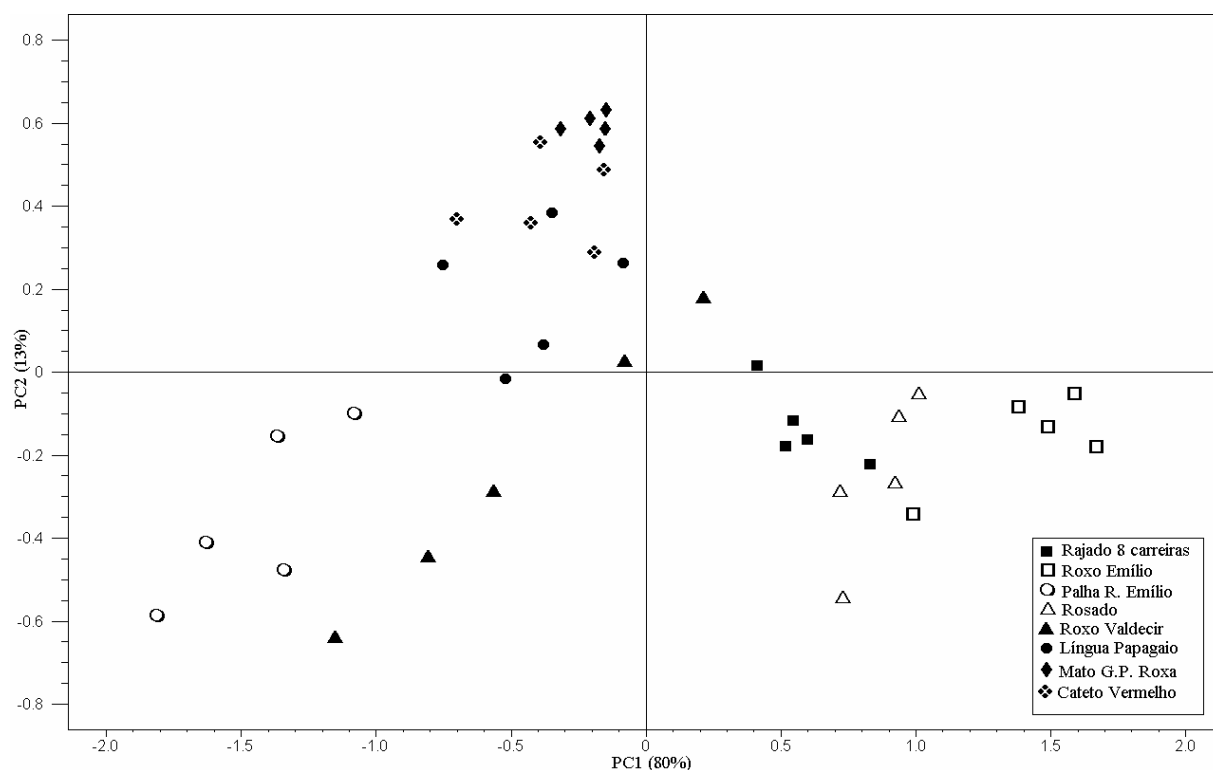


**FIGURA 2** - Espectros de FT-IR na região entre 3000 – 600 ondas.cm<sup>-1</sup> de amostras de tecido floral liofilizados das variedades crioulas e locais de milho Rosado, Cateto Vermelho e Mato Grosso Palha Roxa.

Os espectros mostraram bandas de elevada intensidade (2919 e 2850 ondas.cm<sup>-1</sup>) associadas a deformação do grupo metil ou metileno que são sinais típicos de hidrocarbonetos alifáticos (**Tabela 1** e **Figura 2**). A banda em 1732 ondas.cm<sup>-1</sup>, resultante da deformação axial de grupos C=O, indica a presença de ésteres de ácidos graxos ou polissacarídeos, por exemplo. A presença de compostos de origem protéica nas amostras pode ser sugerida pelos sinais entre 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup> e de aminoácidos pela região entre 1550-1480 ondas.cm<sup>-1</sup>. Na região de *fingerprint* para carboidratos (1200-950 ondas.cm<sup>-1</sup>) diversas bandas foram encontrados para todas as amostras analisadas. Compostos aromáticos foram detectados pelos sinais entre 2000-1700 ondas.cm<sup>-1</sup> e a banda em 633 ondas.cm<sup>-1</sup> (SILVERSTEIN, 1994; LAMBERT, 2001).

Subsequentemente à interpretação dos espectros procedeu-se à determinação dos componentes principais (PCA) do conjunto total de dados. Para efeitos de classificação das variedades de acordo com sua constituição química, a primeira região do espectro utilizada para efeitos de cálculo dos componentes principais (PCAs) compreendeu as bandas entre 3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup>. Para todas as regiões testadas a matriz de dados espectrais foi normalizada em seus componentes lineares, enquanto as colunas foram centralizadas.

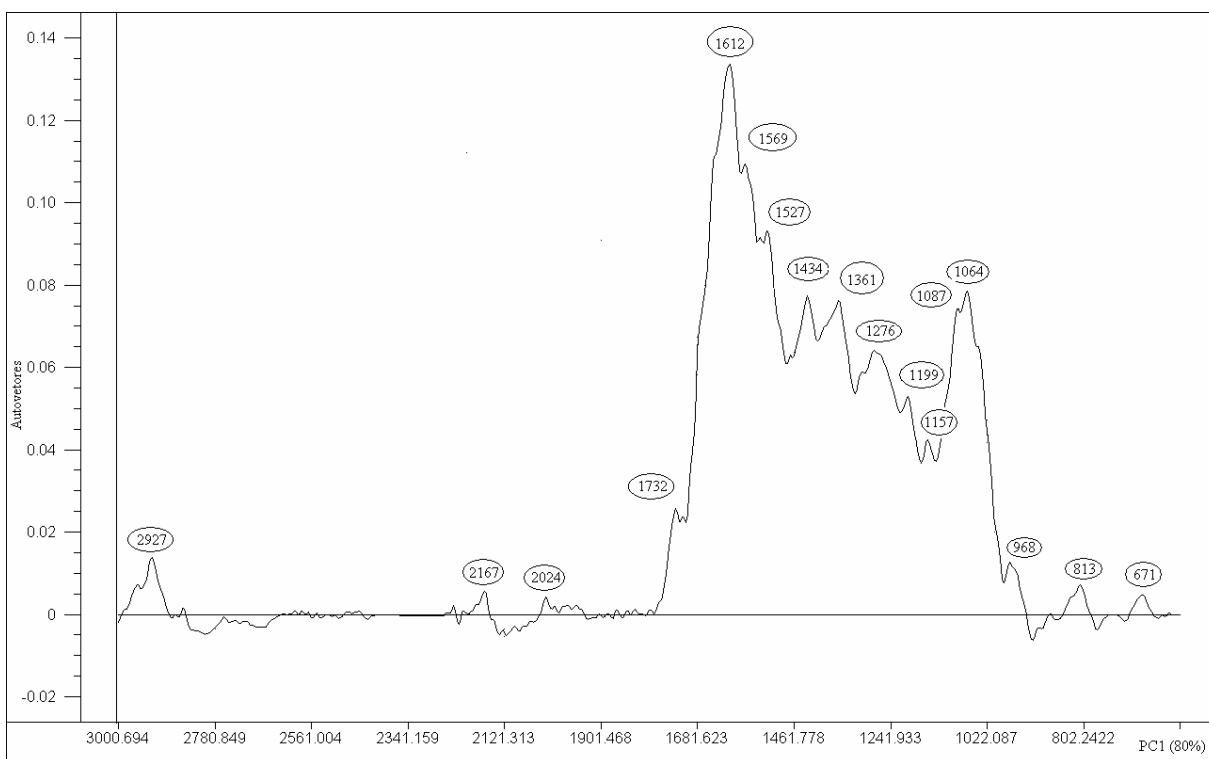
A **Figura 3** mostra a dispersão das variedades em estudo, segundo a determinação dos componentes principais (PCA) da matriz de dados obtida a partir dos espectros de FT-IR. Os componentes principais PC1 e PC2 contribuíram para explicar em 93% a variância presente nos dados. Analisando o gráfico de distribuição fatorial verifica-se que as amostras de tecido floral diferem entre si pela formação de 3 grupos principais.



**FIGURA 3** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (3000 - 600 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM estudadas.

O primeiro deles se localizou em PC1 negativo e PC2 positivo, sendo constituído pelas variedades Mato Grosso Palha Roxa, Cateto Vermelho e Língua de Papagaio. O segundo grupo formado pelas variedades Palha Roxa do Emílio e Roxo do Valdecir localizou-se em PC1 e PC2 negativo, enquanto as variedades Rosado, Roxo do Emílio e Rajado 8 Carreiras ficaram localizadas em PC1 positivo e PC2 negativo. As bandas que mais contribuíram para a separação das amostras ao longo de PC1 foram 1612, 1539, 1527, 1434, 1361, 1276, 1199, 1157, 1087 e 1064 ondas.cm<sup>-1</sup>, como mostra a **Figura 4**, que são característicos principalmente de proteínas e carboidratos. Considerando apenas o eixo do componente

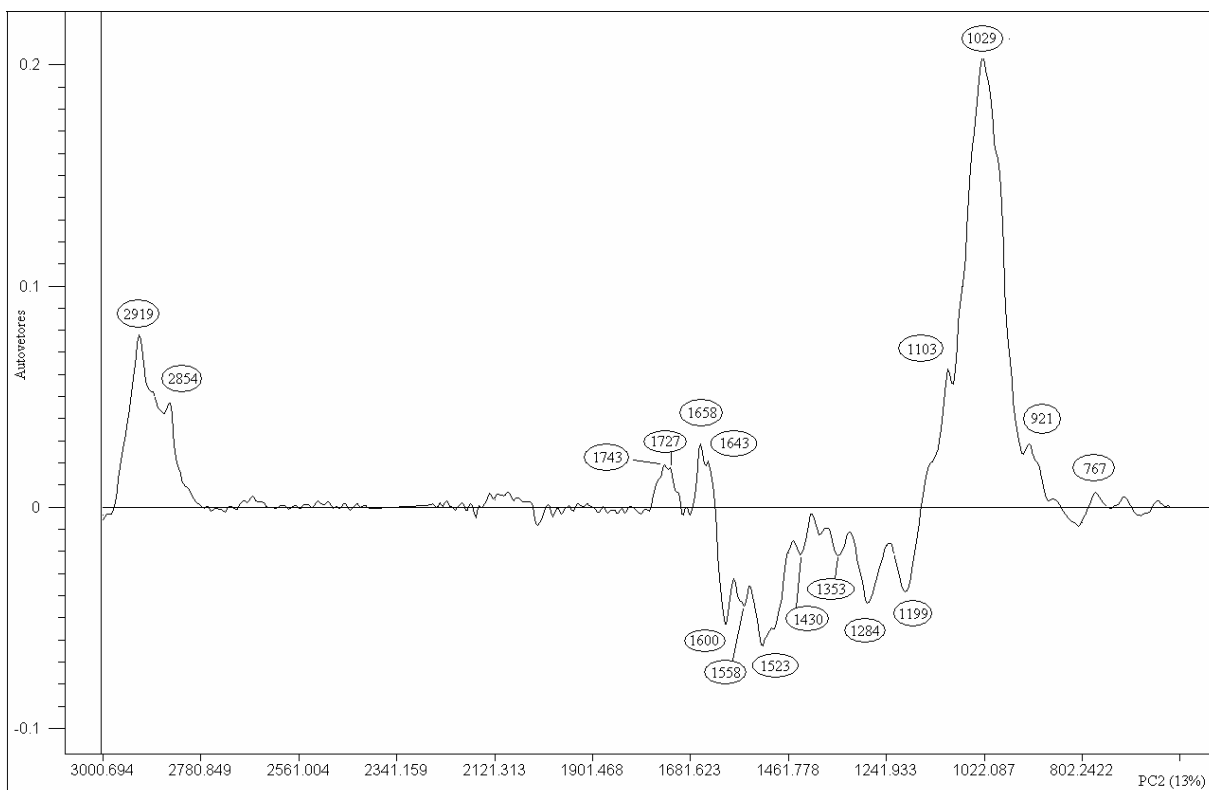
principal 1 (PC1) as variedades Rosado, Roxo do Emílio e Rajado 8 Carreiras apresentaram maior semelhança química em relação às demais. Por outro lado, a classificação das variedades em função do eixo componente principal PC2 separou principalmente Mato Grosso Palha Roxa, Cateto Vermelho e Língua de Papagaio das demais. Neste caso, as bandas que contribuíram para a dispersão das amostras ao longo de PC2 foram principalmente 2919, 2854, 1743, 1727, 1658, 1643, 1103, 1029, 921 ondas.cm<sup>-1</sup> na região positiva que são bandas relacionados a compostos lipídicos, protéicos e carboidratos e 1600, 1558, 1523, 1430, 1353, 1284 e 1199 ondas.cm<sup>-1</sup> na região negativa associados a proteínas e carboidratos, como mostrado na **Figura 5**.



**FIGURA 4** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados espectrais de FT-IR (3000 - 600 ondas.cm<sup>-1</sup>).

Considerando que os sinais característicos para compostos protéicos foram importantes para a separação das amostras, um segundo procedimento experimental foi realizado, utilizando somente a região espectral associada à ocorrência de sinais típicos daquela classe de macromoléculas, isto é, 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup> (**Figura 6**). Nesse caso, os eixos PC1 e PC2

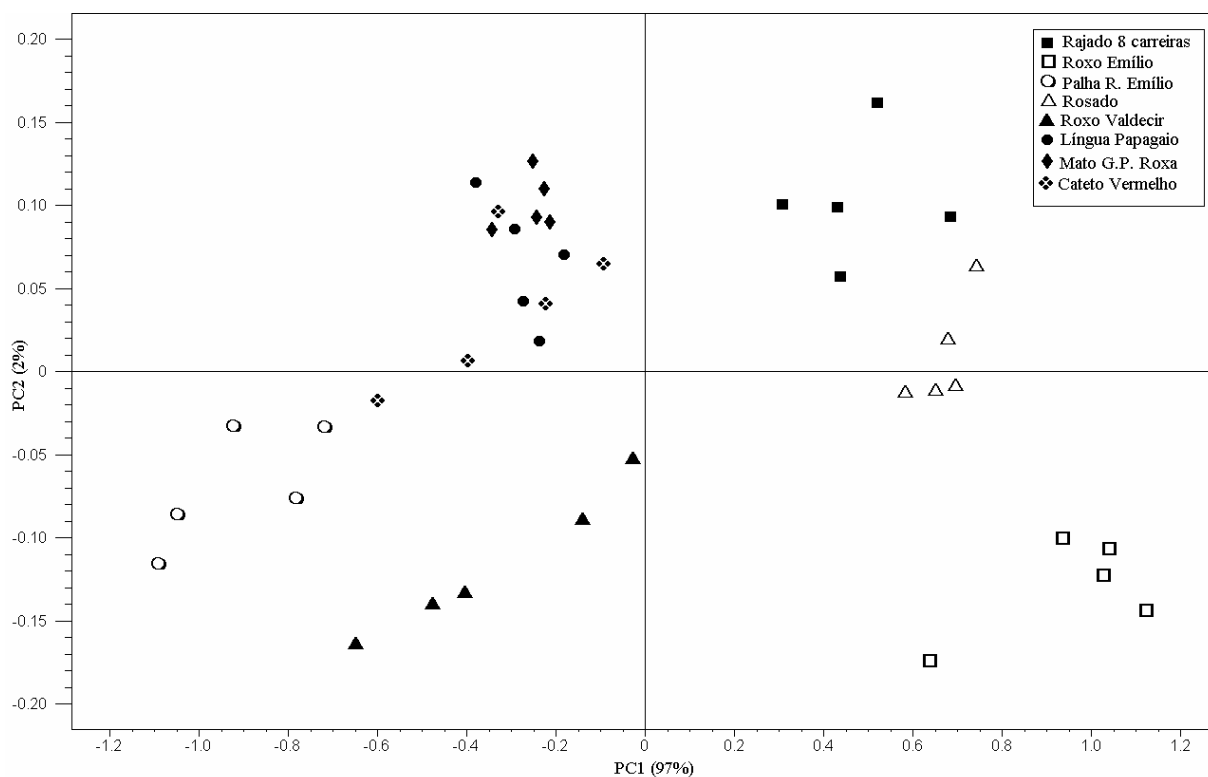
explicaram em 98% a variação total dos dados espectrais, resultando em 4 grupos distintos. Um primeiro agrupamento, constituído pelas amostras de flores das variedades Cateto Vermelho, Mato Grosso Palha Roxa e Língua de Papagaio, localizou-se em PC1 negativo e PC2 positivo. As variedades Rajado 8 Carreiras e Rosado agruparam-se em PC1 e PC2 positivos, enquanto um terceiro grupo (variedades Palha Roxa do Emílio e Roxo do Valdecir, foi observado em PC1 e PC2 negativos. As amostras de flores da variedade Roxo do Emílio se diferenciaram das demais, com valores de PC1 positivo e PC2 negativo.



**FIGURA 5** - Contribuição fatorial de PC2 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados espectrais de FT-IR (3000 - 600 ondas.cm<sup>-1</sup>).

Em função do exposto, constata-se que a análise quimiométrica das amostras para a região de *fingerprint* de proteínas (650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>) revelou um padrão similar de classificação ao observado quando do cálculo dos valores dos componentes principais para os dados espectrais em sua totalidade (3000-600 ondas.cm<sup>-1</sup> - **Figura 3**), exceção feita à variedade Roxo do Emílio, cuja constituição protéica é, provalvemente, distinta das demais VCLM em estudo, haja vista seu não agrupamento.



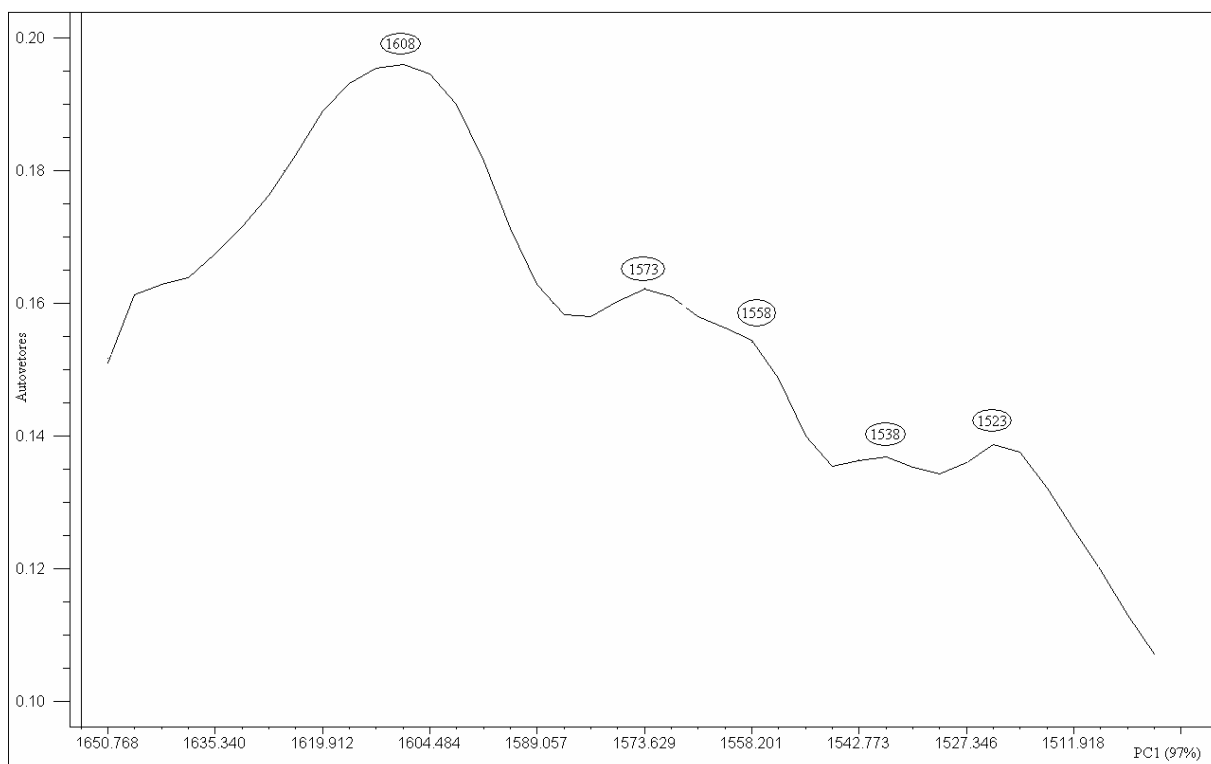


**FIGURA 6** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR na janela espectral de 1650-1500  $\text{ondas.cm}^{-1}$  de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM em estudo.

Os autovetores que determinaram o padrão de distribuição mostrado na **Figura 7** foram 1608, 1573, 1558, 1538 e 1523  $\text{ondas.cm}^{-1}$ . Conforme descrito na literatura (BEEKES *et al.*, 2007), as bandas em 1570 e 1550  $\text{ondas.cm}^{-1}$  relacionam-se ao grupo de amidas II das proteínas. Além disso, algumas bandas dessa região do espectro podem estar correlacionadas com a estrutura secundária das cadeias polipeptídicas (FABIAN & MANTELE, 2002), o que sugere uma constituição protéica distinta para os tecidos analisados e reforça a hipótese de que as diferenças genótípicas entre as VCLM podem ser investigadas através da diversidade química, aqui representada pelas proteínas.

Uma terceira janela espectral de FT-IR, referente à região de *fingerpint* para carboidratos (1200-950  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ) foi analisada, onde os valores de PC1 e PC2 explicaram em 94% a variação total dos dados (**Figura 8**). Para essa região do espectro, as amostras apresentaram um padrão de dispersão bastante similar ao observado na **Figura 3**,

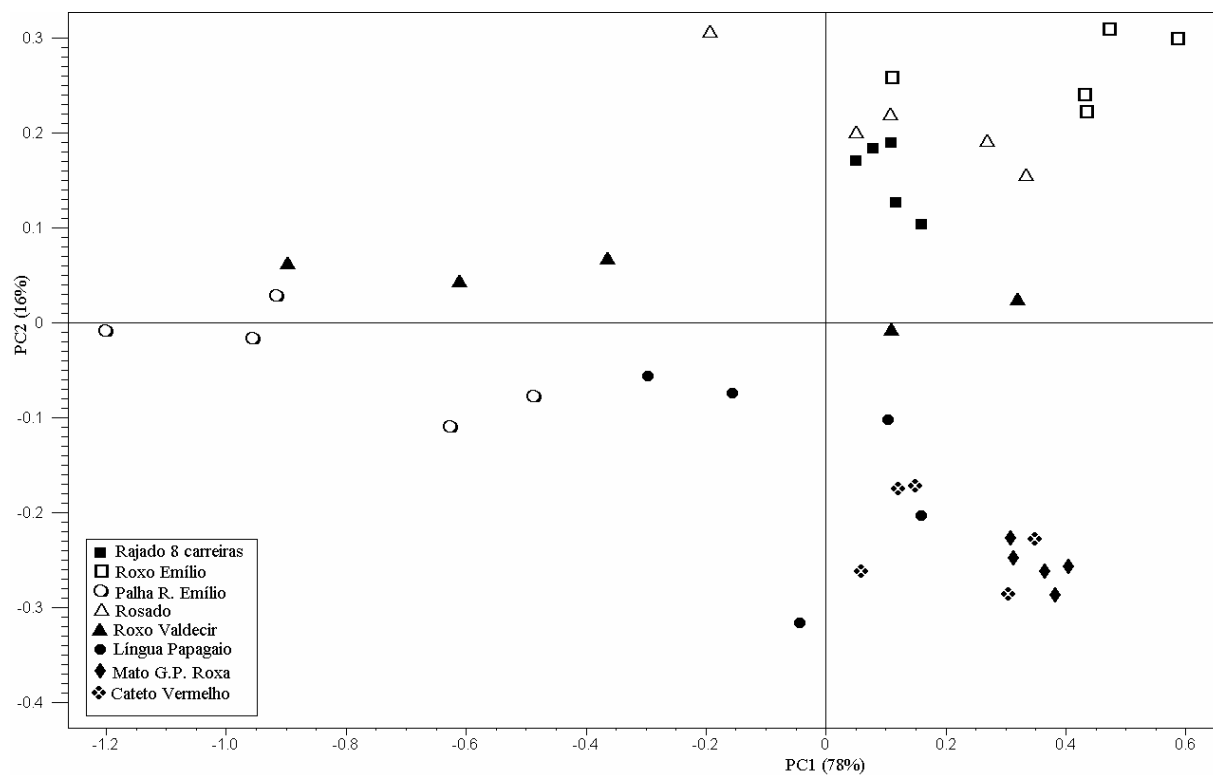
possibilitando a identificação de 3 grupos. As amostras das variedades Palha Roxa do Emílio e Roxo do Valdecir dispersaram-se ao longo do eixo de PC1 -, mostrando certo grau de distinção entre as repetições. As amostras das variedades Rosado, Rajado 8 Carreiras e Roxo do Emílio localizaram-se em PC1 e PC2 +, enquanto as variedades Mato Grosso Palha Roxa, Cateto Vermelho e Língua de Papagaio agruparam-se em PC2 -.



**FIGURA 7** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM, para os dados de FT-IR na região espectral de 1650-1500 ondas.cm<sup>-1</sup>.

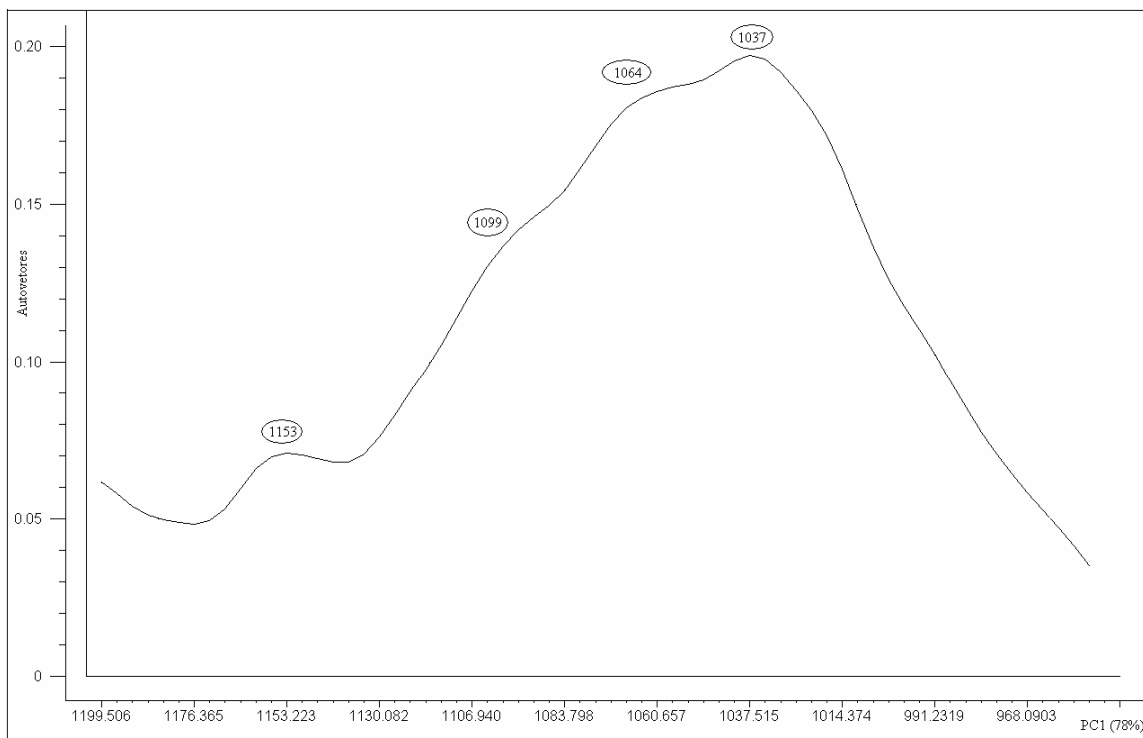
Para a região de carboidratos, sugere-se a presença de polissacarídeos estruturais, tais como celulose, pectina e hemicelulose, além de açúcares simples constituindo as amostras de flores e determinando o padrão de distribuição observado na **Figura 8**. Para o eixo PC1, os autovetores que contribuirão para a distinção das amostras foram 1153, 1099, 1064 e 1037 ondas.cm<sup>-1</sup> (**Figura 9**) e para PC2 foram 1160, 1118, 1091, 1068, 1025, 1010 e 991 ondas.cm<sup>-1</sup> (**Figura 10**). Em um estudo prévio de caracterização de polissacarídeos estruturais de flores (*Cirsium horridulum*), por FT-IR, foram determinadas as bandas características à identificação

de celulose (2850 e 1060 ondas.cm<sup>-1</sup>) e de pectina (1745, 1015 e 1105 ondas.cm<sup>-1</sup>) (MARGA *et al.*, 2003).

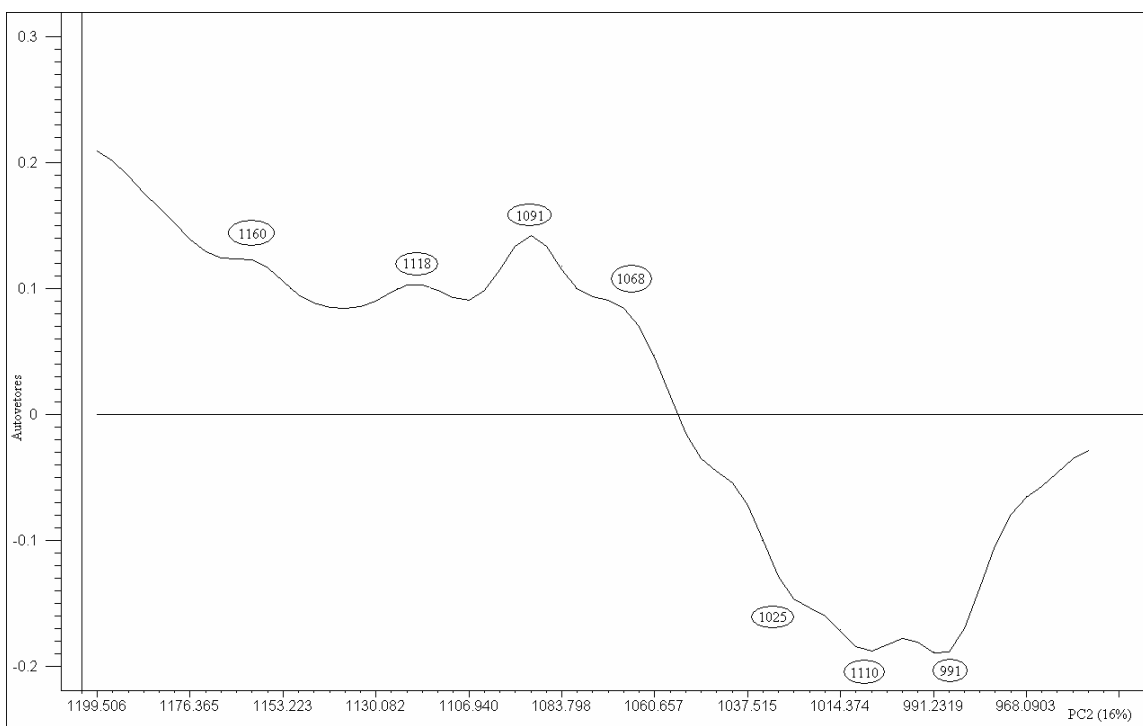


**FIGURA 8** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de FT-IR (1200 - 950 ondas.cm<sup>-1</sup>) de amostras de tecido floral liofilizado das 8 VCLM em estudo.

De forma similar, COIMBRA *et al.* (1999) associando FT-IR e quimiometria, verificaram que amostras padrões de hemicelulose são caracterizadas por bandas em 1173 e 1041 ondas.cm<sup>-1</sup>, enquanto as pectinas em 1145, 1104, 1014 e 952 ondas.cm<sup>-1</sup>. No presente estudo, a distinção dos tecidos florais por PCA provavelmente, refletiu as diferentes proporções dos polissacarídeos de parede celular constituindo as amostras, uma vez que essas são matrizes complexas, devendo apresentar conteúdos distintos dos mesmos.



**FIGURA 9** - Contribuição fatorial de PC1 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados de FT-IR na região espectral de 1200 - 950 ondas.cm<sup>-1</sup>.



**FIGURA 10** - Contribuição fatorial de PC2 das amostras de tecido floral liofilizado para os dados de FT-IR (1200 - 950 ondas.cm<sup>-1</sup>).

Comparando os resultados do presente estudo com os encontrados por COIMBRA *et al.* (1999) pode-se sugerir que a separação das amostras ao longo de PC2 (**Figura 8**) ocorreu devido ao conteúdo distinto de pectina, pela presença da banda em  $1010 \text{ ondas.cm}^{-1}$  (**Figura 10**), devendo ter os tecidos das VCLM Palha Roxa do Emílio, Língua de Papagaio, Cateto Vermelho e Mato Grosso Palha Roxa conteúdos superiores desse composto. Esses resultados indicaram propriedades mecânicas distintas para os tecidos florais, uma vez que a composição da parede celular tem relação direta com características como rigidez e elasticidade. A celulose, por exemplo, confere força e rigidez à célula enquanto a pectina elasticidade, permitindo a adaptação do tecido após um estresse mecânico (WHITNEY *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos por FT-IR, tomados em conjunto, permitem distinguir as amostras de flores femininas das variedades estudadas, independente da região do espectro analisada. Dessa forma, podemos sugerir que as variedades Cateto Vermelho, Mato Grosso Palha Roxa e Língua de Papagaio se distinguem das variedades Palha Roxa do Emílio e Roxo do Valdecir que formam um grupo a parte, assim como as variedades Roxo do Emílio, Rosado e Rajado 8 Carreiras. Sendo assim, a diversidade química detectada nas flores das VCLM, provavelmente, reflete às diferenças genotípicas resultantes do processo de seleção empregado pelos agricultores de Anchieta. Estudos posteriores sobre a diversidade genética desse germoplasma são de interesse para confirmar os resultados do presente estudo e consolidar o uso de FT-IR e quimiometria em estudos de diversidade química.

## **4.2 Caracterização dos extratos florais - MeOH-HCl (1%, v/v)**

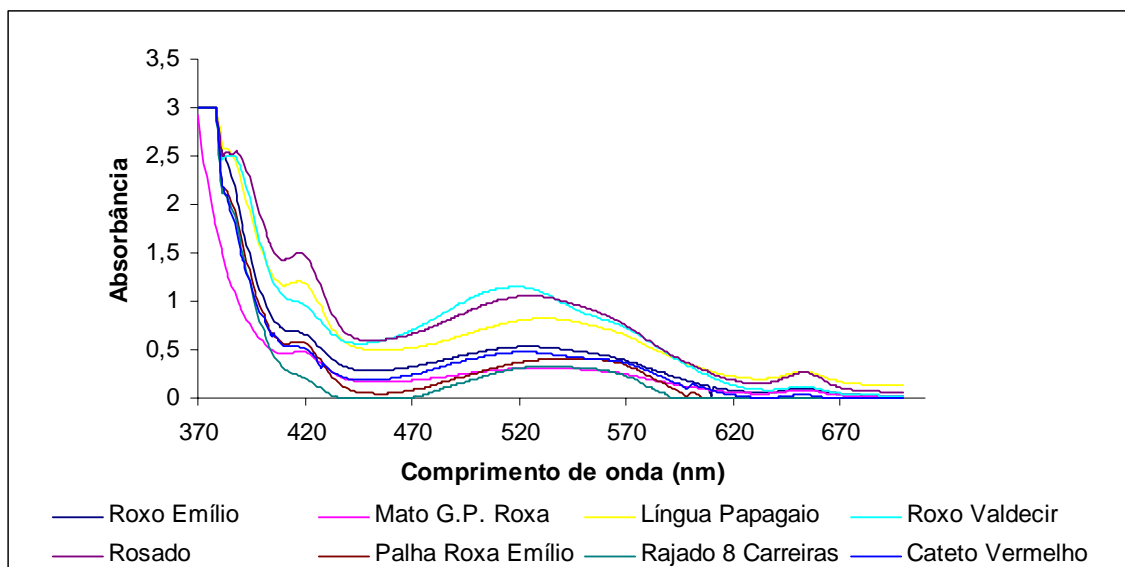
### **4.2.1 Espectroscopia UV-visível**

A espectroscopia UV-visível é uma técnica rápida e simples, usada principalmente para a identificação de grupos cromóforos, especialmente cromóforos conjugados, como aqueles encontrados em compostos aromáticos (LAMBERT *et al.*, 2001). Dessa forma, compostos antociânicos, por exemplo, são facilmente identificados usando tal metodologia, inclusive permitindo a distinção de suas agliconas delphinidina, cianidina, pelargonidina, petunidina, peonidina e malvidina. Isto porque, grupos funcionais ligados ao anel B das

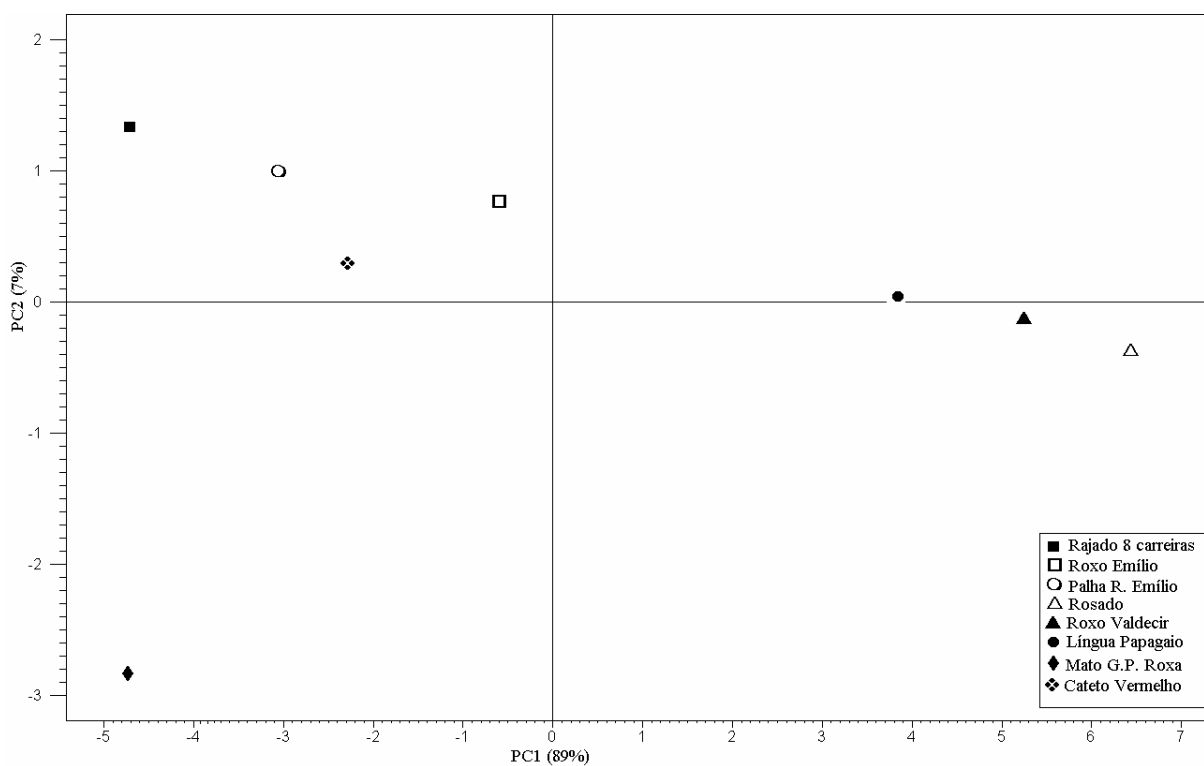
antocianidinas podem provocar um deslocamento no comprimento de onda de absorção máxima daqueles compostos. Cianidina e peonidina, por exemplo, têm máximos de absorbância em 510,5 nm e 511 nm, enquanto delphinidina, petunidina e malvidina apresentam valores de máxima absorbância em 522,5 nm, 549 nm e 520 nm, respectivamente. Da mesma forma, a glicosilação desses compostos provoca um deslocamento no comprimento de onda de absorção máxima na região do visível em relação às agliconas, além de decrescer o coeficiente de absorção molar. Peonidina-3-glicosídeo, por exemplo, tem um comprimento de onda máximo em 536 nm enquanto sua aglicona tem em 511 nm (FULEKI & FRANCIS, 1968; ESCRIBANO-BAILÓN *et al.*, 2004). Assim, considerando a capacidade de detecção dos compostos antociânicos por espectrofotometria UV-visível e o potencial discriminante daqueles metabólitos, extratos metanólicos das flores femininas das VCLM, ricos em compostos antociânicos, foram analisados através da determinação de seu perfil espectral (370 – 700 nm).

Os perfis espectrais dos extratos para a região entre 370-700 nm são mostrados na **Figura 11**. A análise do gráfico permite observar um elevado grau de similaridade entre os extratos, sendo que valores máximos de absorbância entre 280 e 370 nm foram detectados (dados não mostrados), sugerindo a presença de compostos aromáticos, tais como (poli)fenóis e proteínas (LAMBERT *et al.*, 2001). De forma similar, as regiões entre 400-430 nm e 480-560 nm, com valores de absorbância elevados, indicaram a presença de compostos antociânicos (GIUSTI & WROLSTAD, 2001). Para esta região, e apesar da similaridade espectral observada, é possível detectar a diferença de conteúdo de tais compostos para as variedades analisadas, assim como para a região de absorção das clorofilas (630-660 nm).

Com a finalidade de distinguir as amostras não somente por seus conteúdos de compostos antociânicos, os dados espectrais de UV-visível foram submetidos à determinação dos componentes principais (PCA), conforme demonstrado na **Figura 12**. A abordagem quimiométrica utilizada mostrou-se bastante eficiente para classificar os extratos metanólicos das flores das VCLM, onde PC1 e PC2 explicaram em 96% a variabilidade total dos dados.



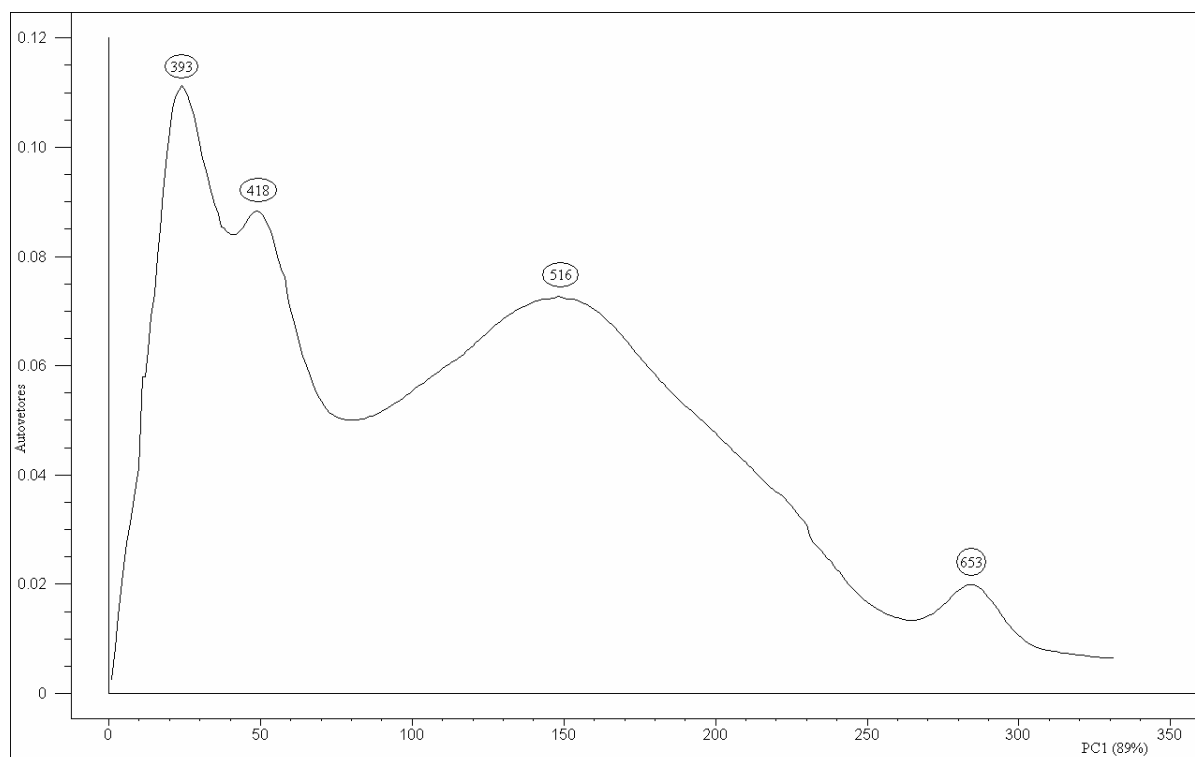
**FIGURA 11** - Perfil espectral UV-visível (370 a 700nm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de amostras de flores femininas das 8 VCLM em estudo.



**FIGURA 12** – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais UV-visível (370-700 nm) do extrato metanol acidificado do tecido floral das 8 VCLM estudadas.

As variedades Rajado 8 carreiras, Palha Roxa do Emílio, Cateto Vermelho e Roxo do Emílio agruparam-se em PC1 ( - ) e PC2 ( + ), enquanto as variedades Língua de Papagaio, Rosado e Roxo do Valdecir localizaram-se em PC1 +. A variedade Mato Grosso Palha Roxa localizou-se em PC1 e PC2 ( - ), destacando-se das demais.

O padrão de classificação observado na **Figura 12** pode ser atribuído aos comprimentos de onda 393, 418, 516 e 653 nm, conforme indicado pelos respectivos valores de contribuições fatorais mostrados na **Figura 13**.



**FIGURA 13-** Contribuição fatorial de PC1 dos extratos MeOH-HCl (1%, v/v) de flores calculada a partir dos dados espectrais UV-visível (370-700 nm).

Os comprimentos de onda 393, 418, 516 nm estão associados às antocianinas (GIUSTI & WROLSTAD, 2001), enquanto o sinal em 653 nm a presença de clorofila.

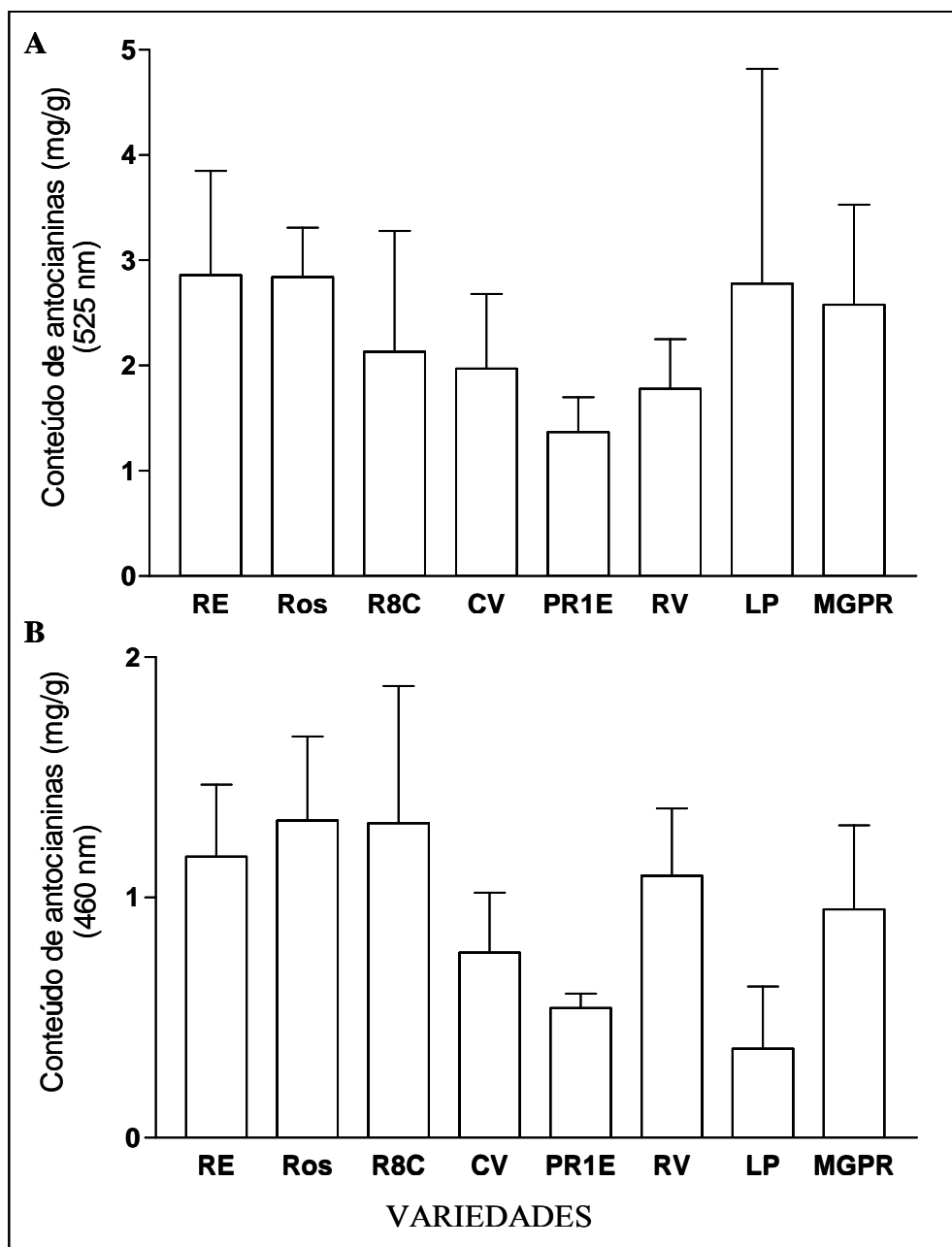
Para o comprimento de onda em 393 nm o menor valor de absorbância foi detectado na variedade Mato Grosso Palha Roxa, e os maiores valores nas variedades Roxo do Valdecir, Língua de Papagaio e Rosado que foram agrupadas utilizando-se a análise de PCA. Para os



comprimentos de onda em 418 e 516 nm os maiores valores de absorbância foram detectados novamente para as variedades Roxo do Valdecir, Língua de Papagaio e Rosado, indicando que estes três extratos possuem um conteúdo maior das distintas antocianinas. Portanto, a análise dos dados UV-visível por PCA confirmou que os extratos metanólicos das VCLM possuem quantidades diferenciadas de antocianinas distintas, confirmando que a técnica e a ferramenta estatística utilizadas são adequadas na discriminação das amostras em função da sua diversidade genética detectada através da diversidade química (antocianinas).

Posteriormente, procedeu-se à quantificação dos compostos antociânicos no tecido floral das variedades estudadas. Porém, para esta análise procedeu-se a extração e quantificação individual das flores para avaliar a variabilidade entre os indivíduos de uma mesma variedade.

Os resultados de conteúdo de antocianinas das 8 VCLM em estudo são mostrados na **Figura 14**, onde se observou uma amplitude de conteúdo médio de antocianinas de 1,36 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo (Palha Roxa do Emílio) a 2,86 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo (Roxo Emílio) [ $\lambda$  525 nm]. As variedades Rosado (2,84 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo) e Língua de Papagaio (2,78 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo) apresentaram teores elevados desses compostos em seus tecidos florais. Para a variedade Língua de Papagaio foi observada a maior variabilidade entre indivíduos, com uma amplitude de valores entre 0,5 a 5,6 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo, seguido da variedade Rajado 8 carreiras (0,90 a 3,75 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo) e da variedade Mato Grosso Palha Roxa (1,34 a 3,91 mg/g de equivalentes de cianidina-3-glucosídeo). A variabilidade encontrada entre os indivíduos de uma mesma variedade demonstra que o processo de seleção realizado pelos agricultores tem resultado em diversidade química, o que em parte é também ocasionado pelas trocas gênicas entre variedades/populações cultivadas em áreas próximas, uma vez que esta é uma espécie de polinização aberta. A manutenção de populações com conteúdos variáveis de compostos de interesse (antocianinas, por exemplo) é de grande importância por permitir a seleção de plantas que possam ser usadas em programas de melhoramento.



**FIGURA 14** - Conteúdo médio de antocianinas (mg/g, peso seco) de tecido floral de VCLM determinado por espectrofotometria UV-visível - 525 nm (A) e 460 nm (B). **RE** = Roxo do Emílio; **Ros** = Rosado; **R8C** = Rajado 8 carreiras; **CV** = Cateto Vermelho; **PR1E** = Palha Roxa 1 do Emílio; **RV** = Roxo do Valdecir; **LP** = Língua de Papagaio; **MGPR** = Mato Grosso Palha Roxa; (n= 7). Colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão da média, respectivamente.

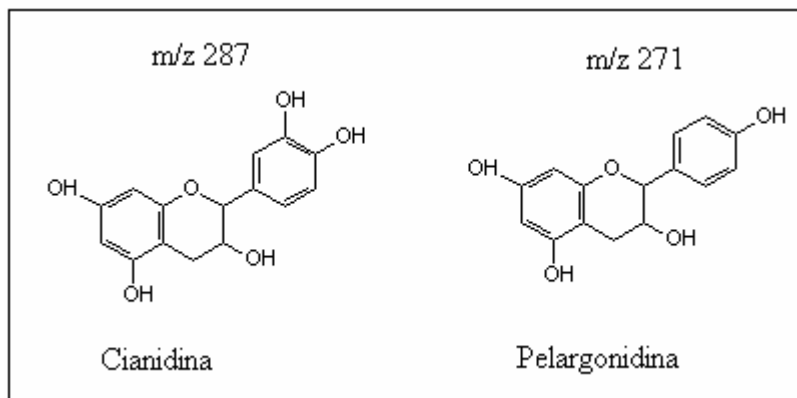
Por outro lado, quando a determinação do conteúdo médio de antocianinas totais nos tecidos florais foi realizada a 460 nm, os maiores valores foram encontrados para as variedades Rajado 8 carreiras (1,31 mg/g de equivalente de cianidina-3-glucosídeo) e Rosado (1,32 mg/g de equivalente de cianidina-3-glucosídeo), seguido das variedades Roxo do Emílio (1,17 mg/g de equivalente de cianidina-3-glucosídeo) e Roxo do Valdecir (1,09 mg/g de equivalente de cianidina-3-glucosídeo).

Para essa classe de antocianinas, a maior variabilidade foi detectada para a variedade Rajado 8 carreiras, com uma amplitude de 0,57 a 2,09 mg/g de equivalente de cianidina-3-glucosídeo.

Tomando em conjunto os resultados encontrados para as antocianinas determinadas a 460 nm e 525 nm, percebe-se que o tecido floral da variedade Palha Roxa do Emílio é o que apresenta menor pigmentação, seguido da variedade Cateto Vermelho e Roxo do Valdecir. Já as variedades Roxo do Emílio, Rosado e Rajado 8 carreiras mostram-se mais pigmentadas que as demais para os dois grupos de antocianinas analisadas. Esses resultados estão de acordo com a classificação obtida através da análise dos dados espectrais de FT-IR (**Figura 3**), onde as variedades Palha Roxa do Emílio e Roxo do Valdecir formaram um grupo distinto de Rosado, Rajado 8 carreiras e Roxo do Emílio.

### 3.2.2 MALDI-TOF

As antocianidinas pelargonidina (m/z 271) e cianidina (m/z 287) e os seus respectivos glicosídeos (m/z 433 e m/z 449) foram identificadas no extrato metanólico acidificado bruto das variedades Roxo do Valdecir e Rosado (**Figura 15**), usando eletrospray e MALDI-TOF. Entretanto, em estudos subsequentes faz-se necessária a remoção de impurezas para a identificação de outros pigmentos de origem antociânica nas flores das VCLM.

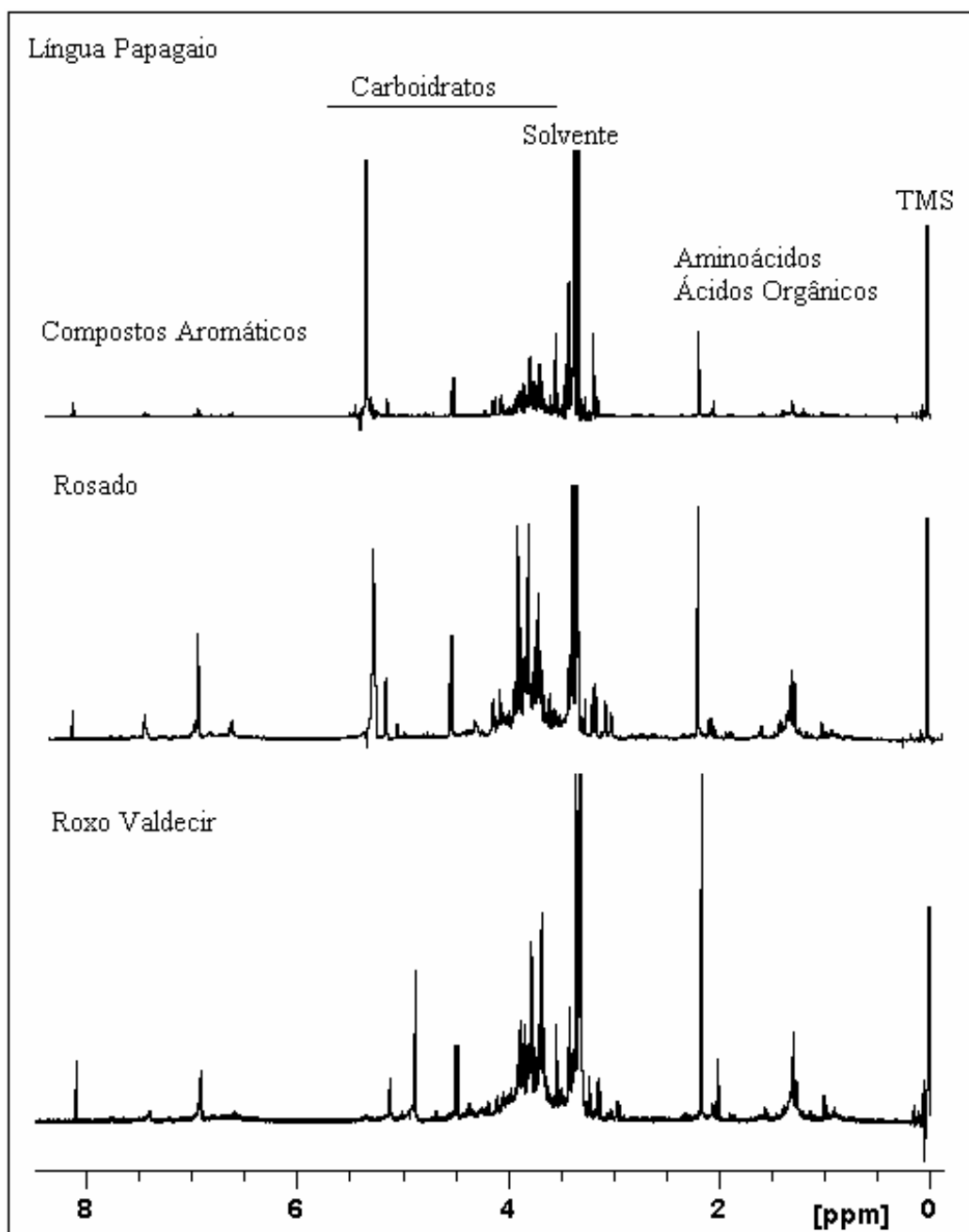


**FIGURA 15** – Antocianidinas detectadas por MALDI-TOF e eletrospray no extrato MeOH-HCl (1%, v/v) bruto das flores das variedades Roxo do Valdecir e Rosado.

#### 4.2.3 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) e análise quimiométrica

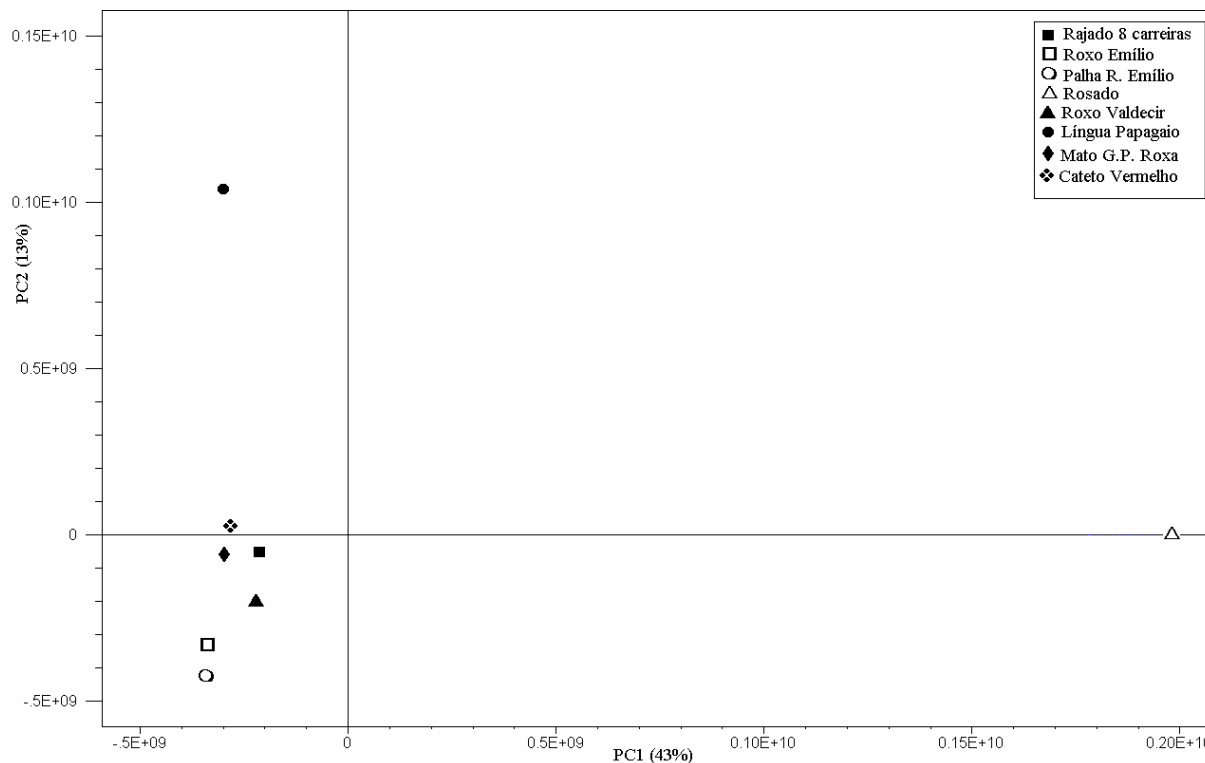
O extrato metanólico bruto das flores femininas das VCLM foi também analisado por  $^1\text{H}$ -RMN, sendo os dados espectrais utilizados para o cálculo dos componentes principais (PCs). Os espectros se mostraram bastantes similares, tendo sido observadas algumas diferenças, principalmente na região de *fingerprint* para carboidratos (3,0 – 5,5 ppm) e aminoácidos e ácido orgânicos (0 – 3,0 ppm) (**Figura 16**). Na região espectral que indica a presença de compostos aromáticos (5,5 – 11 ppm), tais como as antocianinas, as diferenças observadas foram principalmente quanto à intensidade dos sinais entre as variedades.

Subsequentemente os dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN para a janela entre 0,2 e 8,0 ppm foram submetidos à análise de PCA. Os componentes principais 1 (PC1), 2 (PC2) e 3 (PC3) contribuíram para explicar em 67% a variância total dos dados. Essa abordagem analítica permitiu a distinção dos extratos metanólicos dos tecidos florais das variedades Língua de Papagaio e Rosado em relação às demais, que se localizaram em PC1 negativo/PC2 positivo e PC1 positivo, respectivamente. Os extratos das demais variedades mostraram elevada similaridade, ocorrendo em PC1/PC2 negativo (**Figura 17**).

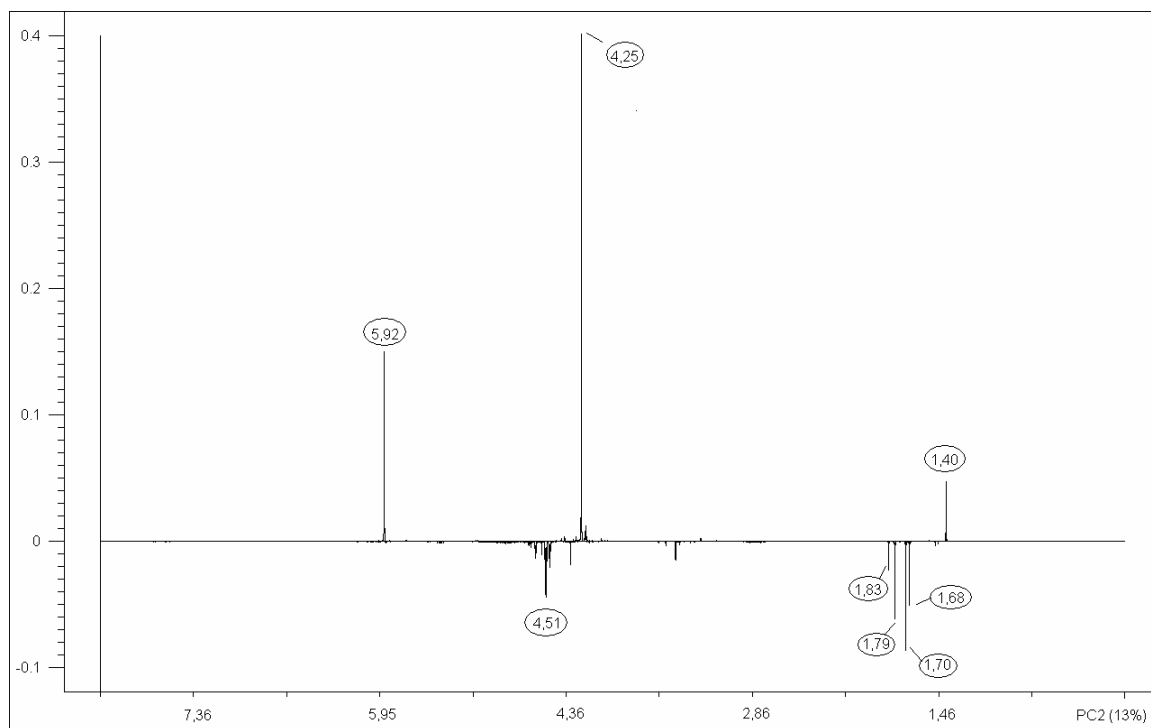


**FIGURA 16** – Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (400 MHz) (0 a 8 ppm) do extrato metanólico acidificado das variedades Roxo do Valdecir, Rosado e Língua de Papagaio, mostrando as regiões de detecção de carboidratos, ácidos orgânicos, carboidratos e compostos aromáticos. TMS (tetrametilsilano – padrão interno); Solvente (MeOH- $\delta_6$ ).

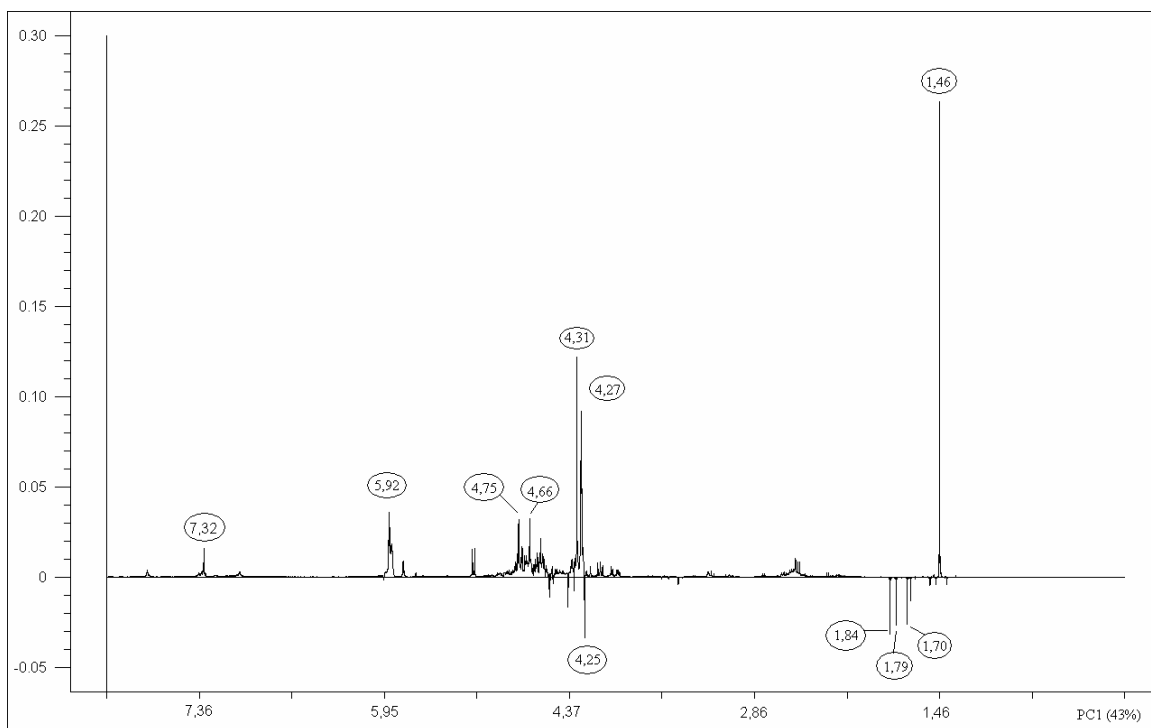
As ressonâncias que contribuíram para a separação da variedade Rosado em PC1 e para a variedade Língua de Papagaio em PC2 estão mostrados na **Figura 18** e **Figura 19**, respectivamente. Para a variedade Rosado, os deslocamentos químicos mais importantes para a separação foram principalmente aqueles característicos para carboidratos (4,27; 4,31; 4,66 e 4,75 ppm), o que pode estar correlacionado com a predominância de um tipo de antocianina no extrato, uma vez que as antocianidinas se ligam aos açúcares, dando origem às antocianinas. Outros três deslocamentos químicos (1,46; 5,92 e 7,32 ppm) também contribuíram para a classificação das variedades ao longo de PC1, estando a primeira ressonância relacionada a presença de aminoácidos ou ácidos orgânicos, enquanto as duas últimas a compostos aromáticos. Por outro lado, o extrato da variedade Língua de Papagaio diferiu das demais, principalmente pelo componente PC2. A contribuição fatorial de PC2 é mostrada na **Figura 19**, onde é possível verificar que as ressonâncias em 1,40; 4,25 e 5,92 ppm foram as responsáveis pelo não agrupamento daquela variedade.



**FIGURA 17** - Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados de  $^1\text{H-RMN}$  (janela espectral de 0,1 a 8,0 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores femininas das 8 VCLM em estudo.



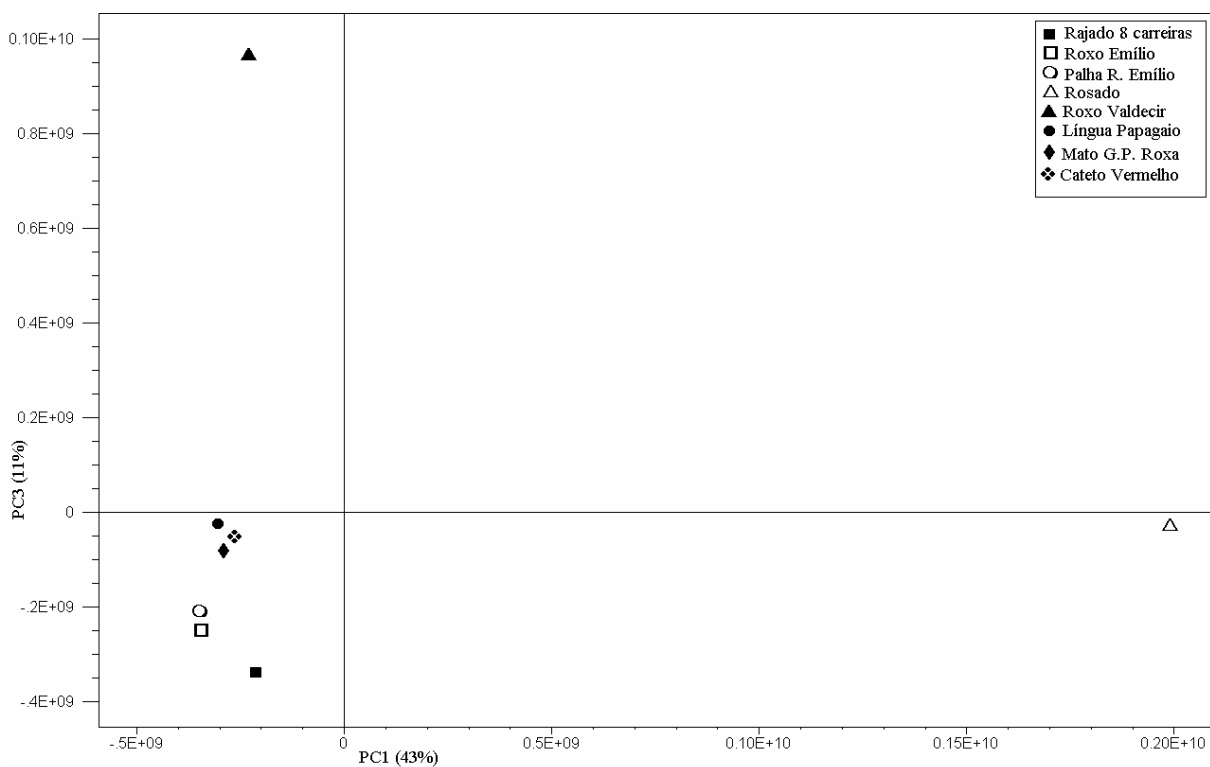
**FIGURA 18** - Contribuição fatorial de PC1 calculada a partir dos dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato metanólico acidificado de flores de VCLM.



**FIGURA 19** - Contribuição fatorial de PC2 determinada a partir dos dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato metanólico acidificado de flores das VCLM.

Essas são ressonâncias características das três classes de compostos detectados pela RMN no extrato metanólico: aminoácidos/ácidos orgânicos, açúcares e compostos aromáticos, sugerindo uma composição química diferenciada em alguma extensão, com base na ocorrência de compostos destas classes de metabólitos, para o extrato da flor feminina da variedade Língua de Papagaio.

O componente principal 3 (PC3) contribuiu em 11% para explicar a variabilidade dos dados espectrais, sendo a classificação das amostras em estudo a partir dos componentes PC1 e PC3 (54%) mostrada na **Figura 20**.

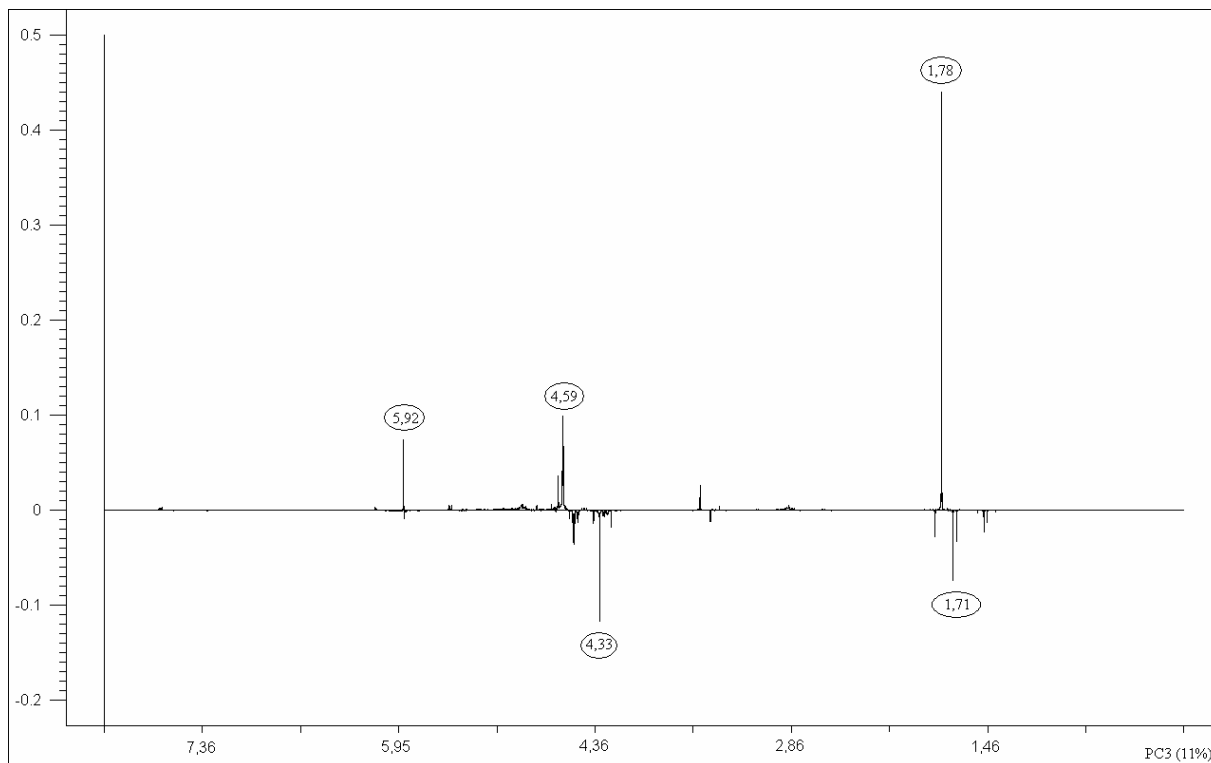


**FIGURA 20** - Distribuição fatorial de PC1 e PC3 para os dados de 1H-RMN (0,2 a 8,0 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores femininas das 8 VCLM estudadas.

Neste caso, as variedades Palha Roxa do Emílio, Cateto Vermelho, Rajado 8 carreiras, Roxo do Emílio, Mato Grosso Palha Roxa e Língua de Papagaio localizaram-se em PC1/PC3 negativo, sugerindo uma composição química similar entre as mesmas. As variedades Rosado e Roxo do Valdecir mostraram-se quimicamente distintas das demais, localizando-se em PC1 positivo e PC1 negativo/PC3 positivo, respectivamente. Os deslocamentos químicos que contribuíram para a separação da variedade Roxo do Valdecir em PC3 positivo estão



mostrados na **Figura 21**, a saber: 1,78; 4,59 e 5,92 ppm. Por outro lado, as ressonâncias em 1,71 e 4,33 ppm foram responsáveis pelo agrupamento das demais variedades, à exceção de Rosado em PC3 negativo.



**FIGURA 21** - Contribuição fatorial de PC3 calculada a partir dos dados espectrais de  $^1\text{H}$ -RMN (0,2 a 8,07 ppm) do extrato MeOH-HCl (1%, v/v) de flores das VCLM em estudo.

As ferramentas analíticas usadas (FT-IR,  $^1\text{H}$ -RMN e UV-visível) associadas à quimiometria mostraram-se adequadas à identificação de variedades com maior similaridade de composição química. Nesse contexto, o emprego da espectrofotometria UV-visível e da  $^1\text{H}$ -RMN revelou constituição diferenciada dos extratos brutos MeOH-HCl (1%, v/v) obtidos das flores das VCLM Língua de Papagaio e Rosado. O extrato bruto da variedade Roxo do Valdecir também se diferenciou dos demais usando UV-visível e  $^1\text{H}$ -RMN (dados não mostrados – PC2 x PC3). Por outro lado, a análise do tecido floral liofilizado por FT-IR mostrou diferenças de composição entre as 3 variedades citadas, indicando que compostos químicos que não são extraídos com o solvente orgânico são de elevada importância para a diferenciação das mesmas. Portanto, a escolha da técnica analítica a ser utilizada para avaliar a similaridade de composição química entre variedades dependerá do objetivo da investigação.

No presente estudo, por exemplo, foi possível discriminar extratos com potencial farmacológico distinto em função da constituição e conteúdo de pigmentos via espectrofotometria UV-visível e <sup>1</sup>H-RMN.

#### 4.2.4 Quantificação e identificação de (poli)fenóis

A espectrofotometria UV-visível, utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965), foi empregada na determinação do conteúdo total de (poli)fenóis das amostras em estudo, juntamente com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os dados de conteúdo médio de fenóis totais e dos compostos (poli)fenólicos identificados por CLAE no tecido floral das 8 VCLM estudadas são mostrados na **Tabela 2**. Os ácidos *t*-cinâmico, gálico e protocateuico foram os principais compostos detectados nas amostras de flores.

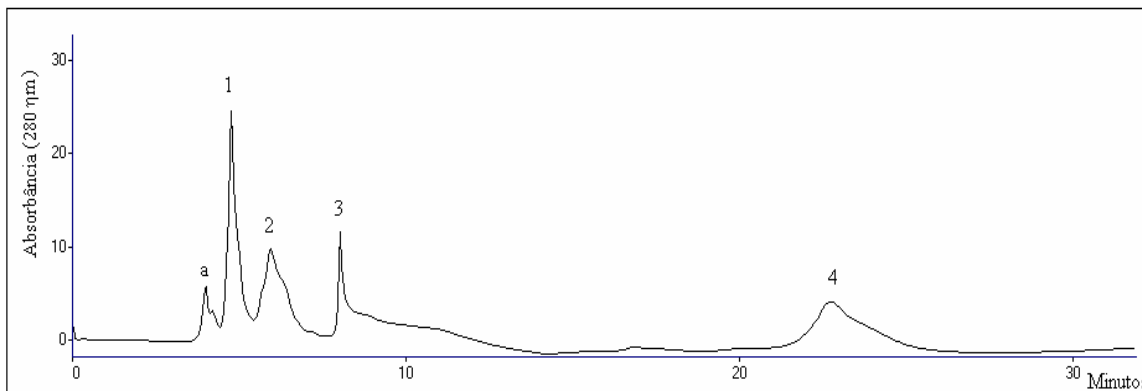
Além desses, o ácido caféico foi detectado em pequenas quantidades nas amostras de todas as variedades, assim como o ácido siríngico nas variedades Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir, Rosado e Palha Roxa do Emílio (**Figura 22 e Tabela 2**).

Entre o germoplasma analisado, o maior teor de fenóis totais (UV-visível) foi detectado na variedade Roxo do Emílio (45,29 µg de equivalente de ácido gálico/mg), seguido da variedade Roxo do Valdecir (32,98 µg de equivalente de ácido gálico/mg). As variedades Rajado 8 carreiras e Palha Roxo do Emílio apresentaram os menores conteúdos (10,12 e 12,87 µg de equivalente de ácido gálico/mg – **Tabela 2**).

**TABELA 2** - Conteúdo médio de fenóis totais\* ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ , peso seco) determinado por espectroscopia de UV-visível e de compostos (poli)fenólicos identificados por CLAE\*\* ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ , peso seco) em amostras de flores femininas das VCLM estudadas.

<i>Variedades</i>	<i>Total*</i>	<i>Ácido protocatecuico</i>	<i>Ácido gálico</i>	<i>Ácido t-cinâmico</i>	<i>Ácido siríntrico</i>	<i>Ácido caféico</i>
<i>Roxo Emílio</i>	45,29 $\pm$ 3,11	2,56 $\pm$ 0,19	0,97 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
<i>Roxo Valdecir</i>	32,98 $\pm$ 3,94	2,03 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,10	1,26 $\pm$ 0,42	0,01 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,04
<i>Rajado 8 Carreiras</i>	10,12 $\pm$ 4,51	1,85 $\pm$ 0,06	2,75 $\pm$ 1,00	1,39 $\pm$ 0,20	<i>n.d.</i>	0,07 $\pm$ 0,04
<i>Língua de Papagaio</i>	24,34 $\pm$ 6,02	1,84 $\pm$ 0,00	4,11 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,12	0,02 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
<i>Rosado</i>	28,35 $\pm$ 5,83	1,04 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00
<i>Mato Grosso Palha Roxa</i>	21,55 $\pm$ 8,80	1,00 $\pm$ 0,33	0,19 $\pm$ 0,09	1,36 $\pm$ 0,08	<i>n.d.</i>	0,13 $\pm$ 0,07
<i>Cateto Vermelho</i>	22,16 $\pm$ 8,35	0,21 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,31 $\pm$ 0,03	<i>n.d.</i>	0,01 $\pm$ 0,00
<i>Palha Roxa do Emílio</i>	12,87 $\pm$ 5,33	1,69 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,07	2,06 $\pm$ 0,80	0,02 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00

\*n= 7 indivíduos; \*\*n= 6 indivíduos; 3 injeções/amostra; n.d.= não detectado.



**FIGURA 22** – Perfil cromatográfico de (poli)fenóis (CLAE, 280 nm) presentes no extrato MeOH-HCl (1%, v/v) do tecido floral da variedade Rosado. 1- ácido protocateuico, 2- ácido gálico, 3- ácido *t*-cinâmico, 4- ácido caféico, a - composto não identificado.

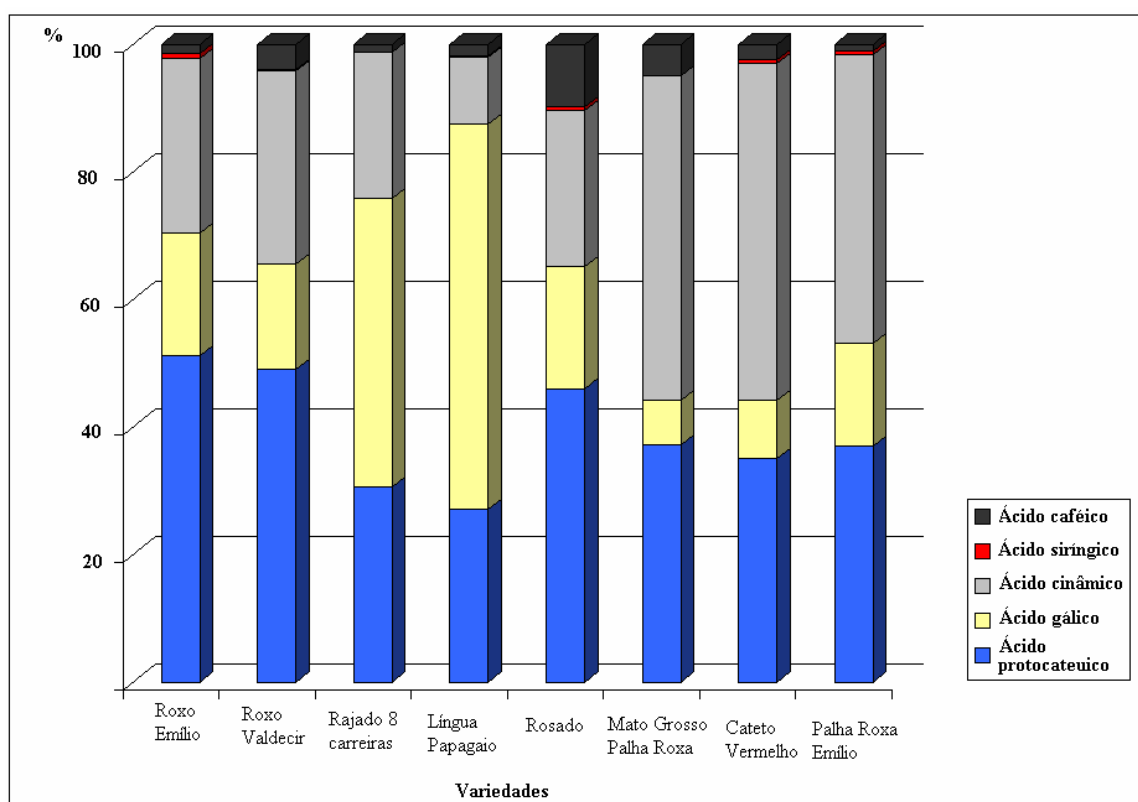
Estudo similar mostrou que extratos de estigmas de flores de 15 variedades de milho provenientes da Sérvia apresentaram quantidades apreciáveis destes metabólitos secundários (8,8 a 29,37  $\mu\text{g}$  de equivalentes de catequina/mg), corroborando os dados encontrados no presente trabalho. No entanto, alguns das VCLM revelaram teores superiores em duas ordens de magnitude, comparativamente aos valores descritos por MAKSIMOSIĆ *et al.* (2005), sugerindo o potencial superior das variedades cultivadas e desenvolvidas pelos agricultores do município de Anchieta de SC como fonte destes compostos de interesse à saúde humana.

As análises cromatográficas revelaram pequenas quantidades de (poli)fenóis em relação ao observado quando da determinação dos teores destes metabólitos secundários por espectrofotometria UV-visível (**Tabela 2**). Isto ocorreu pelo fato da determinação do conteúdo de (poli)fenóis totais ter sido realizada no extrato bruto MeOH-HCl (1%, v/v), contendo também os pigmentos antociânicos, que também reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu.

Entretanto, para a identificação dos mesmos fez-se necessário a separação dos compostos antociânicos dos (poli)fenólicos visando a melhor identificação dos mesmos. Procedimentos dessa natureza são necessários quando pretende-se utilizar técnicas cromatográficas, como a CLAE, uma vez que o extrato metanólico bruto das flores das VCLM é uma matriz complexa, o que dificulta a eluição dos compostos de interesse. Apesar disso, fica evidente que a CLAE permitiu identificar diferenças qualitativas de importância para o

germoplasma em estudo, como demonstrado na **Figura 23**.

Os ácidos *t*-cinâmico, gálico, caféico e protocateuico foram encontrados em todas as variedades, enquanto o ácido siríngico não foi detectado nas variedades Rajado 8 carreiras, Mato Grosso Palha Roxa e Cateto Vermelho. Para as variedades Língua de Papagaio e Rajado 8 carreiras o composto (poli)fenólico majoritário encontrado foi o ácido gálico, enquanto para as variedades Roxo do Emílio, Roxo do Valdecir e Rosado foi o ácido protocateuico. O ácido *t*-cinâmico foi o composto majoritário no extrato das variedades Mato Grosso Palha Roxa, Cateto Vermelho e Palha Roxa do Emílio.



**FIGURA 23** – Percentagem dos ácidos (poli)fenólicos identificados por CLAE no tecido floral das 8 VCLM em estudo.

Esses resultados sugerem potencial farmacológico distinto para as variedades em função das diferenças quantitativas e qualitativas detectadas através da CLAE, conforme evidenciado pelos perfis cromatográficos peculiares segundo a variedade em estudo. Estudos prévios mostraram que o ácido protocateuico, epicatequinas e outros compostos

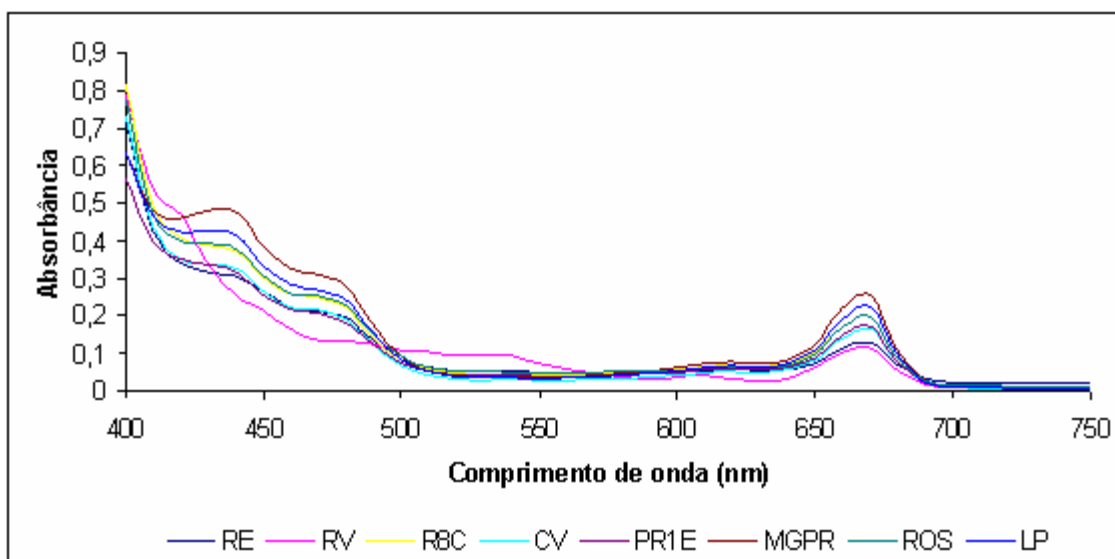
(poli)fenólicos comumente encontrados em chás e frutos possuem atividades anti-mutagênica, anti-carcinogênica, anti-oxidante, além de inibirem a agregação plaquetária (WEISBURGER, 1999; FUJIKI *et al.*, 1998; DEWANTO *et al.*, 2002; REIN *et al.*, 2000).

Os resultados encontrados são de interesse, uma vez que até o presente momento não há registros na literatura concernentes à identificação de tais metabólitos secundários [compostos (poli)fenólicos] no tecido floral dessa espécie, apesar do seu largo emprego como fitoterápico (MAKSIMOSIĆ *et al.*, 2005).

### 4.3 Caracterização dos extratos florais - MeOH-tolueno (v/v)

#### 4.3.1 Espectroscopia UV-visível

Compostos de diferentes polaridades foram extraídos do tecido floral das VCLM utilizando como solvente a mistura metanol/tolueno (v/v). O perfil espectral de UV-visível foi determinado para a janela espectral de 280 a 750 nm (**Figura 24**). Similar ao realizado para o extrato MeOH-HCl (1%, v/v), observou-se um elevado grau de similaridade entre os extratos, com um valor de absorbância máximo entre 280 e 380, sugerindo a presença de grupos cromóforos, encontrados em compostos de origem (poli)fenólica ou protéica (LAMBERT *et al.*, 2001). Para os pigmentos carotenóidicos, o conjunto de ligações duplas conjugadas de sua cadeia hidrocarbônica determina um máximo de absorção entre 400 e 500 nm (BRITTON, 1982; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 2001). Nessa região característica para carotenóides foi detectado um aumento no valor de absorbância para todas as amostras, sugerindo a presença daqueles compostos. A ampliação dessa região do espectro (**Figura 24**) permitiu verificar a similaridade espectral entre os extratos em estudo, exceto para a variedade Roxo do Valdecir.



**FIGURA 24** - Perfil espectral UV-visível de amostras do extrato MeOH-tolueno (1:1, v/v) de flores femininas das 8 VCLM para as janelas espectrais entre 400 a 750nm.

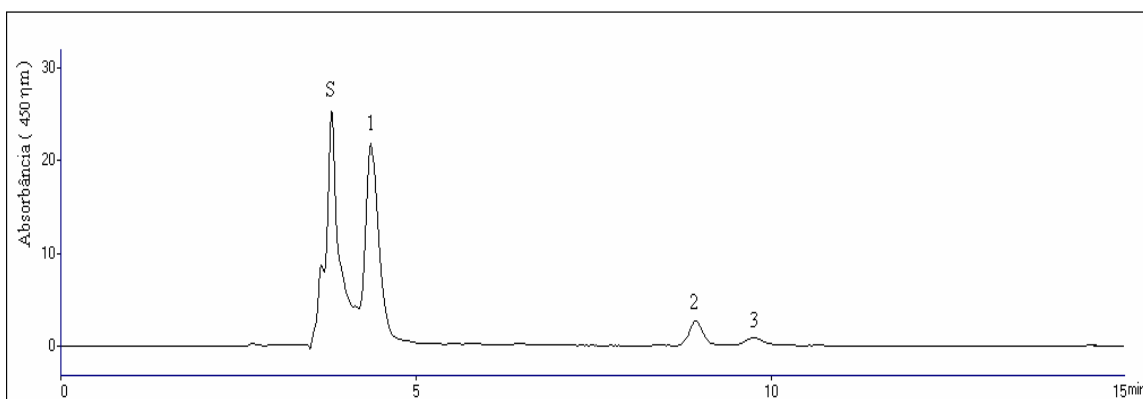
Considerando a natureza lipofílica das clorofilas, verificou-se a presença de tais pigmentos nos extratos MeOH-tolueno na região do espectro compreendida entre 630-660 nm.

#### 4.3.2 Identificação de carotenóides usando CLAE

Os compostos carotenóidicos no extrato MeOH-tolueno das flores foram caracterizados por CLAE, após a saponificação dos mesmos para a retirada de lipídeos e clorofilas. A **Figura 25** mostra que a xantofila luteína é o carotenóide majoritário no tecido floral saponificado da variedade Rosado. Nessa amostra foram identificadas também pequenas quantidades de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno. O mesmo padrão cromatográfico foi obtido para as outras variedades, exceto para Roxo do Valdecir e Roxo do Emílio, onde a xantofila zeaxantina também foi detectada. Os resultados do presente estudo são inéditos, uma vez que trabalhos preliminares (MAKSIMOVIC *et al.*, 2005; VELAZQUEZ *et al.*, 2005) de caracterização química do tecido floral dessa espécie não incluíram tais metabólitos.

Posteriormente, procedeu-se à quantificação desses compostos como mostra a **Tabela 3**. Os maiores conteúdos de luteína foram encontrados no tecido floral da variedade Língua de Papagaio (~176  $\mu\text{g/g}$ ), Rosado (~112  $\mu\text{g/g}$ ) e Mato Grosso Palha Roxa (~95  $\mu\text{g/g}$ ), enquanto

menores teores foram detectados nas amostras das variedades Palha Roxa do Emílio (~39  $\mu\text{g/g}$ ) e Roxo do Valdecir (~51  $\mu\text{g/g}$ ).



**FIGURA 25** – Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) presentes no extrato MeOH-tolueno (v/v) do tecido floral saponificado da variedade Rosado. 1- luteína, 2-  $\beta$ -caroteno, 3-  $\alpha$ -caroteno, S - solvente.

Quando comparados ao conteúdo de luteína, os demais carotenóides são considerados minoritários no tecido analisado. O conteúdo da xantofila zeaxantina, por exemplo, cuja ocorrência foi observada somente nas variedades Roxo do Emílio e Roxo do Valdecir, variou entre 0,92 e 5,45  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Por sua vez, o conteúdo dos carotenóides pró-vitamina A,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, variou entre 0,40 a 6,0  $\mu\text{g/g}$  e 2 a 20  $\mu\text{g/g}$  nas variedades Roxo do Valdecir e Língua de Papagaio, respectivamente.

Os resultados de identificação e quantificação de carotenóides observados no presente estudo são bastante promissores por serem estes metabólitos secundários de alto valor agregado.



**TABELA 3** - Conteúdo\* de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) do tecido floral de VCLM determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

<i>Variedades</i>	<i>Total</i>	<i>Luteína</i>	<i>Zeaxantina</i>	<i><math>\beta</math>-caroteno</i>	<i><math>\alpha</math>-caroteno</i>
<i>Roxo Emílio</i>	59,74	51,52 $\pm$ 5,64	0,92 $\pm$ 0,01	5,33 $\pm$ 0,75	1,97 $\pm$ 0,24
<i>Roxo Valdecir</i>	51,89	44,04 $\pm$ 1,96	5,45 $\pm$ 0,33	2,00 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,35
<i>Rajado 8 Carreiras</i>	85,10	77,56 $\pm$ 6,66	<i>n.d.</i>	5,97 $\pm$ 0,55	1,57 $\pm$ 0,15
<i>Língua de Papagaio</i>	201,89	176,12 $\pm$ 7,55	<i>n.d.</i>	19,93 $\pm$ 1,39	5,84 $\pm$ 0,92
<i>Rosado</i>	129,16	112,07 $\pm$ 3,73	<i>n.d.</i>	13,16 $\pm$ 1,48	3,93 $\pm$ 0,54
<i>Mato Grosso Palha Roxa</i>	104,99	95,06 $\pm$ 8,34	<i>n.d.</i>	8,07 $\pm$ 0,74	1,86 $\pm$ 0,05
<i>Cateto Vermelho</i>	88,30	78,52 $\pm$ 6,83	<i>n.d.</i>	7,84 $\pm$ 0,70	1,94 $\pm$ 0,23
<i>Palha Roxa do Emílio</i>	41,45	39,11 $\pm$ 3,64	<i>n.d.</i>	2,09 $\pm$ 0,30	0,26 $\pm$ 0,22

\* n= 6 indivíduos; 3 injeções/amostra; *n.d.*= não detectado.

A xantofila luteína, por exemplo, é um produto bastante valorizado no mercado internacional, onde aproximadamente 1 mg (70% pureza) custa em torno de R\$ 274,00 (Sigma, EUA). Atualmente, esse metabólito vem sendo extraído e purificado a partir de flores de calêndula pelo fato das mesmas possuírem quantidades apreciáveis e por ser esta uma espécie de rápido florescimento (BAKÓ *et al.*, 2002).

Utilizando o protocolo descrito para a extração de luteína de flores de calêndula (WANG *et al.*, 2006), verificamos que as flores femininas de milho possuem aproximadamente 1/3 deste metabólito secundário em relação ao conteúdo total daquela espécie. No entanto, considerando que o isômero zeaxantina está ausente em algumas variedades, o processo de purificação a partir dessa biomassa pode ter um custo menos elevado por não requerer uma coluna quiral para a separação dos isômeros. Futuramente, faz-se necessário um estudo de viabilidade econômica do processo de extração e purificação desse metabólito a partir das flores femininas do milho.

## 5 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados encontrados no presente estudo nos permitiram concluir que as VCLM são uma fonte de compostos químicos de interesse à saúde humana, como antocianinas, (poli)fenóis e carotenóides. A utilização dessa biomassa como fonte de compostos bioativos poderá representar, em um futuro próximo, uma alternativa de renda aos pequenos agricultores do município de Anchieta. As diferenças quali/quantitativas detectadas para os metabólitos secundários analisados nas amostras das VCLM podem resultar em usos e aplicações distintos daqueles materiais. Dentre as variedades analisadas, Roxo Emílio, Roxo Valdecir e Rosado destacam-se pelo maior conteúdo de antocianinas e (poli)fenóis, sugerindo um potencial farmacológico superior às mesmas, uma vez que diversas atividades biológicas, como anti-oxidante, anti-mutagênica e anti-carcinogênica, têm sido atribuídas a esses metabólitos secundários. Já para a variedade Língua de Papagaio, por exemplo, a despeito do pequeno conteúdo de antocianinas observado, ressalta-se seu elevado teor de luteína, de modo que sua exploração/aplicação no âmbito das indústrias de alimento e/ou farmacêutica poderá enfatizar esta última característica. Assim, as diferenças de composição química descritas neste trabalho sugerem que as VCLM podem ter usos distintos e que a manutenção do cultivo

de variedades distintas é de extrema importância quando se pretende explorar o potencial fitoquímico de uma espécie, por exemplo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.S.; LOTT, M.N.; MARCUS, D.M. The macular xanthophylls. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, p. 183-93, 2005.

BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 53, p. 241–250, 2002.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) Spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 305–319, 2007.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. **Corn Silk**. British Herbal Medicine Association, 64 p., 1996.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H (Eds.). **Carotenoids**. v. 1B, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, p.13-62, 1982.

CHEW, B.P.; BROWN, C.M.; PARK, J.S. Dietary lutein inhibit mouse mammary tumor growth by regulating angiogenesis and apoptosis. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3333-3339, 2003.

CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257-261, 2004.

COIMBRA, M.A.; BARROS, A.; RUTLEDGE, D.N.; DELGADILLO, I. FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. **Carbohydrate Research**, v. 317, p. 145-154, 1999.

DETRE, Z.; JELLINEK, H.; MISKULIN, M.; ROBERT, A.M. Studies on vascular permeability in hypertension: action of anthocyanosides. **Clinical Physiology & Biochemistry**, v. 4, p. 143-149, 1986.

DEWANTO, V.; WU, X.; LIU, R.H. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4959-4964, 2002.

ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Anthocyanins in cereals. **Journal Chromatography A**, v. 1054, p. 129–141, 2004.

FABIAN, H.; MÄNTELE, W. Infrared spectroscopy of proteins. In: CHALMERS, J.M.; GRIFFITHS, P.R. (Eds.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. UK, John Wiley & Sons, Chichester, 2002.

FAN, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy**, v. 28, p. 161-219, 2006.

FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; OKABE, S.; SUEOKA, N.; KOMORI, A.; SUEOKA, I.; KOZU, T.; TADA, Y.; SUGA, K.; IMAI, K.; NAKACHI, K. Cancer inhibition by green tea. **Mutation Research**, v. 402, p. 307-310, 1998.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins – extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72-77, 1968.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Food Analytical Chemistry**, 2001.

KOIDE, T.; HASHIMOTO, Y.; KAMEI, H.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.; TERABE, K. Antitumor effects of anthocyanins fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v. 12, p. 277-280, 1997.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p., 2001.

MAKSIMOVIĆ, Z.; MALENČIĆ, D.; KOVAČEVIĆ, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 873–877, 2005.

MARASCHIN, M.; SUGUI, J.A.; WOOD, K.V.; BONHAM, C.; LANÇAS, F.M.; ARAUJO, P.S.; YUNES, R.A.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J.D. Supercritical fluid extraction of velutinol A from *Mandevilla velutina* (*Apocynaceae*) cultured cells and MALDI-TOF MS analysis. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 77–8, 2001.

- MARGA, F.; GALLO, A.; HASENSTEIN, K.H. Cell wall components affect mechanical properties: studies with thistle flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 792–797, 2003.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, J. (Ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. London, Boca Raton: CRC press, 2002. CD-ROM.
- OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.S.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**. Florianópolis-SC, NEABio, 2006.
- PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v. 100, p. 956-963, 2007.
- REIN, D.; PAGLIERONI, T.G.; PEARSON, D.A.; WUN, T.; SCHMITZ, H.H.; GOSSELIN, R.; KEEN, C.L. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2120S-2126S, 2000.
- SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 387 p., 1994.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–148, 1965.
- SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817–836, 2003.
- VELAZQUEZ, D.V.O.; XAVIER, H.S.; BATISTA, J.E.M.; CASTRO-CHAVES, C. *Zea mays* L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. **Phytomedicine**, v. 12, p. 363–369, 2005.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.
- WEISBURGER, J.H. Tea and Health: the underlying mechanisms. **Proceedings of the**

**Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 220, p. 271-275, 1999.

WHITNEY, S.E.; GOTHARD, M.G.; MITCHELL, J.T.; GIDLEY, M.J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 121, p. 657–663, 1999.

WILSON, R.H.; SMITH, A.C.; KACURAKOVA, M.; SAUNDERS, P.K.; WELLNER, N.; WALDRON, K.W. The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by FT-IR spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 124, p. 397–406, 2000.

YOSHIMOTO, M.; OKUNO, S.; YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O.; YAMAGUCHI, M.; YAMADA, J. Potential mechanism on cancer chemoprevention by anthocyanins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 537-541. 1999.

## *Capítulo 6*

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CAROTENÓIDES DE GRÃOS DE MILHO SOBRE PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS**

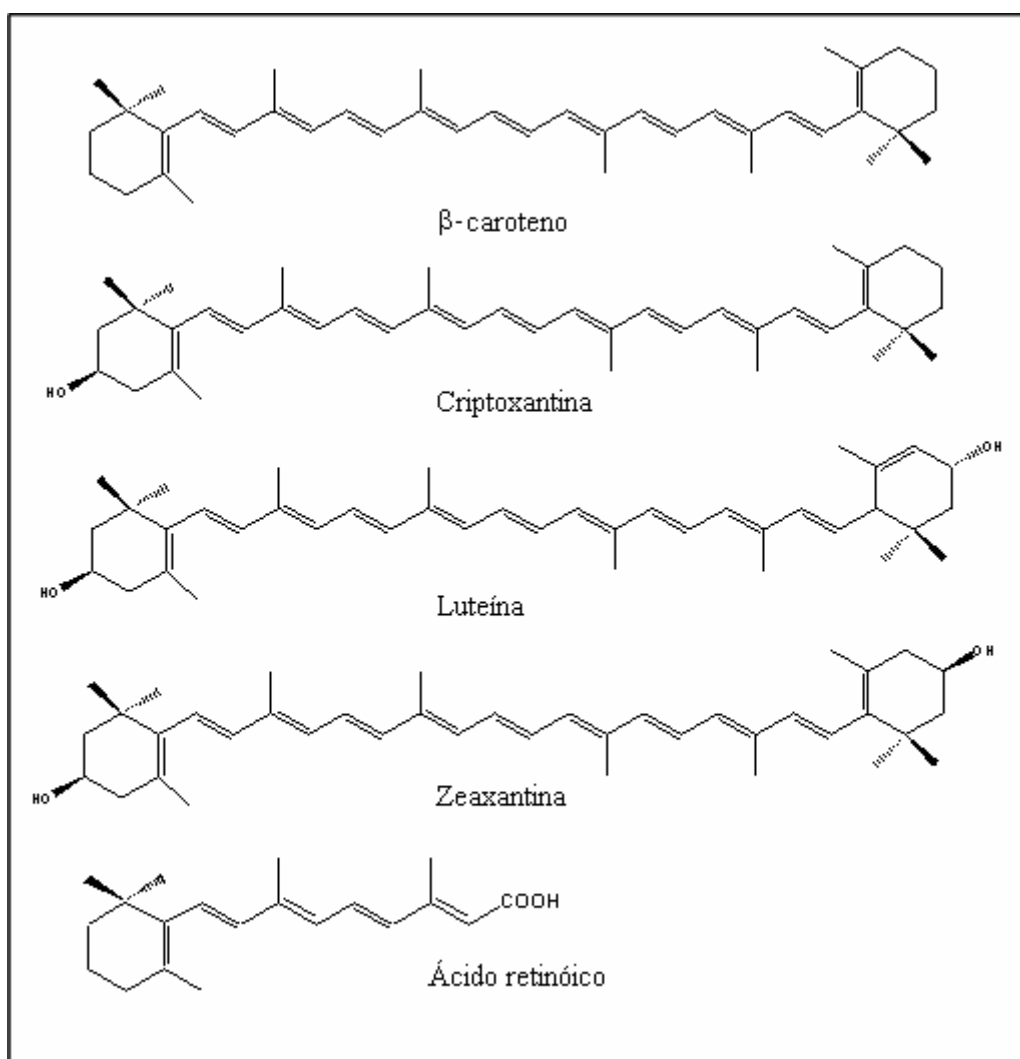
### **1 RESUMO**

As xantofilas zeaxantina e luteína são os principais pigmentos de coloração amarelo-alaranjada, pertencentes à família dos oxicarotenóides, encontrados nos grãos de milho. A importância desses pigmentos está relacionada à sua utilização como corante natural e também como suplementos alimentares. Diversas doenças humanas, a exemplo de alguns tumores e da degeneração macular (DM) estão associadas à formação descontrolada de vasos sanguíneos (neovascularização), sendo referidas como doenças angiogênicas. Com o objetivo de investigar a atividade moduladora da vascularização, um extrato carotenóidico rico em xantofilas, obtido a partir de grãos de milho, foi avaliado utilizando-se como modelos, membranas vascularizadas de anexos embrionários de *Gallus domesticus*. Verificou-se a ocorrência de 38 – 50 % de inibição ( $P < 0,05$ ) da vasculogênese e da angiogênese na vesícula vitelínica (VV) e de 23 - 52% de inibição da angiogênese na membrana corioalantóica (MC) de grupos tratados com o extrato carotenóidico (0,1 - 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/implante, respectivamente), comparado ao controle (veículo). Um efeito inibitório similar ao exercido pelas xantofilas foi observado nos grupos dos controles positivos tratados (10  $\mu\text{M}$ / implante) com ácido retinóico (49% de inibição na VV e 57% na MC) e com luteína (padrão comercial; 65% de inibição na VV e 55% na MC). Esses resultados permitem sugerir que o extrato carotenóidico rico em xantofilas, obtido a partir de grãos de milho, é capaz de inibir processos de formação de vasos sanguíneos (vasculo- e angiogênese), o que sugere a sua futura aplicação na prevenção e/ou terapêutica de doenças relacionadas ao descontrole na regulação da angiogênese.



## 2 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são os pigmentos mais amplamente distribuídos na natureza. Entretanto, os seres humanos não são capazes de sintetizar estes compostos, que são obtidos da dieta, especialmente através da ingestão de frutas e verduras. As xantofilas (oxicarotenóides), denominadas de luteína e zeaxantina, compostos que não possuem atividade pró-vitamina A, são os carotenóides majoritários dos grãos de milho (**Figura 1**) (MANGELS *et al.*, 1993).



**FIGURA 1-** Estruturas químicas dos carotenóides encontrados em grãos de milho e do ácido retinóico, um derivado do β-caroteno.

Algumas atividades importantes relacionadas à saúde humana têm sido atribuídas a essas xantofilas, tais como o aumento da função imune (CHEW & PARK, 2004) o bloqueio do crescimento de tumores (CHEW *et al.*, 2003) e a proteção contra a

degeneração macular relacionada à idade (DM), uma doença similar à catarata que causa cegueira precoce (AHMED *et al.*, 2005).

Um grande número de doenças como, por exemplo, a DM e o crescimento de alguns tumores são caracterizados pela formação descontrolada de vasos sanguíneos (neovascularização). De fato, várias evidências sugerem uma relação entre o descontrole na regulação da formação de vasos sanguíneos e processos tais como isquemia, inflamação, infecção ou câncer (malignização) (CARMELIET, 2003).

A vasculogênese e a angiogênese são os processos de formação de vasos sanguíneos mais conhecidos e estudados. Durante o período de embriogênese, a formação dos primeiros vasos envolve a diferenciação de células precursoras (angioblastos) e a organização de uma rede vascular primária no embrião e no saco vitelínico (vasculogênese) (RUITER *et al.*, 1992). Subsequentemente, esta rede de vasos primários sofre uma remodelagem, que envolve tanto eventos de morte celular e de regressão vascular como a ramificação de capilares a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) (FOLKMAN, 1971). Este último processo ocorre tanto no período embrionário como na fase adulta. Contudo um corpo crescente de evidências mostra que a diferenciação de células progenitoras endoteliais, evento característico da vasculogênese, está presente também no adulto, em associação com algumas patologias, como, por exemplo, o câncer (ZAMMARETTI & ZISCH, 2005). A angiogênese é um processo de extrema importância em inúmeros processos fisiológicos, como por exemplo, no ciclo reprodutivo feminino e na cicatrização, e está associada a algumas condições patológicas, conhecidas como doenças angiogênicas (CARMELIET, 2003).

Observa-se atualmente um aumento no interesse sobre estudos que tenham como objetivo a investigação dos efeitos inibitórios sobre a formação de vasos sanguíneos apresentados por produtos naturais, a exemplo de derivados de cartilagem de tubarão, ergosterol, taxol, vitamina A e do resveratrol (IGURA *et al.*, 2001; TAKAHU *et al.*, 2001; HLATKY & FOLKMAN, 2002; TAN *et al.*, 2003).

A ingestão regular de alimentos, como grãos e produtos derivados, que contenham compostos pró- ou anti-vasculogênicos/angiogênicos têm se consolidado como estratégia profilática em doenças relacionadas ao crescimento descontrolado de vasos sanguíneos (SLAVIN *et al.*, 2001; CARMELIET, 2003). Muitos dos benefícios à saúde associados à ingestão desses alimentos, como a prevenção da DM, têm sido atribuídos a presença de pigmentos, como os carotenóides, sendo de grande interesse a descoberta das atividades biológicas exercidas pelos mesmos no corpo humano. Neste

sentido, o ácido retinóico, que é um derivado do  $\beta$ -caroteno, é amplamente reconhecido pelas suas propriedades anti-angiogênicas (OIKAWA *et al.*, 1989) (**Figura 1**).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar o efeito de um extrato carotenóidico, rico em xantofilas, sobre os processos de formação de vasos sanguíneos, utilizando como modelos, membranas vascularizadas de anexos embrionários de *Gallus domesticus*. O presente estudo integrou um projeto que está sendo realizado no extremo oeste do estado de Santa Catarina, em associação com pequenos agricultores que desenvolvem e cultivam variedades crioulas e locais de milho (VCLM), e que tem como objetivo geral obter informações relacionadas aos compostos bioativos presentes naquelas variedades, voltadas à agregação de valor aos produtos derivados do milho. Para isso, foi realizada, em uma etapa preliminar, a identificação e a quantificação dos carotenóides presentes nos grãos de 26 VCLM cultivadas no município de Anchieta (**Capítulo 4**). O extrato carotenóidico da VCLM MPA1 foi selecionado para os ensaios biológicos por ter sido detectado no mesmo o maior conteúdo de luteína e um elevado conteúdo de zeaxantina.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção do material vegetal**

O composto de milho MPA1 foi desenvolvido por um agricultor (Nélcio Alceu Folgiarini) do município de Anchieta, localizado no extremo oeste de Santa Catarina, com o apoio técnico do Sindicato de Trabalhadores da Agricultura Familiar (SINTRAF) e da Associação dos Pequenos Produtores de Milho Crioulo Orgânico e Derivados (ASSO), a partir da safra 1999/2000. Esse composto foi produzido a partir de populações distintas de milho, sendo 18 delas populações sintéticas comerciais, 4 variedades de polinização aberta do grupo Pixurum e 3 VCLM (Cateto, Mato Grosso Palha Roxa e Amarelão), cultivadas no município de Anchieta.

#### **3.2 Extração e Dosagem de Carotenóides**

Amostras (1 g, peso seco) de grãos das 26 VCLM foram maceradas na presença de 2 volumes de solução de hexano:acetona (v/v), contendo 100 mg/L de hidroxitolueno butilado (BHT). As amostras foram filtradas sob vácuo, centrifugadas por 10 minutos (5.000 rpm) e o solvente evaporado em fluxo de nitrogênio. O extrato concentrado foi

ressuspensão em 3 mL de hexano, lavado com 9 mL de água destilada (3x) e, posteriormente, submetido à espectrofotometria UV-visível (Shimadzu 2301) para a determinação do conteúdo de carotenóides, através da leitura da absorbância a 450 nm (AMAN *et al.*, 2001). A concentração de carotenóides totais foi calculada usando a fórmula de Lambert-Beer, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 2348 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (zeaxantina), como previamente descrito por BRITTON (1982). As análises foram realizadas a partir de 3 extrações independentes.

### **3.3 Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A identificação dos carotenóides foi realizada após a injeção de amostras concentradas (10  $\mu$ L) em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (Vydac 218TP54, 25 cm x 4,6 mm  $\varnothing$  interno) e detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 450nm. A eluição utilizou MeOH:Acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos de interesse (isto é,  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina) foi feita com base nos tempos de retenção determinados a partir da análise de amostras padrões sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides utilizou curva-padrão externa [0,5  $\mu$ g/mL – 45  $\mu$ g/mL para luteína e zeaxantina ( $r^2 = 0,99$ ) e 0,01  $\mu$ g/mL – 12  $\mu$ g/mL para  $\beta$ -caroteno ( $r^2 = 0,98$ )] e considerou a intensidade dos picos de interesse para efeitos de cálculo, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra, obtidas através de extrações independentes.

### **3.4 Ensaios da vesícula vitelínica (VV) e da membrana corioalantóica (MC) de embriões de galinha**

A atividade inibitória do extrato carotenóidico obtido das sementes da VCLM MPA1 sobre a vasculogênese e a angiogênese foi determinada por meio de ensaios da vesícula vitelínica (VV) e da membrana corioalantóica (MC) de embriões de galinha, respectivamente. Para tal, ovos de galinha foram preliminarmente mantidos em estufa incubadora (Gera-Petersime) equipada com ventilação forçada, controle digitalizado de umidade (33%) e temperatura (37,5°C), por um período de 48h.

Os tratamentos *in ovo* (n = 8) foram realizados pela adsorção do extrato carotenóidico (0,1 – 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina) em suportes de metilcelulose (MCE) em forma de disco (0,45% p/v, 3 mm de diâmetro; 1 disco/embrião), polimerizados em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), sob uma bandeja revestida com Teflon<sup>®</sup>. Uma solução de DMSO 2% (v/v) foi utilizada para solubilizar os carotenóides, tendo em vista a baixa solubilidade dos mesmos em meio aquoso. Dessa forma, um grupo tratado apenas com DMSO 2% (v/v) foi usado como controle negativo, e outro grupo tratado apenas com MCE (água ultra-pura; pH 7,2). O ácido retinóico (AR, 10  $\mu\text{M}$ /disco) e luteína (padrão comercial – Sigma/X-6250) (Lut, 10  $\mu\text{M}$ /disco) foram usados como controles positivos.

O ensaio de vasculogênese foi realizado de acordo com o método descrito por DIAS *et al.* (2007). Nesse ensaio, após as primeiras 48 h de incubação (E2; 48 h; estágio 13–HH; HAMBURGER & HAMILTON, 1951) os ovos foram removidos da incubadora e uma janela (10 mm de diâmetro) foi aberta na casca, na posição superior ao embrião (foram utilizados somente ovos contendo embriões viáveis), expondo a VV. O tratamento *in vivo* foi realizado, implantando-se os discos de MCE (1 disco/embrião) sobre a membrana vasculosa da VV, onde ilhotas sangüíneas – primórdios de vasos sangüíneos iniciais – estão presentes na rede vascular primária, como evidência da vasculogênese. Após, as janelas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e os ovos retornaram à incubadora por um período adicional de 48 h, alcançando a idade embrionária de 4 dias (E4; 96h; estágio 23–HH). Concluído o período de incubação, o número de vasos interceptando o limite do disco de MCE foi avaliado usando um microscópio estereoscópico (30x). Desta forma, a inibição da vasculogênese foi determinada em função do decréscimo no número de vasos vitelínicos (aparecimento de uma zona avascular) e expressa como a percentagem de vasos comparada ao controle negativo (DMSO 2%, v/v, veículo).

O ensaio da membrana corioalantóica (MC) foi realizado de acordo com os procedimentos previamente descritos por RIBATTI *et al.* (1987). Os ovos fertilizados foram incubados durante 2 dias (E2) a uma temperatura de 37<sup>0</sup>C e umidade constante (33%) e no 4<sup>o</sup> dia (E4) do experimento foi aberta uma pequena janela na região da câmara de ar da casca, a fim de evitar a aderência dos mesmos. Em seguida, as janelas na casca foram fechadas com filme de celofane preto e retornaram à incubadora. No 6<sup>o</sup> dia (E6; estágio 28/29–HH) de incubação a janela na casca dos ovos foi ampliada (10

mm de diâmetro) para permitir a implantação dos discos de MCE sobre o terço externo da membrana corioalantóica, onde vasos capilares ainda estavam crescendo. Os discos de MCE nos grupos controle negativo foram polimerizados com água ultra-pura estéril ou DMSO 2% (v/v). Os grupos de controle positivo e os grupos tratados com as diferentes concentrações do extrato carotenóidico foram os mesmos usados no ensaio da VV. No 8<sup>o</sup> dia (E8; estágio 34–HH; total de 192 h) de incubação, a inibição da angiogênese foi avaliada conforme descrito para o ensaio de vasculogênese.

Os experimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no protocolo número 069/proc.23080.028290/2006-11/UFSC/CEUA/UFSC, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC).

### 3.5 Análise de dados e estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), obtidos de pelo menos dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através da ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguida do teste de Tukey (HSD). Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de P menores que 0,05.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização química do extrato carotenóidico

A cromatografia líquida revelou que o carotenóide majoritário nos grãos das VCLM analisadas é a xantofila zeaxantina, seguido de luteína,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno. Padrões comerciais foram utilizados na identificação de zeaxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno, enquanto que a identificação dos outros carotenóides baseou-se na comparação dos perfis de eluição obtidos no presente estudo com os registrados em estudos prévios, utilizando grãos de milho e realizados em condições similares (SCOTT & ELDRIDGE, 2005; HULSHOF *et al.*, 2007).

Na **Tabela 1** estão apresentados o conteúdo de carotenóides na variedade selecionada (MPA1) e os conteúdos máximos e mínimos encontrados para as outras variedades estudadas. O conteúdo total de carotenóides variou de 1.963 a 201  $\mu$ g/100g considerando todas as VCLM estudadas, sendo que nos grãos da variedade MPA1

foram detectados aproximadamente 1.900  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de carotenóides totais, usando o método espectrofotométrico.

Através da **Tabela 1** pode-se verificar que as concentrações de luteína e zeaxantina variaram de 3  $\mu\text{g}/100\text{g}$  na variedade Branco (conteúdo mínimo) a 369  $\mu\text{g}/100\text{g}$  na variedade MPA1 (conteúdo máximo) e de 7  $\mu\text{g}/100\text{g}$  na variedade Branco a 1.070  $\mu\text{g}/100\text{g}$  na variedade Roxo do Emílio, respectivamente. Quantidades-traço de  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno foram detectadas em algumas variedades, principalmente naquelas em que os maiores conteúdos de carotenóides totais foram encontrados, como em MPA1 e Roxo do Emílio.

**TABELA 1-** Conteúdo de carotenóides\* ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ , peso seco – média  $\pm$  desvio padrão) nos grãos de variedades crioulas e locais de milho determinados por CLAE (450 nm).

	<b>MPA 01</b>	<b>Varição para as outras VCLM</b>
Zeaxantina	705 $\pm$ 101	7 $\pm$ 1 – 1.070 $\pm$ 254
Luteína	369 $\pm$ 28	5 $\pm$ 3 – 369 $\pm$ 88
$\beta$ -criptoxantina	5 $\pm$ 1	traços – 11 $\pm$ 3
$\beta$ -caroteno	4 $\pm$ 1	traços – 4 $\pm$ 1
$\alpha$ -caroteno	2 $\pm$ 1	traços – 2 $\pm$ 1
Total	1.888 $\pm$ 118	201 $\pm$ 20 – 1.963 $\pm$ 222

\*Média de três extrações independentes

Os resultados do presente estudo, no que diz respeito às xantofilas estão de acordo com trabalhos prévios que mostraram que os conteúdos de luteína e zeaxantina nos grãos de milho variam entre 50 a 2.300  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Contudo na literatura constam registros de conteúdos superiores de  $\beta$ -caroteno (10 a 70  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) (MANGELS *et al.*, 1993). Portanto, as sementes da variedade MPA1 e de outras VCLM destacam-se como importantes fontes de xantofilas com provável aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, porém não constituem fonte de  $\beta$ -caroteno em função da pequena quantidade detectada.

Atualmente existe um crescente interesse em incluir a xantofila luteína na dieta humana, tanto na forma de suplementos dietéticos como através de alimentos funcionais. O suplemento OcuVite<sup>®</sup> (Bausch & Lomb), por exemplo, contém

quantidades significativas de luteína (2 a 6 mg/cápsula), sendo sua ingestão recomendada para manutenção da saúde macular ([http://www.bausch.com/em\\_us/consumer/visioncare/product/vitamins/ocuvite\\_adult.asp.x](http://www.bausch.com/em_us/consumer/visioncare/product/vitamins/ocuvite_adult.asp.x)). Nos Estados Unidos, por exemplo, o reconhecimento da luteína cristalina pela FDA (*Food and Drugs Administration*) como suplemento permitiu o uso do mesmo em alimentos e bebidas sem nenhuma restrição (ALVES-RODRIGUES & SHAO, 2003).

#### **4.2 – Ensaios da vesícula vitelínica (VV) e da membrana corioalantóica (MC) de embriões de galinha**

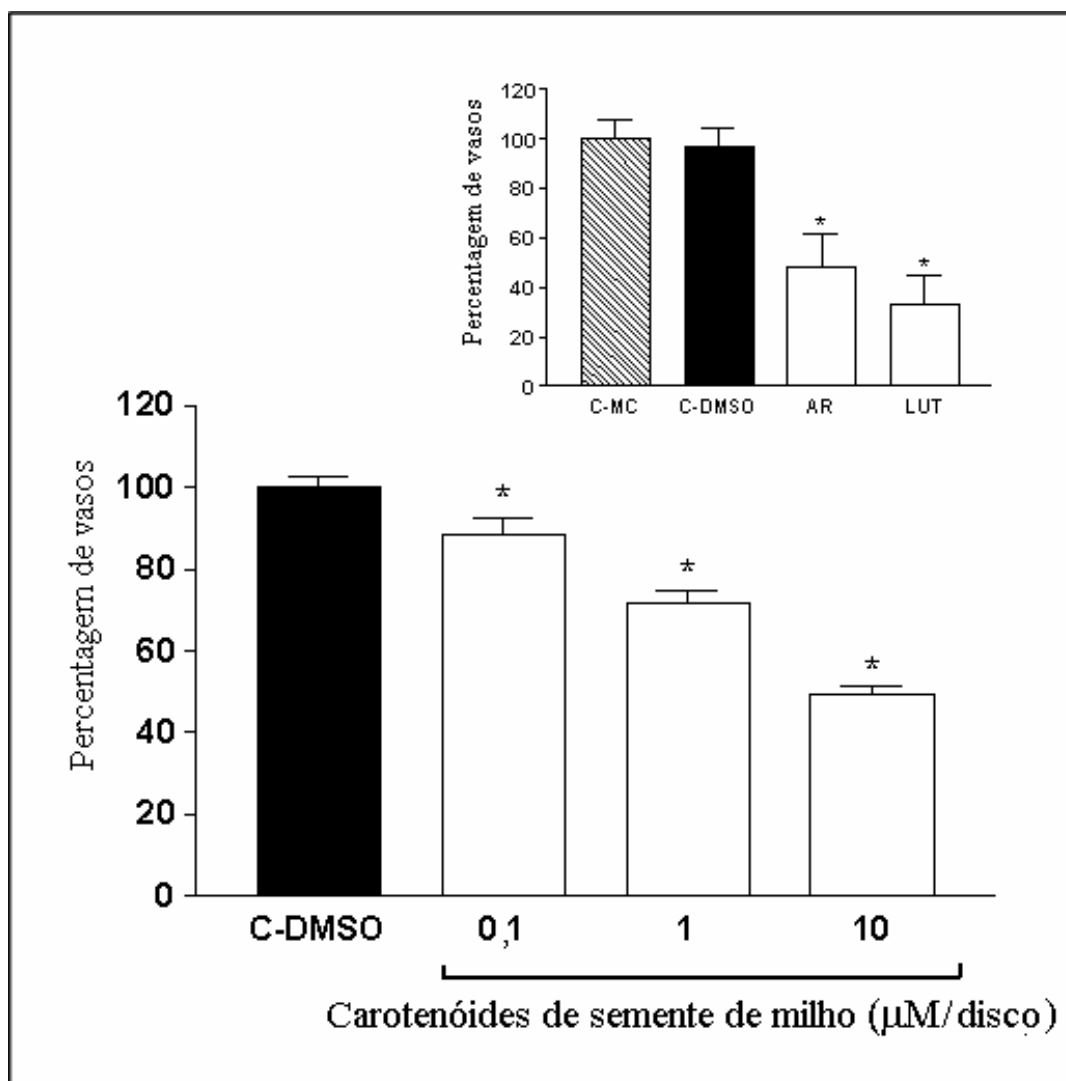
Os carotenóides vêm despertando o interesse na comunidade científica como prováveis candidatos a agentes anticarcinogênicos a serem usados em alimentos funcionais, uma vez que estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de frutas e vegetais tem uma relação inversa com a incidência de várias doenças, principalmente o câncer (ZIEGLER *et al.*, 1996; MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 2002).

No contexto clínico, as xantofilas luteína e zeaxantina têm sido investigadas mais especificamente com relação à prevenção da degeneração macular relacionada à idade (DM), pois existem evidências de que o aparecimento da patologia está associado à diminuição no conteúdo dessa classe de compostos (AHMED *et al.*, 2005). Diversos estudos têm proposto que as xantofilas ajudam a preservar a saúde macular por sequestrarem os radicais livres gerados a partir da incidência de raios ultravioletas (UV) (SUNDELIN & NILSSON, 2001; SANTOSA & JONES, 2005; WHITEHEAD *et al.*, 2006), porém pouca atenção tem sido dada a outros possíveis benefícios e mecanismos de ação desses compostos. Em uma investigação ímpar CHEW *et al.* (2003), demonstraram com base em estudos imuno-histoquímicos, que a inibição do crescimento de tumores mamários em ratos, após a ingestão de luteína, foi decorrente do aumento da apoptose e combinado à inibição da angiogênese.

O ensaio da VV de embriões de galinha foi utilizado no presente estudo por ser um teste rápido e adequado para a avaliação dos processos iniciais de vasculogênese e de angiogênese descrito recentemente por DIAS *et al.* (2007)..

Os resultados permitem concluir que os carotenóides de milho (0,1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco) inibiram de um modo dose-dependente o processo de vascularização (28% - 50% de inibição, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (DMSO 2%, v/v) (**Figura 2**).



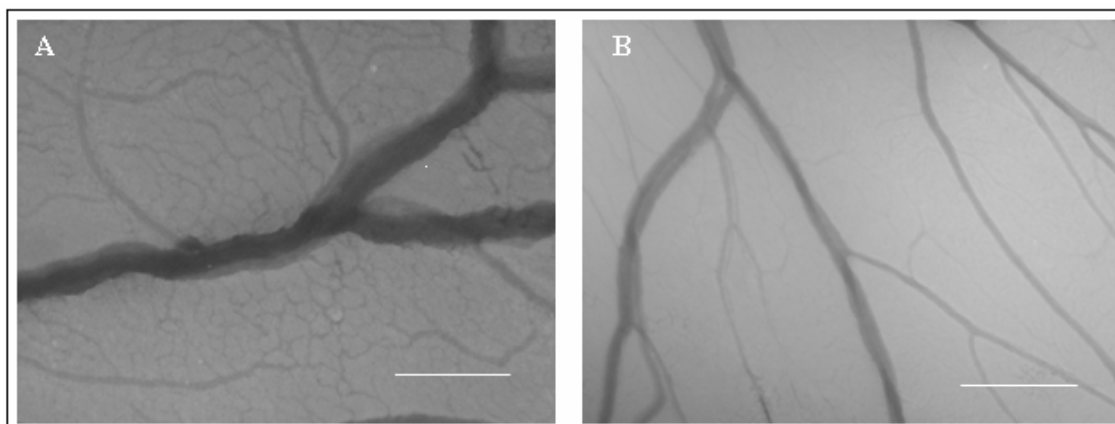


**FIGURA 2-** Efeito do extrato carotenóidico de grãos de milho da variedade MPA1 (0,1 – 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco) administrados em membranas de vesículas vitelínicas de embriões de galinha de 4 dias de idade, cultivados *in ovo*. O *inset* mostra a percentagem do número de vasos nos grupos controle. Discos de metilcelulose contendo apenas água ultrafiltrada (C-MC) ou água ultrafiltrada e DMSO 2% (C-DMSO) foram utilizados como controles negativos. Discos de metilcelulose contendo ácido retinóico (AR; 10  $\mu\text{M}$ ) ou luteína (10  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a percentagem do número de vasos sanguíneos no limite dos discos de metilcelulose quando comparados ao grupo controle (C-DMSO). Colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ) e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da vasculogênese em relação ao controle (C-DMSO), usando ANOVA seguido do teste *post-hoc* Tukey ( $p<0,05$ ).

Na **Figura 3** pode-se observar a redução no número de vasos capilares da vesícula vitelínica de embriões de grupos tratados com 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco quando comparado ao grupo controle.

A utilização do controle com DMSO 2% (v/v) (controle negativo) foi incluído nos experimentos em função da necessidade de solubilização do extrato carotenóidico em um solvente não aquoso. No entanto, na concentração de 2% (v/v), o DMSO, mostrou-se eficiente na solubilização do extrato na MC e não provocou efeito inibitório na formação de vasos vitelínicos iniciais (98 vasos) quando comparado ao grupo controle tratado apenas com MC (100 vasos) (*inset - Figura 2*).

O efeito anti-angiogênico da luteína (padrão comercial) demonstrado por CHEW *et al.* (2003), através de ensaios imuno-histoquímicos, em ratos inoculados com tumores de mama, envolve uma vascularização mais avançada. No presente estudo verificou-se que o efeito inibitório dessa xantofila sobre a vascularização inicial é mais efetivo (cerca de 65% de inibição) do que o exercido pelo ácido retinóico (cerca de 49% de inibição) (**Figura 2**). Além disso, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco (dados não apresentados), os carotenóides inibiram a vascularização em apenas 38% em relação ao controle, possivelmente em função do limite de solubilidade do extrato na MC.



**FIGURA 3-** Micrografias ópticas dos vasos vitelínicos do anexo embrionário da vesícula vitelínica de embriões de galinha de 4 dias de idade, tratados com (A) metilcelulose (grupo controle) e (B) 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco de carotenóides de grãos de milho da variedade MPA1. Bar = 2 mm.

De forma similar aos resultados encontrados no ensaio de vasculogênese e angiogênese iniciais (ensaio da VV), o mesmo extrato carotenóidico de grãos de milho

da variedade MPA1 mostrou uma potente atividade anti-angiogênica utilizando o ensaio na MC.

Nas MC dos grupos controles negativo, em que foram utilizados discos-suporte contendo apenas água ultra-pura ou água e DMSO 2% (v/v), observou-se, em média, 114 e 112 vasos, respectivamente, no limite dos discos (*inset* **Figura 4**). Por outro lado, nas membranas tratadas com o extrato carotenóidico (0,1 – 10  $\mu$ M de equivalente de zeaxantina/disco) foram observados poucos vasos no limite dos discos de MC (23 – 52% de inibição) quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (**Figura 4**).

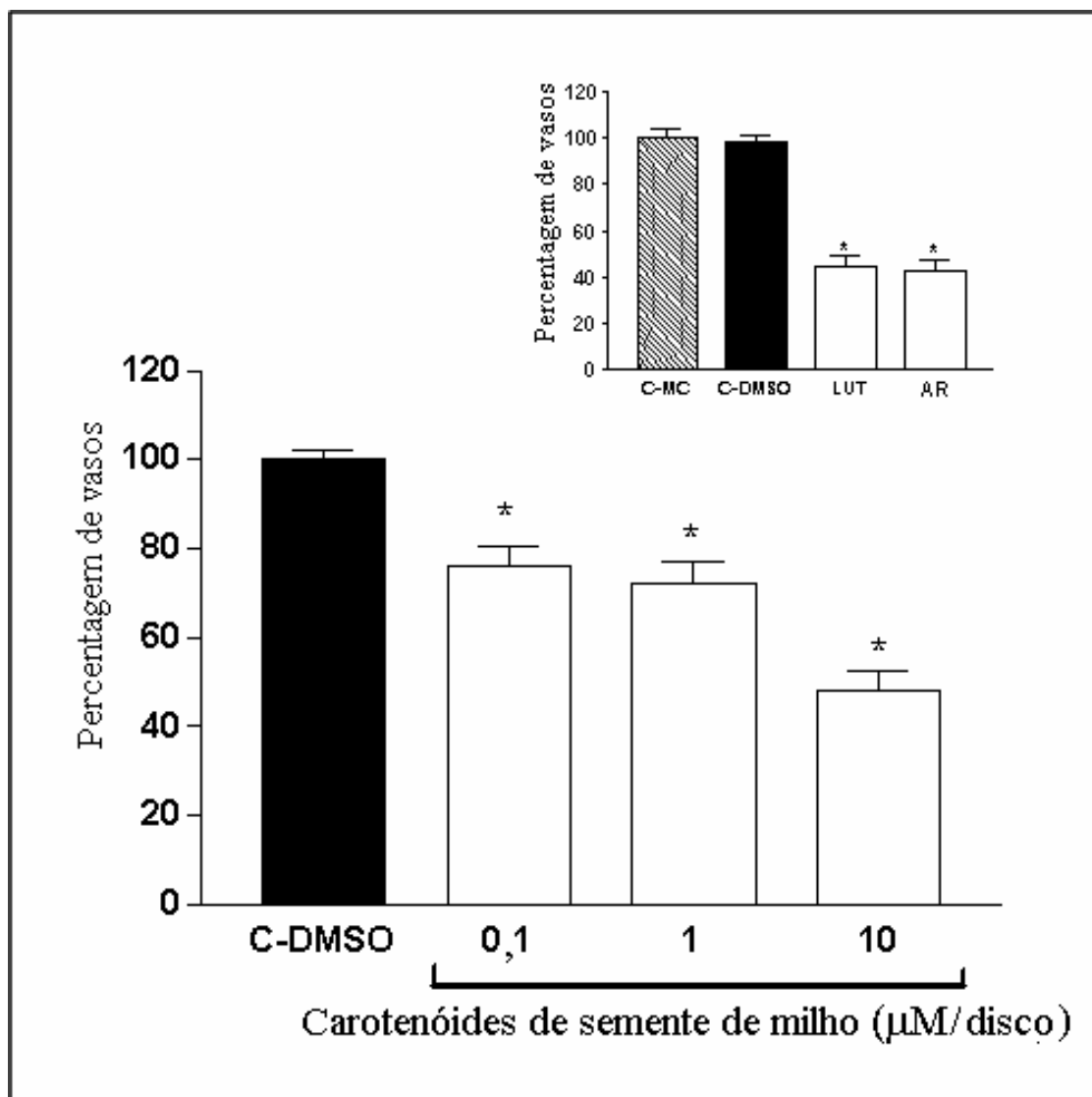
Além disso, como observado na **Figura 4** (*inset*) os controles positivo, ácido retinóico (AR) e luteína comercial (Lut), causaram uma potente inibição da angiogênese (57 e 55%, respectivamente) quando comparada ao grupo controle (DMSO 2%, v/v), sendo este resultado similar ao observado no grupo tratado com a maior concentração de carotenóides (10  $\mu$ M de equivalente de zeaxantina/disco).

A concentração de 10  $\mu$ M/disco de carotenóides foi a que apresentou efeito inibitório mais potente (cerca de 50%), tanto no ensaio da VV como no da MC. Contudo a luteína isolada (Sigma) foi a substância que apresentou maior efeito inibitório (65%), quando administrada sobre a vesícula vitelínica.

Os mecanismos de ação dos carotenóides sobre os processos de formação de vasos sanguíneos ainda são pouco conhecidos, não tendo sido investigados no presente trabalho. Estudos prévios MAJEWSKIA *et al.* (1995) e PAL *et al.*, (2000) mostraram que ácido retinóico, astaxantina e outros carotenóides inibem seletivamente a resposta angiogênica induzida por VEGF (*vascular endothelial growth factor*) no ensaio da MC de embriões de galinha. Portanto, um estudo futuro e mais detalhado se faz necessário para determinar se a combinação de carotenóides presentes nos grãos da variedade MPA1 pode inibir a formação dos vasos sanguíneos, influenciando as vias de sinalização moduladas pelo VEGF.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem a utilização dos grãos das VCLM como fonte de compostos bioativos de interesse às indústrias farmacêuticas e alimentícias, em função de seus conteúdos apreciáveis em zeaxantina e luteína, potentes inibidores dos processos de formação de vasos sanguíneos (vasculogênese e angiogênese).



**FIGURA 4-** Efeito do extrato carotenóidico de grãos de milho da variedade MPA1 (0,1 – 10  $\mu\text{M}$  de equivalente de zeaxantina/disco) administrados em membranas corioalantóicas de embriões de galinha de 8 dias de idade, cultivados *in ovo*. O *inset* mostra a porcentagem de vasos nos grupos controles. Discos de metilcelulose contendo apenas água ultrafiltrada (C-MC); água ultrafiltrada e DMSO 2% (C-DMSO) – controles negativos. Discos de metilcelulose contendo luteína e ácido retinóico (10  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a porcentagem de vasos sanguíneos no limite dos discos de metilcelulose quando comparados ao grupo controle (C-DMSO). Colunas e barras verticais representam, respectivamente, a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ), e os asteriscos denotam uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle (C-DMSO), usando ANOVA seguido do teste *post-hoc* Tukey ( $p < 0,05$ ).

Diante disso, é instigante especular sobre a possível participação daquelas xantofilas nos processos de remodelagem da rede de vasos sanguíneos na região da mácula do olho, uma vez que este tecido é altamente vascularizado. Muito possivelmente, a atividade antioxidante das xantofilas na retina não é o único papel desempenhado pelas mesmas. A associação que existe entre a presença das xantofilas na região macular e a prevenção de doenças degenerativas oculares sugere que aquelas substâncias estejam relacionadas à atividade anti-angiogênica. Portanto, o presente estudo sugere o uso das xantofilas como adjuvantes na prevenção de doenças degenerativas causadas pelo crescimento descontrolado de vasos sanguíneos, bem como a inclusão dos grãos de milho entre os alimentos funcionais na dieta humana, em função de suas quantidades apreciáveis desses metabólitos secundários.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.S.; LOTT, M. N.; MARCUS, D.M. The macular xanthophylls. **Survey of Ophthalmology**, v. 50, p. 183-193, 2005.

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 57-83, 2004.

AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 99-105, 2005.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. *In*: BRITTON G, LIAAEN-JENSEN S, PFANDER H (Eds.). **Carotenoids**. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, v. 1B, p. 13-62, 1982.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, p. 653-660, 2003.

CHEW, B.P.; BROWN, C.M.; PARK, J.S.; MIXTER, P.F. Dietary lutein inhibits mouse mammary tumor growth by regulating angiogenesis and apoptosis. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3333-3339. 2003.

CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 257-261, 2004.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA JR., J.B.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**, doi:10/1016/j.mvr/2007.05.004, 2007.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1182-1186. 1971.

HLATKY, L.; FOLKMAN, F. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 883-893, 2002.

[Http://www.bausch.com/em\\_us/consumer/visioncare/product/vitamins/ocuvite\\_adult.asp](http://www.bausch.com/em_us/consumer/visioncare/product/vitamins/ocuvite_adult.asp). Acesso dia: 10/08/2006.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; WEST, C.E.; HOLLMAN, P.C.H.; Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 20, p. 655-661. 2007.

IGURA, K.; OHTA, T.; KURODA, Y.; KAJI, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 171, p. 11-16, 2001.

MAJEWSKIA, S.; MARCZAKA, M.; SZMURLOA, A.; JABLONSKA, S.; BOLLAG W. Retinoids, interferon  $\gamma$ , 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and their combination inhibit angiogenesis induced by non-HPVharboring tumor cell lines. RAR $\alpha$  mediates the antiangiogenic effect of retinoids. **Cancer Letters**, v. 89, p. 117-124, 1995.

MANGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. **Journal of the American Diet Association**, v. 284-296. 1993.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, J. (Ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC press, 2002. CD ROM.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular Research**, v. 47, p. 31-40, 1994.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e uso de variedades de milho em comunidades de agricultores de Anchieta como estratégia de conservação. In: BOEF De, W.; THIJSEN, M.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B. (Eds.). **Estratégias participativas de manejo da agrobiodiversidade**, Florianópolis – SC: Neabio, p. 215-226, 2006.

OIKAWA, T.; HIROTANI, K.; NAKAMURA, O.; SHUDO, K.; HIRAGUN, A.; IWAGUCHI, T. A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. **Cancer Letters**, v. 48, p. 157-162. 1989.

PAL, S.; IRUELA-ARISPE, M.L.; HARVEY, V.S.; ZENG, H.; NAGY, J.A.; DVORAK, H.F.; MUKHOPADHYAY, D. Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilizing effect of VPF/VEGF, an early step in the angiogenic cascade. **Microvascular Research**, v. 60, p. 112-120, 2000.

RIBATTI, D.; RONCALI, L.; NICO, B.; BERTOSI, M. Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. **Acta Anatomy**, v. 130, p. 257-263, 1987.

RUITER, M.C.; POELMANN, E.; MENTINK, M.M.T.; VANIPEREN, L.; GITTENBERGER-DE-GROOT, A.C. The early formation of the vascular system in quail embryos. In: RUITER, M.C. (Ed.). **Development of the vascular system in the embryo. A concept of the origin of systemic pulmonary collateral arteries**. Koninklijke: Leiden, p. 99-186, 1992.

SANTOSA, S.S.; JONES, P.J.H. Oxidative stress in ocular disease: does lutein play a protective role? **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, p. 861-865, 2005.

SCOTT, C.E.; ELDRIDGE, A.L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 18, p. 551-559, 2005.

SLAVIN, J.L.; JACOBS, D.; MARQUART, L.; WIEMER, K. The role of whole grains in disease prevention. **Journal of the American Diet Association**, v. 101, v. 7, p. 780-786, 2001.

SUNDELIN, S.P.; NILSSON, S.E. Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 31, p. 217-225, 2001.

TAKAHU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients**, v. 131, p. 1409-1413, 2001.

TAN, W.; LIN, L.; LI, M.; ZHANG, Y.X.; TONG, Y.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, p. 255-262, 2003.

WHITEHEAD, A.J.; MARES, J.A.; DANIS, R.P. Macular Pigment. **Archives of Ophthalmology**, v. 124, p. 1038-1045, 2006.

ZAMMARETTI, P.; ZISCH, A.H. Adult endothelial progenitor cells renewing vasculature. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

ZIEGLER, R.G.; MAYNE, S.T.; SWANSON, C.A. Nutrition and lung cancer. **Cancer Causes and Control**, v. 7, p. 157-177, 1996.



## 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade química encontrada, no presente estudo, entre o germoplasma de milho crioulo cultivado em Anchieta (SC) indica a urgente necessidade de se propor/criar ações que promovam a sua conservação. Contudo, para que o processo de conservação *on farm* tenha continuidade, é necessário que os agricultores permaneçam nessa atividade, o que será mais facilmente alcançado quando um maior retorno econômico for obtido por eles. Sendo assim, propõe-se que os resultados aqui encontrados sejam utilizados para subsidiar ações voltadas à agregação de valor da biomassa em questão.

Como exemplo, tem-se a possibilidade de produzir farinhas provenientes daquela localidade com constituição química diferenciada, como foi detectado, no presente estudo, pela técnica de FT-IR associada à quimiometria (PCA) (*Capítulo 1*). A investigação do potencial de uso de algumas delas em setores específicos da indústria de alimentos, como para produção de pães, massas ou produtos processados está entre as possibilidades de agregar valor ao milho crioulo de Anchieta. Além disso, observou-se que via espectroscopia de FT-IR é possível distinguir os polímeros amilose e amilopectina em amostras pela detecção de bandas em 1018 e 997 ondas.cm<sup>-1</sup> (*Capítulo 1*). Esse resultado reveste-se de importância, pois permite a detecção e/ou a quantificação de tais polissacarídeos em amostras de farinha ou de outros alimentos, usando uma técnica rápida, simples e de baixo custo.

De forma similar, verificou-se que a partir das farinhas de milho crioulo podem ser obtidas frações ricas em amilose (FAM) ou amilopectina (FAP), a partir de um protocolo simples e rápido de extração e fracionamento do amido, com constituição química peculiar, como demonstrado por FT-IR e PCA. A distinção de tais frações foi atribuída à associação dos polímeros com contaminantes (lipídios, proteínas e compostos de baixo peso molecular não identificados) e também pela distinta proporção dos dois polissacarídeos constituindo a fração amídica no germoplasma em questão e/ou ainda pela presença de polímeros de tamanho intermediário (*Capítulo 1*). A análise dessas frações por <sup>13</sup>C-RMN revelou a similaridade de perfis espectrais entre as frações ricas em amilose (FAM) extraídas das VCLM e dos cultivares comerciais com o padrão comercial de amilose (Sigma), exceto pela presença de compostos de origem lipídica (*Capítulo 2*). A <sup>1</sup>H-RMN, por sua vez, constituiu uma ferramenta analítica bastante adequada à identificação de frações amídicas de variedades com

maior potencial de uso na indústria, em função da similaridade de perfis espectrais encontradas entre as mesmas e o padrão comercial (Sigma) (*Capítulo 2*). Sendo assim sugere-se um potencial ainda a ser explorado de algumas daquelas frações por determinados setores da indústria de alimentos, principalmente aqueles relacionados à produção de espessantes.

As farinhas do germoplasma analisado podem ser também diferenciadas em função de seu valor nutricional associado ao conteúdo de proteínas. Os resultados demonstraram que além da elevada amplitude de valores de proteínas totais detectada entre as amostras, algumas variedades têm um maior conteúdo das frações globulina e glutelinas, que são justamente aquelas que apresentam maior proporção dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano. A aplicação da técnica de PCA a esse conjunto de dados quantitativos foi de grande auxílio, pois permitiu a rápida distinção das variedades de maior valor nutricional. De forma complementar, a análise dos espectros de FT-IR para a região de *fingerprint* de proteínas (1650-1500  $\text{ondas.cm}^{-1}$ ), usando PCA, reforçou o resultado de que as farinhas das VCLM e dos cultivares comerciais possuem constituição protéica distinta, consolidando o emprego dessa técnica em estudos que envolvam o *screening* de vários genótipos (*Capítulo 3*).

Através do presente estudo foi possível também detectar o potencial diferenciado das farinhas das VCLM em relação à presença e conteúdo de pigmentos, tais como carotenóides e antocianinas e/ou outros compostos de interesse à saúde humana, como, por exemplo, (poli)fenóis. Os pigmentos denominados flobafenos, compostos de ocorrência bastante restrita na natureza, foram encontrados apenas nas amostras de grãos das variedades roxas, sendo esse um resultado de grande interesse, em função das aplicações dos mesmos no setor industrial e farmacêutico. Em contrapartida, as demais variedades pigmentadas mostraram-se como fontes adequadas para extração de compostos antociânicos. A elucidação estrutural de tais compostos encontra-se em andamento e é etapa essencial para agregar valor às farinhas produzidas na região ou para utilização das mesmas como fonte de matéria-prima de pigmentos a serem usados como corantes de bebidas ou de alimentos. As farinhas de milho crioulo podem ainda ter um valor nutricional diferenciado, em função de seus teores de ácidos (poli)fenólicos, conforme demonstrado no presente estudo (*Capítulo 4*).

Os maiores valores de conteúdos de carotenóides, por sua vez, foram encontrados entre as cultivares comerciais. De qualquer forma, as xantofilas, zeaxantina e luteína, que são os carotenóides majoritários das farinhas de milho, podem ser facilmente extraídas dessa

biomassa (grãos) para produção de suplementos alimentares que possuem, nos dias de hoje, elevado valor de mercado.

O extrato carotenoídico rico em xantofilas, obtido a partir de grãos de milho, mostrou um potente efeito inibitório nos processos de formação de vasos sanguíneos (vasculo- e angiogênese), sugerindo a sua futura aplicação na prevenção e/ou terapêutica de doenças relacionadas à angiogênese descontrolada (*Capítulo 6*).

As flores femininas das variedades de milho crioulo, semelhante às farinhas, apresentam constituição química diferenciada, conforme evidenciado pelo uso de análises espectroscópicas como, FT-IR (3000-600; 1650-1500 e 1250-900 ondas.cm<sup>-1</sup>), 1H-RMN, UV-visível e quimiométrica (PCA). As classes de compostos químicos relacionadas a essa distinção e que podem resultar em um potencial farmacológico diferenciado para esse tecido foram as antocianinas, os (poli)fenóis e os carotenóides. As antocianidinas pelargonidina e cianidina foram identificadas como sendo os compostos majoritários por MALDI-TOF/MS, no extrato metanólico bruto (MeOH-HCl, 1%,v/v) das flores femininas de VCLM. Contudo, foram detectados conteúdos distintos de antocianinas (460 e 525 nm), (poli)fenóis (ácidos gálico, *t*-cinâmico, protocatecuico, siríngico e caféico) e carotenóides (luteína, β-caroteno, α-caroteno e zeaxantina) entre as VCLM. Esses resultados apontam na direção, a curto e médio prazo, da utilização daquela biomassa como fonte de matéria-prima de compostos de interesse a saúde humana, visando a produção de fitoterápicos ou fitofármacos.

Tomados em conjunto, em um futuro próximo, espera-se que os resultados aqui encontrados possam ser usados para a criação de uma marca coletiva, no município de Anchieta, a ser usada pelos produtos derivados dos milhos crioulos (farinhas diferenciadas, fitoterápicos e/ou fitofármacos), gerando um maior retorno econômico aos pequenos agricultores e, portanto, estimulando-os a continuarem conservando aquele germoplasma.