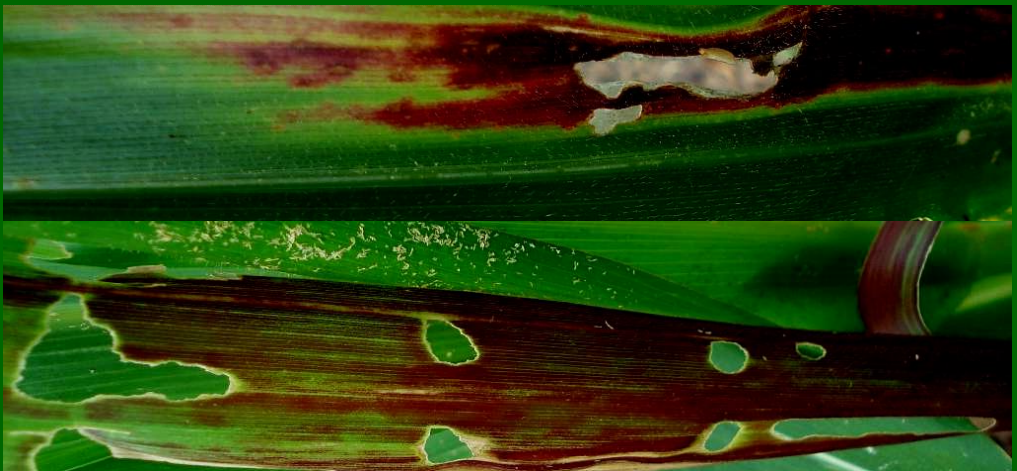


Priscilla Maria Menel Lemos



**DETERMINAÇÃO DO METABOLOMA FOLIAR PARCIAL
DE VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO (*Zea mays*),
VISANDO A CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS
FOLIARES CONTENDO (POLI)FENÓIS E CAROTENÓIDES**



**Florianópolis – SC
2010**



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

Priscilla Maria Menel Lemos

**DETERMINAÇÃO DO METABOLOMA FOLIAR PARCIAL DE
VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO (*Zea mays*), VISANDO A
CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FOLIARES CONTENDO
(POLI)FENÓIS E CAROTENÓIDES**

Florianópolis

2010

Priscilla Maria Menel Lemos

**DETERMINAÇÃO DO METABOLOMA PARCIAL FOLIAR DE
VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO (*Zea mays*), VISANDO A
CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FOLIARES CONTENDO
(POLI)FENÓIS E CAROTENÓIDES**

Tese submetida ao Centro de
Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Doutor em
Recursos Genéticos Vegetais
Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Maraschin

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

L557d Lemos, Priscilla Maria Menel

Determinação do metaboloma foliar parcial de variedades crioulas de milho (*Zea mays*), visando a caracterização dos extratos foliares contendo (poli)fenóis e carotenóides [tese] / Priscilla Maria Menel Lemos ; orientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC, 2010.

218 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

- 1) análise metabolômica, 2) milho (*Zea mays*),
 - 3) variedades crioulas de milho, 4) compostos fenólicos,
 - 5) carotenóides, 6) valorização agricultura familiar.
- I. Maraschin, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

*“Study the teaching of the pine tree, the bamboo and the
plum blossom,*

*The pine is evergreen, firmly rooted and venerable
The bamboo is strong, resilient, unbreakable
The plum blossom is hardy fragrant and elegant.”*



Art of Peace, #19

Morihei Ueshiba

*“Conheça os ensinamentos do pinheiro
do bambu e da cerejeira,*

*O pinheiro é verdejante, firmemente enraizado e venerável
O bambu é resistente, resiliente, inquebrável,
A cerejeira é fortemente fragrante e elegante”.*

Arte da Paz, #19

Morihei Ueshiba

(tradução Priscilla MM Lemos)

*Dedico esta tese ao Brasil. E a todo povo brasileiro,
um exemplo de resistência, tolerância e sobrevivência.
Resistência a inúmeras situações de estresse,
mantendo o nível de bom-humor elevado, quase sempre.
Tolerância e valorização da diversidade
de cores, de formas, de opções, de pensamentos...
E sobrevivência em situações de grande adversidade,
exercitando a criatividade e o senso prático.
Este povo que merece ter o seu bem-estar conservado,
suas riquezas preservadas e o seu futuro garantido.
Espero ter auxiliado na valorização da diversidade,
biológica e de formas de pensamento. Ter contribuído para
que os agricultores familiares possam comercializar folhas
de milho, tornando assim mais sustentável seu modo de vida
centenário, sábio e belo. E ter retribuído o investimento deste
povo, que permitiu todos estes anos de estudo e pesquisa em
Universidades Federais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Álvaro e Marly e as minhas irmãs Káthia, Cinthia e Giselle, pelo apoio afetivo, psicológico e material ao longo desta jornada. Pelos exemplos e valores compartilhados e pela possibilidade de compreender e ser compreendida. Bem como, os demais familiares que estão sempre presentes em minha vida, sobrinhos queridos, tios, primos...

Agradeço as minhas irmãs de coração Carlinha, Malena, Moniquinha, Trá e Eli. Por estarem sempre por perto, mesmo quando longe (Rio de Janeiro, Paraíba, EUA, Canadá...). Agradeço também ao meu irmão de coração, Lucas, remediavelmente esquecido, amigo que deveria chamar de “anjo-da-guarda”, tamanha a sua ajuda durante todo o período, incluindo coletas, busca de amostras, opinião em manuscritos...

Ao Arnaldo, agradeço pelo amor, amizade, apoio, compreensão, companheirismo, entusiasmo e por todos os momentos maravilhosos que já vivemos juntos. Você surgiu em minha vida durante este doutorado e enfrentou, ao meu lado, bravamente este desafio (quem já conviveu com alguém durante a finalização da tese, sabe do que estou falando!!)

A todos os amigos que a vida me presenteou, muito obrigada por serem tão maravilhosos e por tornarem minha vida tão rica e bela!!

Agradeço a toda a “família” científica do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio), do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), Laboratório de Frutas e Hortaliças (LFH) e Laboratório de Bioatividade e Embriotoxicidade (LBE). Especialmente ao professor Dr. Marcelo Maraschin (Prof. M2), pela confiança, competência, orientação, gentileza, amizade e muito, muito conhecimento e questionamento. Minha vida se divide em antes e depois deste doutorado. Agradeço aos professores co-orientadores, Dr. Paulo Fernando Dias e Dra. Juliana Bernardi Ogliari, por fornecerem em conjunto com o Prof M2, os meios necessários para execução deste trabalho. Muito obrigada também pela amizade, apoio e motivação. Agradeço aos professores Dr Rubens Onofre Nodari e Prof Miguel Pedro Guerra, pela possibilidade de aprendizado, pelo amplo conhecimento ofertado e pelo empréstimo de inúmeros equipamentos e livros. Obrigada ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alves, pelo apoio facilitando sempre o contato com as sementes crioulas. Agradeço também a professora Dra Edna Regina Amante pelo entusiasmo, motivação, ampla possibilidade de aprendizado e empréstimo de equipamentos (intermináveis varreduras UV-vis, horas e horas espectrofotométricas, horas e horas de liofilização...).

Agradeço ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pela simpatia, sabedoria, experiência, conhecimento e conselhos durante minha qualificação e defesa. Também sou muito grata a Profa. Dra. Tânia Bordim Bomfim pelas ótimas sugestões durante a defesa.

Agradeço ao Prof Dr Hernán Terenzi (CCB-UFSC), pelo empréstimo de equipamento e coordenação no Projeto Proteoma – SC. Também ao Prof Dr Nelson Gabilan, pelo auxílio com a liofilização. Pelo mesmo motivo (liofilização) também sou muito grata a Profa Dra Débora Machado Fracalossi e equipe do LAPAD – UFSC. Agradeço também a possibilidade de utilizar a Fazenda da Ressacada – UFSC, para o cultivo das safras 2006-2007 e 2007-2008 e ao pessoal de apoio da Fazenda (a quem limpa o mato! Muito obrigada!!).

Agradeço ao pessoal das “coxias”, aos técnicos laboratoriais que permitiram que o “show” aparecesse, Luís Pacheco (LMBV), Maria Luisa Peixoto (LFDV), Marcelo Borghezán (LMBV) e Atháide (Laboratório de Sementes).

Obrigada também aos secretários Bernadete e Nilton, pelo auxílio nos momentos difíceis e também nos fáceis...

Agradeço ao pessoal da limpeza, D^{na} Bete e Dani, pelo cuidado e gentileza.

Agradeço também ao Prof. Antônio Gilberto Ferreira, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Universidade Federal de São Carlos, UFSCar – SP), pela obtenção dos espectros de RMN e pela hospitalidade. Elisângela e Katuska, muito obrigada pelo grande auxílio na obtenção dos espectros.

Agradeço ao Prof Dr Karl Wood, do Depto de Química da Purdue University – EUA pela possibilidade de aquisição dos espectros de massa MALDI-TOF e pelo compartilhamento de conhecimento sobre os flavonóides do milho.

Agradeço aos colegas, Shirley, pela amizade, por compartilhar comigo o conhecimento e a paixão pela química e pelas variedades crioulas de milho, além de sempre “abrir caminho”, muito obrigada! Pelo auxílio no aprendizado de “a onde estão as coisas e como elas funcionam,” muito obrigada, ao Luciano, Volmir e Lírio. Obrigada também aqueles colegas (Loisiana, Bia, Manoela, Cristiane, Rossana, Ana, Simone, Pancho, Jane, Luciane, Tainá, Cristiane, Gustavo, Nicolas, Sara, Fernanda e Fernanda) que compartilharam a rotina laboratorial e muito mais que isto, amizade, idéias e risadas! Obrigada àqueles colegas que “meteram a mão na massa: Danielle, Elaine, Bianca, Aline, William e Nathalie. Muito obrigada pela amizade, afinidade e apoio, sem a ajuda de vocês eu não teria concluído este trabalho. Agradeço também ao pessoa que está dando continuidade à pesquisa sobre o milho crioulo no LMBV.

Ao CNPq pela concessão da bolsa para realização deste trabalho, ao governo brasileiro que financia a pesquisa científica neste país e a FAPESC que financiou uma parte deste trabalho. Agradeço também a EPAGRI (Técnicos Adriano Canci e Clístenes) pelo apoio e fornecimento de sementes e a EMBRAPA, pelos mesmos motivos.

E finalmente agradeço aos agricultores de Anchieta e as organizações que os representam (Prefeitura Municipal, ASSO, SINTRAF) pelo apoio, compartilhamento de informações e de sementes, obrigada por possibilitarem o meu acesso ao universo das variedades crioulas.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Justificativa	3
3. Revisão de Literatura	5
3.1. Metaboloma e métodos analíticos	5
3.1.1 Metaboloma Vegetal	8
3.2 Milho – origem, dispersão e diversidade genética	9
3.3 Milho – metabólitos de interesse no tecido foliar	15
4. Objetivos	18
Geral	18
Específicos	18
5. Referências Bibliográfica	19
CAPÍTULO 1 - Análise dos carotenóides presentes nas folhas das variedades crioulas de milho através de espectrofotometria UV-visível, quimiometria e cromatografia líquida de alta eficiência	
Introdução	30
Material e Métodos	33
Resultados e Discussão	36
Conclusões	53
Referências Bibliográficas	56
CAPÍTULO 2 - Análise dos compostos fenólicos de tecido foliar das variedades de milho por espectrofotometria UV-visível, espectrometria de massa (MALDI-TOF) e cromatografia líquida de alta eficiência	
Introdução	61
Material e Métodos	62
Resultados e Discussão	65
Conclusões	95
Referências Bibliográficas	98
CAPÍTULO 3 – Análise de flavonóides de folhas de variedades crioulas de milho por espectrofotometria UV-visível e espectrometria de massa (MALDI-TOF)	
Introdução	104
Material e Métodos	107
Resultados e Discussão	110
Conclusões	152
Referências Bibliográficas	156

CAPÍTULO 4 – Perfil metabólico e potencial antioxidante in vitro do extrato aquoso foliar de variedades crioulas de milho

Introdução	165
Material e Métodos	167
Resultados e Discussão	171
Conclusões	188
Referências Bibliográficas	189

CONCLUSÕES FINAIS	194 - 200
--------------------------	-----------

FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1: Características fenotípicas das variedades crioulas de milho cujo metaboloma foliar parcial foi determinado no presente estudo.	17
--	----

CAPÍTULO 1

Figura 1: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato hexano: acetona, obtido a partir do tecido foliar liofilizado das variedades crioulas de milho ($n=4$ indivíduos), cultivadas na Ressacada-2006/ 2007.	37
---	----

Figura 2: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato hexano: acetona, obtido a partir do tecido foliar desidratado em estufa das variedades crioulas de milho e das variedades comerciais ($n = 4$ repetições), cultivadas na Ressacada-2007/ 2008.	38
---	----

Figura 3: Análise dos componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato hexano: acetona obtido a partir do tecido foliar liofilizado das variedades crioulas de milho cultivadas em Florianópolis-2006/ 2007	42
--	----

Figura 4: Análise dos componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato hexano: acetona obtido a partir do tecido foliar desidratado em estufa das variedades de milho cultivadas em Florianópolis- 2007/ 2008	43
--	----

Figura 5: Concentração média de carotenóides totais (mg/g de folha) \pm desvio padrão (coeficiente de variação – CV%), observados no extrato hexano: acetona	45
---	----

Figura 6: Via de síntese dos principais carotenóides presentes nos grãos de milho e provavelmente observados no tecido foliar das variedades analisadas	48
--	----

Figura 7: Cromatograma - CLAE mostrando perfil qualitativo de carotenóides do tecido foliar liofilizado da variedade Mato Grosso Palha Roxa	48
--	----

- Figura 8:** Proporção de luteína, zeaxantina, *trans* β -caroteno e licopeno, observada através da análise de CLAE. 49
- Figura 9:** Concentração média dos carotenóides majoritários (mg/g de folha \pm desvio padrão) obtido através da análise de CLAE, para o extrato hexano:acetona. 50

CAPÍTULO 2

- Figura 1:** Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH 100%, obtido a partir do tecido foliar das variedades crioulas de milho ($n= 4$ repetições). 66
- Figura 2:** Perfis espectrofométricos obtidos para os padrões de ácido gálico e de ácido clorogênico (0,200 mg/mL) dissolvidos em MeOH 100%. As setas apontam o início da absorção de luz em 290 nm. 68
- Figura 3:** Concentração de compostos fenólicos totais (mg/g de folha \pm desvio-padrão) determinada através da reação de Folin Ciolcateu, para o extrato MeOH 100% ($n= 4$ repetições). 68
- Figura 4:** Espectro de massa obtido através da técnica de MALDI-TOF para o extrato MeOH 100% do tecido foliar, mostrando um perfil de sinais massa carga (m/z) positivos (cátions) observados para a variedade Mato Grosso Palha Roxa (MG). 74
- Figura 5:** Compostos fenólicos de baixo peso molecular que apresentam apenas um anel benzênico em sua estrutura como os derivados do ácido benzóico (A) e os derivados do ácido cinâmico (B). 75
- Figura 6:** Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para as variedades de milho 76-86
- Figura 7:** Cromatograma - CLAE mostrando perfil de compostos fenólicos observados para o extrato MeOH 100% obtido a partir do tecido foliar da variedade Roxo (RX). 89
- Figura 8:** Proporção dos diferentes compostos fenólicos observada para o tecido foliar das variedades de milho, evidenciada através da análise de CLAE. 89
- Figura 9:** Concentração média dos treze compostos fenólicos majoritários (mg/g de folha \pm desvio padrão) obtida através da análise de CLAE, para o extrato metanólico 100%. 90

CAPÍTULO 3

- Figura 1:** Detalhes estruturais de alguns flavonóides encontrados em tecidos de *Zea mays*: quercetina (A), caempferol (B), naringenina (C), apigenidina (D), cianidina (E) e pelargonidina (F). 105
- Figura 2:** Perfil espectrofométrico UV-visível ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar das 111

variedades crioulas de milho (n= 4 repetições).

- Figura 3:** Perfil espectrofométrico UV-visível ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% foliar da variedade Palha Roxa, após o procedimento de semi-purificação. 113
- Figura 4:** Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de folha \pm desvio-padrão) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar de variedades de *Zea mays* L. (n = 4 repetições). 113
- Figura 5:** Concentração média de antocianinas totais (mg/g de folha) \pm desvio padrão (CV%) determinada em 530 nm, para o extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar de variedades de milho (n = 4 repetições). 118
- Figura 6:** Detalhes da pigmentação foliar tentativamente associada à presença de antocianinas em áreas lesionadas do tecido foliar das variedades de milho em estudo. 118
- Figura 7:** Via de síntese dos principais flavonóides observados em grãos do milho (*Zea mays* L.). 120
- Figura 8:** Detalhes do padrão de coloração dos grãos das variedades de milho em estudo. Pericarpo (**p**) e endosperma (**e**). 123
- Figura 9:** Detalhe da diversidade de coloração de grãos de espigas oriundas das mesmas plantas, cujos tecidos foliares foram alvos do presente estudo. 123
- Figura 10:** Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar das variedades de milho. 127-141
- Figura 11:** Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir dos dados espectrais de varredura UV-visível (250 a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar das variedades de milho. 149
- Figura 12:** Análise dos Componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato MeOH 100% do tecido das de milho. 151

CAPÍTULO 4

- Figura 1:** Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato aquoso do tecido foliar desidratado em estufa das variedades crioulas de milho (n= 4 repetições). 172
- Figura 2:** Concentração de compostos fenólicos totais (mg/g de folha) determinada através da reação de Folin-Ciocalteu, para o extrato aquoso das folhas das diferentes variedades de milho (n = 4 repetições). 175
- Figura 3:** Perfil espectrofométrico de varredura ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato aquoso das amostras comerciais de flores femininas de milho (n= 4 repetição). 175

Figura 4: Concentração média de compostos fenólicos totais (mg/g de folha, Folin-Ciocalteu) do extrato aquoso de flores femininas de milho disponíveis comercialmente (n = 4 repetições).	175
Figura 5: Perfil cromatográfico (CLAE) de ácidos fenólicos do extrato aquoso foliar da VCM Palha Roxa (PR).	177
Figura 6: Proporção dos compostos fenólicos no tecido foliar, consoante às variedades de milho, determinada via CLAE.	177
Figura 7: Concentração média e total dos ácidos fenólicos majoritários (mg/g de folha \pm desvio padrão), determinada via análise cromatográfica (CLAE), do extrato aquoso foliar.	179
Figura 8: Porcentagem de inibição (equivalente Trolox) da oxidação do radical DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato aquoso das folhas das variedades de milho.	182
Figura 9: Porcentagem de inibição (equivalente Trolox) da oxidação do radical DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato aquoso das amostras comerciais de flores femininas de milho.	182
Figura 10: Concentração média de proteínas totais (μ g/g de folha) obtida para o extrato aquoso das folhas das variedades de milho.	184
Figura 11: Em (A), perfis espectrofotométricos de varredura (200 a 700 nm) do extrato foliar em tampão fosfato salino, variedades Mato Grosso Palha Roxa (MG) e Língua de Papagaio (LP). Em (B), concentração média de proteínas totais (μ g/g de folha) no extrato tampão fosfato salino.	184
Figura 12: Perfil espectrofotométrico de varredura (λ = 200 a 700 nm) dos extratos hidroalcolólicos do tecido foliar das variedades crioulas de milho MPA, Roxo e Língua de Papagaio.	186
Figura 13: Concentração média de compostos fenólicos totais (mg/g de folha - Folin-Ciocalteu) dos extratos hidroalcolólicos das folhas. Os valores se referem a média observada para as três variedades avaliadas MPA, Roxo e Língua de Papagaio.	187
Figura 14: Concentração média de antocianinas (mg/g de folha) dos extratos hidroalcolólicos das folhas. Os valores se referem a média observada para as as três variedades avaliadas MPA, Roxo e Língua de Papagaio.	187
CONCLUSÕES FINAIS	
Figura 1: Concentração média de carotenóides totais (mg/g de folha) e compostos fenólicos totais (mg/g de folha) obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para os extratos foliares das variedades crioulas de milho.	201

RESUMO

O estabelecimento do perfil metabolômico parcial das folhas de variedades crioulas de milho (VCM) atualmente cultivadas por agricultores familiares de Anchieta-SC representa uma iniciativa inovadora e adequada, pois aprofunda o conhecimento sobre as singularidades metabólicas destes genótipos, contribuindo para uma caracterização mais detalhada do germoplasma. Também subsidia a avaliação do potencial desta biomassa como fonte de compostos de interesse nutricional e efeito benéfico sobre a saúde humana e animal. Neste contexto, o **capítulo 1** apresenta os resultados da espectrofotometria UV-vis, quimiometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hexano: acetona de folhas das VCM. Indicando um teor superior de carotenóides totais para o material liofilizado (≈ 47 mg/g de folha), em comparação ao material desidratado em estufa (≈ 20 mg/g de folha), sendo que o menor custo, torna o emprego da estufa interessante para a secagem. A CLAE apontou a luteína e o β -caroteno como os componentes majoritários destes extratos. E a quimiometria associada a espectrofotometria foi utilizada com sucesso na busca de biomassas foliares com um teor proeminente de carotenóides. O emprego do metanol como solvente permitiu a recuperação eficiente de diferentes classes de compostos fenólicos presentes nas folhas do milho. Os resultados da espectrofotometria UV-visível, da quimiometria, da espectrometria de massa (MALDI-TOF) e da CLAE auxiliaram na caracterização dos derivados dos ácidos benzóico e cinâmico (**capítulo 2**) e também, dos flavonóides (**capítulo 3**) presentes no tecido foliar das VCM. A oxidação do reativo de Folin-Ciocalteu indicou uma média de aproximadamente 10 mg/g de folha para as VCM, no extrato metanólico (MeOH 100%) e de cerca de 40 mg/g, para o extrato metanólico acidificado (MeOH HCl 1%). Possibilitando a comercialização de extratos ricos em compostos fenólicos a partir das folhas de milho. Os compostos majoritários identificados nestes extratos foram a quercetina, o ácido gálico e o ácido clorogênico (**capítulo 2**). A presença da cianidina, da pelargonidina, da peonidina, da malvidina, da delphinidina e da petunidina e também de inúmeros de seus ésteres foi relatada para as folhas das VCM. Bem como sinais (m/z) que podem ser associados a antocianinas de ocorrência mais raras na natureza, como a apigenidina e a luteolinidina. Tais compostos são proximamente relacionados aos monômeros encontrados na estrutura química dos flobafenos. Antocianinas e flobafenos são

pigmentos sintetizados a partir da naringenina e nos grãos de milho podem ser encontrados na camada de aleurona do endosperma (derivados de antocianinas), ou no pericarpo (derivados de flobafenos). Aparentemente, cada genótipo analisado apresenta uma composição antociânica única em suas folhas (**capítulo 3**). A quimiometria foi empregada para a análise das varreduras UV-vis dos extratos metanólicos mostrando a aplicabilidade desta ferramenta também na prospecção de biomassas possuidoras de teor interessante de ácidos fenólicos e flavonóides (**capítulos 2 e 3**). O **capítulo 4** trata da caracterização do extrato aquoso foliar obtido a partir das VCM. Chama atenção o elevado teor de compostos fenólicos totais (≈ 80 mg/g de folha) observado nos chás das folhas de milho, superior ao observado para a infusão de suas flores femininas. O chá de “cabelo” de milho (flores femininas) é indicado pela medicina tradicional, como diurético, antiinflamatório e antitumoral. Além disso, os extratos aquosos das folhas de milho mostraram atividade antioxidante *in vitro* (ensaio DPPH) interessante, similar a 0,160 mg de Trolox (análogo sintético da vitamina E) e ligeiramente inferior ao extrato aquoso da erva-mate e ao suco de uva. Enfim o conjunto de resultados obtidos com a caracterização dos compostos (poli)fenólicos e carotenóides indicaram que as folhas de milho permitem a obtenção de extratos ricos nestes metabólitos secundários de alto valor agregado. Indicando novas alternativas de aproveitamento para esta biomassa, gerando uma possibilidade adicional de renda para os agricultores familiares brasileiros.

Palavras-chave:

1) Análise Metabolômica. 2) Milho (*Zea mays*). 3) Variedades Crioulas de Milho. 4) Compostos Fenólicos. 5) Carotenóides. 6) Valorização da Agricultura Familiar.

ABSTRACT

Partial metabolomic profiles obtained from leaves of maize landraces actually cultivate in Anchieta –SC, represent a new and adequate initiative, since this strategy can reveal metabolic singularities from these genotypes and contribute to more detail characterization of the germplasm. Besides that, allow the evaluation of maize leaves from landraces as source of compounds with nutritional and other positive benefits over human and animal health. **Chapter 1** detail the results

obtained with UV-visible spectrophotometry, chemometrics and high performance liquid chromatography (HPLC) of hexane: acetone extracts from maize leaves. Superior total carotenoids content was indicated to lyophilized samples (≈ 47 mg/g leaves), compared to oven dried samples (≈ 20 mg/g leaves), but lower costs make the oven dry an interesting option. HPLC reveal lutein and β -caroten as the major components of these extracts. Chemometrics associated to spectrophotometry was successfully use in the screening of maize leaves with upper carotenoids content. Methanol employed as solvent allows the efficient recovery of different classes of phenolic compounds from maize leaves. UV-visible spectrophotometry, chemometrics, MALDI-TOF mass spectrometry and HPLC results help the characterization of benzoic and cinamic acids derivatives (**chapter 2**) and flavonoids (**chapter 3**) from maize leaf tissues. Folin-Ciocalteu reaction indicates approximately 10 mg/g leaves as the mean for methanolic extract (MeOH 100%) and near 40 mg/g, for acidic methanolic extract (MeOH HCl 1%). Such results suggest an additional possibility, phenolic rich extract from maize leaves commercialization. Quercetin, gallic acid and chlorogenic acid are the most abundant components identified by HPLC (**chapter 2**). Additionally, cyanidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, delphinidin and petunidin, and several of their esters are detected by MS MALDI-TOF. Anthocyanins more rare in nature are also detected, like apigenidin and luteolinidin. Such metabolites are near related to the chemical structure of phlobaphene monomers. Anthocyanins and phlobaphenes are pigments synthesized from naringenin and in maize grains can be found in aleurone layer from endosperm (anthocyanin derivatives) and in pericarp (phlobaphenes derivatives). Results indicate an unique anthocyanic composition for maize leaves from each genotype analyzed here (**chapter 3**). Chemometrics associated to the UV-vis wavelength scans of methanolic extracts show their applicability as a tool for prospection of high phenolic content biomasses (**chapter 2** and **3**). **Chapter 4** is related to maize leaf tissues aqueous extract characterization. Attention must be paid to the elevated phenolic concentration (≈ 80 mg/g leaves) of maize leaves teas, superior to the content observed for feminine maize flowers aqueous extract. Maize silk (feminine flowers) teas are indicated in traditional medicine as diuretic, anti-inflammatory and antitumoral. Maize leaves aqueous extracts show an interesting *in vitro* antioxidant activity (DPPH assay), similar to 0.160 mg of Trolox (synthetic vitamin E) and slightly inferior of yerba-mate aqueous extract and grape juice. Finally, the embodiment of results obtained

here for (poly)phenolic and carotenoidic extracts characterization indicate that maize leaves can really be used as source of high economic value secondary metabolites. Indicating new alternatives for the profitable use for landraces maize leaves, generating an additional source of remuneration for brazilian family farmers.

Key Words:

1) Metabolomic Analysis. 2) Maize (*Zea mays*). 3) Maize Landraces. 4) Phenolic Compounds. 5) Carotenoids. 6) Family Agriculture Valoration.

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da agrobiodiversidade é considerada fundamental para a sustentabilidade do gênero humano (WOOD, LENNÉ, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). No entanto, o estreitamento da base genética de espécies de importância agrícola tem sido observado desde o início da sua domesticação, fato que vem se acentuando notadamente em função de programas convencionais de melhoramento genético (MACHADO, PARTENIANI, 1998; FERNIE et al., 2006). A redução da variabilidade torna as populações mais vulneráveis às pragas e doenças e mais exigentes em termos de balanço hídrico e nutricional. Para compensar tais fragilidades e manter a produtividade em níveis aceitáveis, os agricultores utilizam doses crescentes de agrotóxicos, adubos químicos, irrigação e mecanização; aumentando os custos de produção e os danos ao ambiente (PIRAGES, 2000; VILELA DE ANDRADE, 2000; MASAKURE, HENSON, 2005). É importante salientar que a diminuição da diversidade em cultivo coincide com a destruição da agricultura familiar em todo o mundo (WEID, SOARES, 1998; BRASIL - MAPA, 2004). Os agricultores familiares costumam valorizar a variabilidade genética das espécies, mantendo em cultivo diversas variedades, como resposta às variações nas condições ambientais em uma mesma área de cultivo (p.ex, heterogeneidade na composição química e drenagem do solo) e também pela possibilidade de diminuição de perdas relacionadas à instabilidade do clima, ou ainda às demandas de mercado (BRUSH, 2001).

No ano de 1996, integrantes do Sindicato dos Trabalhadores Rurais na Agricultura Familiar de Anchieta-SC (SINTRAF) iniciaram um trabalho de sensibilização e mobilização junto aos agricultores familiares daquela cidade e região, promovendo ações de capacitação em agroecologia, de resgate de variedades tradicionais e de busca de maior soberania alimentar (FURHMANN, 2004). No caso específico do milho (*Zea mays* L.), foram localizadas na região cinco variedades tradicionais em cultivo, no ano de 1997, e, em 2002, 33 diferentes variedades de milho já haviam sido resgatadas (VOGT, 2005). Neste mesmo ano, a Associação dos Pequenos Agricultores Plantadores de Milho Crioulo, Orgânico e Derivados de Anchieta-SC (ASSO) foi legalmente constituída com o objetivo de proteger os interesses dos agricultores da região e auxiliar: 1) no resgate e na multiplicação de sementes das variedades tradicionais;

2) na produção de alimentos agroecológicos e 3) na comercialização dos produtos derivados do milho (VOGT, 2005).

Atualmente, é crescente o uso de variedades tradicionais como fonte de alelos para a restauração da diversidade genética de espécies agrícolas, principalmente em função de sua maior resistência a agentes estressores bióticos e abióticos (BRUSH, 2001; OGLIARI et al., 2004; FERNIE et al., 2006). Todavia, no caso do milho, as matérias primas oriundas destas variedades tradicionais possuem um valor de mercado reduzido, gerando baixo retorno econômico para os agricultores que as cultivam. Tal situação pode dificultar a continuidade de seu cultivo, potencializando o risco de extinção destes genótipos e aumentando a erosão genética deste importante cereal. Tal realidade não é, obviamente, de interesse, considerando o significativo valor social e econômico do milho. Sendo assim, como uma alternativa a este quadro, sugere-se a adoção de estratégias com suporte científico que estimulem os agricultores familiares a manterem e ampliem as áreas de cultivo deste germoplasma.

Neste contexto, o estabelecimento do perfil metabômico de biomassas (tecidos e órgãos, e.g.) oriundas de variedades crioulas de milho, atualmente cultivadas por agricultores de Anchieta-SC, representa uma iniciativa adequada, pois aprofunda o conhecimento sobre as singularidades metabólicas daqueles genótipos, contribuindo para uma caracterização mais detalhada deste germoplasma. Além disto, subsidia a avaliação de seu potencial como fonte de compostos de interesse nutricional e com efeitos benéficos à saúde humana. Os resultados obtidos com esta abordagem podem levar ao uso de partes do milho de menor aproveitamento, como as folhas, gerando novas alternativas de renda para os agricultores familiares. Sendo assim, propõem-se que os estudos que vêm sendo executados pela equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) e do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEAbio), do CCA/UFSC, associados às ações da ASSO, SINTRAF e de outros atores de Anchieta e região, subsidiem a tomada de decisões no que se refere à otimização de usos correntes de biomassas de milho, bem como indiquem novas possibilidades de aplicações destas. Tal cenário poderá contribuir para a melhoria no padrão de vida dos agricultores familiares da região, através do aumento do aporte de recursos financeiros àquelas famílias, levando a um redimensionamento e valorização da atividade de cultivo das variedades crioulas de milho e a conservação deste importante germoplasma.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a maioria das propriedades rurais produtivas pertence a agricultores familiares e a adoção de políticas públicas visando fortalecer esta atividade é justificada pelos dados referentes ao número de pessoas envolvidas, tamanho da área ocupada, qualidade/quantidade/diversidade de produtos, possibilidade de redução do êxodo rural, além da promoção do desenvolvimento econômico e social dos pequenos e médios municípios (CASTELÕES, 2002; EPAGRI, 2005). A agricultura familiar se mostra essencial à manutenção do agronegócio nacional, todavia, em uma atitude míope, apenas recentemente este segmento do setor produtivo tem sido mais valorizado. No início da década de 90 ainda não existiam ações nacionais voltadas ao seu atendimento, sendo privilegiados apenas os agricultores mais capitalizados e a esfera produtiva das *commodities* (MATTEI, 2005). Em Santa Catarina, aproximadamente 90% dos produtores rurais dedicam-se à agricultura familiar, mas apenas nos últimos anos foi possível constatar, de forma mais consistente e racional, a busca de atividade produtiva sustentável com maior cuidado para com a saúde dos agricultores e dos consumidores (EPAGRI, 2005). Neste cenário, assume-se que o desenvolvimento dos territórios rurais depende da dinamização da agricultura familiar, da diversificação da economia local e da capacidade de criação de novas fontes geradoras de renda agrícola e não agrícola (CASTELÕES, 2002; EPAGRI, 2005; LEMOS, MARASCHIN, 2008).

A cultura do milho é uma atividade agrícola muito importante na região extremo-oeste de SC e, especificamente em Anchieta, as variedades crioulas daquele cereal continuam fortemente presentes entre as famílias, sendo o seu plantio observado em 40% das propriedades rurais do município (CANCI et al., 2002). A cooperação estabelecida entre os membros do LMBV e NEABio/CCA-UFSC com a ASSO e o SINTRAF decorre da percepção do grande potencial de uso das variedades crioulas de milho (VCM) na área da nutrição e saúde humana, bem como do fato de que o baixo retorno econômico atualmente obtido pelos agricultores familiares que as cultivam se deve, em parte, à falta de conhecimento e valorização das peculiaridades deste germoplasma. O grupo de pesquisa do LMBV vem aplicando a análise metabolômica a um conjunto de VCM e assim, além de conhecimento acadêmico, gera subsídios técnico-científicos que podem aprimorar o uso corrente deste germoplasma, bem como propor novas aplicações e/ou novos produtos derivados de suas biomassas.

Algumas das aplicações correntes da análise metabolômica consistem na identificação e quantificação de metabólitos em tecidos ou órgãos de interesse, na determinação de quais fatores (abióticos) podem alterar estes perfis metabólicos, na comparação de perfis metabólicos entre amostras de diferentes genótipos, ou seja, na identificação dos diversos mecanismos bioquímicos e genéticos que regulam os fluxos metabólicos (OLIVER et al., 2002; SUMNER et al., 2003; BINO et al., 2004; SAGHATELIAN, CRAVATT, 2005; MOCO et al., 2008). Como exemplo desta abordagem analítica, menciona-se um estudo com sementes de milho que eficientemente discriminou variedades modificadas e não modificadas geneticamente, via determinação dos perfis metabólicos das sementes por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) associada à quimiometria. Esta combinação de técnicas analíticas foi capaz de estabelecer padrões diagnósticos e relacionar as variedades modificadas geneticamente com os diferentes eventos de engenharia genética que as geraram (MANETTI et al., 2004). Inserido neste contexto, o presente estudo efetuou a análise metabolômica parcial do tecido foliar proveniente de seis VCM disponibilizadas pelos agricultores de Anchieta-SC e de duas variedades comerciais de milho, desenvolvidas no Brasil.

O aproveitamento das folhas do milho se mostra como uma alternativa interessante para incremento da renda dos agricultores familiares, primeiramente porque elas são produzidas em grande quantidade, em paralelo a produção de grãos. Em segundo lugar, porque ainda não possuem uma finalidade rentável, sendo um resíduo agrícola usualmente utilizado na cobertura do solo e na preparação de forragem para os ruminantes (SCHWAB et al., 2003; COLOMBATTO et al., 2004; FILYA, 2004). Os resultados aqui obtidos sugerem destinos economicamente mais interessantes para a biomassa foliar do milho, considerando a presença de metabólitos secundários e a sua utilização na área da saúde humana e animal. Alguns resultados revelaram a ocorrência de concentração relevante de pigmentos antioxidantes, sendo que a ingestão regular destes compostos está relacionada com a prevenção de doenças degenerativas, como o câncer (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; FARRÉ et al., 2010; JEONG et al., 2010; MARI et al., 2010). Existe um mercado mundial em contínua expansão para produtos e alimentos enriquecidos com compostos antioxidantes de origem natural. Sendo assim, assume-se a real possibilidade de extração de compostos bioativos de alto valor econômico a partir das biomassas do milho, visando sua comercialização junto a setores da indústria.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metaboloma e métodos analíticos

No presente, a humanidade vive uma revolução cultural caracterizada pelos avanços tecnológicos e pelo intenso fluxo de informações, comparável em impacto, ao surgimento da agricultura há aproximadamente 10.000 anos e à Revolução Industrial iniciada no século XIX (PIRAGES, 2000). Algumas inovações tecnológicas ocorridas nas três últimas décadas levaram a uma nova forma de se pensar os sistemas biológicos e principalmente, de pesquisá-los (OLIVER et al., 2002; COSTA, 2008; JABLONKA, LAMB, 2010). Na área biológica, o marco inicial desta revolução foi denominado era genômica, sendo caracterizado pelo desenvolvimento, padronização e otimização das técnicas de engenharia genética (SUMNER et al., 2003). Os ensaios genômicos evoluíram rapidamente e o imenso volume de dados genéticos possibilitou o aprofundamento da análise das variações temporais e espaciais no acúmulo de transcritos, proteínas e metabólitos. Esta nova fase da atual revolução na área biológica foi denominada de era pós-genômica, ou da genômica funcional (FELL, 2001).

O termo metaboloma foi cunhado no ano de 1998, denominando a análise da concentração relativa de metabólitos resultante de modificações no padrão de expressão de um gene (OLIVER et al., 1998; SUMNER et al., 2003; GOODACRE et al., 2004). A originalidade do uso do termo metaboloma por Oliver *et al.* (1998), deve-se não a inovações nas técnicas utilizadas, mas sim ao estabelecimento, pela primeira vez, do uso deste conjunto de técnicas, como complemento das outras áreas “-ômicas” (SUMNER et al., 2003). De modo geral, a partir de então o termo passou a designar uma estratégia de análise bastante complexa, que se refere ao levantamento quantitativo e qualitativo dos metabólitos presentes em um organismo, ou em um dado tecido, no momento da análise (OLIVER et al., 1998; OLIVER et al., 2002; BINO et al., 2004; GOODACRE et al., 2004; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005).

Qualquer alteração induzida geneticamente, epigeneticamente, ou por influência do ambiente é manifestada em última instância, através de alterações na concentração de metabólitos. Comparando os perfis metabólicos gerados em tecidos que diferem geneticamente, ou no seu estado epigenético, diferenças genômicas funcionais podem ser acessadas (OLIVER et al., 2002; SUMNER et al., 2003; BINO et al., 2004; SAGHATELIAN,

CRAVATT, 2005; FERNIE, SCHAUER, 2008; KEURENTJES, 2009).

O estado epigenético se refere a alterações singulares que a célula possui em seu material genético, não estando associadas a mudanças na sequência do DNA, mas sim a modificações na conformação assumida por estas moléculas. Modificações epigenéticas são capazes de alterar a expressão dos genes, pelo aumento ou diminuição do acesso de vários fatores de transcrição às regiões de transcrição dos genes. O controle epigenético pode ser alcançado através da expansão e dispersão de sequências repetitivas de DNA ao longo dos genomas, que por sua vez podem desencadear alterações na estrutura da cromatina e na organização das histonas nos nucleossomas. Outro mecanismo que participa do controle epigenético é a alteração da população de RNA de interferência (HABU et al., 2001; BRUCE et al., 2007; COSTA, 2008; JABLONKA, LAMB, 2010).

Mudanças no controle epigenético podem levar a profundas alterações fenotípicas e, nos vegetais, estão intimamente envolvidas na construção das “memórias”. Estudos indicam que algumas situações ambientais podem imprimir uma marca no genoma do indivíduo, através de mecanismos que envolvem a metilação do DNA, alterando deste modo a estrutura da sua cromatina e o *status* epigenético de suas células. Ou seja, informações do ambiente externo causam uma reprogramação do ambiente celular. Eventos como a vernalização, a organização dos meristemas apical e da raiz, a determinação do período de floração, o desenvolvimento da semente e a repressão da ativação do endosperma antes da fertilização, são fenômenos governados através de mecanismos epigenéticos (HABU et al., 2001; STEIMER et al., 2004; BOND, FINNEGAN, 2007; BRUCE et al., 2007; GEHRING, HENIKOFF, 2007; PARKINSON et al., 2007; COSTA, 2008; JABLONKA, LAMB, 2010).

O metabolismo é uma rede complexa de reações altamente ordenada e interconectada, de modo que mesmo pequenas alterações, como a diminuição na concentração de apenas uma enzima ou a alteração da sua atividade, podem levar à alteração simultânea na concentração de centenas de metabólitos. Desta forma, a análise do metaboloma pode fornecer uma ligação direta entre o genoma, o transcriptoma e o proteoma e revelar quais fatores influenciam diretamente uma dada função biológica (FELL, 2001; WOOD, 2001; OLIVER et al., 2002; BINO et al., 2004; GOODACRE et al., 2004; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005; FERNIE, SCHAUER, 2008; KEURENTJES, 2009).

Até o presente, a utilização de uma única técnica não possibilita a obtenção do quadro metabolômico completo de uma dada amostra, sendo necessária a adoção de um conjunto interdisciplinar de abordagens que integra a biologia, a química analítica, a química orgânica, a quimiometria e a informática (FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005). As técnicas analíticas comumente utilizadas na metabolômica são as cromatografias líquida (CL) ou gasosa (CG), associadas ou não à espectrometria de massa (EM) e as espectroscopias de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transformed infrared* – FTIR) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN) (ABHYANKAR et al., 2005; MITCHELL, CARMICHAEL, 2005; WIND et al., 2005; KEURENTJES, 2009). Os levantamentos metabolômicos podem ser conduzidos de modo seletivo ou de modo não seletivo. No caso das análises seletivas, a atenção se focaliza na caracterização de um composto, ou de um conjunto de metabólitos pertencente a uma classe específica (*target compounds*), permitindo assim um aumento na sensibilidade e normalmente se preocupando com a quantificação do(s) analito(s). Técnicas como a CL e CG são utilizadas nesta forma de análise. De outra maneira, as análises conduzidas no modo não seletivo procuram condições que permitam a observação simultânea do maior número de compostos nas amostras, geralmente não se preocupando com a sua quantificação. Técnicas como a RMN, a FTIR e a EM podem ser empregadas na execução destas análises menos seletivas (GOODACRE et al., 2004; FERNIE, SCHAUER, 2008).

Geralmente, os dados metabolômicos são tratados através de métodos de análise multivariada, primeiramente em função do enorme volume de informações que deve ser considerado (32.000 dados/espectro ¹H RMN, e.g.) e também porque grande parte do que se deseja elucidar são relações complexas, lineares ou não-lineares. O uso da matemática e de ferramentas da estatística para a análise de um (mega)conjunto de informações químicas recebe a denominação de quimiometria. Os métodos de análise multivariada comumente utilizados na quimiometria incluem a análise dos componentes principais (PCA), a análise de agrupamentos hierárquicos, a regressão múltipla e as análises discriminatória, fatorial e canônica (LEARDI, 2003; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005).

3.1.1 Metaboloma vegetal

Organismos vegetais são fontes de milhares de compostos orgânicos com estrutura, função e utilização apenas parcialmente esclarecidas. Acredita-se que na natureza existam entre 100.000 a 200.000 metabólitos originários de vias biossintéticas secundárias (SCHWAB, 2003; BINO et al., 2004; KEURENTJES, 2009) e que em uma única folha de *Arapdopsis thaliana* possam ser encontrados aproximadamente 5.000 diferentes metabólitos primários e secundários. Todavia, no presente momento, a análise metabolômica ainda está muito limitada em sua compreensão deste complexo quadro, já que a tecnologia disponível permite que se acesse apenas uma parte dos metabolomas, i.e., metabolômica parcial. Apesar desta limitação, a análise metabolômica vem sendo adotada como rotina para o estudo de espécies vegetais e diversas revisões foram publicadas sobre os avanços que seu uso vem possibilitando (SCHWAB, 2003; SUMNER et al., 2003; GOODACRE et al., 2004; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005; HALL, 2006; KEURENTJES, 2009).

O levantamento metabólico em vegetais foi realizado em larga escala pela primeira vez por Roessner et al. (2000; 2001), os quais detectaram simultaneamente 150 compostos em amostras de tubérculo de *Solanum tuberosum* (batata), via CG/EM, sendo que 77 destes metabólitos foram identificados como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. De forma similar, outro trabalho utilizando CG/EM, em amostras de diferentes acessos de *A. thaliana*, identificou e quantificou pouco mais de 300 compostos, permitindo o estabelecimento de perfis metabólicos correlacionados com cada genótipo em estudo (WOOD, 2001). Por sua vez, o acoplamento da CL à EM foi empregado na análise do exsudato de floema de *Curcubita maxima*, detectando açúcares, aminoácidos e alguns glicosídeos (FIEHN, 2003). A ressonância magnética nuclear de hidrogênio (1H RMN), associada à análise quimiométrica (PCA) foi utilizada com sucesso na determinação do metaboloma de flores de 12 variedades de *Cannabis sativa*, com o intuito de identificar características químicas peculiares àqueles genótipos (CHOI et al., 2004). De fato, a análise metabolômica é considerada uma ferramenta de grande potencial para a identificação e controle de qualidade de variedades vegetais (KUHNEN, 2007; KUHNEN et al., 2008a; KUHNEN et al., 2008b; FERNIE, SCHAUER, 2008; MOCO et al., 2008). Tendo também sido empregada eficientemente para acessar alterações metabólicas decorrentes de modificações genéticas, fornecendo um elo, entre dada manipulação genética e

seu efeito sobre uma rede metabólica (WOOD, 2001; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005; FERNIE, SCHAUER, 2008). Assume-se como uma possibilidade adicional gerada pelos estudos metabolômicos de espécies agrícolas, o mais rápido e eficiente desenvolvimento de variedades que combinem aparência e sabor atraentes, com níveis superiores de fitonutrientes (e.g., flavonóides e carotenóides - BINO et al., 2004; FERNIE, SCHAUER, 2008).

No presente, o grande desafio da metabolômica vegetal parece ser o de encontrar padrões nas redes metabólicas que estejam diretamente correlacionadas com as alterações fenotípicas ou fisiológicas nos tecidos ou órgãos avaliados (GOODACRE et al., 2004; FERNIE, SCHAUER, 2008; KEURENTJES, 2009).

Almejando conhecer o maior número de metabólitos presentes nas folhas das variedades de milho sob análise, foram obtidos extratos com o uso de sistemas de solventes abrangendo uma ampla faixa de solubilidade: 1) hexano: acetona [50: 50, v/v], 2) metanol, 3) metanol acidificado (HCl 1%), 4) etanol: água [em diferentes proporções] e 5) água. Para a caracterização de cada um destes extratos foram empregadas técnicas não seletivas e seletivas. Uma análise exploratória mais abrangente foi obtida através da espectrofotometria de varredura UV-vis (200 a 700 nm) e da espectrometria de massa (EM) com interface de ionização/desorção assistida por laser acoplada a um analisador de tempo de voo (MALDI-TOF - *matrix assisted laser desorption ionization time of flight*). Sendo tais técnicas analíticas complementadas por outras de maior seletividade, objetivando, além da identificação, a quantificação dos compostos de interesse. Neste contexto, foram utilizados métodos espectrofotométricos para a quantificação dos carotenóides totais (Lambert-Beer, 450 nm - BRITTON, 1992), dos compostos fenólicos (reativo de Folin-Ciocalteu, 725 nm - RANDHIR et al., 2002), das antocianinas (Lambert-Beer, 530 nm - MADHAVI et al., 1996) e das proteínas (método de Bradford, 595 nm - BRADFORD, 1976). Um maior detalhamento da composição química dos extratos foi obtido através da associação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a EM MALDI-TOF.

3.2 Milho – origem, dispersão e diversidade genética

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família *Poaceae* e à tribo *Maydeae*, que compreende sete gêneros, sendo dois nativos do Hemisfério Ocidental, *Zea* e *Tripsacum*, e cinco originários da Ásia.

O gênero *Zea* é formado por cinco espécies, o milho (*Z. mays*), e quatro outras conhecidas como teosinte, denominadas de *Z. parviglumis*, *Z. luxurians*, *Z. perennis* e *Z. diploperennis*. Evidências genéticas e morfológicas sugerem que a seleção efetuada pelo homem durante milhares de anos sobre o teosinte foi o processo responsável pelo surgimento das formas ancestrais do milho (WHITE, DOEBLEY, 1998; BENZ, 2001; STALLER, 2003; KANE, RIESEBERG, 2005). Estes agricultores partiram de uma gramínea com vários colmos e espigas pequenas contendo grãos encapsulados de difícil aproveitamento, e obtiveram uma planta com um único colmo e grandes espigas, com grãos de fácil acesso e melhor qualidade nutricional (WHITE, DOEBLEY, 1998; FREITAS, 2001; JAENICKE-DESPRÉS *et al.*, 2003; KANE, RIESEBERG, 2005; BUCKLER *et al.*, 2006).

Estudos sobre a evolução do milho utilizando técnicas baseadas em isoenzimas e microsátélites indicaram a Costa do Pacífico, no México, mais especificamente na região das terras altas da Bacia do Rio Balsas, como o centro de origem deste cereal (LÜBBERSTEDT *et al.*, 1998; WHITE, DOEBLEY, 1999; BENZ, LONG, 2000; POPE *et al.*, 2001; JAENICKE-DESPRÉS *et al.*, 2003; MATSUOKA *et al.*, 2003; KANE, RIESEBERG, 2005; BUCKLER *et al.*, 2006). No México, amostras de espigas de oito carreiras de grãos, datando aproximadamente 4700 anos, constituem evidências arqueológicas da domesticação do milho. Estes materiais foram encontrados na localidade de Guilá Naquitz, no estado de Oaxaca e em uma série de cavernas localizadas nas terras altas de Tehuacán, em Puebla (STALLER, THOMPSON, 2002; STALLER, 2003).

Aparentemente, características positivas presentes no milho, relacionadas com a sua morfologia, bem como à qualidade nutricional mais elevada de seus grãos, foram fixadas há aproximadamente 4000 anos, através da presença de genes favoráveis em *loci* controladores. Sugere-se que durante o período de domesticação, a seleção humana tenha primeiramente buscado tornar o milho mais cultivável e facilitar o acesso a suas sementes. Já durante a fase de melhoramento, a seleção parece ter sido focalizada no incremento da produtividade e da qualidade nutricional dos grãos, além da melhoria de outros aspectos agrossistêmicos (JAENICKE-DESPRÉS *et al.*, 2003; BUCKLER *et al.*, 2006). Apesar da grande diferença morfológica existente entre o milho e o teosinte, estas gramíneas são muito parecidas geneticamente, com seus híbridos se mostrando férteis. Estudos indicam que diferenças na regulação gênica, ou seja, no estado

epigenético, levaram ao surgimento de tamanha divergência na forma, apesar da similaridade gênica (WHITE, DOEBLEY, 1998; JAENICKE-DESPRÉS *et al.*, 2003).

Segundo Jablonka e Lamb (2010), o estresse resultante do processo de domesticação pode levar as espécies a aumentarem a sua variabilidade fenotípica através da ativação de diversos mecanismos de controle epigenético. A seleção efetuada pelo homem teria então canalizado a evolução do milho, através da escolha dos fenótipos mais adequados. Os traços que distinguem o milho do teosinte são primariamente controlados por 5 segmentos cromossômicos. Uma região denominada *tga 1* (*teosinte glume architecture 1*), localizada no cromossomo 4, é responsável pelas alterações que tornaram os grãos de milho mais acessíveis ao consumo humano. Isto ocorreu através da retirada de uma cápsula protetora bastante endurecida, a gluma, existente no teosinte. Outra região *tb 1* (*teosinte branched 1*), localizada no cromossomo 1, interage com a região *ba 1* (*barren stalk 1*), localizada no cromossomo 3, para o controle dos meristema laterais, levando a existência de um único colmo no milho. Além disso, *tg 1* e *ba 1* também controlam a formação das inflorescências deste vegetal, levando a formação das inflorescências femininas nos ramos laterais, no caso do milho. Outra região gênica *pbf* (*prolamin box binding factor*) codifica um fator envolvido no controle da expressão das proteínas de reserva nos grãos de milho, enquanto *su 1* (*sugary 1*) codifica para uma enzima desramificadora de amido, influenciando na estrutura dos polímeros de amilopectina. Regiões gênicas menos conhecidas, mas provavelmente envolvidas com o processo de domesticação do milho, são *rs 1* (*ramosa 1*) que parece influenciar a arquitetura da espiga, *zfl 2* (*zeafloricaula/leafy 2*) que parece controlar o desenvolvimento do meristema floral, *ts 2* (*tassel seed 2*) e *d 8* (*dwarf 8*), genes reguladores envolvidos com a determinação sexual dos tecidos meristemáticos (JAENICKE-DESPRÉS *et al.*, 2003; KANE, RIESEBERG, 2005; BUCKLER *et al.*, 2006).

O homem é considerado o principal agente difusor do milho, já que este vegetal se reproduz apenas através de cultivo e não dispõe de mecanismos eficientes de propagação e dispersão naturais (PATTERNIANI *et al.*, 2000; FELIPIIM, 2001). A partir do México, a dispersão auxiliada pelo homem levou o milho para o norte em direção ao Canadá e para o sul, até a região da Patagônia argentina, milhares de anos antes da chegada dos colonizadores europeus (FREITAS, 2001; FREITAS *et al.*, 2003).

A determinação do momento em que o milho adentrou a América do Sul é controversa, com dois cenários predominantes

sendo apresentados pelos autores que se dedicam à pesquisa nesta área. Alguns defendem que o milho chegou àquela região entre 8000 e 7000 anos atrás, baseando-se principalmente em informações obtidas a partir da análise de fitólitos de grânulos de amido, hipoteticamente provenientes de grãos e de folhas de milho (PIPERNO, 2003; PIPERNO, 2009). Outros autores propõem datas mais recentes para a introdução deste cereal na América do Sul, entre 4200 e 3900 anos atrás (STALLER, THOMPSON, 2002; STALLER, 2003). Esta última corrente arqueológica parece mais consistente, sendo corroborada pela cronologia construída através das evidências genéticas para a origem e a domesticação do milho. Sugere-se também que a chegada do milho à América do Sul esteja mais fortemente associada ao seu emprego no preparo de uma bebida fermentada (“chicha”), utilizada em cerimônias sagradas e rituais, comparativamente ao seu uso como alimento. Afirma-se que foram estes usos cerimoniais, associados às características da cultura andina, que garantiram a rápida expansão do milho para as terras altas e baixas da América Latina (STALLER, 2003). Índícios arqueológicos apontam para um aumento na importância do milho como alimento, no vale do Rio Orinoco - Bacia Amazônica/Venezuela, há apenas 3000 anos (PERRY, 2004).

Estudos indicam que o milho chegou ao Brasil através de dois grandes eventos migratórios dos povos Tupi-Guarani. Um primeiro evento ocorrido na região Norte a partir da Bacia Amazônica, e um segundo ocorrido na região sul, a partir do Paraguai (PERRY, 2004). Os Guaranis são conhecidos como povos plantadores de milho, existindo registro do cultivo sistemático de pelo menos treze variedades, entre elas o *Avatí moroti*, de grãos farináceos e coloração amarelo-clara, havendo também variantes de grãos totalmente brancos (FELIPIM; 2001). Outro estudo relata variedades de grãos amarelos e espigas pequenas (*Avati ju*), grãos amarelos e espiga grande (*Avati ju guaçu*), grãos brancos e macios (*Avati si*), grãos coloridos (*Avati para’i*) e também uma variedade precoce de grãos macios e espiga pequena (*Avati’i* – milho criança, LITAI, DARELLA, 2000). Na época do contato com os colonizadores europeus, os Guaranis também cultivavam um milho de grão branco e duro que foi adotado pelo homem civilizado, originando a variedade comercial conhecida como *Cristal*, utilizada ainda hoje para confecção de canjica. Neste mesmo período histórico, os povos Kaingang cultivavam uma variedade de milho de grãos dentados farináceos, normalmente brancos, mas que também podiam se mostrar amarelos, vermelhos, variegados e roxos (PATTERNIANI et al., 2000).

Quando Colombo retornou à Europa em 1493, levou consigo alguns grãos de milho, cereal até então desconhecido pelos países do Mediterrâneo. Em função dos movimentos de colonização europeus decorridos em apenas 100 anos, comerciantes e navegadores distribuíram este cereal pelos cinco continentes (FREITAS, 2001). Sendo assim, há pelo menos 7000 anos, grupos de agricultores com distintas tradições culturais, vivendo sob diversas condições ambientais, cultivam e selecionam sementes de *Z. mays*, legando às gerações atuais o milho altamente domesticado e produtivo (FREITAS, 2001; BUCKLER et al., 2006).

No presente, são conhecidos cinco tipos principais de grãos de milho, classificados segundo o endosperma - pipoca, duro, dentado, farináceo e doce - existindo tipos intermediários, como o semi-duro ou semi-dentado. De cada tipo de grão de milho derivam muitas variedades, cujo número total já ultrapassa as 250 conhecidas e cuja origem está direta ou indiretamente ligada aos trabalhos de seleção/melhoramento efetuados pelas civilizações pré-colombianas (MACHADO, PARTENIANI, 1998). A princípio, as variedades são formas distintas que uma espécie pode apresentar, sendo que tais diferenças podem ser morfológicas, como a cor das flores ou o tamanho dos frutos, mas também bioquímicas, fisiológicas e citológicas. É importante salientar que estas características distintivas devem ser estáveis após a variedade ser multiplicada por sucessivas gerações (BRASIL - MMA, 2005).

A FAO utiliza os termos variedade local, "*landrace*" e variedade tradicional, como sinônimos, significando populações que são produto de melhoramento e seleção efetuada pelos agricultores, deliberadamente ou não, de modo contínuo, através de gerações (ZAID et al., 2001). Zeven (1998) denomina de "*landrace*", aquela variedade com alta capacidade de tolerância a diferentes situações de estresse biótico e abiótico, resultando em uma produtividade mediana e estável, mesmo em sistemas agrícolas de baixo investimento (*input*) energético. Já Louette (2001) considera os termos local e crioula de modo distinto, dividindo as variedades tradicionais em: variedades locais, quando estas nunca passaram pelos processos convencionais de seleção e melhoramento genético, e variedades crioulas, quando derivadas de cultivares que passaram pelo melhoramento formal, mas foram aclimatadas às condições de uma dada região, estando frequentemente misturadas às variedades locais. No caso dos agricultores familiares da região de Chiapas e Oaxaca no México, uma variedade é definida em função das vantagens e desvantagens que ela apresenta, e suas sementes classificadas de modo simples, as que vêm dentro de

embalagens, são comerciais e as que não vêm embaladas são crioulas. Além disso, para estas comunidades, as variedades de milho que passaram pelo processo de melhoramento formal, mas que foram cultivadas durante várias gerações na região e que se aclimataram às condições da localidade, tornaram-se crioulas (BELLON et al. 2006).

A grande diversidade adquirida em milhares de anos de seleção possibilitou ao milho uma ampla adaptação de solo e de clima. Foram identificadas variedades que toleram extremos de pH, deficiência nutricional e hídrica, níveis aumentados de radiação ultra-violeta, diferentes patologias (vírus, bactérias e fungos) e o ataque de herbívoros, (MACHADO, PARTENIANI, 1998; UDRY, 2000; FREITAS, 2001).

Esta grande flexibilidade e adaptação a diferentes situações ambientais e de estresse se deve em grande parte à elevada diversidade genética e epigenética apresentada pelo milho. Até um terço dos genes ou dos fragmentos gênicos pode ser específico para cada variedade deste cereal, ou seja, duas variedades podem ser mais distintas entre si do que os seres humanos se distanciam geneticamente dos chimpanzés (BUCKLER et al., 2006). Todavia, além de diferenças com relação à sequência do DNA, as variedades de milho também apresentam padrões de controle epigenético da expressão de seus genes bastante distintos. É interessante notar que os genes mais importantes para a domesticação do milho transcrevem para fatores envolvidos na regulação de outros genes, indicando que a maior parte da diferença entre o milho e o teosinte se concentra no padrão de expressão dos seus genes e não em alterações na sequência de aminoácidos de suas proteínas (JAENICKE-DESPRÉS et al., 2003; KANE, RIESEBERG, 2005; BUCKLER et al., 2006; KEURENTJES, 2009).

O milho tem um genoma grande e complexo, com até 80% do seu DNA sendo formado por sequências repetitivas, em grande parte, relacionadas a elementos de transposição e sujeitas a variados mecanismos de controle epigenético. A localização destes elementos de transposição a menos de 1 kilobase dos sítios de início de transcrição, aponta para o seu envolvimento com a expressão dos genes (MARTIESSEN, 1996; WHITE, DOEBLEY, 1998; GERING, HENIKOFF, 2007; ZHAO et al., 2007). Sugere-se que a inserção e a deleção destas sequências repetitivas possam dirigir o processo evolutivo no milho, gerando as diferenças observadas entre as suas variedades, por exemplo. Elementos transposicionais são candidatos atraentes para tais processos

evolutivos de divergência, pois podem ser ativados em resposta a condições que imponham estresse genômico ou ambiental, como radiação UV, infecção por patógenos, ou hibridação interespecífica. O genoma do milho é muito dinâmico e parece ter acumulado elementos de transposição em maior grau que os seus parentes mais próximos como o sorgo (WHITE, DOEBLEY, 1998; ZHAO et al., 2007).

Tamanha diversidade genética e epigenética podem estar relacionadas com uma grande diversidade química presente nos tecidos/órgãos das variedades de milho. Existe uma íntima relação entre a morfologia, a fisiologia e a bioquímica vegetal e um exemplo disto são as alterações observadas para a obtenção do milho a partir do teosinte. Conforme já mencionado, uma das alterações na arquitetura da inflorescência feminina do milho foi a supressão do desenvolvimento da gluma. Sugere-se que a perda desta camada protetora possa ter induzido o surgimento de maior pigmentação nos grãos de algumas variedades de milho, principalmente compostos fenólicos e antocianinas. A ativação de novas vias metabólicas, em resposta à seleção genética que resultou na forma da espécie vegetal, indica a relação existente entre a divergência genética, a morfologia e as diferenças metabólicas (STAFFORD, 1998). No milho, diversos *loci* relacionados ao controle do padrão de pigmentação de seus tecidos estão sujeitos à paramutação. Ou seja, um alelo pode ter a sua expressão alterada, de modo herdável, pela ação de outro alelo, quando em heterozigose. Um exemplo é o locus *red* (*r*), um complexo contendo muitos genes *r* duplicados que codificam para fatores de transcrição. Tais fatores regulam a atividade de genes envolvidos com a síntese das antocianinas (MARTIESSEN, 1996; GERING, HENIKOFF, 2007). Os alelos paramutados no milho normalmente sofrem mudanças no seu padrão de metilação, alterando deste modo sua expressão. Sendo assim, um novo padrão de coloração pode surgir em resposta a um estímulo ambiental, como o aumento de incidência de luz solar, após a retirada da proteção da gluma.

3.3 Milho – metabólitos de interesse no tecido foliar

O milho é um vegetal direcionado à produção de grãos, sendo uma das espécies mais eficientes no armazenamento e conversão de energia luminosa, com a maior parte da sua matéria seca (≈ 90%) tendo origem a partir da fixação de CO₂, via fotossíntese. Segundo técnicos da EMBRAPA (MAGALHÃES et al., 2002), um incremento na produtividade do milho poderia ser alcançado através

do melhoramento genético direcionado ao aumento na eficiência fotossintética, através de alterações em algumas rotas bioquímicas. Portanto, um maior conhecimento da morfologia, da fisiologia e da bioquímica do milho permitiria avanços na caracterização de suas variedades e auxiliaria na definição de aspectos de interesse para a manipulação em programas de melhoramento genético assistido (MAGALHÃES et al., 2002; RICCARDI et al., 2004).

Algumas das variedades crioulas de milho de Anchieta-SC apresentam um padrão fenotípico singular na coloração de seus grãos, flores e folhas (**Figura 1**), revelando diferenças quantitativas e qualitativas nos pigmentos presentes naqueles tecidos. Os principais metabólitos secundários associados à coloração do tecido foliar são as clorofilas (verde), os carotenóides (amarelo, alaranjado e vermelho) e os compostos fenólicos (rosa, vermelho, púrpura e azul). Os carotenóides e os compostos fenólicos foram considerados nesta pesquisa, de modo similar ao realizado pela equipe do LMBV para os grãos e flores femininas das VCM (KUHNEN, 2007).

É crescente o número de descobertas científicas associadas a fitoquímicos que dificultam o estabelecimento de processos degenerativos em humanos (HASHIMOTO, 2003; SEO et al., 2003; ZIELINSKI, 2003; WU et al., 2004; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; FARRÉ et al., 2010; JEONG et al., 2010; MARI et al., 2010). Em relação ao milho, especificamente, existem registros etnobotânicos do uso terapêutico dos extratos aquosos de suas inflorescências femininas (“cabelo de milho”), principalmente em função do seu efeito diurético, auxiliando na eliminação de cálculos renais, no tratamento da hipertensão e de certas neoplasias, principalmente aquelas relacionadas ao trato urogenital (Dr DUKE’S DATABASE, 2005; VELÁZQUEZ et al., 2005). Os efeitos benéficos de *Z. mays* sobre a saúde humana relatados pela medicina tradicional podem, em alguma extensão, estar associados à presença de metabólitos secundários bioativos nos seus tecidos.

Por fim, os resultados obtidos com o presente trabalho de doutoramento podem viabilizar a comercialização da biomassa foliar das VCM como fonte de compostos com alto valor agregado, e.g. carotenóides e compostos fenólicos, úteis no setor farmacêutico, cosmético e alimentício.




	<p>Mato Grosso Palha Roxa (MG): variedade de porte alto, com grãos dentados, endosperma amarelo e grãos com o pericarpo pigmentado de roxo na porção da coroa. Cerca de 50% das plantas possuem caule, sabugos e palha da espiga de coloração roxa intensa. Resistentes ao ataque de patógenos. Apresenta pigmentação na bainha das folhas e na proximidade de lesões no tecido foliar. Ciclo de 66 dias até o início da liberação do pólen e rendimento médio de 5645 Kg grãos/ha.</p>				
	<p>Palha Roxa (PR): variedade de porte alto, cultivada em Anchieta há mais de 20 anos. A palha das espigas e outros tecidos apresentam coloração roxa intensa. Os grãos são dentados, de endosperma amarelo e pericarpo incolor, roxo apenas na região da coroa, ou com a pigmentação avermelhada distribuída de modo homogêneo. Apresenta pigmentação no tecido foliar, principalmente nas nervuras e bainha das folhas. Ciclo de 70 dias até o início da liberação do pólen e rendimento médio de 5510 Kg grãos /ha.</p>				
	<p>Roxo (RX): variedade com porte alto, de grãos dentados e coloração roxa intensa, concentrada no pericarpo. Esta variedade foi obtida a partir da segregação dos grãos roxos da variedade Palha Roxa, apresentando certa percentagem das plantas com a bainha da folha e a palha da espiga caracteristicamente pigmentados. Rendimento médio 4735 Kg grãos/ha.</p>				
	<p>Rajado 8 Carreiras (RC): composto precoce, com espigas de oito carreiras de grãos dentados que podem apresentar variações de coloração de endosperma (branco ou amarelo) e pericarpo sem pigmentação, roxo ou com estrias castanhas que fazem com que os grãos sejam rajados. Variedade de porte médio, que pode apresentar pigmentação avermelhada na bainha foliar e na palha da espiga. Rendimento médio de 5454 Kg grãos/ha.</p>				
	<p>Língua de Papagaio (LP): variedade composta, com espigas multicoloridas formadas por grãos que podem apresentar endosperma amarelo ou branco, e pericarpo incolor (maioria) ou avermelhado. Até 50% dos grãos podem apresentar a camada mais externa do endosperma com coloração preto-azulada. Apresenta certa percentagem das plantas com pigmentação arroxada na palha da espiga e bainha das folhas. Ciclo de 71 dias até a liberação do pólen e rendimento médio de 5804 Kg grãos/ha.</p>				
	<p>MPA 01 (MP): variedade desenvolvida a partir de 30 populações distintas, 18 variedades comerciais sintéticas, 4 de polinização aberta, 3 crioulas (Cateto, Mato Grosso Palha Roxa e Amarelão) e 5 de origem desconhecida. Possui porte alto, grãos dentados de endosperma amarelo e pericarpo despigmentado. Apresenta pigmentação na palha e bainhas foliares em alguns indivíduos. Ciclo de 72 dias até o início da liberação do pólen e rendimento médio de 7453 Kg grãos/ha.</p>				
 (MG)	 (PR)	 (RX)	 (RC)	 (LP)	 (MP)

Figura 1: Características fenotípicas das variedades crioulas de milho cujo metaboloma foliar parcial foi determinado no presente estudo (CANCI et al. 2004; ALVES et al., 2007). Destaque para a variabilidade de coloração das folhas, grãos, flores femininas e palhas da espiga.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Determinar o perfil metabólico parcial do tecido foliar das variedades crioulas de milho: Mato Grosso Palha Roxa (MG), Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC), Língua de Papagaio (LP) e MPA 1 (MP).

Objetivos Específicos

- a) Determinar o perfil espectral UV-visível (200 a 700 nm) de extratos do tecido foliar das variedades de milho;
- b) Extrair e quantificar as frações (poli)fenólica, antociânica e carotenóideica totais nas amostras de tecido foliar das variedades em estudo;
- c) Analisar quali/quantitativamente os ácidos fenólicos e os carotenóides do tecido foliar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- d) Identificar as classes de compostos fenólicos presentes no tecido foliar, via espectrometria de massa (MALDI TOF) com injeção direta;
- f) Propor novas formas de aproveitamento para o tecido foliar do milho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHYANKAR, G.; REDDY, V.D.; GIRI, C.C.; RAO, K.V.; LAKSHMI, V.V.S.; PRABHAKAR, S.; VAIRAMANI, M.; THIPPESWAMY, B.S. & BHATTACHARYA, P.S. Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. **Phytochemistry**, 66: 2441–2457 (2005).

ALVES, A.C.; OGLIARI, J.B.; CANCI, A.; BALBINOT Jr, A.A.; KIST, V. Produtividade de grãos de milho crioulo. In: ALVES, A.C.; OGLIARI, J.B.; CANCI, A. **Produtividade de grão e qualidade da semente do milho crioulo**. Instituto Porerekan/UFSC (2007).

BELLON, M.R.; ADATO, M.; BECERRIL, J.; MINDEK, D. Poor farmers' perceived benefits from different types of maize germplasm: The case of creolization in lowland tropical Mexico. **World Development**, 34: 113–129 (2006).

BENZ, B.F.; LONG, A. prehistoric maize evolution in the Tehuacan Valley. **Current Anthropology**, 4: 459-465 (2000).

BENZ, B.F. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz, Oaxaca. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 98: 2104-2106 (2001).

BINO, R.J.; HALL, R.D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B.J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M.H.; TRETHERWEY, R.N.; LANGE, B.M.; WURTELE, E.S.; SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, 9: 418:425 (2004).

BOND, D.M.; FINNEGAN, E.J. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. **TRENDS in Plant Science**, 12: 211-216 (2007).

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**, 72: 248-254 (1976).

BRASIL- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) **Agricultura familiar: biodiversidade e segurança alimentar**. Brasília. (2004).

BRASIL – MMA. Regras para o Acesso Legal ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado. Coordenação Técnica: Cristina Maria do A. Azevedo e Fernanda Álvares da Silva. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, DEPARTAMENTO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO. Brasília – DF. Abril (2005).

BRITTON, G. Natural food colorants. **Carotenoids**, 5: 141-182 (1992).

BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.A.; NAPIER, J.A.; PICKET, J.A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, 173: 603–608 (2007).

BRUSH, S. B. **Genes in the field: On farm conservation of crop diversity**. Co-published by IPGRI, Rome-Italy. Lewis Publishers, Boca Raton-USA and IDRC, Ottawa-Canada. (2001).

BUCKLER, E.S.; GAUT, B.S.; MCMULLEN, M.D. Molecular and functional diversity of maize. **Current Opinion in Plant Biology**, 9: 172–176 (2006).

CANCI, A. **Sementes crioulas: construindo soberania a semente na mão do agricultor**. São Miguel do Oeste: McLee, (2002).

CASTELÕES, L. **Agricultura familiar ocupa a maior parte da área rural brasileira**. Artigo acessado em 21/10/2005. <http://www.comciencia.br/reportagens/ppublicas/pp07.htm> (2002)

CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; HAZEKAMP, A.; ERKELENS, A.; LEFEBER, A.W.M.; VERPOORTE, R. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Natural Products**, 67: 953-957 (2004).

COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; PHIPPS, R.H.; OWEN, E. *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Animal Feed Science and Technology**, 11: 111–128 (2004).

COSTA, F.F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, 410: 9–17 (2008).

DR DUKE'S DATABASE. **Phytochemical and Ethnobotanical Databases**. Acessado em 19/10/2005. http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/pl_act.xsql?taxon=1077 (2005).

EPAGRI. Página acessada em 21/10/2005. <http://www.epagri.rct-sc.br/epagri/index.jsp> (2005).

FARRÉ, G.; SANAHUJA, G.; NAQVI, S.; BAI, C.; CAPELL, T.; ZHU, C.; CHRISTOU, P. Travel advice on the road to carotenoids in plants. **Plant Science**, 179: 28–48 (2010).

FELIPIM, AP. **O sistema agrícola guarani mbyá e seus cultivares de milho: um estudo de caso na aldeia guarani da Ilha do Cardoso, município de Cananéia - SP**. Dissertação de Mestrado. Ciências Florestais. ESALQ, USP. (2001).

FELL, D.A. Beyond genomics. **TRENDS in Genetics**, 17: 680-682 (2001).

FERNIE, A.; TADMOR, Y.; ZAMIR, D. Natural genetic variation for improving crop quality. **Current Opinion in Plant Biology**, 9: 196–202 (2006).

FERNIE, A.R.; SCHAUER, N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? **TRENDS in Genetics**, 25: 39-48 (2008).

FIEHN, O. Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. **Phytochemistry**, 62: 875–886 (2003).

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, 116: 141–150 (2004).

FREITAS, F. O. **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. (2001).

FREITAS, F.O.; BENDEL, G.; ALLABY, R.B.; BROWN, T.A. DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. **Journal of Archaeological Science**, 30: 901–908 (2003).

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

FURHMANN, E. **Anchieta é referência em agroecologia**. Artigo acessado em 20/05/2006.
http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.asp?subcategoriad=10&id=7766 2004.

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA methylation dynamics in plant genomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1769: 276–286 (2007).

GERMAN, J.B.; WATKINS, S.M.; FAY, L. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. **Journal of American Dietetic Association**, 105: 1425-1432 (2005).

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W.B.; HARRIGAN, G.G.; KELL, D.B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. **TRENDS in Biotechnology**, 22: 245-252 (2004).

HABU, Y.; KAKUTAN, T.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. **Current Opinion in Genetics & Development**, 11: 215–220 (2001).

HALL, R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, 169: 453–468 (2006).

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

HASHIMOTO, Y. Structural development of synthetic retinoid and thalidomide-related molecules. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 52: 16–23 (2003).

JABLONKA, E.; LAMB, M.J. **Evolução em quatro dimensões. DNA, comportamento e história da vida.** Tradução: Cláudio Ângelo. Companhia das Letras, São Paulo. 500 pp (2010).

JAENICKE-DESPRÉS, V.; BUCKLER, E.S.; SMITH, B.D.; GLIBERT, M.T.P.; COOPER, A.; DOEBLEY, J.; PAABO, SVANTE. Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. **Science**, 302: 1206-1208 (2003).

JEONG, J; JUNG, H.; LEE, S.; LEE, H.; HWANG, K.T.; KIM, T. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. **Food Chemistry**, 123: 338–344 (2010).

KANE, N.C.; RIESEBERG, L.H. Maize genetics: The treasure of the Sierra Madre. **Current Biology**, 15: 137-139 (2005).

KEURENTJES, J.J.B. Genetical metabolomics: closing in on phenotypes. **Current Opinion in Plant Biology**, 12: 223–230 (2009).

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.).** Tese em Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC (2007).

KUHNEN, S.; ALCÂNTARA, G.B.; BOFFO, E.F.; FERREIRA, A.G.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Espectroscopias de RMN de C-13 e H-1 e quimiometria aplicadas à análise da fração amídica de grãos de variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.). **Anais X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear**, Niterói. AUREMN. pp 135-136, 2008a.

KUHNEN, S.; SILVA SANTOS, M.; FERREIRA, A.G.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. RMN de H-1 e quimiometria aplicadas à análise da diversidade química de estigmas/estiletos de variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.). **Anais X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear**, Niterói. AUREMN. pp 69-70, 2008b.

LEARDI, R. Chemometrics in data analysis. In: **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. NAES, T; ISAKSSON, T; FEARN, T; DAVIES, T. NIR Publications, West Sussex. (2003).

LEMOS, P. M. M. ; MARASCHIN, M. **Avanços e perspectivas biotecnológicas na agricultura**. In: PIMENTEL, LO; DEL OLMO, BOFF, SO. (Org.). PROPRIEDADE INTELECTUAL: Gestão do Conhecimento, Inovação Tecnológica no Agronegócio e Cidadania. 1º ed. Florianópolis: Ed. Fundação José Arthur Boiteaux, p. 95-107 (2008).

LITAIF, A.; DARELLA, M.D.P. **Os índios Guarani-Mbya e o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. XXII Reunião Brasileira de Antropologia. Fórum de Pesquisa 3: "Conflitos Socioambientais e Unidades de Conservação". Brasília – DF. (2000).

LOUETTE, D. Traditional management of seed and genetic diversity: what is a landrace? In: BRUSH, S. B. **Genes in the field: On farm conservation of crop diversity**. Co published by IPGRI, Rome-Italy, Lewis Publishers, Boca Raton-USA and IDRC, Ottawa-Canada. (2000).

LÜBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A.E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, 117: 447-450 (1998).

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. (organizadores). **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rede Projetos Tecnologias Alternativas. Rio de Janeiro. (1998).

MADHAVI, D.L.; JUTHANGKON, S.; LEWEN, K.; BERBER-JIMENEZ, M.D.; SMITH, M.A.L. Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa cell cultures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 44: 1170-1176 (1996).

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E. **Fisiologia do Milho**. Circular técnica 22. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. (2002).

MANETTI, C.; BIANCHETTI, C.; BIZARRI, M.; CASCIANI, L.; CASTRO, C.; D'ASCENZO, G.; DELFINI, M.; DI COCCO, M.E.; LAGANÀ, A.; MICCHELI, A.; MOTTO, M.; CONTI, F. NMR-based metabonomic study of transgenic maize. **Phytochemistry**, 65: 3187-3198 (2004).

MARI, A.; TEDESCO, I.; NAPPO, A.; RUSSO, G.L.; MALORNI, A.; CARNONE, V. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of "Annurca" apple, a southern Italian cultivar. **Food Chemistry**, 123: 157-164 (2010).

MARTIESSEN, R. Epigenetic phenomena: Paramutation and gene silencing in plants. **Current Biology**, 6: 810-813 (1996).

MASAKURE, O.; HENSON, S. Why do small-scale producers choose to produce under contract? Lessons from nontraditional vegetable exports from Zimbabwe. **World Development**, 33: 1721-1733 (2005).

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, G.J.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 99: 6080-6084 (2003).

MATTEI, L. **Impacto do Pronaf: análise de indicadores**. Ministério do Desenvolvimento Agrário, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural. (2005).

MITCHELL, S.C.; CARMICHAEL, P.L. Metabonomics and the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 244 (1-2): 10-14 (2005).

MOCO, S.; FORSHED, J.; DE VOS R. C. C. H.; BINO, R. J.; VERVOORT, J. Intra- and inter-metabolite correlation spectroscopy of tomato metabolomics data obtained by liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. **Metabolomics**, DOI 10.1007/s11306-008-0112-8: 1-14, 2008.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C.; KIST, V.; FONSECA, J.A.; BALBINOT, A. **Análise da diversidade genética de variedades locais de milho do Extremo-Oeste de Santa Catarina**. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Agroecologia (CBA). Porto Alegre (2004);

OLIVER, S.G.; WINSON, M.K.; KELL, D.B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **TRENDS in Biotechnology**, 16: 373-378 (1998).

OLIVER, D.J.; NIKOLAU, B.; WURTELE, E.S. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. **Metabolic Engineering**, 4: 98–106 (2002).

PARKINSON, S.E.; GROSS, S.M.; HOLLICK, J.B. Maize sex determination and abaxial leaf fates are canalized by a factor that maintains repressed epigenetic states. **Developmental Biology**, 308: 462–473 (2007).

PATTERNIANI, E.; NASS, L.L.; SANTOS, M.X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Org.) Paralelo 15. Brasília, DF. (2000).

PERRY, L. Starch analyses reveal the relationship between tool type and function: an example from the Orinoco valley of Venezuela. **Journal of Archaeological Science**, 31: 1069-1081 (2004).

PIPERNO, D. A few kernels short of a cob: on the Staller and Thompson late entry scenario for the introduction of maize into northern South America. **Journal of Archaeological Science**, 30: 831–836 (2003).

PIPERNO, D.R. Identifying crop plants with phytoliths (and starch grains) in Central and South America: A review and an update of the evidence. **Quaternary International**, 193 (1-2): 146-159 (2009).

PIRAGES, D. Diversity and social progress in the next millennium: an evolutionary perspective. **Futures**, 32: 513-523 (2000).

POPE, K.O.; POHL, M.E.D.; JONES, J.E.; LENTZ, D.L.; von NAGY; VEGA, F.J.; QUITMYER, I.R. Origin and environmental setting of ancient agriculture in the lowlands of Mesoamerica. **Science**, 292: 1370-1373 (2001).

RANDHIR, R; PREETHI, S; KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and

phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 37: 1247-1256 (2002).

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; JACQUEMONT, M.; VINCENT, D.; ZIVY, M. Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 1003-1011 (2004).

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. (autores); CORADIN, L.; POMBO, V.B. (organizadores). **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 100 p (2008).

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, 23: 131–142 (2000).

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZEER, L.; FERNIE, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**, 13: 11–29 (2001).

SAGHATELIAN, A.; CRAVATT, B.F. Global strategies to integrate the proteome and metaboloma. **Current Opinion in Chemical Biology**, 9: 62–68 (2005).

SCHWAB, E.C.; SHAVER, R.D.; LAUER, J.G.; COORS, J.G. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. **Animal Feed Science and Technology**, 109: 1–18 (2003).

SEO, H.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OH, M.; KIM, H.; KIM, J.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris* herba. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–12 (2003).

STAFFORD, H.A. Teosinte to maize - Some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoids pathways. **Phytochemistry**, 49: 285-293 (1998).

STALLER, J.E.; THOMPSON, R.G. A multidisciplinary approach to understanding the initial introduction of maize into coastal Ecuador. **Journal of Archaeological Science**, 29: 33–50 (2002).

STALLER, J.E. An examination of the paleobotanical and chronological evidence for an early Introduction of maize (*Zea mays* L.) into South America: A response to Pearsall. **Journal of Archaeological Science**, 30: 373–380 (2003).

STEIMER, A.; SCHÖB, H.; GROSSNIKLAUS, U. Epigenetic control of plant development: new layers of complexity. **Current Opinion in Plant Biology**, 7: 11–19 (2004).

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

UDRY, C. V. Economia da biodiversidade para a agricultura. In: **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Org.) Paralelo 15. Brasília, DF. (2000).

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**, 12: 363–369 (2005).

VILELA DE ANDRADE, R. Importância e uso de banco de germoplasma para o melhoramento genético vegetal - milho. In: **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Org.) Paralelo 15. Brasília, DF. (2000).

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. (2005).

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. **Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products**. Wiley & Sons, London. (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. (organizadores). **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rede Projetos e Tecnologias Alternativas. Rio de Janeiro. (1998).

WIND, R.A.; HU, J.; MAYORS, P.D. Slow-MAS NMR: A new technology for *in vivo* metabolomic studies. **Drug Discovery Today: Technologies**, 2: 283-286 (2005).

WHITE, S.; DOEBLEY, J. Of genes and genomes and the origin of maize. **Trends in Genetics**, 14: 327-332 (1998).

WHITE, S.E.; DOEBLEY, J.F. The molecular evolution of terminal ear 1, a regulatory gene in the genus *Zea*. **Genetics**, 153: 1455–1462 (1999).

WOOD, D.; LENNÉ, J.M. The conservation of agrobiodiversity on farm: questioning the emerging paradigm. **Biodiversity and Conservation**, 6: 109-129 (1997).

WOOD, N. Profiling modified metabolomas. **TRENDS in Plant Science**, 6: 191 (2001).

WU, L; CHIANG, Y; CHUANG, H; WANG, S; YANG, G; CHEN, Y; LAI, L; SHYUR, L; Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents. **Pharmaceutical Research**, 21: 2212-2219 (2004).

ZAID, A; HUGHES, HG; PORCEDDU, E; NICHOLAS, F. Glossary of biotechnology for food and agriculture - A revised and augmented edition of the glossary of biotechnology and genetic engineering, **FAO Research and Technology Paper**, 9 (2001).

ZHAO, X.; CHAI, Y.; LIU, B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. **Plant Science**, 172: 930–938 (2007).

ZIELINSKI, H. Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–20 (2003).

CAPÍTULO 1 – Análise de carotenóides foliares de variedades crioulas de milho por espectrofotometria UV-visível, quimiometria e cromatografia líquida de alta eficiência

INTRODUÇÃO

No presente capítulo serão apresentados os resultados referentes à caracterização do extrato hexano: acetona do tecido foliar das variedades de milho em estudo. O tecido foliar do milho é produzido em elevada quantidade (~ 5000 Kg/ha) em paralelo à produção de grãos e assume-se que tal biomassa pode apresentar um teor de carotenóides de interesse. Sendo assim, os extratos foliares foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), visando a identificação e quantificação destes metabólitos. Além desta técnica convencional, foi avaliada uma estratégia paralela que consiste na combinação da espectrofotometria de varredura UV-visível com a análise quimiométrica. Esta forma simples e rápida de análise foi empregada para a discriminação do teor de capsaicinóides, metabólitos responsáveis pela pungência em pimentas *habanero* (DAVIS et al., 2007). Por sua vez, o sistema extrator composto pelos solventes hexano: acetona já demonstrou sua eficiência na análise de compostos carotenóides em grãos e flores femininas de variedades crioulas de milho (KUHNNEN, 2007) e em alimentos derivados de grãos deste cereal (AMAN et al., 2005a).

Carotenóides são compostos que, em geral, apresentam coloração vermelha, alaranjada ou amarela. Ocupam a segunda posição na classe de pigmentos mais abundantes na natureza, tendo sua cor mascarada pela clorofila nos tecidos fotossintetizantes, mas contribuindo de modo significativo para a coloração de frutos como o tomate, ou de raízes, como a cenoura (BARTLEY, SCOLNIK, 1995; SCHOEFS, 2004). Possuem como estrutura química básica um esqueleto tetraterpênico (C₄₀), que pode ser modificado dando origem a mais de 700 compostos. São divididos em dois grandes grupos, os carotenos, altamente apolares e os oxicarotenóides, conhecidos genericamente como xantofilas, com maior polaridade, em função da presença de grupamentos hidroxila em sua estrutura (BARTLEY, SCOLNIK, 1995; HOWITT, POGSON, 2006; FARRÉ et al., 2010).

O papel biológico desempenhado pelos carotenóides nos tecidos vegetais está diretamente relacionado à presença ou ausência de atividade fotossintética no tecido em questão. Em todos os tecidos, estes compostos assumem um papel de proteção contra

os efeitos deletérios causados pela exposição à radiação UV e pelo surgimento de estresse oxidativo. Nas flores e frutos de algumas espécies são essenciais à atração de polinizadores e dispersores, sendo responsáveis não apenas pela coloração, mas também pelo sabor e aroma destes órgãos. Nas sementes, os carotenóides são essenciais à manutenção da via de síntese do ácido abscísico (AAB), um fitohormônio originado a partir da xantofila zeaxantina, após uma série de reações oxidativas (BARTLEY, SCOLNIK, 1995; HOWITT, POGSON, 2006; FARRÉ et al., 2010). Nos tecidos fotossintéticos, os carotenóides estão majoritariamente embebidos nas membranas dos cloroplastos, onde atuam como pigmentos auxiliares absorvendo a energia luminosa na faixa de 450 nm e transferindo-a para os centros de reação da antena (WALTON, BROWN, 1999). Outra função relevante destes pigmentos é a proteção do aparato celular fotossintético contra danos foto-oxidativos, via sequestro do excesso de energia (*quenching*) do triplete da clorofila. Mutantes com defeitos na síntese dos carotenóides sofrem estresse oxidativo severo, fato que geralmente leva à morte, ainda nas fases iniciais de seu desenvolvimento (BARTLEY, SCOLNIK, 1995; HOWITT, POGSON, 2006). Em populações de plantas sob condições de alta exposição à luz solar, um percentual do excesso de energia captada pelo cloroplasto é dissipado como calor, através da conversão de violaxantina à zeaxantina através do ciclo das xantofilas (BARTLEY, SCOLNIK, 1995; FÄRBER, JAHNS, 1998).

Além do papel na fisiologia vegetal, aproximadamente 50 carotenóides são importantes na nutrição humana e ao menos 40 destes atuam como precursores na síntese de compostos retinóides. O organismo humano é incapaz de sintetizar os compostos retinóides (vitamina A e seus derivados) e, normalmente, obtém o esqueleto carbônico necessário a partir de carotenóides, como o β -caroteno, ingeridos na dieta. Outros carotenóides assumem funções diversas, como por exemplo, proteção contra danos causados pela radiação solar, exercida pelas xantofilas, luteína e zeaxantina, as quais se concentram nas áreas expostas do organismo humano (GRUNE et al., 2005). Nos olhos, a presença destes compostos está relacionada à menor incidência de degeneração macular e de catarata associadas ao envelhecimento (WRONA et al., 2001; AHMED et al., 2005; GRUNE et al., 2005; LEUNG, 2008; O-SULLIVAN et al., 2008; FARRÉ et al., 2010). Estudos pré-clínicos relatam que além da cor atraente, atividade pró-vitamina A e antioxidante, alguns carotenóides possuem ação protetora e terapêutica com relação ao câncer (WRONA et al., 2001;

HOSOKAWA et al., 2004; SHARONI et al., 2004; AHMED et al., 2005; BERTRAM, VINE, 2005; GRUNE et al., 2005; O-SULLIVAN et al., 2008; van BREEMEN, PAJKOVIC, 2008; FARRÉ et al., 2010).

Os carotenóides interessam, portanto, à indústria alimentícia como micronutrientes enriquecendo a composição dos alimentos e também, como pigmentos e antioxidantes naturais (SCHOEFS, 2004, AMAN, et al., 2005a; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; FARRÉ et al., 2010). Corroborando esta informação, foram encontrados documentos patentários que protegem processos para obtenção de carotenóides a partir de diferentes biomassas vegetais, como: raízes de cenoura (US 5510551, 1996), frutos de caqui (US 0116818 A1, 2007), flores de *marygold* (WO 114794 A1, 2006) e de tagetes (PI 0311688-3 A, 2008), bem como folhas de alfafa (US 258782, 2004). Também foram localizados documentos descrevendo o enriquecimento de óleos vegetais através da adição de extratos ricos em zeaxantina (WO 03/105807 A1, 2003) e pela adição de extratos de calêndula e óleo de açafrão (WO 117826, 2006), visando principalmente o aproveitamento pela indústria alimentícia. Um estudo relatou a possibilidade de aumento do valor nutritivo e econômico agregado a óleos comestíveis de menor qualidade, através da adição de extratos de tomate, com alta concentração do carotenóide licopeno (BENAKMOUN et al., 2008).

Sendo assim, a constatação de teores elevados de carotenóides nas folhas do milho justifica o seu aproveitamento para obtenção destes metabólitos visando à comercialização com o setor industrial. O mercado mundial para a comercialização de extratos de carotenóides foi de 887 milhões de dólares em 2004, com projeções indicando uma movimentação de cerca de US\$ 1,2 bilhão para 2009 (CHEMICAL MARKET REPORTER, 2006). No entanto, este valor foi superado pelos relatos do mercado mundial para tais pigmentos em 2009, o qual movimentou uma cifra próxima de US\$ 2 bilhões (FARRÉ et al., 2010). Carotenóides como o β -caroteno, a astaxantina e a cantaxantina são produzidos e comercializados por gigantes do setor, como a DSM (antiga Roche – Holanda) e a BASF (Alemanha), enquanto o licopeno e a luteína são produzidos por empresas menores, existindo ainda espaço para um crescimento substancial na sua produção e comercialização (FROST, SULLIVAN, 2004). A descoberta de novas fontes de luteína e β -caroteno, compostos com forte demanda de mercado, oferece uma ótima vantagem competitiva para setores industriais, como o alimentício, cosmético e farmacêutico (FARRÉ et al., 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

Material foliar de *Zea mays*

Foram considerados dois conjuntos de amostras originados de experimentos independentes, implantados em setembro/2006 e setembro/2007, na fazenda experimental da Ressacada (CCA-UFSC), localizada em Florianópolis-SC.

A área útil da parcela foi de 5m², sendo utilizadas 40 sementes (2 sementes/cova) em cada parcela. O desbaste das plântulas foi realizado três semanas após o início da emergência destas, sendo então mantidos 20 indivíduos, espaçados 0,25m entre si. Os tratamentos culturais necessários se restringiram ao controle manual de plantas invasoras.

Nos dois experimentos mencionados foram avaliadas 6 variedades crioulas de milho (VCM): Mato Grosso Palha Roxa (MG), Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC), Língua de Papagaio (LP) e MPA 01 (MP). No experimento de 2007, foram também consideradas como testemunhas relativas duas variedades comerciais, BRS 1030 (BR - híbrido simples) e Fortuna (FO - variedade de polinização aberta). O delineamento experimental adotado foi de blocos completos casualizados.

Coleta e preparo do material foliar

O material foliar foi coletado no estágio de emissão das flores femininas, aproximadamente uma semana após a emissão do pendão masculino. Para tal, a quinta folha (ápice → base) foi selecionada, por ser usualmente a folha mais próxima ao local de emissão da espiga. Apenas o terço mediano do limbo foliar foi considerado (10g/planta, peso fresco).

No **experimento de 2006**, o material foliar de 6 plantas (n = 6) de cada VCM foi imediatamente congelado em N₂ líquido, sendo posteriormente liofilizado e armazenado (-18°C) até análise. No **experimento de 2007**, o material foliar foi desidratado em estufa (42-45°C, até peso constante) e conservado em recipientes plásticos (ausência de luz, em temperatura ambiente). Para efeito dos procedimentos analíticos, o material foliar de 6 plantas de cada repetição foi agrupado em uma única amostra, sendo que para cada variedade de milho foram consideradas 4 repetições (n = 4).

Extração com organosolvente (Hex: Ac=O)

As amostras foram preparadas segundo o protocolo proposto por AMAN et al. (2005a). O tecido foliar ($0,300 \pm 0,001\text{g}$) foi macerado com adição de N_2 líquido e 20 mL de Hex: Ac=O 1:1 (v/v), com 100 mg/L de BHT (hidroxitolueno butilado). As amostras permaneceram em repouso, em ausência de luz, por 30 minutos e, posteriormente, foram filtradas sob vácuo, sendo o solvente removido com auxílio de rotaevaporador ($T \cong 35^\circ\text{C}$). Para maior estabilidade, os extratos foram armazenados a -20°C , na ausência de solventes com a atmosfera dos frascos substituída por N_2 gasoso.

Espectrofotometria de varredura UV-visível

O extrato bruto foi submetido à varredura em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu 2301), abrangendo uma faixa espectral de 200 a 700 nm, com intervalo de leitura de 1 nm por ponto amostral. Foi coletado um espectro por repetição, de modo que 6 e 4 perfis espectrais foram obtidos para as amostras provenientes dos experimentos de 2006 e 2007, respectivamente.

Análise quimiométrica

Os dados da varredura espectrofotométrica dos extratos brutos permitiram a construção de matrizes de dados (250 a 700 nm – 10 nm/ponto amostral) que foram submetidas à quimiometria, através da Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando matrizes de correlação e de covariância. A análise dos dados utilizou os programas estatísticos Excel (Microsoft Office, 2003), GraphPad Prism 2.01 e Fitopac Shell Program (2008).

Saponificação do extrato organosolvente

Para a saponificação, 2 mL do extrato bruto foram acrescidos de 2 mL de hexano e 200 μL de KOH 10% em metanol, seguido de repouso em temperatura ambiente e ausência de luz, durante 8 horas. As amostras foram então lavadas em funil de separação (4x, 20 mL de água ultra-pura) para a remoção do álcali e também dos compostos polares ainda presentes no extrato. A fração remanescente foi concentrada sob fluxo de N_2 e a atmosfera interna do frasco âmbar substituída por N_2 gasoso. As amostras foram armazenadas em freezer (-18°C) até o momento da análise.

Quantificação dos carotenóides totais

A concentração de carotenóides totais foi calculada a partir dos valores de absorvância ($\lambda = 450 \text{ nm}$) dos extratos brutos (BRITTON, 1992), utilizando a fórmula ($[\text{pigmentos}] \text{ (g)} = \text{absorvância}/\epsilon \text{ (}\beta\text{-caroteno)}$) - **577,7** (peso molecular médio carotenóides).

Análise de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE)

Alíquotas (10 μL) das amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com termostatizador (35°C) de coluna de fase reversa C_{18} (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm), acoplada a pré-coluna (C_{18} , Vydac 201TP54, 30 mm x 4,6 mm \varnothing , 5 μm) e detector espectrofotométrico (450 nm). A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10, v/v), fluxo de 1 mL/min e a identificação dos compostos de interesse (i.e., β -caroteno, luteína, zeaxantina) foi efetuada via co-cromatografia (10 $\mu\text{g/mL}$) e comparação dos tempos de retenção de amostras de compostos padrões, sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides foi realizada utilizando-se curva padrão externa (luteína - Sigma, 0,461 a 461 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,998$), considerando-se os valores de áreas dos picos de interesse para efeitos de cálculos das concentrações dos analitos. Os resultados foram expressos em mg/g de folha e representam a média de 3 injeções consecutivas para cada amostra.

Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos a ANOVA, considerando o modelo: $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$, onde Y_{ij} é a observação da i -ésima variedade, da j -ésima repetição; μ , equivale a média geral; g_i é o efeito do tratamento, supostamente aleatório, normal e independente, distribuído com média zero e variância σ_g^2 ; b_j é o efeito das repetições e e_{ij} é o erro experimental. Variáveis que apresentarem significância $P \leq 0,05$ foram submetidas a testes de separação das médias através do método *post-hoc* LSD (*least squares difference*). As análises foram realizadas com apoio dos programas estatísticos Excel (Microsoft Office, 2003), GraphPad Prism versão 2.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos perfis espectrofotométricos de varredura (200 a 700 nm – **Fig. 1**) revelaram certa similaridade entre as amostras foliares individuais ($n = 6$) liofilizadas. Para todas as variedades, as médias de absorbância se mostraram superiores a 2 nas janelas espectrais de 300 a 480 nm e 650 a 670 nm. Na **Figura 2** são mostrados os perfis espectrais das amostras desidratadas em estufa, pode-se perceber que os perfis das variedades são novamente similares, apresentando, no entanto, valores de absorbância ≥ 2 em uma faixa mais estreita de comprimentos de onda (350 - 450 nm e 660 – 670 nm), comparativamente ao material liofilizado. Todavia, independente da variedade ou do tratamento utilizado para preservação (liofilização ou estufa), todos os perfis espectrais evidenciaram sinais de absorbância entre 410 - 470 nm, indicando que o sistema extrator Hex: Ac=O foi capaz de extrair os carotenóides presentes nas folhas de milho (TSAO, DENG, 2004). Tal sistema de solventes também extraiu eficientemente clorofilas, conforme indicado pelos valores de absorbância entre 640 – 680 nm (DARKO et al., 2000), compostos fenólicos (290 – 380 nm - BACHEREAU et al., 1998) e flavonóides (530 – 570 nm – BODDU et al., 2005); estes últimos compostos, em menor conteúdo.

Uma análise preliminar dos dados sugere que o processamento pós-colheita utilizado nas amostras liofilizadas (**Fig. 1**) permitiu uma maior recuperação quantitativa de metabólitos, comparativamente à secagem da biomassa em estufa (**Fig. 2**). Os procedimentos adotados, i.e., congelamento imediato em N_2 e liofilização das amostras (**Fig. 1**) visaram à suspensão da atividade metabólica do tecido foliar, de modo a minimizar a degradação dos compostos químicos presentes nas amostras. É sabido que em estudos fitoquímicos as etapas de coleta, armazenamento e preparo das amostras merecem atenção especial, de modo a evitar ao máximo a degradação ou transformação dos metabólitos pela ação de fatores como catálise enzimática, calor, luz, oxidação e alterações de pH (OLIVER, PALOU, 2000; TSAO, DENG, 2004; LAY Jr. et al., 2006). A análise do material liofilizado deve, portanto, fornecer um quadro mais fidedigno do conteúdo de carotenóides presentes no tecido foliar destas variedades, em comparação às informações geradas a partir do material desidratado em estufa. Informações da literatura confirmam que a adoção do processo de liofilização para preservação das amostras resulta em maior eficiência na extração de carotenóides (OLIVER, PALOU, 2000).

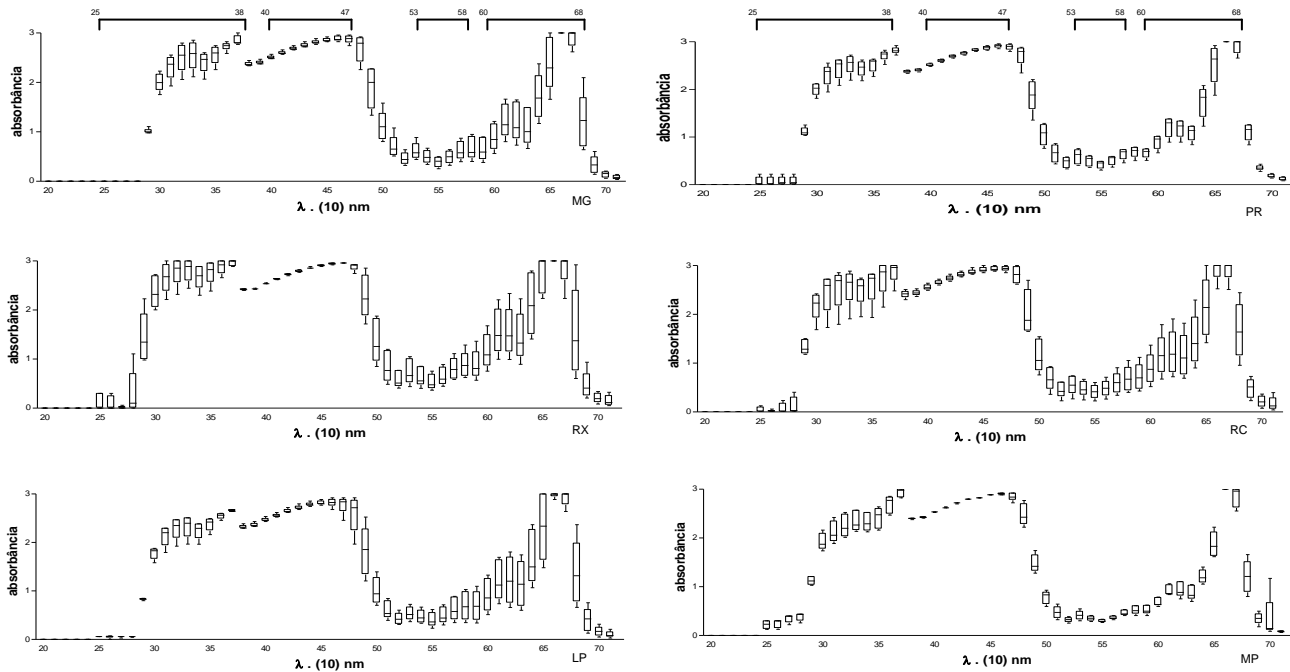


Figura 1: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato hexano: acetona, obtido a partir do tecido foliar liofilizado das variedades crioulas de milho ($n=4$ indivíduos), cultivadas na Ressacada-2006/ 2007. **MG** = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio e **MP** = MPA1.

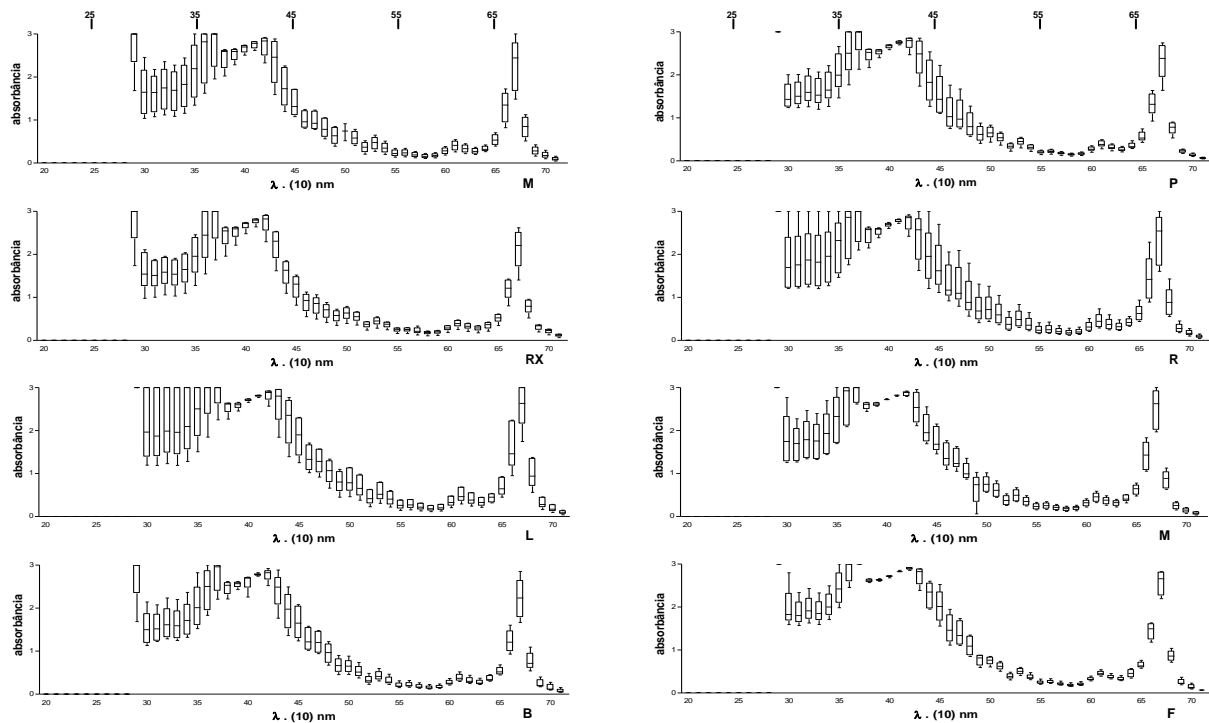


Figura 2: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato hexano: acetona, obtido a partir do tecido foliar desidratado em estufa das variedades crioulas de milho e das variedades comerciais ($n = 4$ repetições), cultivadas na Ressacada-2007/2008. **MG** = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio, **MP** = MPA1, **BR** = BRS 1030 e **FO** = Fortuna.

Todavia, considerando o uso das folhas de milho em escala industrial, a necessidade de liofilização torna o processo bastante oneroso em função do custo do equipamento, longo tempo requerido à secagem e do baixo rendimento. Sendo assim, manteve-se o interesse pela análise dos materiais desidratados em estufa, condição mais próxima da realidade dos agricultores familiares brasileiros.

O estudo quimiométrico efetuado com os dados gerados pela espectrofotometria de varredura UV-visível empregou a análise dos componentes principais (PCA). Este método de análise pode auxiliar no esclarecimento de padrões de similaridade/dissimilaridade existente entre os extratos Hex: Ac=O foliares obtidos a partir das variedades de milho. Tal método reduz o número de dimensões que definem a variação dos dados, simplificando a interpretação dos resultados, sem perder, no entanto, a fração mais relevante das informações associadas a estes. Do ponto de vista matemático, a PCA visa obter p combinações lineares a partir de p variáveis. Estas combinações lineares são então ordenadas de modo decrescente em função da quantidade de informação contida sobre a variabilidade dos dados. Do ponto de vista geométrico, o PCA corresponde às direções que representam a maior quantidade possível de informação, em um espaço multidimensional derivado das variáveis originais. Estas direções, ou componentes principais (*principal components* - PC), podem ser consideradas como eixos de um novo sistema ortogonal que mantém a dimensionalidade global dos dados brutos. Os objetos da análise são então projetados sobre estes novos eixos e recebem a denominação de autovalores (*eigenvalues*) ou escores (*scores*). A posição dos autovalores neste novo sistema ortogonal é influenciada pelas variáveis originais, com algumas variáveis contribuindo de modo mais significativo do que outras. Esta contribuição diferencial das variáveis para a definição da posição dos autovalores sobre os novos eixos denomina-se contribuição fatorial (*loading*), no caso dos estudos quimiométricos e de autovetor (*eigenvector*), de um modo mais geral. O uso da análise de PCA permite a identificação da estrutura dos dados como, por exemplo, padrões de similaridade, representados pela localização próxima de autovalores (LEGENDRE, LEGENDRE, 1998; LEARDI, 2003; FUKUSAKI, KOBAYASHI, 2005).

Para a análise dos perfis foliares através de PCA foram consideradas duas possibilidades de cálculo, utilizando matrizes de correlação e de covariância. No cálculo através de matrizes de correlação, cada variável contribui com igual peso para a distribuição dos objetos ao longo dos eixos, pois os dados são

estandardizados, diminuindo deste modo a variação na magnitude e ressaltando a composição dos resultados. Considerando as variáveis aqui analisadas, este tipo de cálculo deve diminuir a influência das diferenças na concentração dos componentes que absorvem luz nos comprimentos de onda de interesse, ressaltando, assim, características qualitativas da composição química do tecido foliar. Por outro lado, efetuando-se a análise através de matrizes de covariância, as diferenças de magnitude entre as variáveis são preservadas, pois os dados são considerados sem a necessidade de processamento prévio. No estudo aqui relatado, tal informação é de interesse, pois deste modo, os comprimentos de onda com maior absorvância (maior concentração) contribuirão de modo mais significativo à distribuição dos objetos ao longo dos eixos. Em todas as figuras apresentadas para a análise de PCA são mostradas apenas as informações fornecidas pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), já que estes definiram mais de 70% da variabilidade observada nos dados amostrais.

A **figura 3** mostra os resultados dos PCA para as varreduras obtidas a partir do material foliar liofilizado. Neste caso, foram considerados apenas os resultados relativos a quatro indivíduos para cada uma das variedades, com os dois indivíduos que foram descartados, tendo sido escolhidos aleatoriamente. Este procedimento foi adotado de modo a facilitar a comparação dos resultados entre o material liofilizado e o aquele desidratado em estufa. Considerando o uso de matrizes de correlação, os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) resolveram 73,3% da variabilidade, revelando o agrupamento de indivíduos consoante ao seu genótipo. Assim, as repetições da variedade MP se agruparam em PC1 negativo e PC2 positivo, as de LP em PC2 negativo e a maioria das repetições de RC, em PC2 positivo (**Fig. 3A**). Por sua vez, o cálculo dos componentes principais através de matrizes de covariância, definiu 77,4% da variabilidade em PC1 e PC2, com o agrupamento dos indivíduos da variedade MP ficando agora restrito a PC1 negativo. As demais variedades agruparam-se de forma similar ao observado quando do uso de matrizes de correlação (**Fig. 3B**).

As janelas espectrais (ηm) de maior influência para a distribuição dos autovetores nos PCA e correlacionadas ($\geq 0,7$) com os componentes principais foram, para o cálculo utilizando matrizes de correlação (**Fig. 3A**), 310 - 350 ηm e 470 - 690 ηm possuindo correlação positiva com PC1, e 290 ηm e a faixa espectral entre 370 a 450 ηm que mostraram correlação positiva com PC2. Por sua vez,

o cálculo a partir de matrizes de covariância (**Fig. 3B**) demonstrou que as janelas espectrais de maior influência na distribuição ao longo de PC1 e PC2 foram 480 a 690 nm e 290 a 380 nm, respectivamente.

A **figura 4** mostra os resultados de PCA obtidos para as amostras desidratadas em estufa. O cálculo de PCA através de matrizes de correlação e covariância resolveu respectivamente 82,8% e 91,5% da variabilidade amostral (**Fig. 4A e 4B**). Utilizando a matriz de correlação, a PCA indicou tendências de agrupamento para as variedades RX e MG (PC2 positivo), FO (PC2 negativo) e LP, com todas as suas repetições em PC1 positivo (**Fig. 4A**). A PCA calculada através de matrizes de covariância revelou o agrupamento de todas as repetições de RX em PC1 negativo e PC2 positivo, enquanto MG se concentrou em PC2 positivo e BR em PC2 negativo. As tendências de agrupamento das variedades FO e LP observadas anteriormente (**Fig. 4A**) se mostraram menos evidentes no caso do cálculo através de covariância (**Fig. 4B**).

No caso do material desidratado em estufa, a análise dos resultados de PCA utilizando matrizes de correlação (**Fig. 4A**) revelou que os comprimentos de onda que apresentaram correlação positiva ($\geq 0,7$) com PC1 foram 300 a 360 nm, 380 nm, 420 a 440 nm e 480 a 710 nm. Neste caso, os comprimentos de onda característicos de absorção máxima dos carotenóides (450 a 470 nm) mostraram correlação negativa com PC2. O uso de matrizes de covariância (**Fig. 4B**) para cálculo dos PCA demonstrou que os comprimentos de onda de 300 a 360 nm, 380 nm, 420 a 450 nm e 480 nm a 690 nm apresentaram correlação positiva ($\geq 0,7$) com PC1. Além disto, novamente, a faixa espectral típica dos carotenóides (450 – 470 nm) apresentou correlação negativa com PC2.

Sendo os carotenóides considerados como metabólitos alvo na caracterização do extrato Hex: Ac=O, as informações geradas com a análise de PCA foram empregadas na busca de VCM com teores superiores destes compostos. Para tal, foram utilizadas as informações dos autovetores e autovalores mais proximamente relacionados com os comprimentos de onda entre 410 – 470 nm. As amostras de material liofilizado das variedades RC e RX apresentaram teores proeminentes de carotenóides (**Fig. 3**). De forma similar, as amostras desidratadas em estufa das variedades FO, LP e PR revelaram autovalores indicando repetições que se localizaram proximamente aos autovetores influenciados por comprimentos de onda na faixa de 410 a 450 nm (**Fig. 4**).

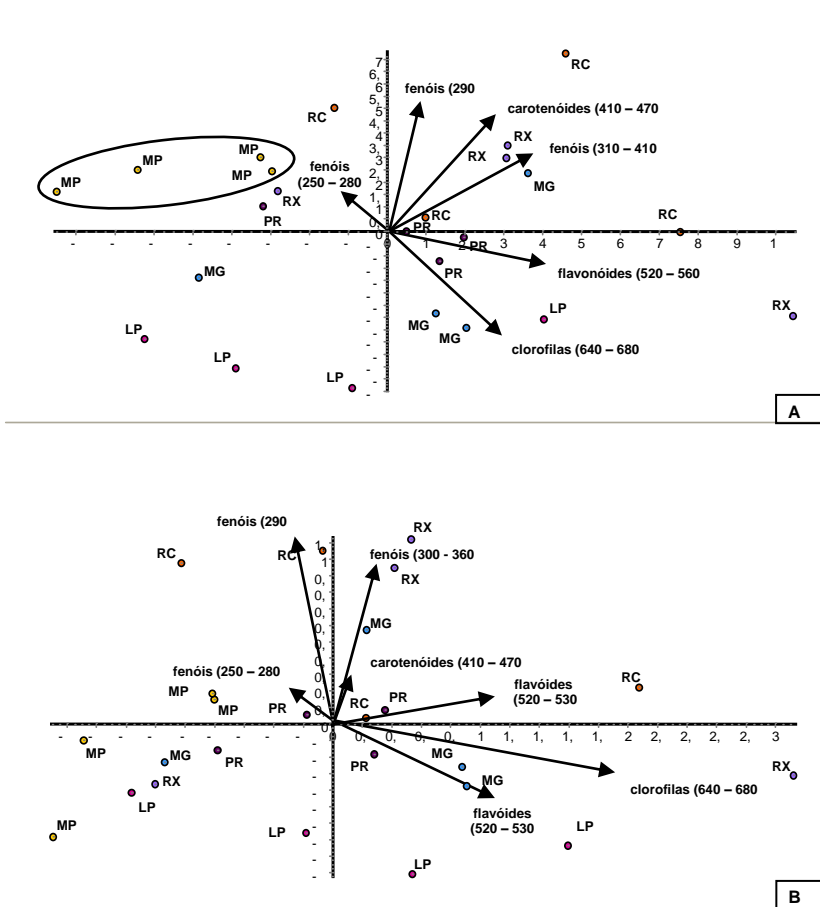
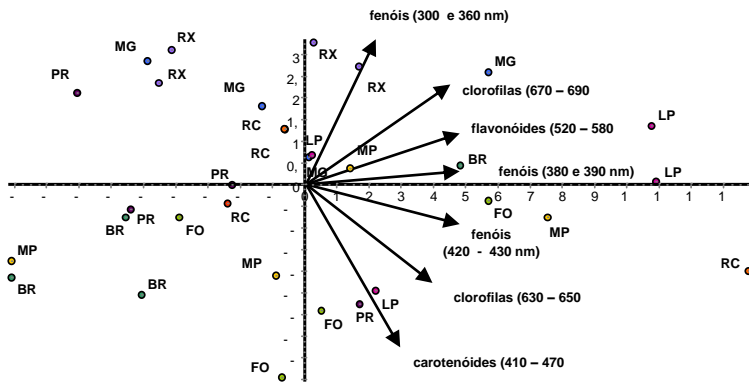


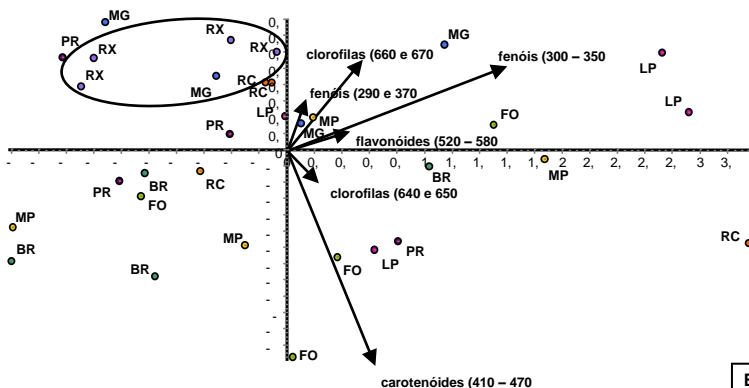
Figura 3: Análise dos Componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato hexano: acetona obtido a partir do **tecido foliar liofilizado** das variedades crioulas de milho cultivadas em **Florianópolis- 2006/ 2007**. **A)** PCA utilizando cálculo através de matrizes de correlação, **B)** PCA utilizando cálculo através de matrizes de covariância.

Autovalores: **MG** = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio e **MP** = MPA1.

As setas indicam a direção de **autovetores** associados a comprimentos de onda de interesse.



A



B

Figura 4: Análise dos componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato hexano: acetona obtido a partir do **tecido foliar desidratado em estufa** das variedades de milho cultivadas em **Florianópolis- 2007/ 2008**. **A)** PCA utilizando cálculo através de matrizes de correlação, **B)** PCA utilizando cálculo através de matrizes de covariância.

Autovalores: **MG** = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio, **MP** = MPA1, **BR** = BRS 1030 e **FO** = Fortuna.

As setas indicam a direção de **autovetores** associados a comprimentos de onda de interesse.

A concentração de carotenóides totais nas amostras foliares foi determinada a partir da absorbância em 450 nm. Amostras liofilizadas mostraram um teor médio de carotenóides totais de $41,380 \pm 0,442$ (mg/g de folha \pm desvio padrão), com RC apresentando média ligeiramente superior a este valor, sendo esta diferença significativa ($P \leq 0,05$) apenas entre RC e LP (**Fig. 5A**). A variância observada entre os tratamentos se mostrou maior do que aquela observada entre os indivíduos dentro de cada variedade, com quadrados médios (QM) iguais a 0,78 e 0,38, respectivamente. O efeito residual foi de 0,19 e os valores de r^2 e F foram iguais a 0,569 e 3,968, respectivamente.

Um teor médio de carotenóides totais de $26,220 \pm 3,855$ (mg/g de folha \pm desvio padrão) foi observado para as amostras desidratadas em estufa, com as variedades LP e FO apresentando médias superiores a este valor (**Fig. 5B**) e diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com relação à variedade RX. Neste experimento, a variância existente entre os tratamentos (59,46) se mostrou superior, àquela observada para as diferentes repetições de indivíduos (25,25) e para a variância residual (17,87). O valor observado para r^2 foi igual a 0,526 e para F igual a 3,328.

A quantificação dos carotenóides totais (**Fig. 5**) confirmou a observação de que o material liofilizado apresentou teor significativamente mais elevado de metabólitos, comparativamente às amostras desidratadas em estufa e concordou com a análise quimiométrica (**Fig. 3 e 4**), destacando as mesmas VCM. Além disso, ressalta-se que no material liofilizado, as repetições das variedades se mostraram mais homogêneas em relação às amostras desidratadas em estufa. Por exemplo, todos os indivíduos da variedade MP mostraram o mesmo teor de carotenóides, com desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) iguais a zero, mesmo com o n amostral ampliado para 10 indivíduos (dados não mostrados). Neste mesmo experimento, a variedade RC mostrou desvio padrão igual a 0,691 e CV% igual a 1,65%; superiores ao observado para MP, mas muito inferiores aos valores obtidos para o material foliar de RC desidratado em estufa, com desvio padrão de 7,527 e CV% de 23,33%. Comparando os resultados obtidos para cada uma das variedades ao se empregar as duas formas de processamento pós-colheita, fica evidente que a desidratação em estufa acarretou em um aumento adicional na variabilidade existente entre as repetições.

Em um experimento com delineamento idêntico implantado em outra localidade (Guaraciaba-SC), na mesma safra (2007/2008),

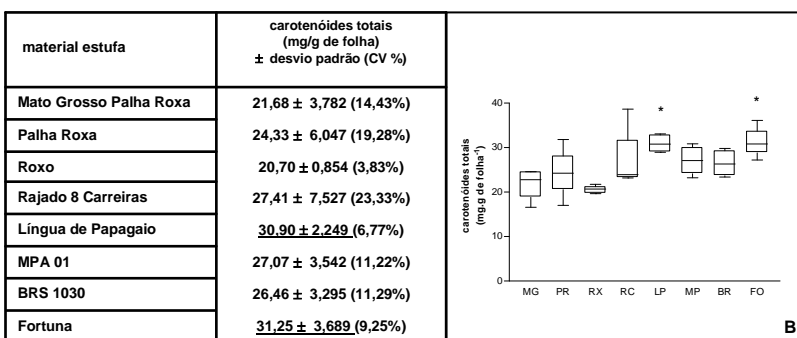
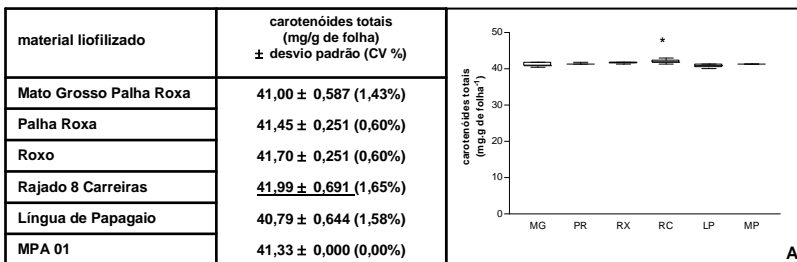


Figura 5: Concentração média de carotenóides totais (mg/g de folha) ± desvio padrão (coeficiente de variação – CV%), observados no extrato hexano: acetona, obtido para **(A) material liofilizado cultivado em Florianópolis (2006/2007)** e **(B) material desidratado em estufa cultivado em Florianópolis (2007/2008)**.

(*) indicam significância $P \leq 0,05$ – ANOVA.

utilizando processamento pós-colheita similar, i.e. refrigeração e desidratação em estufa (dados não mostrados), foram obtidos resultados parecidos àqueles observados para as folhas desidratadas em estufa, oriundas de cultivo em Florianópolis-SC. Todas as variedades mostraram valores de desvio-padrão e CV% maiores que aqueles observados para o material liofilizado. Novamente, a variedade RC figurou entre aquelas com maior variabilidade, enquanto MP se apresentou mais homogênea. O teor médio de carotenóides foi de ≈ 15 mg/g de folha, similar ao observado para o material desidratado em estufa (Florianópolis) e inferior aos valores obtidos para o material liofilizado. Sugere-se que um menor conteúdo de metabólitos e uma maior variação entre as repetições resultem, em alguma extensão, da ausência de interrupção metabólica total no processamento da biomassa foliar imediatamente após a coleta.

Dando continuidade à caracterização dos carotenóides presentes no extrato Hex: Ac=O foi realizada a análise destes metabólitos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tal, um pré-tratamento do extrato organosolvente (protocolo de saponificação) se mostrou necessário, de forma a garantir a resolução cromatográfica e a precisão das quantificações. De fato, a ocorrência de complexos carotenóides-proteínas ou carotenóides-ácidos graxos (ésteres de carotenóides) em condições fisiológicas é comum, uma característica que dificulta a separação cromatográfica (OLIVER, PALOU, 2000; TSAO, DENG, 2004; AMAN et al., 2005b). Além disto, as condições alcalinas do meio de saponificação contribuem para a degradação e remoção de compostos indesejados, tais como as clorofilas.

A **figura 6** mostra a via de síntese dos carotenóides mais comuns encontrados nos grãos de milho, a saber: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina e os carotenos, α - e β -caroteno (AMAN et al., 2005 a; HULSHOF et al., 2007; KIMURA et al., 2007; KUHNEN, 2007). Já a **figura 7** mostra um perfil cromatográfico obtido por CLAE, representativo dos carotenóides identificados no tecido foliar das variedades de milho. Neste cromatograma são identificados apenas os carotenóides majoritários, luteína, zeaxantina, *trans* β -caroteno e *trans* licopeno, identificados através da comparação com os tempos de retenção e da co-cromatografia de compostos padrões disponíveis comercialmente. Estes quatro carotenóides foram detectados em todas as amostras foliares analisadas até o presente momento. O cromatograma também mostra quatro compostos minoritários não detectados em todas as amostras e que ainda não tiveram sua identidade completamente

confirmada. A falta de compostos de referência confiáveis e disponíveis comercialmente é um dos principais problemas enfrentados nos estudos fitoquímicos que se valem da análise cromatográfica, utilizando a detecção espectrofotométrica dos metabólitos (OLIVER, PALOU, 2000; AMAN et al., 2005b).

Os resultados de quantificação dos carotenóides majoritários identificados na CLAE são apresentados nas **figuras 8 e 9**. A luteína e o β -caroteno apresentaram os teores mais elevados para as amostras analisadas, compondo de 72 a 84% do extrato saponificado (**Fig. 8**), sendo que para algumas variedades a luteína perfaz cerca de 50% do extrato Hex:Ac=O. As variedades que apresentaram teores mais elevados de luteína foram MP, RC e RX, no caso do material liofilizado (**Fig. 8A**) e MG, PR, RC, LP e BR, no material desidratado em estufa (**Fig. 8B**). O *trans* β -caroteno representou cerca de 40% do conteúdo carotenóidico total nas amostras liofilizadas das variedades PR e LP (**Fig. 8A**). De modo similar, nas amostras desidratadas em estufa uma proporção de *trans* β -caroteno (~ 40%) foi observada para MP e FO (**Fig. 8B**).

Considerando os valores absolutos obtidos a partir dos resultados da CLAE (**Fig. 9**), o teor médio de luteína observado para o material liofilizado foi de $26,534 \pm 5,397$ mg/g de folha, com MP e PR apresentando conteúdo médio superior a este valor. Diferenças significativas ($P \leq 0,01$) foram encontradas apenas comparando-se MP com MG, RX, RC e LP. E comparando-se PR aos genótipos MG e RC ($P \leq 0,05$). O teor médio de *trans* β -caroteno foi de $20,657 \pm 8,064$ mg/g de folha, com as variedades PR e LP apresentando concentração superior a este valor, sendo as diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em relação a MG, RX, RC e MP, para a primeira variedade e em relação a MG, RX, RC e MP, no caso da segunda (**Fig. 9A**). No material desidratado em estufa, as variedades PR e LP mostraram concentração média de luteína superior a $7,199 \pm 1,487$ mg/g de folha, teor médio observado para este experimento, sendo significativas ($P \leq 0,05$) as diferenças apenas em relação a MG. O conteúdo médio de *trans* β -caroteno para este conjunto de amostras foi de $4,326 \pm 1,362$ mg/g de folha e as diferenças observadas não mostraram significância estatística (**Fig. 9B**).

Comparando-se os resultados obtidos com a quantificação de carotenóides totais através de espectrofotometria, aos resultados obtidos com a quantificação dos carotenóides majoritários através

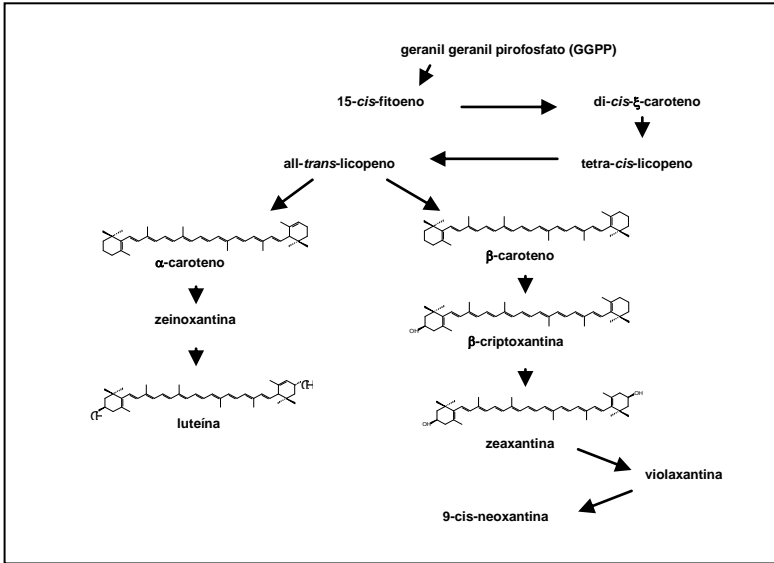


Figura 6: Via de síntese dos principais carotenóides presentes nos grãos de milho e provavelmente observados no tecido foliar das variedades analisadas. (Esquema baseado em HOWITT, POGSON, 2006).

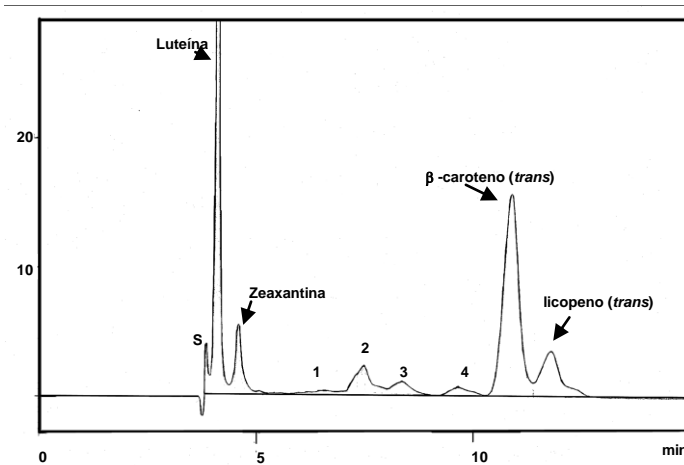


Figura 7: Cromatograma - CLAE mostrando perfil qualitativo de carotenóides do tecido foliar liofilizado da variedade Mato Grosso Palha Roxa. Setas e legendas indicam os carotenóides majoritários, os números (1 – 4) indicam compostos ainda não identificados e S = solvente.

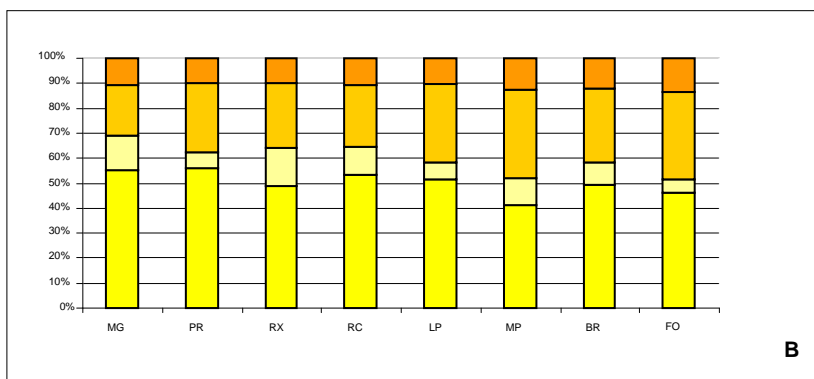
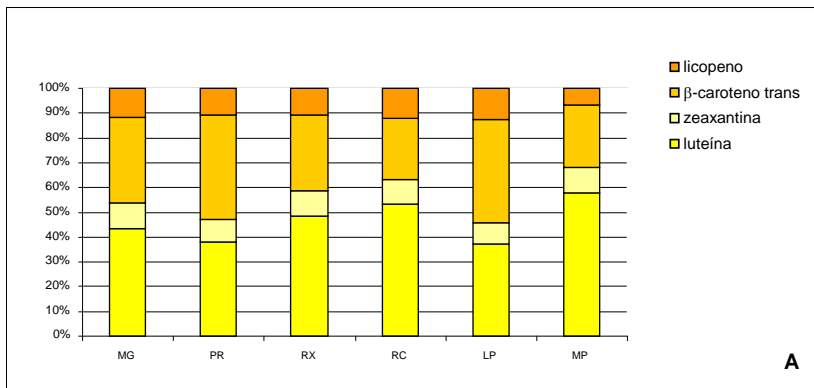


Figura 8: Proporção de luteína, zeaxantina, *trans* β-caroteno e licopeno, observada para o tecido foliar das variedades de milho, evidenciada através da análise de CLAE.

A) material liofilizado e cultivado em Florianópolis 2006/2007, **B)** material desidratado em estufa e cultivado em Florianópolis 2007/2008.

A	Luteína	Zeaxantina	β -caroteno (<i>trans</i>)	licopeno	total parcial CLAE	total espectrofotômetro
MG	20,799 \pm 5,189	4,929 \pm 1,032	16,549 \pm 2,311	5,548 \pm 0,650	47,826 \pm 8,745	41,00 \pm 0,587
PR	<u>29,291 \pm 2,104</u>	6,549 \pm 0,592	<u>32,461 \pm 2,412</u>	8,109 \pm 0,478	76,410 \pm 4,255	41,45 \pm 0,251
RX	25,717 \pm 2,552	5,487 \pm 0,489	16,145 \pm 2,081	5,646 \pm 0,543	52,995 \pm 4,650	41,70 \pm 0,251
RC	21,667 \pm 3,268	4,073 \pm 2,911	10,140 \pm 9,257	4,859 \pm 1,625	45,703 \pm 7,769	41,99 \pm 0,691
LP	26,216 \pm 3,609	5,831 \pm 0,628	<u>29,401 \pm 10,106</u>	8,810 \pm 1,931	70,258 \pm 13,195	40,79 \pm 0,644
MP	<u>35,517 \pm 4,594</u>	6,488 \pm 0,947	15,399 \pm 3,236	4,043 \pm 0,742	61,447 \pm 7,950	41,33 \pm 0,000

B	Luteína	Zeaxantina	β -caroteno (<i>trans</i>)	licopeno	total parcial CLAE	total espectrofotômetro
MG	5,211 \pm 0,594	1,294 \pm 0,136	1,931 \pm 1,110	0,999 \pm 0,614	9,436 \pm 2,094	21,68 \pm 3,782
PR	<u>8,741 \pm 2,663</u>	0,927 \pm 0,186	4,389 \pm 3,315	1,506 \pm 1,275	15,564 \pm 8,413	24,33 \pm 6,047
RX	5,731 \pm 1,079	1,768 \pm 0,485	3,020 \pm 0,386	1,175 \pm 0,193	11,695 \pm 1,694	20,70 \pm 0,854
RC	7,620 \pm 2,220	1,617 \pm 0,783	3,509 \pm 2,271	1,538 \pm 1,328	14,284 \pm 2,347	27,41 \pm 7,527
LP	<u>9,662 \pm 2,146</u>	1,274 \pm 0,366	5,890 \pm 1,769	1,964 \pm 1,049	18,791 \pm 2,014	30,90 \pm 2,249
MP	6,348 \pm 1,018	1,663 \pm 0,765	5,431 \pm 1,622	1,934 \pm 0,845	15,377 \pm 1,018	27,07 \pm 3,542
BR	7,070 \pm 1,406	1,297 \pm 0,679	4,265 \pm 1,278	1,710 \pm 0,395	14,342 \pm 3,368	26,46 \pm 3,295
FO	7,206 \pm 0,791	0,800 \pm 0,147	5,449 \pm 3,674	2,072 \pm 1,564	15,527 \pm 7,774	31,25 \pm 3,689

Figura 9: Concentração média dos carotenóides majoritários (mg/g de folha \pm desvio padrão) obtido através da análise de CLAE, para o extrato hexano:acetona.

Em (A) material liofilizado proveniente de Florianópolis 2006/2007 e em (B) material desidratado em estufa proveniente de Florianópolis 2007/2008.

Os valores sublinhados se referem a variedades com médias significativamente diferentes $P \leq 0,05$.

de CLAE (**Fig. 9**), algumas discrepâncias foram detectadas principalmente no caso do material liofilizado, que revelou para todas as variedades na análise através de CLAE, concentração média de carotenóides superior a concentração total destes compostos, calculada através da espectrofotometria (**Fig. 9A**). No material desidratado em estufa, de modo geral, a concentração de carotenóides totais determinada espectrofotometricamente foi maior do que aquela calculada com o emprego da CLAE (**Fig 9B**). Este tipo de comportamento está mais em conformidade com o que era esperado, já que na quantificação através de CLAE estão sendo considerados apenas os quatro compostos mais abundantes, não todos os carotenóides presentes na amostra.

O conjunto de dados gerados a partir da análise do extrato Hex: Ac=O do material foliar das variedades de milho, em dois diferentes experimentos, empregando estratégias distintas de análise, indicou as variedades crioulas de milho LP, RC e PR como de maior interesse quanto ao conteúdo de carotenóides, sugerindo o aproveitamento de seu tecido foliar para a extração desta classe de compostos. Embora o conteúdo médio de carotenóides totais dos genótipos crioulos não tenha sido significativamente superior a média observada para as duas variedades comerciais (BRS 1030 e Fortuna) analisadas como testemunhas relativas no experimento de 2007/2008.

A comparação do teor de carotenóides foliares totais obtido para o material desidratado em estufa, ca. 18 mg/g (média dos resultados espectrofotométricos e da CLAE), às informações disponíveis na literatura, salienta o potencial de aproveitamento desta biomassa como fonte destes metabólitos bioativos. Por exemplo, comparativamente aos grãos das mesmas variedades aqui estudadas, cujos valores situaram-se entre 0,006 e 0,023 mg/g de farinha, respectivamente para RC e BR (KUHNNEN, 2007), as folhas apresentaram um conteúdo mais elevado de carotenóides. A couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) contém aproximadamente 0,25 – 0,30 mg de carotenóides totais/g de folha (LEFSRUD et al., 2007), sendo que o USDA considera a couve como a verdura de uso rotineiro na alimentação humana com mais alto teor de luteína (0,109 – 0,395 mg/g de folha) e de β -caroteno (0,047 – 0,146 mg/g de folha). O espinafre também é considerado excelente fonte de carotenóides, com conteúdos apreciáveis de β -caroteno (0,041 a 0,094 mg/g de folha) e de luteína (0,053 a 0,160 mg/g de folha). Na raiz da cenoura, fonte reconhecida de β -caroteno, encontra-se aproximadamente 0,182 mg/g deste carotenóide (USDA, 2002). A

calêndula (*Calendula officinalis*) é uma importante fonte para a obtenção de carotenóides pela indústria farmacêutica e cosmética, principalmente de luteína, com teor médio de carotenóides totais em suas pétalas de 7,71 mg/g e de luteína igual a 5,69 mg/g (BAKÓ et al., 2002). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que o tecido foliar de milho desidratado em estufa possui concentração média de 6,921 mg de luteína/g de folha, sendo que algumas variedades crioulas apresentaram teores ainda mais elevados, como LP (9,226 mg/g) e RC (8,328 mg/g).

Ressalta-se que tais valores são superiores aos observados para todas as fontes de carotenóides mencionadas pela literatura científica consultada. Todavia, estes valores de rendimentos são inferiores aos encontrados em alguns documentos patentários. Por exemplo, para as flores de *marygold* (provavelmente *Tagetes erecta*) foi observado um rendimento de luteína semi-purificada de aproximadamente 10,218 mg/g de biomassa (WO 114794 A1, 2006). Para a raiz da cenoura (*Daucus carota*) rendimentos de até 12,44 mg de carotenóides/g de biomassa foram obtidos via extração utilizando a precipitação com sais, e.g., cloreto de cálcio e gluconato de cálcio (US 5510551, 1996). No entanto, ainda que eventuais rendimentos inferiores sejam obtidos com o uso da biomassa foliar de *Z. mays*, assume-se que seu aproveitamento se mostra viável. Tal assertiva se baseia no fato de que as folhas de milho são um resíduo agrícola produzido em elevada quantidade (~ 5000 Kg/ha), com a calêndula, por exemplo, não ultrapassando 140 Kg sumidades florais/ha (VIEIRA et al., 2006). Além disso, o custo de sua produção está imbutido na obtenção dos grãos e o tecido foliar do milho ainda não possui um aproveitamento específico, como a raiz da cenoura, normalmente destinada a alimentação humana.

Sabe-se que tanto a luteína quanto a zeaxantina vêm sendo muito valorizadas pela indústria, pois atuam como potentes agentes antioxidantes, substituindo os análogos artificiais em alimentos, cosméticos e produtos de beleza. Além disso, são pigmentos que quando ingeridos proporcionam diversos benefícios à saúde, auxiliando inclusive no tratamento e na profilaxia do câncer (BERTRAM, VINE, 2005; WRONA et al., 2005; van BREEMEN, PAJKOVIC, 2008). Existem atualmente no mercado produtos ricos nestes compostos, sendo comercializados para a prevenção da catarata e da degeneração macular associadas ao envelhecimento (AHMED et al., 2005; LEUNG, 2008). Finalmente, pelo menos 40 carotenóides, inclusive o β -caroteno e a β -criptoxantina, atuam como precursores na síntese da vitamina A e dos retinóides. Nesta

primeira década do século XXI, uma mobilização em escala mundial vem acontecendo em busca de alimentos ricos em compostos pró-vitamina A. Fato que decorre do grande impacto que a deficiência nutricional desta vitamina inflige sobre uma fatia significativa da população, retirando vidas principalmente de crianças nos países da América Latina e do Caribe (GRAEBNER et al., 2004; HULSHOF et al., 2007; KIMURA et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos com o emprego das técnicas analíticas aqui descritas indica que os carotenóides existentes no tecido foliar das variedades de milho foram eficientemente extraídos com o uso do sistema de solventes hexano: acetona (hex: Ac=O). Além disso, o emprego da espectrofotometria de varredura UV-vis revelou que adicionalmente aos carotenóides também foram extraídos outros metabólitos como, por exemplo, clorofilas e compostos fenólicos. Essa informação se mostrou relevante à subsequente análise dos compostos carotenóides via CLAE, pois confirmou a necessidade de saponificação das amostras.

Além disso, o emprego da varredura UV-vis possibilitou a constatação da existência, em um mesmo perfil espectrofotométrico, de regiões com maior variação entre as amostras, como a janela espectral entre 640 - 680 nm, onde o desvio padrão, em alguns casos, foi 10 vezes maior, que aquele observado para regiões como a faixa entre 380 - 450 nm. Esta informação chama a atenção para a possibilidade de que análises espectrofotométricas de menor abrangência (apenas um comprimento de onda, por exemplo), possam mostrar, dependendo da faixa do espectro escolhida, maior ou menor similaridade, considerando uma mesma amostra. A possibilidade de visualizar esta variação diferenciada e dependente do comprimento de onda/classe de compostos químicos considerados, já justifica o emprego de uma análise mais abrangente, como a varredura espectrofotométrica UV- visível.

A combinação da varredura em espectrofotômetro, com a análise através de PCA se revelou uma estratégia promissora para a bioprospecção de amostras, indivíduos ou espécies que apresentem teor interessante de metabólitos secundários que absorvem luz, como por exemplo, os carotenóides. Nas análises de PCA, os autovalores mais proximamente relacionados aos autovetores influenciados pelos comprimentos de onda entre 410 - 470 nm se

referiram a amostras de variedades que apresentaram médias (mg/g de folha) superiores ao teor médio de carotenóides totais do experimento em questão, utilizando espectrofotômetro e CLAE.

Outro aspecto indicador de que os resultados foram congruentes é a relação aparente entre formação de agrupamentos satisfatórios para as repetições na análise de PCA, com a possibilidade de detecção de diferenças significativas através da ANOVA e do teste de separação de médias (Tukey-HSD). Agrupamentos indicando similaridade entre as repetições foram observados para MP (material liofilizado) e para RX (material desidratado em estufa), com o emprego da análise de PCA, sendo que estas mesmas variedades apresentaram diferenças significativas indicadas pela análise estatística univariada.

Considerando o material desidratado em estufa, os resultados da quantificação espectrofotométrica dos carotenóides totais apresentaram uma correlação de 0,82 com a quantificação dos carotenóides majoritários através de CLAE. Os resultados obtidos para as amostras liofilizadas não mostraram correlação tão satisfatória (cerca de 0,20). Os motivos porque tais resultados mostraram falta de consonância ainda deverão ser esclarecidos com a continuidade da análise do tecido foliar das VCM.

Foram analisadas duas formas de processamento pós-colheita, o congelamento imediato em N₂ seguido de liofilização e a refrigeração seguida de desidratação em estufa. Os resultados obtidos indicaram que o emprego de N₂ e liofilização garantiram a qualidade das amostras, permitindo uma avaliação mais criteriosa do metaboloma foliar parcial, enquanto o emprego da refrigeração e desidratação em estufa, apesar de levar a uma perda generalizada de metabólitos e a um aumento aparente na variação entre as repetições, mostrou um rendimento de carotenóides bastante satisfatório, além de ser mais viável economicamente. No futuro, outras formas de processamento pós-colheita poderão ser testadas, como o branqueamento imediato das amostras, seguido de desidratação em estufa. O branqueamento poderia auxiliar interrompendo o metabolismo foliar antes do processo de desidratação ter início.

Independente da forma de processamento pós-colheita, algumas variedades crioulas apresentaram uma variabilidade química mais elevada (RC), comparativamente a outras (MP), atribuindo-se tal fato a estrutura genética distinta dos genótipos em estudo. Por exemplo, os cruzamentos iniciais que originaram a variedade MPA 01 (MP) envolveram variedades comerciais sintéticas (**Figura 1 – Introdução Geral**) podendo ter resultado em

uma maior homogeneidade genética. Por outro lado se sugere que as práticas de seleção e manejo adotadas pelos agricultores familiares de Anchieta-SC normalmente promovam e auxiliem na manutenção de elevado grau de variabilidade na maioria das VCM.

Os resultados deste capítulo parecem apontar para algumas variedades crioulas como, Língua de Papagaio (LP), Rajado 8 Carreiras (RC) e Palha Roxa (PR) como genótipos fonte de conteúdos superiores de carotenóides. Assumindo que o tecido foliar de milho apresente em outras condições de cultivo rendimento em carotenóides (mg/g de biomassa) similar ao observado neste estudo, é possível competir comercialmente com biomassas como a calêndula e a cenoura, fontes usuais destes compostos para indústria. Se este for o caso, o material foliar do milho pulverizado poderia ser adicionado ao fubá de milho, enriquecendo o seu conteúdo de carotenóides. Tal produto poderia ser utilizado como uma “multi-mistura” enriquecendo a merenda escolar brasileira, por exemplo. Ou então, as folhas pulverizadas poderiam ser encapsuladas e comercializadas como um produto rico em carotenóides. Também poderão ser obtidos extratos semi-purificados industrializados ricos em carotenóides específicos, como a luteína e/ou o β -caroteno, dependendo do genótipo de milho escolhido.

Considerando tal contexto se assume a real possibilidade de aproveitamento das folhas de milho para a obtenção de compostos carotenóides, gerando uma expectativa de fornecimento desta biomassa para a indústria. A comercialização com o setor industrial pode gerar um significativo aumento no aporte financeiro para os agricultores familiares que cultivam este germoplasma atualmente. No entanto, os possíveis efeitos colaterais que esta aproximação com o setor industrial pode trazer para os pequenos agricultores e para a continuidade do cultivo destas variedades, não podem ser esquecidos. Em primeiro lugar os agricultores devem estar conscientes de seus direitos e se precaverem contra a usurpação deste germoplasma ou do conhecimento associado ao seu cultivo, manejo e aproveitamento. Em segundo lugar, existe uma preocupação com relação ao risco de diminuição da diversidade química e genética, atualmente ainda preservada em alguns destes genótipos. Um dos riscos eminentes é a alteração do sistema tradicional de manejo do milho, visando aumentar a homogeneidade da matéria prima, normalmente uma das exigências do setor industrial. Estratégias extras para a valorização da diversidade intravarietal deverão ser adotadas.

Vale ressaltar que é de grande valia perceber que ainda hoje algumas destas variedades são manejadas pelos agricultores familiares, de modo que se mantenha alta a diversidade genética. E que as peculiaridades químicas destas variedades de milho podem e devem ser aproveitadas, gerando um leque mais amplo de possibilidades para os agricultores familiares brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. S.; LOTT, M. N.; MARCUS, D. M. The Macular xanthophylls. **Survey of Ophthalmology**, 50: 183-193 (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**, 1074: 99-105 (2005a).

AMAN, R.; BIEHL, J.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS e NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. **Food Chemistry**, 92: 753-763 (2005b).

BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Physiologia Plantarum**, 104: 203-210 (1998).

BAKO, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 53: 241–250 (2002).

BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: Pigments for photo protection, visual attraction and human health. **The Plant Cell**, 7: 1027-1038 (1995).

BENAKMOUM, A.; ABBEDDOU, S.; AMMOUCHE, A.; KEFALAS, P.; GERASOPOULOS, D. Valorization of low quality edible oil with tomato peel waste. **Food Chemistry**, 110: 684–690 (2008).

BERTRAM, J.S.; VINE, A.L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target. **Biochimica and Biophysica Acta**, 1740: 170-178 (2005).

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

BRITTON, G. Natural food colorants. **Carotenoids**, 5: 141-182 (1992).

CHEMICAL MARKET REPORTER. **World spending on carotenoids to pass \$1 bn mark by 2009**. In: <http://www.chemicalmarketreporter.com> (2006).

DARKO, E.; SCHOEFS, B; LEMOINE, Y. Improved liquid chromatographic method for the analysis of photosynthetic pigments of higher plants. **Journal of Chromatography A**, 876: 111-116 (2000).

DAVIS, C.B.; MARKEY, C.E.; BUSCH, M.A.; BUSCH, K.W. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometrics analysis of UV spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 5925-5933 (2007).

FARRÉ, G.; SANAHUJA, G.; NAQVI, S.; BAI, C.; CAPELL, T.; ZHU, C.; CHRISTOU, P. Travel advice on the road to carotenoids in plants. **Plant Science**, 179: 28–48 (2010).

FÄRBER, A.; JAHNS, P. The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization. **Biochimica and Biophysica Acta**, 1363: 47-58 (1998).

FROST, SULLIVAN, European spending on carotenoids to pass \$400 M mark by 2010. **Multiclient Report on Carotenoids in Europe**. Published by: Frost & Sullivan, CA – USA. In: <http://www.frost.com> (2004).

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

GRAEBNER, I. T.; SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F. de SOUZA, E.M.T. Carotenoids from native Brazilian dark-green vegetables are bioavailable: a study in rats. **Nutrition Research** 24: 671–679 (2004).

GRUNE, T.; SCHRÖDER, P.; BIESALSKI, H.K. Low molecular weight antioxidants. **The Handbook of Environmental Chemistry**, 2: 77–90 (2005).

HAMANO, P.S.; MERCADANTE, A.Z. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). **Journal of Food Composition and Analysis**, 14: 335-343 (2001).

HOSOKAWA, M.; KUDO, M.; MAEDA, H.; KOHNO, H.; TANAKA, T.; MIYASHITA, K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1675: 113–119 (2004).

HOWITT, C.A.; POGSON, B. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant Cell Environment**, 29: 435-445 (2006).

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUIJA, T.; WESTA, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20: 655–661 (2007).

KIMURA, M.; KOBORI, C.N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, 100: 1734–1746 (2007).

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.)**. Tese. Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC (2007).

LAY JR., J.O.; BORGMANN, S.; LIYANAGE, R.; WILKINS, C.L. Problems with the “omics”. **Trends in Analytical Chemistry**, 25: 1046-1056 (2006).

LEARDI, R. Chemometrics in data analysis. In: **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. NAES, T;

ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. NIR Publications, West Sussex. (2003).

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. 2nd Edition. Elsevier. (1998).

LEFSRUD, M.; KOPSLL, D.; WENZEL, A.; SHEEHAN, J. Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigments concentrations during leaf ontogeny, **Scientia Horticulturae**, 112: 136-141 (2007).

LEUNG, I.Y-F. Macular pigment: New clinical methods of detection and the role of carotenoids in age-related macular degeneration. **Optometry**, 79: 266-272 (2008).

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, 881: 543-555 (2000).

O-SULLIVAN, L.; RYAN, L.; AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Cellular transport of lutein is greater from uncooked rather than cooked spinach irrespective of whether it is fresh, frozen, or canned. **Nutrition Research**, 28: 532–538 (2008).

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. (autores); CORADIN, L.; POMBO, V.B. (organizadores). **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 100 p (2008).

SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1054: 217–226 (2004).

SHARONI, Y.; DANILENKO, M. DUBI, N.; BEN-DOR, A.; LEVY, J. Carotenoids and transcription. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 430: 89–96 (2004).

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, 812: 85–99 (2004).

USDA - NCC **Carotenoid Database for U. S. Foods** – 1998 (2002).

VAN BREEMEN, R.B.; PAJKOVIC, N. Multitargeted therapy of cancer by lycopen. **Cancer Letters**, 269 (2): 339-351 (2008).

VIEIRA, M. C.; GOMES, H. E.; SANGALLI, A.; HEREDIA, Z. N. A.; TEIXEIRA, I. R., RAMOS, M. B. M. Crescimento e produção de biomassa de calêndula (*Calendula officinalis* L.) provenientes de dois tipos de diáporos e duas colorações de capítulos florais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais – Botucatu**, 8: 193-197 (2006).

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. **Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products**. Wiley & Sons, London. 425p. (1999).

WRONA, M.; ROZANOWSKA, M.; CZUB-PELECH, B.; SARNA. Antioxidant action of zeaxanthin in protection of human RPE cells against oxidative damage. **Association Research on Vision Ophthalmology**, 42: 576 (2001).

US 5510551 – **Extraction of carotenoids from natural sources** (1996).

US 0116818 A1 – **Extract containing beta-cryptoxanthin component from persimmon fruit**. (2007).

WO 114794 A1 – **Isolation and purification of carotenoids from marigold flowers**. (2006).

PI 0311688-3 A – **Processo para a produção de cristais de carotenóides partindo de uma resina oleosa de um vegetal que contém carotenóide**. (2008).

US 258782 – **Isolation of lutein from alfafa**. (2004).

WO 03/105807 A1 – **Microcrystalline zeaxanthin with high bioavailability in oily carrier formulations**. (2003).

WO 117826 – **Composition comprising olive oil enriched and supplemented with lutein**. (2006).

CAPÍTULO 2 – Análise dos compostos fenólicos de tecido foliar das variedades de milho por espectrofotometria UV-visível, espectrometria de massa (MALDI-TOF) e cromatografia líquida de alta eficiência.

INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de relevante importância na fisiologia vegetal, estando envolvidos no crescimento e na reprodução destes organismos, além de ocuparem uma posição chave na resistência a patógenos e na defesa anti-herbivoria (ROSS, KASUM, 2002). Formam um grupo extenso e bastante diversificado de compostos que compartilha uma estrutura química comum, com pelo menos um anel benzênico ligado a grupamentos hidroxila. Através de uma série de modificações possíveis sobre este esqueleto básico podem ser obtidos pelo menos 8000 compostos fenólicos diferentes (TSAO, DENG, 2004; GRUNE et al., 2005; PRODANOV et al., 2008). As suas principais classes são os ácidos fenólicos, os flavonóides, os estilbenos e as lignanas (TAPIERO et al., 2002; TSAO, DENG, 2004).

Estudos apontam a presença nas folhas do milho (*Zea mays*) de alguns ácidos fenólicos, como os ésteres do ácido caféico e do ácido clorogênico. Estes compostos fenólicos podem ser observados na proximidade dos locais de infecção com patógenos, indicando seu possível envolvimento com a resposta de defesa desta espécie vegetal a estresses bióticos (GUELDNER et al., 1992; STAFFORD, 1998). No caso do ataque de pragas, como a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), um conteúdo elevado de ácido clorogênico nas folhas pode comprovadamente auxiliar uma variedade de milho a apresentar um desempenho de campo superior, comparativamente a variedades que não apresentam este fenótipo (GUELDNER et al., 1992).

Deste modo, o estabelecimento do perfil de compostos fenólicos no tecido foliar das variedades crioulas de milho pode ser justificado, visando uma melhor caracterização e valorização deste germoplasma, notadamente em função do envolvimento destes metabólitos secundários com as respostas de defesa a diferentes estressores bióticos e também abióticos, como temperatura, disponibilidade hídrica e insolação (GUELDNER et al., 1992; STAFFORD, 1998; RHANDIR, SHETTY, 2005; HICHEM et al., 2009). Além disso, existe a possibilidade de obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir da biomassa foliar do milho e o eventual interesse da indústria alimentícia visando o emprego

destes extratos como agentes antioxidantes naturais, agregando assim mais uma alternativa para o seu aproveitamento.

A atividade antioxidante apresentada pelos compostos fenólicos parece ser tão efetiva que diversos estudos sugerem a sua utilização na indústria alimentícia, em substituição aos antioxidantes sintéticos, como o BHT (hidroxitolueno butilado), sabidamente carcinogênicos (SEO et al., 2003; WODJILO et al., 2007). Além disso, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos existentes nas frutas e nas verduras parece ser mais efetiva que àquela observada para as vitaminas essenciais, presentes nestes mesmos alimentos. Adicionalmente, o alto potencial redox dos compostos fenólicos permite que atuem simultaneamente como agentes redutores, sequestrantes de espécies reativas de oxigênio, ou ainda, quelantes de metais (TSAO, DENG, 2004).

Outros efeitos benéficos sobre a saúde relacionados à ingestão de compostos fenólicos são:

- atividade antitumoral (YANG et al., 2001; ORSOLIC et al., 2003; ZIELINSKI, 2003; RODRIGUES-CASO et al., 2003; JEONG et al., 2004; SEERAM et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; MARI et al., 2010);
- atividade hipoglicêmica (PRODANOV *et al.*, 2008; MONTAGUT *et al.*, 2009);
- e atividade profilática e terapêutica sobre problemas cardiovasculares (JUSTESEN *et al.*, 1998; TAPIERO *et al.*, 2002; PRODANOV *et al.*, 2008; MONTAGUT *et al.*, 2009; PRASAIN *et al.*, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Material foliar de *Zea mays*

Foram consideradas as variedades crioulas de milho: Mato Grosso Palha Roxa (MG), Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC), Língua de Papagaio (LP) e MPA 01 (MP) e também, duas variedades comerciais como testemunha, BRS 1030 (BR - híbrido simples) e Fortuna (FO - variedade de polinização aberta).

Os estudos utilizaram material foliar oriundo de cultivo na safra 2007/ 2008, efetuado na fazenda experimental da Ressacada (CCA-UFSC), localizada em Florianópolis-SC.

Coleta e preparo do material foliar

O material foliar foi coletado no estágio de emissão das flores femininas, aproximadamente uma semana após a emissão do pendão masculino. Para tal, a quinta folha (ápice → base) foi selecionada, por ser usualmente a folha mais próxima ao local de emissão da espiga. Apenas o terço mediano do limbo foliar foi considerado (10g/planta, peso fresco).

O material foliar foi desidratado em estufa (42-45°C, até peso constante) e conservado em recipientes plásticos (ausência de luz, em temperatura ambiente). Para efeito dos procedimentos analíticos, o material foliar de 6 plantas de cada repetição foi agrupado em uma única amostra, sendo que para cada variedade de milho foram consideradas 4 repetições (n = 4).

Obtenção do extrato metanólico (MeOH 100%)

Amostras ($0,150 \pm 0,001$ g, peso seco) foram adicionadas de 10 mL de metanol puro e mantidas a 25°C, durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados em suporte de celulose, sob vácuo, e armazenados a -20°C em frascos âmbar, cuja atmosfera interna foi substituída por N₂ gasoso.

Espectrofotometria de varredura UV-visível

Os extratos foram submetidos à espectrofotometria de varredura UV-visível (Shimadzu 2301), abrangendo a faixa espectral de 200 a 700 nm, em intervalo de 1 nm.

Quantificação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado via espectrofotometria e reação de Folin-Ciocalteu, conforme descrito previamente (RANDHIR et al., 2002). Os valores de concentração foram calculados com auxílio de uma curva-padrão externa (ácido gálico - Sigma, 1 a 243 mg/mL, $y = 1,4028x - 0,0259$, $r^2 = 0,999$) e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico/ mg tecido.

Detecção dos compostos fenólicos por espectrometria de massa (MALDI-TOF/ EM)

A detecção dos compostos fenólicos foi realizada com injeção direta de alíquotas do extrato metanólico (1 μ L) em 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). Foram considerados apenas os sinais massa/carga (m/z) ≥ 250 .

Semi-purificação das amostras

O extrato metanólico (1 mL) foi evaporado sob fluxo de N_2 gasoso e particionado através da adição de 250 μ L de metanol 100% e 750 μ L de heptano. Após agitação (10 segundos, vórtex), a solução permaneceu em repouso (10 min) e o sobrenadante (fração heptano) foi descartado. Tal procedimento foi repetido 2 vezes.

Detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a semi-purificação, alíquotas de 10 μ L da fração polar remanescente foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna de fase reversa (C_{18} Shim-Pack CLC-ODS, 250 mm x 4,6mm \varnothing , 5 μ m - 40°C) acoplada a pré-coluna (C_{18} Shim-Pack CLC-ODS, 30 mm x 4,6mm \varnothing , 5 μ m) e detector espectrofotométrico UV-visível ($\lambda = 280$ nm). A eluição utilizou H_2O : AcOH: η -BuOH (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel e fluxo de 0,8 mL/min. A identificação dos compostos de interesse foi efetuada via comparação com os tempos de retenção e co-cromatografia de compostos padrões, sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração externa (ácido gálico – Sigma; 0,06 a 2 mg/mL, $y = 3E+07x + 128,25$, $r^2 = 1$) e comparação com a área dos picos dos compostos de interesse. Os valores foram expressos em mg de equivalentes de ácido galico/mg de biomassa seca, sendo resultantes da média de três injeções consecutivas.

Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à ANOVA, considerando o modelo: $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$, onde Y_{ij} é a observação da i -ésima variedade ($i = 1, 2, \dots, 8$) da j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, 4$); μ , equivale à média geral; g_i é o efeito do tratamento, supostamente aleatório, normal e independente, distribuído com média zero e variância σ_g^2 ; b_j é o efeito das repetições e e_{ij} é o erro experimental. Variáveis que apresentarem significância $P \leq 0,05$ foram submetidas a testes de separação das médias através do método *post-hoc* LSD (*least squares difference*). As análises foram realizadas com apoio dos programas estatísticos Excel (Microsoft Office, 2003) e Prism GraphPad versão 2.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos geralmente são bastante polares, solúveis em água e em diferentes alcoóis, como o metanol e o etanol (LAPORNIK et al., 2005). Sendo assim, o procedimento inicialmente adotado para a extração destes compostos do tecido foliar das variedades de milho utilizando metanol 100%, pareceu adequado. Estudos indicam o metanol como um solvente eficaz para a extração destes metabólitos secundários, principalmente compostos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, em suas formas livre ou esterificada (TSAO, DENG, 2004; LAPORNIK et al., 2005; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006).

De modo a realizar uma análise exploratória inicial, os extratos MeOH 100% foram submetidos a varreduras em espectrofotômetro UV-visível ($\lambda = 200$ a 700 nm - **Fig. 1**), resultando em perfis similares para as variedades em estudo. Em uma análise visual, as diferenças mais marcantes entre as variedades para estes extratos pareceram ser de ordem quantitativa. Para todos os genótipos, os maiores valores de absorvância foram observados na faixa de detecção dos compostos fenólicos (290 a 430 nm), ultrapassando o limite de detecção do equipamento em 290 nm. As variedades crioulas, Mato Grosso Palha Roxa (MG), Roxo (RX) e Língua de Papagaio (LP) apresentaram valores de absorvância comparativamente mais elevados na janela espectral entre 300 e 360 nm, sendo esta a faixa de absorção dos fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico (≈ 320 nm) e do ácido caféico (≈ 360 nm - TSAO, DENG, 2004), por exemplo. No que se refere às duas variedades utilizadas como

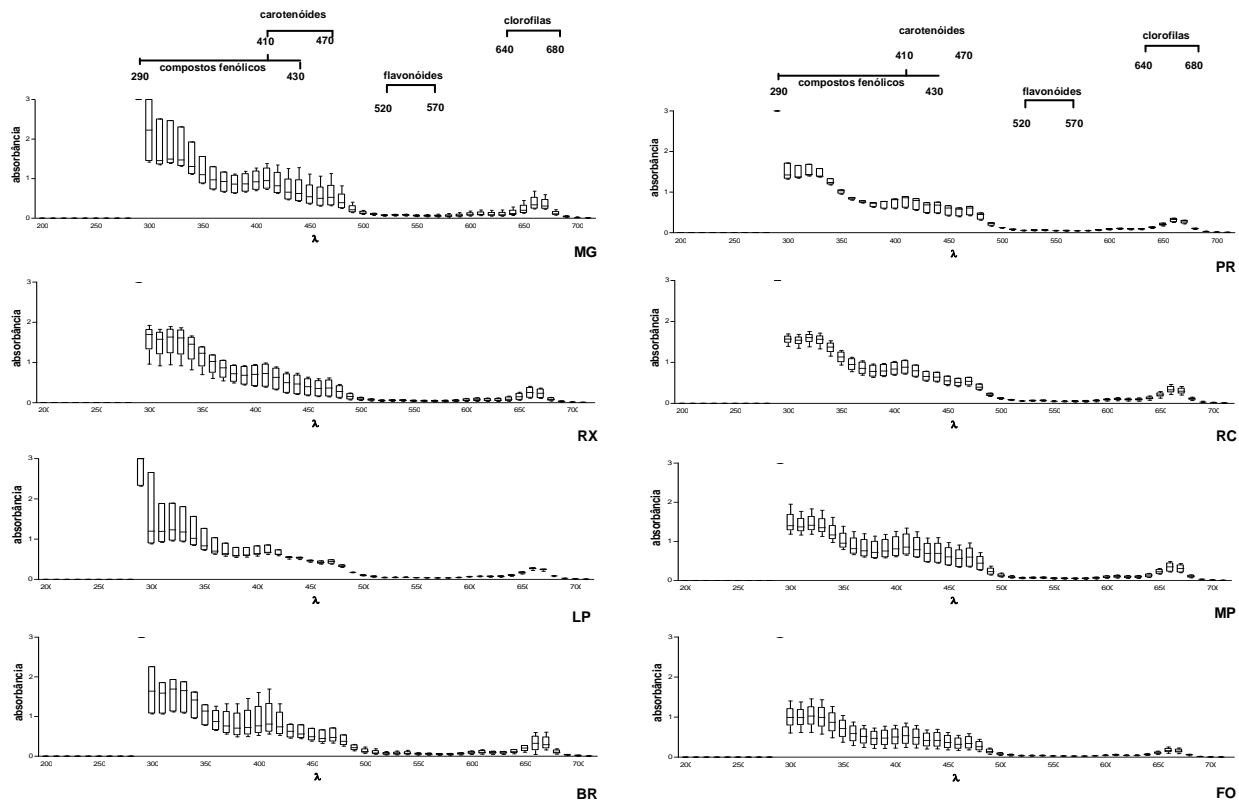


Figura 1: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH 100%, obtido a partir do tecido foliar das variedades crioulas de milho ($n = 4$ repetições).

MG = Mato Grosso Palha Roxa. **PR** = Palha Roxa. **RX** = Roxo. **RC** = Rajado 8 Carreiras. **LP** = Línqua de Papaaiao. **MP** = MPA 01. **BR** = BRS 1030 e **FO** = Fortuna

testemunha, BRS 1030 apresentou um teor mais elevado de compostos fenólicos (**Fig. 1**).

O fato de não ter sido detectada absorção de luz na região de comprimentos de onda entre 190 e 280 nm (**Fig. 1**) para nenhum dos extratos analisados é de interesse, porque segundo Tsao e Deng (2004), importantes compostos fenólicos apresentam máximas de absorbância em 280 nm, tais como os derivados do ácido benzóico e as dihidro-chalconas.

Na tentativa de esclarecer esta informação, foram efetuadas varreduras UV-vis em amostras de padrões comerciais de ácido gálico, um dos derivados do ácido benzóico, e também de ácido clorogênico, um dos derivados do ácido cinâmico (**Fig. 2**). Os perfis espectrais obtidos para estes padrões comerciais iniciaram a absorção de luz apenas em 286 nm (em 290 nm na representação gráfica dos perfis – **Fig. 2**) e não em 280 nm como indicado pelas informações obtidas na literatura. Sendo assim, não se descarta a hipótese de que o pico de absorbância observado em 290 nm, para todas as variedades (**Fig. 1**), esteja associado à presença de uma concentração elevada de derivados do ácido benzóico e/ou dihidro-chalconas.

Subsequentemente, alíquotas do extrato metanólico foliar das VCM foram analisadas quanto ao conteúdo total de compostos fenólicos, utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram um teor médio para todas as variedades analisadas de $10,280 \pm 2,427$ mg de equivalentes de ácido gálico/g de folha. As variedades que apresentaram um conteúdo superior destes compostos foram crioulas (**Fig. 3**), RX ($14,375 \pm 1,648$ mg/g) e RC ($13,284 \pm 1,311$ mg/g). E a variedade crioula MP foi aquela que mostrou o menor teor de compostos fenólicos dentre todas, com média igual a $7,420 \pm 0,626$ mg/g. A variância observada para os tratamentos se mostrou superior àquela observada para as repetições de cada variedade, com quadrados médios (QM) iguais a 23,56 e 1,07, respectivamente. O efeito residual foi igual a 1,03 e os valores de r^2 igual a 0,884 e F igual a 22,93.

Kuhnen (2007) determinou o conteúdo de compostos fenólicos nos grãos das mesmas VCM que tiveram as folhas aqui analisadas, tendo sido obtido um teor médio de $775,123 \pm 155,285$ µg equivalentes de ácido gálico/g de farinha e curiosamente os teores mais elevados foram observados para as variedades RX (média = 988,73 µg/g) e RC (média = 908,45 µg/g), bem como, o menor teor para a variedade MP (média = 545,92 µg/g).

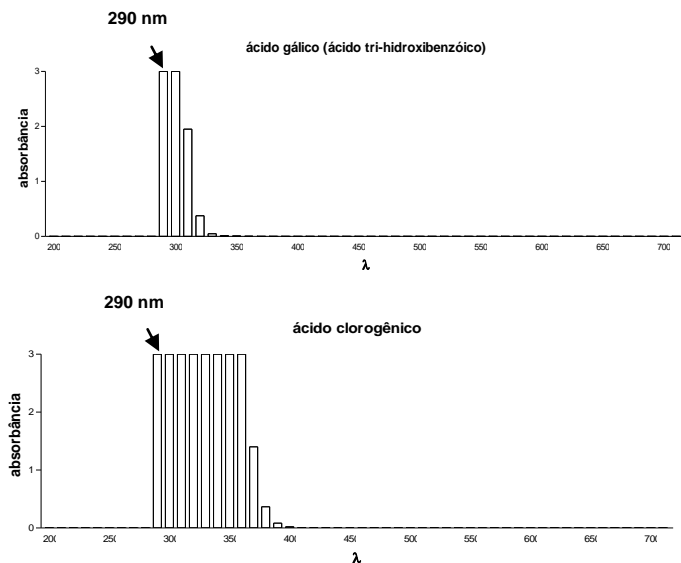


Figura 2: Perfis espectrofométricos obtidos para os padrões de ácido gálico e de ácido clorogênico (0,200 mg/mL) dissolvidos em MeOH 100%. As setas apontam o início da absorção de luz em 290 nm.

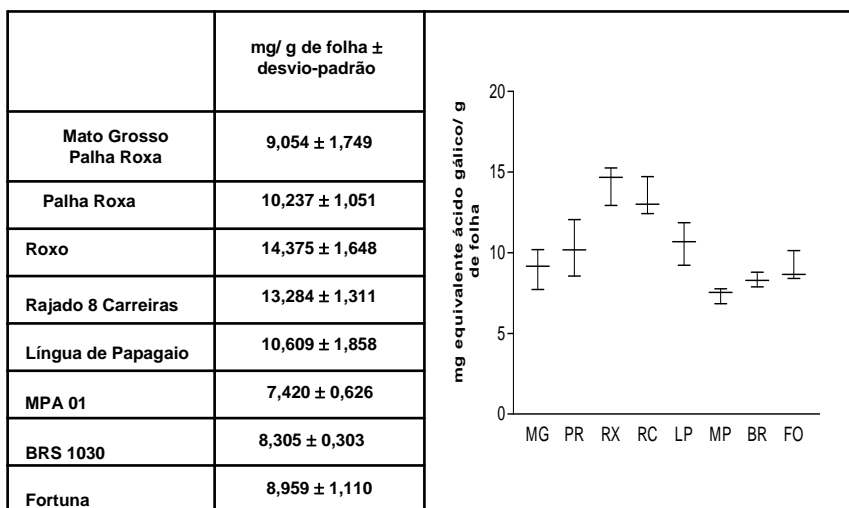


Figura 3: Concentração de compostos fenólicos totais (mg/g de folha ± desvio-padrão) determinada através da reação de Folin Ciolcateau, para o extrato MeOH 100% (n= 4 repetições).

Desse modo, foi calculada a correlação entre a concentração de compostos fenólicos presente nas folhas e o teor destes metabólitos nos grãos, obtendo-se um valor de 0,98 para o coeficiente de correlação. Embora a concentração média de compostos fenólicos nos grãos seja cerca de 13 vezes inferior ao conteúdo médio observado para o tecido foliar destas VCM.

Um estudo recente avaliou a concentração de compostos fenólicos totais presentes nas folhas de dois genótipos de milho, tendo observado uma média de 13,350 mg/g de folha e a existência de relação direta entre um maior conteúdo destes metabólitos e uma maior resistência do milho ao estresse salino (HICHEM et al, 2009). Tal valor é apenas ligeiramente superior à média observada para todas as variedades aqui analisadas, mas similar ao observado para as variedades crioulas RX e RC (**Fig. 3**).

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos nos grãos de milho aparece com maior frequência na literatura científica consultada, como observado para uma variedade de grãos roxos cultivada no Peru, que apresentou teor médio igual a 17,56 mg/g de farinha (CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2003). Outro estudo também realizado com grãos de milho roxo peruano mostrou um conteúdo de compostos fenólicos não antociânicos igual a 13,285 mg/g de farinha (PEDRESCHI, CISNEROS ZEVALLOS, 2007). Considerando que são tecidos distintos em estrutura e função, é interessante o fato de folhas e grãos de milho apresentarem concentrações de compostos fenólicos totais similares.

Del Pozo-Insfran et al. (2006) compararam o conteúdo destes metabólitos entre uma variedade de grãos brancos e duas variedades de grãos azuis, uma de origem americana e outra, mexicana. O primeiro genótipo mostrou um conteúdo médio mais elevado de compostos fenólicos totais ($4,899 \pm 0,119$ mg/g), comparativamente aos dois genótipos de grãos azuis (var. americana = $4,510 \pm 0,018$ mg/g e var. mexicana = $1,310 \pm 0,052$ mg/g). Em estudo similar, grãos de 18 genótipos de milho mexicano apresentaram uma concentração de compostos fenólicos totais variando entre 1,7 a 34 mg/g de farinha. Neste caso, a presença de pigmentos antociânicos nos grãos parece ser diretamente relacionada com o teor fenólico, já que valores superiores destes metabólitos foram sempre observados nas variedades pigmentadas, de grãos roxos (média = 15,41 mg/g), de grãos negros (média = 5,10 mg/g) e de grãos vermelhos (média = 4,86 mg/g). Por sua vez, as variedades de grãos amarelos e brancos apresentaram

concentrações médias de 3,83 mg/g e 1,70 mg/g, respectivamente (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

Estas informações ressaltam a influência do genótipo sobre o teor de compostos fenólicos totais, com variedades possuidoras de grãos com pigmentos roxos, negros e vermelhos mostrando um conteúdo mais elevado, em comparação aos genótipos de grãos amarelos e brancos. Curiosamente, no presente estudo esta distinção também foi observada (**Fig. 3**), com RX e RC possuidoras de grãos com pericarpo pigmentado, RX de coloração roxa e RC de coloração variável, mostrando teor de compostos fenólicos mais elevado do que MP, BR e FO, de grãos amarelos.

A análise dos extratos em acetona 70% dos estigmas das flores de 15 variedades de milho provenientes da Sérvia revelou um conteúdo apreciável de compostos fenólicos, i.e., 9 a 29 mg/g de biomassa, conforme o genótipo considerado (MAKSIMOSIĆ et al., 2005). A determinação da concentração dos fenóis totais nas flores femininas das VCM (KUHNNEN, 2007) estabeleceu valores médios similares ao estudo supracitado, com RX apresentando cerca de 45 mg/g e teores relativamente menores para as variedades LP (24 mg/g) e MG (22 mg/g). Estes valores se mostraram superiores à média observada para o extrato MeOH 100% das folhas i.e., 10,28 mg/g. Já o tecido floral das variedades PR e RC apresentou valores mais similares ao teor médio das folhas, com médias iguais a 13 e 10 mg/g, respectivamente. Apesar do conteúdo ligeiramente inferior de compostos fenólicos no tecido foliar das VCM, este tecido parece ser mais interessante quanto à sua exploração comercial, em função do maior volume produzido e por ainda não apresentar um destino economicamente rentável, comparativamente aos seus grãos e flores femininas.

A análise da composição química de resíduos da agroindústria alimentícia, e.g., cascas e sementes resultantes do processamento de frutas, indica a possibilidade de aproveitamento destas biomassas para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. Resíduos de groselha negra (*Ribes nigrum* var. Rosenthal) contêm cerca de 8000 mg de compostos fenólicos totais/L (extrato metanólico), enquanto teores de 1000 mg/L e 3200 mg/L foram observados em resíduos de groselha vermelha (*Ribes rubrum* var. Rondon) e de uva (*Vitis vinifera* var. Pinot Noir), respectivamente (LAPORNIK et al., 2005). Convertendo-se os resultados da quantificação dos compostos fenólicos das folhas das VCM para a unidade utilizada no estudo supracitado (mg/L), valores bastante atraentes são percebidos, ligeiramente superiores à

groselha vermelha, 1041 mg/L (var. MP) a 1425 mg/L (var. RX). Sendo assim se propõe que as folhas de milho poderiam também ser aproveitadas para obtenção de compostos fenólicos, visando o uso como antioxidantes naturais, pela indústria alimentícia.

Um estudo realizado por Wojdylo et al. (2007) determinou o teor de compostos fenólicos totais (reativo de Folin-Ciocalteu) em extratos MeOH 80% de 32 espécies vegetais. As maiores concentrações foram observadas para *Echinacea purpurea* (folha – 15,15 mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g amostra), *Melissa officinalis* (planta – 13,2 mg EAG/100 g) e *Taraxacum officinale* (raiz – $12,6 \pm 0,34$ mg EAG/100 g). Comparando os valores obtidos neste estudo com os observados nas amostras de tecido foliar das VCM, entre 7,420 e 14,375 mg EAG/g de folha (**Fig. 3**), percebe-se a viabilidade de aproveitamento da biomassa foliar das VCM para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. Outro estudo avaliou o extrato metanólico de artemísia (*Artemisia herba*), planta empregada pela medicina tradicional chinesa no tratamento de distúrbios digestivos e da febre, além de ser prescrita como diurético e anti-inflamatório (SEO et al., 2003). Neste caso, um conteúdo de compostos fenólicos totais de $113,4 \pm 0,5$ mg/g de biomassa foi detectado, sendo ca. 10 vezes superior ao observado para as folhas de milho (**Fig. 3**). No entanto, no estudo de SEO et al. (2003) as amostras foram liofilizadas, podendo tal procedimento influenciar, em alguma extensão, nas diferenças observadas nos dois estudos, uma vez que aqui as folhas de milho foram desidratadas em estufa.

Para uma análise mais abrangente dos extratos metanólicos das folhas do milho, alíquotas (1 μ L) foram analisadas por espectrometria de massa (EM). A EM fornece informações relacionadas ao peso molecular e a estrutura química dos compostos químicos, utilizando as diferenças na razão entre a massa e a carga (m/z) das moléculas ionizadas em um determinado extrato, para separá-las e identificá-las. Para que isto ocorra, os diferentes espectrômetros de massa atuam empregando fontes de ionização e analisadores diversos. As fontes de ionização são responsáveis pela aquisição de carga dos compostos químicos presentes nos extratos, através da perda ou ganho de prótons, e também, pela transferência destes íons para uma fase gasosa. Os analisadores realizam então a separação dos compostos em função dos seus diferentes valores de m/z (FULCRAND et al., 2008). A técnica de EM aqui empregada, MALDI-TOF, utiliza a irradiação da amostra por um feixe de laser para a ionização da matriz (MALDI - *matrix assisted laser desorption ionization*). Já a separação dos íons

é obtida em função de diferenças nos seus tempos de voo (TOF - *time of flight*), dentro de um campo eletromagnético pré-determinado.

Um espectro de massa representativo dos resultados obtidos através do emprego da EM do tipo MALDI-TOF para o tecido foliar das variedades de milho em estudo é mostrado na **Figura 4**. De modo geral, foram observados sinais em uma janela espectral entre 100 e 1000 m/z. No entanto, para a busca da identidade dos compostos fenólicos presentes no extrato organosolvente, foram considerados apenas os sinais acima de 250 m/z (**Fig. 4**).

Além disso, dentro do escopo do presente capítulo, a busca da identidade dos sinais de interesse considerou principalmente os valores de m/z para os derivados do ácido benzóico e para os derivados do ácido cinâmico (**Fig. 5**). Os sinais m/z propostos consideraram estes ácidos fenólicos na sua forma livre, bem como esterificados a diferentes resíduos de açúcar ou a pequenos radicais orgânicos como; metil, etil, propil, butil, acetil e malonil. Informações da literatura ressaltam que os compostos fenólicos podem ser encontrados na forma livre, esterificados a outros ácidos fenólicos, formando oligômeros, ou então esterificados a resíduos de açúcar, como a glucose, arabinose, galactose, ramnose e xilose (TAPIERO et al., 2002; TSAO, DENG, 2004). No caso específico de extratos de grãos de milho, a grande maioria (cerca de 85%) dos compostos fenólicos se encontra esterificado aos componentes da parede celular (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

Os resultados da busca de identidade para os sinais detectados nos espectros de massa adquiridos em modo positivo a partir dos extratos metanólicos são apresentados no conjunto de tabelas que formam a **Figura 6**.

Os perfis espectrais de todas as variedades apresentaram sinais típicos de derivados do ácido benzóico, e.g., ésteres dos ácidos gálico (m/z 154), protocatecuico (m/z 170), vanílico (m/z 168) e siríngico (m/z 198 - **Figs. 5 e 6**). Mais especificamente, todas as variedades apresentaram um sinal em 330 m/z que pode ser tentativamente atribuído ao ácido protocatecuico metilado glicosídeo, ao ácido gálico metilado ramnosídeo, ao ácido gálico etilado xilosídeo, ao ácido vanílico glicosídeo e/ou ao ácido siríngico xilosídeo. Com exceção a variedade RX, as demais apresentaram um pico em 440 m/z indicando a presença do ácido benzóico di malonado ramnosídeo (**Fig 6**). Com relação ao número de sinais referentes aos derivados do ácido benzóico, as variedades crioulas com número mais elevado foram RX (24 sinais m/z) > PR (22 sinais m/z) = LP (22 m/z). Todavia, nenhuma apresentou número próximo

àquele observado para a variedade testemunha BR (41 sinais m/z). No outro extremo, a variedade FO, também utilizada como testemunha, apresentou apenas 10 sinais m/z (**Fig. 6**).

Considerando o número de derivados fenólicos esterificados detectados se constatou que o ácido benzóico ocorre como composto principal, com média de 6 ésteres detectados para todas as variedades, seguido do ácido gálico com 4 derivados. Além disso, foi observado que alguns dos sinais se mostraram específicos para certos genótipos. Por exemplo, apenas os extratos da variedade PR apresentaram sinais em 302 m/z (ácido gálico xilosídeo), em 310 m/z (ácido benzóico propilado ramnosídeo e/ou ácido benzóico butilado xilosídeo), em 388 m/z (ácido gálico malonado xilosídeo), em 462 m/z (ácido protocatecuico ramnosil glicosídeo e/ou ácido vanílico xilosil glicosídeo) e em 506 m/z (ácido siríngico ramnosil glicosídeo). A despeito do maior número de sinais m/z obtidos para as variedades RX e BR, nenhum composto específico foi detectado para RX, enquanto apenas dois picos específicos (256 m/z e 386 m/z) foram detectados para a variedade híbrida BR (**Fig. 6**).

Nos extratos foliares das variedades de milho também foram observados sinais indicando a presença de ésteres de fenilpropanóides, e.g., ácidos cinâmico (m/z 148), cumárico (m/z 138), caféico (m/z 180), ferúlico (m/z 194), sinápico (m/z 224) e o ácido clorogênico (m/z 354 – **Figs. 5 e 6**).

Os espectros analisados apresentaram um composto de 250 m/z associado ao ácido cumárico malonado e/ou ao ácido ferúlico butilado e também um pico de 294 m/z, sugerindo a presença do ácido cinâmico ramnosídeo, porém, este resultado deverá ser confirmado, porque se suspeita que possa ser um artefato da técnica ou resquício da matriz orgânica utilizada para a ionização das amostras. Um sinal m/z 440 detectado em todos os espectros, exceto nos da variedade RX, sugere a presença de ácido benzóico di malonado ramnosídeo, do ácido cinâmico di ramnosídeo ou ainda do ácido clorogênico malonado (**Fig. 6**). As variedades crioulas com maior número de sinais associados aos derivados do ácido cinâmico foram MG (25 sinais m/z) > RC (24 sinais m/z) > LP (23 m/z). Novamente, a variedade BR apresentou o número mais elevado de sinais (27 m/z) e, curiosamente, RX mostrou o menor número (11 sinais m/z), inferior inclusive a FO (14 sinais m/z).

Considerando o número de ésteres observados para cada composto, os ácidos cinâmico e sinápico apresentaram a maior diversidade química (4 ésteres), seguidos pelo ácido cumárico (3 ésteres - **Fig. 6**).

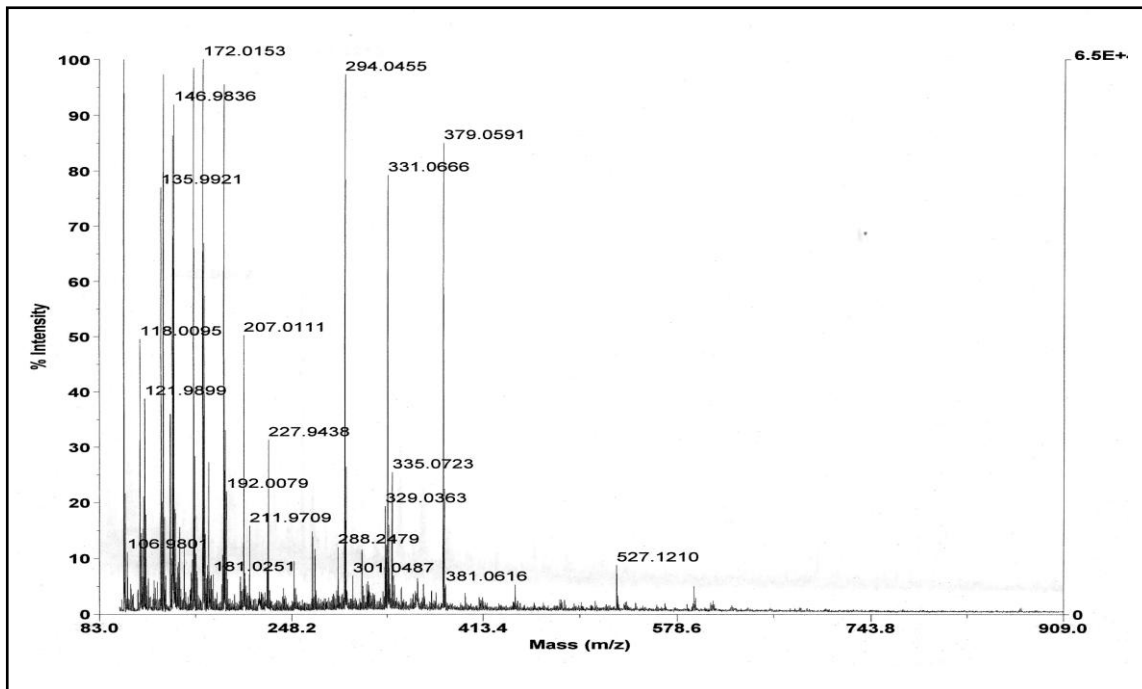
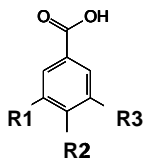
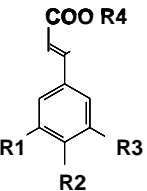


Figura 4: Espectro de massa obtido através da técnica de MALDI-TOF para o extrato MeOH 100% do tecido foliar, mostrando um perfil de sinais massa carga (m/z) positivos (cátions) observados para a variedade **Mato Grosso Palha Roxa (MG)**.



		m/z
ácido gálico	R = 3 OH	154
ácido protocatecuico	R = 2 OH + H	170
ácido siríngico	R = OCH₃ + OH + OCH₃	198
ácido vanílico	R = OCH₃ + OH + H	168
ácido benzóico	R = 3 H	122

↑ polaridade



		m/z
ácido caféico	R = 2 H + 2 OH	180
ácido sinápico	R = 2OCH₃ + H + OH	224
ácido ferúlico	R = OCH₃ + 2H + OH	194
ácido clorogênico	R = H + 2OH + ác. quínico	354
ácido cumárico	R = 3H + OH	164
ácido cinâmico	R = 4H	148

↑ polaridade

Figura 5: Compostos fenólicos de baixo peso molecular que apresentam apenas um anel benzênico em sua estrutura como os derivados do ácido benzóico (A) e os derivados do ácido cinâmico (B).

(baseado em TSAO, DENG, 2004)

Mato Grosso Palha Roxa	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 268,0397)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 268,0397)
ácido benzóico + etil + ramnose	(M+ = 296,0437)
ácido benzóico + propil + xilose	(M+ = 296,0437)
ácido benzóico + ramnose + ramnose	(M+ = 414,0905)
ácido benzóico + metil + xilose + ramnose	(M+ = 414,0905)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,9812)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,101)
ácido protocatecuico + malonil + malonil + glicose + glicose	(M+ = 650,0952)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,101)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,101)
ácido gálico + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 650,0952)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,101)
ácido vanílico + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 592,2664)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,101)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0338) - matriz
ácido cinâmico + propil + ramnose	(M+ = 336,0666)
ácido ciano hidroxil-cinâmico	(M+ = 379,0591) - matriz
ácido cinâmico + malonil + ramnose	(M+ = 380,0461)
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9812)
ácido cinâmico + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 628,1319)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,0369)
ácido cumárico + xilose	(M+ = 296,0437)
ácido cumárico + malonil + malonil	(M+ = 336,0666)
ácido cumárico + malonil + malonil + ramnose + ramnose	(M+ = 628,1319)
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,9069)
ácido caféico + malonil + xilose	(M+ = 398,0806)
ácido caféico + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 660,4101)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,0369)
ácido ferúlico + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 588,1788)
ácido ferúlico + malonil + malonil + xilose + glicose	(M+ = 660,4101)

Figura 6(A): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos **compostos fenólicos** observados para a variedade **Mato Grosso Palha Roxa (MG)**.

Mato Grosso Palha Roxa - Continuação	
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,9069)
ácido sinápico + etil + glicose	(M+ = 414,0905)
ácido sinápico + malonil + malonil + xilose + xilose	(M+ = 660,4101)
ácido clorogênico + etil	(M+ = 382,105)
ácido clorogênico + butil	(M+ = 410,0686)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,9812)
ácido clorogênico + metil + ramnose + ramnose	(M+ = 660,4101)
ácido clorogênico + etil + xilose + ramnose	(M+ = 660,4101)
ácido clorogênico + propil + xilose + xilose	(M+ = 660,4101)

Figura 6(A): Compostos fenólicos, variedade Mato Grosso Palha Roxa

Palha Roxa	
ácido benzóico + glicose	(M+ = 284,2635)
ácido benzóico + propil + ramnose	(M+ = 310,0484)
ácido benzóico + butil + xilose	(M+ = 310,0484)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,9588)
ácido protocatecuico + metil + ramnose	(M+ = 314,0724)
ácido protocatecuico + etil + xilose	(M+ = 314,0724)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,0789)
ácido protocatecuico + ramnose + glicose	(M+ = 462,209)
ácido gálico + xilose	(M+ = 302,0247)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,0789)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,0789)
ácido gálico + glicose	(M+ = 332,0482)
ácido gálico + malonil + xilosil	(M+ = 388,1046)
ácido vanílico + ramnose	(M+ = 314,0724)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,0789)
ácido vanílico + xilose + glicose	(M+ = 462,209)
ácido vanílico + ramnose + glicose	(M+ = 476,221)
ácido siringico + malonil	(M+ = 284,2635)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,0789)
ácido siringico + ramnose + glicose	(M+ = 506,2118)
ácido siringico + metil + glicose + glicose	(M+ = 536,0473)
ácido siringico + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 592,3154)

Figura 6(B): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade Palha Roxa (PR).

Palha Roxa - Continuação	
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0037) - matriz
ácido cinâmico + glicose	(M+ = 310,0484)
ácido ciano-hidroxicinâmico	(M+ = 379,0163) - matriz
ácido cinâmico + malonil + ramnose	(M+ = 380,0614)
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9588)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,0369)
ácido cumárico + ramnose	(M+ = 310,0484)
ácido cumárico + malonil + xilose + glicose	(M+ = 518,277)
ácido cumárico + malonil + malonil + xilose + glicose	(M+ = 629,8727)
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,8836)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,0369)
ácido ferúlico + malonil + malonil + xilose + xilose	(M+ = 629,8727)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,8836)
ácido sinápico + malonado	(M+ = 310,0484)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,9588)
ácido clorogênico + ramnose	(M+ = 499,6085)
ácido clorogênico + malonil + glicose	(M+ = 602,2463)
ácido clorogênico + metilado + glicose + glicose	(M+ = 692,3543)

Figura 6(B): Compostos fenólicos, variedade Palha Roxa

Roxo	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 267,9173)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 267,9173)
ácido benzóico + glicose	(M+ = 284,2914)
ácido benzóico + etil + ramnose	(M+ = 296,0461)
ácido benzóico + propil + xilosideo	(M+ = 296,0461)
ácido protocatecuico + metil + ramnose	(M+ = 314,0992)
ácido protocatecuico + etil + xilose	(M+ = 314,0992)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,0955)
ácido protocatecuico + propil + glicose + glicose	(M+ = 520,1451)

Figura 6(C): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade Roxo (RX).

Roxo - Continuação	
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,0955)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,0955)
ácido gálico + glicose	(M+ = 332,1055)
ácido gálico + etil + glicose + glicose	(M+ = 520,1451)
ácido gálico + propil + ramnose + glicosideo	(M+ = 520,1451)
ácido gálico + butil + xilose + glicose	(M+ = 520,1451)
ácido gálico + malonil + xilose + xilose	(M+ = 520,1451)
ácido vanílico + ramnose	(M+ = 314,0992)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,0955)
ácido vanílico + etil + glicose	(M+ = 520,1451)
ácido siringico + malonil	(M+ = 284,2914)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,0955)
ácido siringico + metil + ramnose + glicose	(M+ = 520,1451)
ácido siringico + etil + xilose + glicose	(M+ = 520,1451)
ácido siringico + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 592,3155)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,043) - matriz
ácido cinâmico + propil + ramnose	(M+ = 336,0766)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,0474)
ácido cumárico + xilose	(M+ = 296,0461)
ácido cumárico + malonil + malonil	(M+ = 336,0766)
ácido cafeico + malonil	(M+ = 265,9319)
ácido caféico + butil + glicose	(M+ = 398,0863)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,0474)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,9319)
ácido sinápico + etil + ramnose	(M+ = 398,0863)
ácido sinápico + propil + xilose	(M+ = 398,0863)

Figura 6(C): Compostos fenólicos, variedade Roxo.

Rajado 8 Carreiras	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 268,0512)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 268,0512)
ácido benzóico + glicose	(M+ = 284,2962)
ácido benzóico + ramnose + ramnose	(M+ = 414,1089)
ácido benzóico + metil + ramnose + xilose	(M+ = 414,1089)
ácido benzóico + malonil + ramnose	(M+ = 440,9903)
ácido benzóico + etil + ramnose + ramnose	(M+ = 442,9935)
ácido benzóico + etil + ramnose + glicose	(M+ = 458,1306)
ácido benzóico + propil + xilose + glicose	(M+ = 458,1306)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,1207)
ácido protocatecuico + malonil + xilose	(M+ = 458,1306)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,1207)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,1207)
ácido gálico + glicose	(M+ = 332,1135)
ácido gálico + malonil + xilose + glicose	(M+ = 550,6236)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,1207)
ácido siringico + malonil	(M+ = 284,2962)
ácido siringico + xilosideo	(M+ = 330,1207)
ácido siringico + etil + glicose + glicose	(M+ = 550,6236)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0451) - matriz
ácido ciano hidroxicinâmico	(M+ = 379,0635) - matriz
ácido cinâmico + malonil + ramnose	(M+ = 380,0908)
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9903)
ácido cinâmico + malonil + malonil + glicose	(M+ = 482,1884)
ácido cinâmico + malonil + malonil + glicose + glicose	(M+ = 644,2678)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,0453)
ácido cumárico + metil + xilose + xilose	(M+ = 442,9935)
ácido cumárico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 482,1884)
ácido cumárico + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 644,2678)

Figura 6(D): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade **Rajado 8 Carreiras (RC)**.

Rajado 8 Carreiras - Continuação	
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,9182)
ácido caféico + metil + xilose + xilose	(M+ = 458,1306)
ácido caféico + malonil + malonil + ramnose + ramnose	(M+ = 644,2678)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,0453)
ácido ferúlico + malonil + glicosideo	(M+ = 442,9935)
ácido ferúlico + malonil + malonil + xilose + ramnose	(M+ = 644,2678)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,9182)
ácido sinápico + etil + glicose	(M+ = 414,1089)
ácido sinápico + butil + glicose	(M+ = 442,9935)
ácido sinápico + malonil + xilose	(M+ = 442,9935)
ácido clorogênico + butil	(M+ = 410,0947)
ácido clorogênico + malonado	(M+ = 440,9903)
ácido clorogênico + butil + glicose + glicose	(M+ = 734,2564)
ácido clorogênico + malonil + xilose + glicose	(M+ = 734,2564)

Figura 6(D): Compostos fenólicos, variedade Rajado 8 Carreiras (RC).

Lingua de Papagaio	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 268,0249)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 268,0249)
ácido benzóico + glicose	(M+ = 284,2692)
ácido benzóico + ramnose + ramnose	(M+ = 414,0756)
ácido benzóico + metil + ramnose + xilose	(M+ = 414,0756)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,95)
ácido protocateuico + metil + glicose	(M+ = 330,0829)
ácido protocateuico + butil + ramnose + glicose	(M+ = 518,1073)
ácido protocateuico + malonil + xilose + ramnose	(M+ = 518,1073)

Figura 6(E): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade Língua de Papagaio (LP).

Lingua de Papagaio - Continuação	
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,0829)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,0829)
ácido gálico + xilose + xilose	(M+ = 434,0692)
ácido gálico + butil + ramnose + ramnose	(M+ = 518,1073)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,0829)
ácido vanílico + propil + ramnose + glicose	(M+ = 518,1073)
ácido vanílico + butil + xilose + glicose	(M+ = 518,1073)
ácido vanílico + malonil + xilose + xilose	(M+ = 518,1073)
ácido siringico + malonil	(M+ = 284,2692)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,0829)
ácido siringico + etil + ramnose + ramnose	(M+ = 518,1073)
ácido siringico + propil + xilose + ramnose	(M+ = 518,1073)
ácido siringico + butil + xilose + xilose	(M+ = 518,1073)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0115) - matriz
ácido cinâmico + propil + ramnose	(M+ = 336,0458)
ácido ciano hidroxicinâmico	(M+ = 379,0219) - matriz
ácido cinâmico + malonil + ramnose	(M+ = 380,0242)
ácido cinâmico + malonil + glicose	(M+ = 396,0435)
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,95)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,021)
ácido cumárico + malonil + malonil	(M+ = 336,0458)
ácido cumárico + malonil + ramnose	(M+ = 396,0435)
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,8923)
ácido caféico + butil + glicose	(M+ = 398,0387)
ácido caféico + metil + glicose + glicose	(M+ = 518,1073)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,021)
ácido ferúlico + butil + ramnose	(M+ = 396,0435)
ácido sinápico + etil	(M+ = 251,9146)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,8923)
ácido sinápico + malonil + malonil	(M+ = 396,0435)
ácido sinápico + etil + ramnose	(M+ = 398,0387)
ácido sinápico + propil + xilose	(M+ = 398,0387)
ácido sinápico + etil + glicose	(M+ = 414,0756)
ácido clorogênico + propil	(M+ = 396,0435)
ácido clorogênico + butil	(M+ = 410,0369)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,95)

Figura 6(E): Compostos fenólicos, variedade Língua de Papagaio (LP).

MPA 01	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 268,0524)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 268,0524)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,9872)
ácido benzóico + etil + ramnose + ramnose	(M+ = 442,9951)
ácido protocatecuico + ramnose	(M+ = 300,1006)
ácido protocatecuico + metil + xilose	(M+ = 300,1006)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,112)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,112)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,112)
ácido gálico + glicose	(M+ = 332,1129)
ácido gálico + malonil + xilose + glicose	(M+ = 550,639)
ácido gálico + malonil + malonil + ramnose + ramnose	(M+ = 633,8413)
ácido vanílico + xilose	(M+ = 300,1006)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,112)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,112)
ácido siringico + glicose + glicose	(M+ = 522,6133)
ácido siringico + etil + glicose + glicose	(M+ = 550,639)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0381) - matriz
ácido ciano hidroxicinâmico	(M+ = 379,0588) - matriz
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9872)
ácido cinâmico + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 628,2146)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 250,0409)
ácido cumárico + metil + xilose + xilose	(M+ = 442,9951)
ácido cumárico + malonil + malonil + ramnose + ramnose	(M+ = 628,2146)
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,9223)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 250,0409)
ácido ferúlico + malonil + glicose	(M+ = 442,9951)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,9223)
ácido sinápico + butil + glicose	(M+ = 442,9951)
ácido sinápico + malonil + xilose	(M+ = 442,9951)
ácido sinápico + malonil + glicose + glicose	(M+ = 633,8413)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,9872)

Figura 6(F): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade **MPA 01 (MP)**.

BRS 1030	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 267,8903)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 267,8903)
ácido benzóico + etil + ramnose	(M+ = 296,0034)
ácido benzóico + propil + xilose	(M+ = 296,0034)
ácido benzóico + xilose + xilose	(M+ = 386,0607)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,9348)
ácido benzóico + etil + ramnose + ramnose	(M+ = 442,9382)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,0755)
ácido protocatecuico + malonil + ramnose	(M+ = 386,0607)
ácido protocatecuico + metil + ramnose + ramnose	(M+ = 460,9787)
ácido protocatecuico + propil + xilose + xilose	(M+ = 460,9787)
ácido protocatecuico + etil + ramnose + xilose	(M+ = 460,9787)
ácido protocatecuico + metil + ramnose + glicose	(M+ = 476,2348)
ácido protocatecuico + etil + xilose + glicose	(M+ = 476,2348)
ácido protocatecuico + butil + glicose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido protocatecuico + malonil + xilose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido gálico + malonil	(M+ = 256,1083)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,0755)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,0755)
ácido gálico + metil + ramnose + ramnose	(M+ = 476,2348)
ácido gálico + etil + xilose + ramnose	(M+ = 476,2348)
ácido gálico + propil + xilose + xilose	(M+ = 476,2348)
ácido gálico + propil + glicose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido gálico + butil + ramnose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido gálico + malonil + xilose + ramnose	(M+ = 534,0357)
ácido vanílico + glicose	(M+ = 330,0755)
ácido vanílico + malonil + glicose	(M+ = 386,0607)
ácido vanílico + butil + glicose	(M+ = 386,0607)
ácido vanílico + malonil + xilose	(M+ = 386,0607)
ácido vanílico + ramnose	(M+ = 460,9787)
ácido vanílico + etil + xilose + xilose	(M+ = 460,9787)
ácido vanílico + metil + xilose + ramnose	(M+ = 460,9787)
ácido vanílico + ramnose + glicose	(M+ = 476,2348)
ácido vanílico + metil + xilose + glicose	(M+ = 476,2348)
ácido vanílico + propil + glicose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido siringico + xilose	(M+ = 330,0755)
ácido siringico + propil + ramnose	(M+ = 386,0607)
ácido siringico + butil + xilose	(M+ = 386,0607)
ácido siringico + metil + xilose + xilose	(M+ = 476,2348)
ácido siringico + etil + ramnose + glicose	(M+ = 534,0357)
ácido siringico + propil + xilose + glicose	(M+ = 534,0357)

Figura 6(G): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos compostos fenólicos observados para a variedade **BRS 1030 (BR)**.

BRS 1030 - Continuação	
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 294,0641) - matriz
ácido cinâmico + propil + ramnose	(M+ = 336,0359)
ácido ciano hidroxicinâmico	(M+ = 379,0155) - matriz
ácido cinâmico + xilose + xilose	(M+ = 412,0357)
ácido cinâmico + malonil + glicose	(M+ = 412,0357)
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9348)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 249,9169)
ácido cumárico + xilose	(M+ = 296,0034)
ácido cumárico + malonil + malonil	(M+ = 336,0359)
ácido cumárico + metil + xilose + xilose	(M+ = 442,9382)
ácido caféico + malonil	(M+ = 265,8894)
ácido caféico + butil + glicose	(M+ = 398,0309)
ácido caféico + malonil + ramnose	(M+ = 412,0357)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 249,9169)
ácido ferúlico + butil + glicose	(M+ = 412,0357)
ácido ferúlico + malonil + xilose	(M+ = 412,0357)
ácido ferúlico + malonil + glicose	(M+ = 442,9382)
ácido sinápico + propil	(M+ = 265,8894)
ácido sinápico + glicose	(M+ = 386,0607)
ácido sinápico + etil + ramnose	(M+ = 398,0309)
ácido sinápico + propil + xilose	(M+ = 398,0309)
ácido sinápico + propil + ramnose	(M+ = 412,0357)
ácido sinápico + butil + xilose	(M+ = 412,0357)
ácido sinápico + butil + glicose	(M+ = 442,9382)
ácido sinápico + malonil + xilose	(M+ = 442,9382)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,9348)
ácido clorogênico + etil + glicose + glicose	(M+ = 706,076)

Figura 6(G): Compostos fenólicos, variedade BRS 1030 (BR).

Fortuna	
ácido benzóico + ramnose	(M+ = 268,0007)
ácido benzóico + metil + xilose	(M+ = 268,0007)
ácido benzóico + etil + ramnose	(M+ = 295,9868)
ácido benzóico + propil + xilose	(M+ = 295,9868)
ácido benzóico + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 440,9023)
ácido benzóico + etil + ramnose + ramnose	(M+ = 442,8999)
ácido protocatecuico + metil + glicose	(M+ = 330,0473)
ácido gálico + metil + ramnose	(M+ = 330,0473)
ácido gálico + etil + xilose	(M+ = 330,0473)
ácido siríngico + xilose	(M+ = 330,0473)
ácido cinâmico + ramnose	(M+ = 293,9811) - matriz
ácido cinâmico + propil + ramnose	(M+ = 336,0084)
ácido ciano hidroxicinâmico	(M+ = 378,986) - matriz
ácido cinâmico + ramnose + ramnose	(M+ = 440,9023)
ácido cumárico + malonil	(M+ = 249,9956)
ácido cumárico + xilose	(M+ = 295,9868)
ácido cumárico + malonil + malonil	(M+ = 336,0084)
ácido cumárico + metil + xilose + xilose	(M+ = 442,8999)
ácido ferúlico + butil	(M+ = 249,9956)
ácido ferúlico + malonil + glicose	(M+ = 442,8999)
ácido sinápico + etil	(M+ = 251,8842)
ácido sinápico + butil + glicose	(M+ = 442,8999)
ácido sinápico + malonil + xilose	(M+ = 442,8999)
ácido clorogênico + malonil	(M+ = 440,9023)

Figura 6(H): Sinais massa carga (m/z) obtidos através de MALDI-TOF (modo positivo) para o extrato MeOH do tecido foliar, fragmentos relacionados aos **compostos fenólicos** observados para a variedade **Fortuna (FO)**.

Adicionalmente, foi possível detectar sinais específicos para alguns genótipos, e.g. MG (m/z 382, ácido clorogênico etilado e m/z 588, ácido ferúlico malonado ramnosídeo glicosídeo) e RC (m/z 458, ácido caféico metilado di xilosídeo e m/z 482 ácido cinâmico di malonado glicosídeo e/ou ácido cumárico di malonado ramnosídeo – **Fig. 6**).

Agrupando os sinais referentes aos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, foram detectados em média 40 sinais m/z, com as variedades crioulas com média igual a 39 sinais m/z, contra média igual a 46 m/z para as cultivares comerciais. O número máximo foi observado para BR (68 m/z) e o mínimo para FO (24 m/z), com LP (45 m/z) representando o valor máximo dentre as variedades crioulas e MP, o mínimo (32 m/z).

Complementando as informações obtidas através da EM, os extratos metanólicos do tecido foliar das variedades de milho foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A associação da CLAE a EM auxilia na identificação dos compostos fenólicos e permite a quantificação destes metabólitos, dependendo geralmente do acesso a compostos padrão confiáveis.

A **Figura 7** mostra um perfil cromatográfico representativo dos compostos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, observados para o extrato MeOH 100% foliar das VCM. Neste cromatograma são identificados apenas os compostos fenólicos que tiveram sua identidade confirmada através de informações da literatura e da comparação com os tempos de retenção de compostos padrão. Sendo assim o pico (1) se refere à quercetina, o pico (2) ao ácido gálico, o pico (3) ao ácido tânico, o pico (4) ao ácido sinápico, o pico (5) ao ácido protocatecuíco, o pico (6) ao ácido clorogênico, o pico (7) ao ácido hidroxibenzoico, o pico (8) ao ácido vanílico, o pico (9) ao ácido siríngico, o pico (10) ao ácido caféico, o pico (11) ao ácido cumárico, o pico (12) ao ácido ferúlico e o pico (13) ao ácido cinâmico (**Fig. 7**).

Aparentemente, a adoção do protocolo de semi-purificação utilizando a partição do extrato MeOH com heptano se mostrou eficiente, removendo compostos indesejáveis que poderiam interferir negativamente na separação cromatográfica como, por exemplo, os carotenóides e as clorofilas, cuja presença foi detectada nos perfis de varredura UV-visível (**Fig. 1**).

A **Figura 8** apresenta as proporções em que os ácidos fenólicos foram observados nos extratos metanólicos foliares. A quercetina foi o composto mais abundante para a maioria das variedades (exceto para RX e BR), média de 27%, máximo de 47% para MG e mínimo de 17% para RX. Considerando todas as

variedades, o ácido clorogênico foi responsável, em média, por 18% do extrato, com máximo igual 24% (BR) e mínimo de 12% (MG). O ácido gálico e o ácido tânico foram observados cada um, em média de 9% do conteúdo fenólico total. O ácido gálico apresentou máximo para PR (16%) e mínimo igual a zero para MG e MP. Para o ácido tânico, PR apresentou a maior proporção dentre as variedades crioulas, com média de 11%, enquanto FO mostrou a menor proporção, média igual a 8%. O ácido siríngico e o ácido cumárico são responsáveis, cada um, por 8% do extrato. O ácido siríngico em maior proporção na variedade MP (média de 15%) e menor proporção em MG (média de 4%). No caso do ácido cumárico, teores máximos e mínimos foram detectados para as variedades LP (15%) e BR (2%), respectivamente. Por fim, o ácido protocatecuico foi responsável por cerca de 6% do extrato metanólico foliar, com teor máximo nas amostras de MP (8%) e mínimos em MG (4%).

Em conjunto, estes sete ácidos fenólicos são responsáveis por aproximadamente 85% do conteúdo observado nos extratos metanólicos das variedades em estudo (**Fig. 8**).

Considerando os valores absolutos da CLAE (**Fig. 9**), o teor médio de quercetina foi de $0,701 \pm 0,235$ mg/g de folha, com MG ($0,952 \pm 0,029$ mg/g), FO ($0,940 \pm 0,010$ mg/g) e RC ($0,900 \pm 0,177$ mg/g) apresentando os teores mais elevados e diferença significativa em relação as demais variedades. Variância para os tratamentos de 0,165, maior do que aquela existente entre as diferentes repetições, igual a 0,001 e resíduo da análise igual a 0,009. O valor de R^2 foi de 0,898 e de F igual a 17,57. O ácido clorogênico mostrou teor médio de $0,494 \pm 0,262$ mg/g de folha, com RX mostrando média diferente ($P \geq 0,05$) em relação a todas as variedades, igual a $1,089 \pm 0,311$ mg/g. ANOVA com R^2 igual a 0,883 e F igual a 15,16, variância para o tratamento de 0,206, para as repetições de 0,012 e resíduo, de 0,014. Já para o ácido gálico, a média apresentada foi igual a $0,294 \pm 0,255$ mg/g de folha, maior conteúdo para RX ($0,742 \pm 0,145$ mg/g) e diferença significativa em relação a todas as outras variedades. As variedades MG e MP também apresentaram diferenças significativas em relação a todas as outras variedades, mas porque nestas, o ácido gálico não foi detectado.

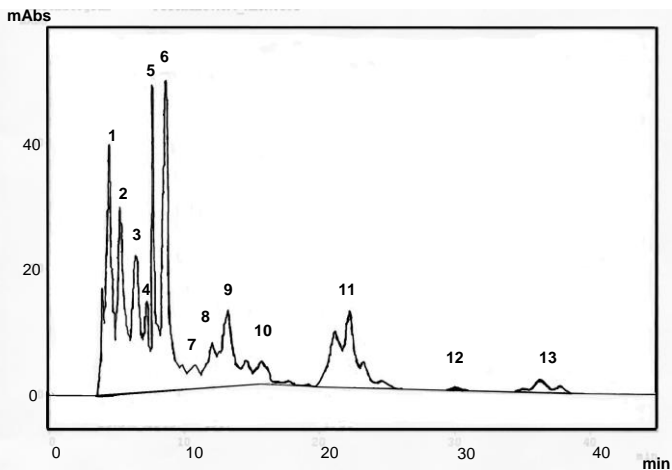


Figura 7: Cromatograma - CLAE mostrando perfil de compostos fenólicos observados para o extrato MeOH 100% obtido a partir do tecido foliar da variedade Roxo (RX).

Identificação dos picos: (1) quercetina, (2) ácido gálico, (3) ácido tânico, (4) ácido sinápico, (5) ácido protocatecuico, (6) ácido clorogênico, (7) ácido hidroxi-benzóico, (8) ácido vanílico, (9) ácido siríngico, (10) ácido caféico, (11) ácido cumárico, (12) ácido ferúlico e (13) ácido cinâmico.

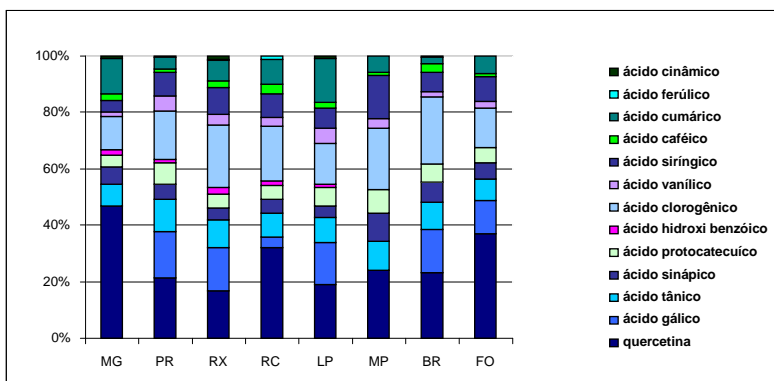


Figura 8: Proporção dos diferentes compostos fenólicos observada para o tecido foliar das variedades de milho, evidenciada através da análise de CLAE.

	MG	PR	RX	RC	LP	MP	BR	FO
quercetina	<u>0,952 ± 0,029</u>	0,534 ± 0,014	<u>0,837 ± 0,180</u>	<u>0,900 ± 0,177</u>	0,600 ± 0,041	0,343 ± 0,012	0,502 ± 0,014	<u>0,941 ± 0,011</u>
ácido gálico	0,000 ± 0,000	0,403 ± 0,046	<u>0,742 ± 0,145</u>	0,105 ± 0,181	0,479 ± 0,100	0,000 ± 0,000	0,329 ± 0,023	0,295 ± 0,001
ácido tânico	0,156 ± 0,015	0,288 ± 0,011	0,506 ± 0,160	0,235 ± 0,033	0,283 ± 0,046	0,146 ± 0,006	0,209 ± 0,008	0,195 ± 0,003
ácido sinápico	0,121 ± 0,013	0,124 ± 0,012	0,196 ± 0,062	0,140 ± 0,005	0,131 ± 0,006	0,145 ± 0,005	0,159 ± 0,006	0,147 ± 0,011
ácido protocatecuico	0,085 ± 0,015	0,195 ± 0,033	<u>0,259 ± 0,049</u>	0,145 ± 0,018	<u>0,202 ± 0,046</u>	0,120 ± 0,005	0,136 ± 0,018	0,140 ± 0,008
ácido OH benzóico	0,036 ± 0,016	0,024 ± 0,015	0,106 ± 0,062	0,037 ± 0,024	0,033 ± 0,038	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
ácido clorogênico	0,243 ± 0,040	0,430 ± 0,047	<u>1,089 ± 0,311</u>	0,548 ± 0,055	0,469 ± 0,016	0,308 ± 0,004	0,512 ± 0,055	0,352 ± 0,002
ácido vanílico	0,026 ± 0,026	0,132 ± 0,016	0,200 ± 0,049	0,086 ± 0,015	0,170 ± 0,040	0,052 ± 0,002	0,043 ± 0,011	0,062 ± 0,008
ácido síringico	0,085 ± 0,012	0,202 ± 0,010	<u>0,468 ± 0,111</u>	0,233 ± 0,051	0,223 ± 0,071	0,216 ± 0,006	0,151 ± 0,034	0,225 ± 0,003
ácido caféico	0,054 ± 0,006	0,033 ± 0,017	0,116 ± 0,015	0,093 ± 0,023	0,068 ± 0,029	0,017 ± 0,002	0,064 ± 0,015	0,026 ± 0,005
ácido cumárico	0,255 ± 0,003	0,106 ± 0,133	0,362 ± 0,126	0,254 ± 0,022	<u>0,495 ± 0,217</u>	0,081 ± 0,004	0,051 ± 0,002	0,156 ± 0,022
ácido ferúlico	0,000 ± 0,000	0,007 ± 0,005	0,005 ± 0,004	0,023 0,002	0,002 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,006 ± 0,003	0,000 ± 0,000
ácido cinâmico	0,012 ± 0,000	0,000 ± 0,005	0,064 ± 0,022	0,005 ± 0,007	0,010 ± 0,007	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
total Σ	2,025	2,478	4,952	2,803	3,175	1,427	2,162	2,539
área total cromatograma	2,024	3,245	6,073	3,744	3,594	2,083	2,166	2,826

Figura 9: Concentração média dos treze compostos fenólicos majoritários (mg/g de folha ± desvio padrão) obtida através da análise de CLAE, para o extrato metanólico 100%. Constando a concentração total relativa ao somatório dos 13 compostos fenólicos e a concentração total referente a área total do cromatograma de CLAE.

Os valores sublinhados se referem a variedades com médias significativamente superiores, $P \leq 0,05$.

O ácido tânico mostrou média de $0,252 \pm 0,115$ mg/g de folha, com RX mostrando o teor mais elevado ($0,506 \pm 0,160$ mg/g) e MP, o menor teor ($0,146 \pm 0,006$ mg/g). Para o ácido siríngico, média de $0,225 \pm 0,110$ mg/g de folha, com RX novamente mostrando o maior conteúdo ($0,468 \pm 0,111$ mg/g) e MG, o menor conteúdo ($0,085 \pm 0,012$ mg/g). R^2 de 0,859, F igual a 12,19, variância entre os tratamento igual a 0,036, entre as repetições igual a 0,002 e residual igual a 0,003. Para o ácido cumárico, a média observada foi de $0,220 \pm 0,153$ mg/g de folha, com LP ($0,495 \pm 0,217$ mg/g) mostrando teor médio, superior em relação a MG, MP, BR e FO. O R^2 foi igual a 0,810, F igual 8,046, variância para os tratamentos de 0,070, para as repetições de 0,021 e para os resíduos de 0,009. No caso do ácido protocatecuíco, a média foi de $0,160 \pm 0,055$ mg/g de folha, com RX apresentando média superior ($0,259 \pm 0,049$ mg/g) e diferença ($P \geq 0,05$) em relação a todas as variedades, exceto LP ($0,202 \pm 0,046$ mg/g). A variância entre os tratamentos foi igual a 0,091, para as repetições igual a 0,0003 e para o resíduo, igual a 0,0009. O R^2 foi igual a 0,837e o F igual a 10,28 (**Fig. 9**).

Se o teor total obtido através do somatório dos 13 compostos fenólicos identificados pela CLAE for comparado com o resultado da quantificação empregando a área total do cromatograma, pode-se perceber que para as variedades MG, LP, BR e FO, estes valores são quase coincidentes. Isto pode indicar que para estes genótipos, a quase totalidade dos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico foi identificada. Enquanto, para outras variedades, como PR, RX, RC e MP, alguns compostos permaneceram ainda sem identificação (**Fig. 9**), já que a concentração calculada pela área total do cromatograma se mostrou maior que aquela determinada pelo somatório dos 13 compostos identificados.

Comparando os valores obtidos com a quantificação através da CLAE, com àqueles obtidos ao se empregar a reação de Folin-Ciocalteu, pode-se perceber que a concentração de compostos fenólicos totais é maior para todas as variedades, quando os resultados desta última técnica são considerados (**Fig. 4**), comparativamente aos observados para a CLAE (**Fig. 9**). Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta dissimilaridade entre os valores observados pelas duas técnicas, para os mesmos extratos MeOH. Uma delas reside nas diferenças intrínsecas existentes entre elas, com a CLAE apresentando uma maior sensibilidade e também seletividade, já que as suas condições de execução foram selecionadas de modo a dirimir possíveis interferências que poderiam comprometer a identificação e

quantificação dos compostos fenólicos. Já o método colorimétrico está mais sujeito a tal espécie de erro, com metabólitos não fenólicos podendo interferir na quantificação, já que o reativo de Folin-Ciocalteu pode ser reduzido por metabólitos como a vitamina C, por exemplo (SULTANA et al., 2007). Além disso, existem metabólitos que quando presentes nos extratos atrapalham a análise e chegam mesmo a impedir que a reação colorimétrica ocorra. De qualquer modo, os resultados da reação de Folin-Ciocalteu parecem congruentes com as informações observadas na literatura (**Fig. 4**).

Adicionalmente, os resultados da CLAE complementaram àqueles obtidos com a EM para a identificação dos compostos fenólicos. Como mencionado anteriormente, os espectros de EM (**Fig. 6**) indicaram para todas as variedades um sinal proeminente em 250 m/z que pode ser associado à presença de derivados dos ácidos ferúlico e/ou cumárico. Baseando-se nos resultados da CLAE que revelaram conteúdo 44 vezes maior de ácido cumárico, comparativamente ao teor de ácido ferúlico (**Fig. 9**), sugere-se que o composto de m/z 250 seja o ácido cumárico malonado. Concordando com esta lógica, os compostos visualizados em maior concentração pela CLAE devem ter seus ésteres representando sinais mais facilmente detectados nos espectros de EM. Assim, o metabólito com m/z 440 observado nas folhas de quase todas as variedades, com exceção de RX, refere-se ao ácido clorogênico malonado (0,494 mg/g de folha), em contrapartida ao ácido cinâmico di ramnosídeo (0,012 mg/g de folha), também proposto inicialmente para o sinal em 440 m/z. Neste contexto, infere-se que o sinal m/z 284 esteja associado ao ácido siríngico malonado (**Fig. 6**). A identificação do composto de m/z 330 não foi possível através da associação CLAE/ EM MALDI-TOF, em função das concentrações similares de ácido gálico (0,294 mg/g de folha) e ácido siríngico (0,225 mg/g de folha). Estudos subsequentes de espectrometria de massa *in tandem* (EM/ EM) poderiam confirmar a identidade inequívoca do metabólito associado ao sinal de m/z 330.

Os resultados da EM e da CLAE para a identificação dos compostos fenólicos de interesse, quando comparados à referencial disponível na literatura, revelaram concordância composicional em relação ao observado no tecido foliar dos genótipos de milho. Gueldner e colaboradores (1992) detectaram a presença de ácido clorogênico e Stafford (1998) mencionou a existência de derivados do ácido cinâmico, neste tecido. No presente estudo o ácido clorogênico, um dos derivados do ácido cinâmico, foi observado como o segundo ácido fenólico majoritário no extrato MeOH via

CLAE e diversos sinais que podem ser associados a seus ésteres foram detectados através de EM.

Outros estudos (ALLERDINGS et al., 2005; BUNZEL et al., 2005; FUNK et al., 2005; BARRIÈRE et al., 2008) comentam que a parede celular do milho se caracteriza pela existência dos ácidos cumárico e ferúlico em sua estrutura, nas formas monomérica, dimérica e trimérica. Além disto, consoante ao tecido e ao estágio de desenvolvimento, tais compostos podem perfazer de 3 a 5% da estrutura da parede celular desta gramínea. Nas folhas, os resíduos dos ácidos ferúlico e cumárico normalmente se encontram esterificados a polissacarídeos não-celulósicos, participando da construção das ligações cruzadas entre os resíduos de guaiacil e arabinoxilanas, e entre as cadeias de arabinoxilanas. Tais ligações cruzadas reforçam toda a estrutura da parede celular, diminuindo a digestibilidade dos tecidos foliares, tornando-os mais resistentes ao ataque de microrganismos e também de herbívoros. O ácido cumárico foi observado como quinto composto em ordem de abundância no tecido foliar do milho, não sendo, todavia, observada concentração relevante de ácido ferúlico. Sugere-se que talvez as condições aqui utilizadas para a extração tenham sido muito brandas, não promovendo a liberação significativa destes ácidos fenólicos que se encontram esterificados aos componentes da parede celular. Já o ácido gálico e o ácido tânico (fragmento da hidrólise de taninos) foram extraídos de modo mais eficiente, com ambos ocupando a terceira colocação, como compostos mais frequentes nos extratos foliares (CLAE), além de apresentarem sinais que podem ser associados a presença de seus ésteres (EM). Indicando, portanto, que o tecido foliar de milho possui uma concentração significativa de taninos, com as variedades pigmentadas PR e RX, mostrando um teor relativamente mais elevado que as demais variedades.

Alguns dos principais ácidos fenólicos detectados para as folhas das VCM também foram observados como componentes majoritários nos seus grãos (KUHNNEN, 2007), como o ácido gálico e o ácido protocatecuico, com médias de 176 e 147 $\mu\text{g/g}$ de farinha, respectivamente. Todavia, foram também observadas diferenças marcantes entre estes órgãos. Por exemplo, o ácido cinâmico, composto detectado apenas em baixa concentração nas folhas, foi o ácido fenólico mais abundante nos grãos das VCM. E o ácido clorogênico, segundo ácido fenólico mais abundante nas folhas, foi detectado em baixa concentração nos grãos de apenas algumas das VCM analisadas (e.g. PR, RX e MP - KUHNNEN, 2007).

Análises dos grãos de milho roxo provenientes do Peru apontaram o flavonóide quercetina como o seu componente majoritário, com média de ≈ 45 mg/g de farinha. Além disso, foram observados derivados esterificados dos ácidos ferúlico e cumárico (média = 25 mg/g de farinha), do ácido protocatecuico (14,61 mg/g) e do ácido vanílico (8,46 mg/g). Este estudo mostrou que a hidrólise em meio alcalino da farinha destes grãos roxos, gera um aumento na concentração de ácidos cumárico e ferúlico detectados para o extrato, indicando a liberação destes metabólitos dos componentes da parede celular (PEDRESCHI, CISNEROS ZEVALLOS, 2007).

De modo similar a este estudo, a quercetina foi observada como componente majoritário das folhas de quase todas as VCM analisadas (exceto RX). É importante salientar que as condições analíticas aqui adotadas para a execução da CLAE não foram as ideais para a detecção da quercetina, pois em 280 nm existe a possibilidade de co-eluição com outros ácidos fenólicos, tornando assim mais difícil a sua identificação e quantificação. Todavia, o pico (1) foi identificado como a quercetina (**Fig. 7**) apesar desta ressalva, principalmente em função da detecção de diversos ésteres deste ácido fenólico na análise de EM do extrato MeOH 100%. Além disso, existem relatos na literatura que mencionam a quercetina como um dos compostos fenólicos majoritários dos grãos de milho, sendo nestas análises também utilizada a detecção espectrofotométrica em 280 nm (PEDRESCHI, CISNEROS ZEVALLOS, 2007).

Outro estudo apontou os grãos de milho como uma excelente fonte alimentar de compostos fenólicos, entre eles o ácido ferúlico, cumárico, protocatecuico, vanílico, siríngico e caféico (RHANDIR et al., 2008). Del Pozo-Insfran et al. (2009) compararam o conteúdo de compostos fenólicos de grãos de três variedades de milho, com colorações de grãos branca e azul. Os autores demonstraram ser o ácido ferúlico o composto fenólico majoritário, independente do genótipo (grãos brancos: 2,484 mg/g; grãos azuis – variedade americana: 0,927 mg/g e variedade mexicana: 0,202 mg/g). De forma interessante, os ácidos protocatecuico, cumárico e gálico não foram detectados, ou ocorreram como compostos traços. Curiosamente, ao invés de quercetina, este trabalho revelou a presença de catequina, apenas para os grãos azuis, com média de 0,021 mg/g para a variedade mexicana e 0,014 mg/g para a variedade americana. Recentemente, um levantamento efetuado com 18 genótipos mexicanos de milho demonstrou a influência genotípica significativa sobre o teor e composição de compostos fenólicos nos grãos de *Z. mays*, com 94 a 98% do ácido ferúlico

presente se mostrando na forma esterificada (LOPES-MARTINEZ et al., 2009).

Dentre as diferenças estabelecidas ao se comparar o conteúdo fenólico dos grãos de milho, àquele observado para o tecido foliar (**Fig. 9**), chama atenção, a presença de um teor elevado de ácido clorogênico nas folhas, sem menção deste composto nos grãos de milho, bem como a menção na literatura de teores elevados de ácido ferúlico nos grãos, sem a detecção de teores relevantes deste metabólito nas folhas das VCM em estudo, nas condições adotadas para a extração destes metabólitos (**Fig. 9**).

Conforme mencionado anteriormente a presença de um teor elevado de ácido clorogênico nas folhas de uma variedade de milho parece melhorar o seu desempenho no campo, levando a aparente inibição do ataque de alguns predadores como a lagarta-do-cartucho (GUELDNER et al., 1992). Sendo assim, a variedade RX que mostrou o teor mais elevado de ácido clorogênico pode se mostrar interessante na busca de informação genética ou epigenética que leve a este aumento da resistência do milho ao ataque de herbívoros. Dentro deste contexto, Sasse (2008) pesquisou a resistência de algumas VCM a infecção com o fungo *Exserohilum turcicum*, causador da doença conhecida como queima de turcicum ou requeima da folha (*northern leaf blight*). Os resultados obtidos neste estudo são bastante interessantes, pois indicaram a variedade MP como aquela mais resistente à infecção por este fungo, enquanto a variedade RX foi a que se mostrou mais suscetível ao ataque, apresentando a maior extensão de lesões foliares. Exatamente em ordem contrária, a quantificação dos compostos fenólicos no tecido foliar das VCM, onde RX apresentou o maior conteúdo e MP, o menor teor. Neste caso específico, os compostos fenólicos não parecem relacionados com a resistência observada.

CONCLUSÕES

A escolha do metanol como solvente para a extração dos compostos fenólicos dos tecidos foliares das VCM se mostrou adequada, permitindo a identificação e quantificação de 13 ácidos fenólicos via CLAE. Permitiu também determinar o perfil destes metabólitos secundários nas folhas das VCM por espectrometria de massa MALDI-TOF (EM MALDI-TOF).

Os perfis espectrofotométricos UV-vis obtidos para os extratos MeOH 100% foliares revelaram a existência de diferenças principalmente quantitativas na região de absorção dos compostos

fenólicos entre estas VCM. Adicionalmente, esta abordagem analítica apontou a presença de outras classes de metabólitos que não os compostos fenólicos, e.g., carotenóides e clorofilas. Esta constatação se mostrou importante para o estabelecimento de um protocolo adequado de análise cromatográfica dos ácidos fenólicos (CLAE), requerendo a adoção de um protocolo prévio de semi-purificação das amostras.

A oxidação do reativo de Folin-Ciocalteu indicou uma média de aproximadamente 10 mg/g de folha para as VCM, com as variedades crioulas apresentando uma concentração ligeiramente superior a observada para as variedades testemunha, sem apresentarem, no entanto, diferença estatística (teste t). Mesmo assim, os teores apresentados pelas variedades crioulas Roxo e Rajado 8 Carreiras merecem destaque, com médias iguais a 14,375 mg/g e 13,284 mg/g respectivamente, bastante similares a valores observados na literatura para as folhas de milho.

De forma não esperada se constatou que os teores médios de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de folhas das VCM são altamente correlacionados ($r = 0,98$) aos valores obtidos para os grãos destas mesmas VCM. Embora as folhas tenham apresentado teor médio cerca de 13 vezes superior àquele observado para os grãos. Esta informação pode interessar agronomicamente, pois facilitaria a caracterização e a busca de genótipos interessantes de milho, já que variedades que mostram teor elevado de ácidos fenólicos em suas folhas devem apresentar um conteúdo também elevado em seus grãos. É interessante notar que a concentração média de compostos fenólicos nas folhas das VCM aqui consideradas parece mais similar a concentração observada para os grãos de outros genótipos de milho.

A partir dos espectros de massa (EM MALDI-TOF) obtidos para o tecido foliar de todas as VCM foi revelado um quadro de grande diversidade de sinais massa/carga (m/z) associados aos derivados do ácido benzóico e aos derivados do ácido cinâmico, principalmente aqueles esterificados a radicais orgânicos e a resíduos de açúcar. Se o número de sinais m/z for considerado como uma medida da diversidade química existente, as variedades crioulas aparentemente possuem extratos foliares menos complexos, principalmente se comparadas à variedade testemunha BR. Uma elevada diversidade química, como aquela indicada para os extratos desta variedade pode representar uma vantagem comercial, quando se visa o seu aproveitamento integral, possibilitando efeitos múltiplos para estes extratos, aditivos ou sinérgicos, sobre a saúde humana (GURIB-FAKIM, 2006).

Os resultados obtidos com o emprego da CLAE foram altamente esclarecedores quando associados às informações geradas com a EM MALDI-TOF. Deste modo, foi possível propor a identidade do sinal detectado em 250 m/z, como sendo o ácido cumárico malonado e do sinal em 440 m/z, como sendo o ácido clorogênico malonado. Ressalta-se ainda que a associação da CLAE a EM claramente apontaram a preponderância de ácidos fenólicos malonados no tecido foliar do milho, como o ácido cumárico malonado (250 m/z), ácido siringico malonado (284 m/z) e ácido clorogênico malonado (440 m/z). Também chama atenção a alta frequência com que foram observados nos espectros, sinais referentes a ácidos fenólicos esterificados a diferentes resíduos de açúcar, e.g. ácido gálico xilosídeo (302 m/z), ácido cumárico ramnosídeo (310 m/z), ácido protocatecuico ramnosil glicosídeo (462 m/z). Bem como, ésteres destes compostos glicosilados acrescidos de uma ou duas moléculas de malonil, e.g. ácido gálico malonil xilosídeo (388 m/z), ácido gálico di malonil di ramnosídeo (633 m/z), ácido cumárico malonil xilosil glicosídeo (518 m/z), ácido cumárico di malonil di ramnosídeo (628 m/z), ácido protocatecuico malonil xilosídeo (458 m/z) e ácido protocatecuico di malonil di glicosídeo (650 m/z).

O emprego da CLAE possibilitou a identificação e a quantificação de 13 compostos fenólicos. Os sete compostos majoritários foram quercetina, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido tânico, ácido cumárico, ácido siringico e ácido protocatecuico, perfazendo 85% do conteúdo de fenóis presente no extrato metanólico foliar.

Comparando a quantificação através da CLAE com aquela efetuada com o uso do reativo de Folin-Ciocalteu se percebe que com a CLAE, os resultados foram em média 3,38 vezes inferiores àqueles observados através de Folin-Ciocalteu. Todavia, as duas técnicas analíticas mostraram uma correlação positiva igual a 0,91, indicando que apesar das diferenças nos valores absolutos, as proporções entre as variedades parecem ter sido mantidas.

Considerando o conjunto de resultados obtidos para a caracterização dos compostos fenólicos, as VCM que mostraram maior destaque foram RX > RC > LP e PR. Assim se assume como de interesse o uso destes genótipos em programas de melhoramento genético desta espécie vegetal, visando o aumento no conteúdo destes metabólitos nas suas folhas. A título de ilustração da importância destes resultados se sabe que compostos fenólicos como o ácido clorogênico mantém correlação positiva com a resistência do milho ao ataque de herbívoros.

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos das folhas se mostraram especialmente relevantes quando comparados àqueles observados para espécies de diferentes farmacopéias, demonstrando a importância da biomassa foliar do milho como fonte de compostos de interesse à saúde humana. Por fim, destaca-se que as folhas das VCM, principalmente no caso das variedades crioulas RX e RC, podem ser aproveitadas para obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos, com potencial aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica.

Destaca-se que a clara distinção existente entre os genótipos crioulos de milho com relação ao teor dos compostos fenólicos no tecido foliar possibilita um rico arsenal de possibilidades de aproveitamento desta biomassa. Sugere-se, portanto, que os agricultores poderão aproveitar as folhas de todos estes genótipos, para fornecimento de matéria-prima à indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica. Se implementado, tal cenário pode auxiliar na manutenção e valorização da diversidade genética e química ainda preservadas neste germoplasma de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERDINGS, E.; RALPH, J.; SCHATZ, P. F.; GNICHWITZ, D.; STEINHART, H.; BUNZEL, M. Isolation and structural identification of di-arabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. **Phytochemistry**, 66: 113–124 (2005).

BUNZEL, M.; RALPH, J.; FUNK, C.; STEINHART, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. **Tetrahedron Letters**, 46: 5845–5850 (2005).

BARRIÈRE, Y.; THOMAS, J.; DENOUE, D. QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, *p*-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 X F286. **Plant Science**, 175 (4): 585-595 (2008).

CARVALHO, M.; JERÓNIMO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SILVA, B.M. Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. **Food Chemistry**, 122: 49–54 (2010).

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from

andean purple corn and red-fleshed sweet potato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 3313-3319 (2003).

DEL POZO-INSFRAN, 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**, 39: 696-703 (2006).

FULCRAND, H.; MANÉ, C.; PREYS, S.; MAZEROLLES, G.; BOUCHUT, C.; MAZAURIC, J.; SOUQUET, J.; MEUDECI, E.; LI, Y.; COLE, R.B.; CHEYNIER, V. Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. **Phytochemistry**, 69: 3131-3138 (2008).

FUNK, C.; RALPH, J.; STEINHART, H.; BUNZEL, M. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. **Phytochemistry** 66: 363-371 (2005).

GRUNE, T.; SCHRÖDER, P.; BIESALSKI, H.K. Low molecular weight antioxidants. **The Handbook of Environmental Chemistry**, 2: 77-90 (2005).

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**, 40: 1211-1213 (1992).

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27: 1-93 (2006).

HICHEM, H.; MOUNIR, D.; NACEUR, E.A. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. **Industrial Crops and Products**, 30: 144-151 (2009).

JEONG, W.; KIM, I.; HU, R. & KONG, A. T. Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. **Pharmaceutical Research**, 21: 649-660 (2004).

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and

beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 799: 101–110 (1998).

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.). **Tese em Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC** (2007).

LAPORNIK, B.; PROŠEC, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, 71: 214-222 (2005).

LOPEZ-MARTINEZ, L.X; OLIART-ROS, R.M.; VALERIO-ALFARO, G.; LEE, C.; PARKIN, K.L.; GARCIA, H.S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **LWT - Food Science and Technology**, 42: 1187–1192 (2009).

MAKSIMOVIC, Z.; MALENCIC, D.; KOVACEVIC, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**, 96: 873–877 (2005).

MARASCHIN, M., PASSOS, R.; DUARTE DA SILVA, J. M. O.; DIAS, P. F.; ARAÚJO, P. S.; OLTRAMARI, A. C.; FONTANA, J. D.; CARO, M. S. B. Isolation and *trans*-resveratrol analysis in Brazilian red wine by ¹H-nuclear magnetic resonance. In: **Magnetic resonance in food science – a view to the future**. (WEBB et al., Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp.136-141 (2001).

MARI, A.; TEDESCO, I.; NAPPO, A.; RUSSO, G.L.; MALORNI, A.; CARNONE, V. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. **Food Chemistry**, 123: 157–164 (2010).

MONTAGUT, G.; BAIGES, I.; VALLS, J.; TERRA, X.DEL BAS, J.M.; VITRAC, X.; RICHARD, T.; MÉRILLON, J. AROLA, L.; BLAY, M.; BLADÉ, C.; FERNÁNDEZ-LARREA, J.; PUJADAS, G.; SALVADÓ, J.; ARDÉVOL, A. A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. **Food Chemistry**, 116: 265–270 (2009).

ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIC, S.; TADIC, Z; BASIC, I. Inhibitory effect of water soluble derivative of propolis and its polyphenolic

compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible model of antitumor action. **Nutrition & Cancer**, 47: 156-163 (2003).

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

PRASAIN, J.K.; PENG, N.; DAI, Y.; MOORE, R.; ARABSHAHI, A.; WILSON, L.; BARNES, S.; WYSS, J.; KIM, H.; WATTS, R.L. Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. **Phytomedicine**, 16: 233–243 (2009).

PRODANOV, M.; GARRIDO, I.; VACAS, V.; LEBRÓN-AGUILAR, R.; DUEÑAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Ultrafiltration as alternative purification procedure for the characterization of low and high molecular-mass phenolics from almond skins. **Analytica Chimica Acta**, 609: 241–251 (2008).

RANDHIR, R.; PREETHI, S; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 37: 1247-1256 (2002).

RANDHIR, R.; SHETTY, K. Developmental stimulation of total phenolics and related antioxidant activity in light- and dark-germinated corn by natural elicitors. **Process Biochemistry**, 40: 1721–1732 (2005).

RANDHIR, R.; KWON, Y.; SHETTY, K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9: 355–364 (2008).

RODRIGUES-CASO, C.; RODRÍGUEZ AGUDO, D.; SÁNCHEZ JIMÉNEZ, F.; MEDINA, M. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60: 1760–1763 (2003).

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, 22: 19–34 (2002).

SASSE, S. Caracterização de variedades locais de milho procedentes de Anchieta – SC quanto à resistência *Exserohilum turcicum*. **Dissertação em Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC** (2008).

SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1054: 217–226 (2004).

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M.; HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16: 360–367 (2005).

SEO, H.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OH, M.; KIM, H.; KIM, J.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris* herba. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–12 (2003).

STAFFORD, H.A. Teosinte to maize - Some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoids pathways. **Phytochemistry**, 49: 285-293 (1998).

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, 104: 997–1005 (2007).

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedical Pharmacotherapy**, 56: 200-207 (2002).

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, 812: 85–99 (2004).

YANG C. Y., LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21: 381-406 (2001).

WODJILO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, 105: 940-949 (2007).

ZIELINSKI, H. Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–20 (2003).

CAPÍTULO 3 – Análise de flavonóides de folhas de variedades crioulas de milho por espectrofotometria UV-visível e espectrometria de massa (MALDI-TOF)

INTRODUÇÃO

É interessante notar que desde o início da domesticação do milho as populações indígenas estabeleceram uma clara distinção entre as variedades para utilização cerimonial, sendo preferidas aquelas de grãos vermelhos e roxos, enquanto as variedades de grãos amarelos e brancos eram preferencialmente de uso alimentar (STAFFORD, 1998; PONELEIT, 2001). Apesar de valorizadas tradicionalmente, as variedades com grãos vermelhos e roxos são pouco conhecidas atualmente no Brasil, sendo mais frequente o cultivo de variedades com grãos amarelos e mais raramente, aquelas de grãos brancos.

Pigmentos vegetais são responsáveis pelas diferenças na coloração dos grãos do milho, com as cores amarela e alaranjada, por exemplo, resultando do acúmulo de compostos carotenóides no endosperma (AMAN et al., 2005; KIMURA et al., 2007; KUHNEN, 2007) e a coloração branca, surgindo a partir da reflexão da luz nas camadas de amido que envolvem este mesmo tecido. Todavia, a visualização destas cores só é possível se o pericarpo da semente for incolor e não existirem pigmentos acumulados na camada mais superficial do endosperma, denominada de aleurona (STAFFORD, 1998). Tanto no pericarpo, quanto na camada de aleurona de algumas variedades de milho podem ser observados pigmentos, normalmente flavonóides, de cor vermelha, castanha, roxa, púrpura e azul (ANDERSON, EMERSON, 1923; STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2004; CORTÉS et al., 2006; DEL POZO-INSFRÁN et al., 2006; PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007; GONZÁLEZ-MANZANO et al., 2008). As diversas variedades também podem apresentar acúmulo de pigmentos derivados de flavonóides nas porções vegetativas da planta como flores, folhas e raízes (STAFFORD, 1998; FOSSEN et al., 2001; HALBWIRTH et al., 2003; SEKHON et al., 2006; YANG et al., 2008; YANG, ZHAI, 2010).

A maioria das variedades crioulas de milho (VCM) analisadas neste estudo apresenta algum tipo de pigmentação nos seus grãos aparentemente associada à presença de flavonóides. Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à caracterização desta

classe de compostos fenólicos nos tecidos foliares das VCM de interesse. Além dos flavonóides, outras classes de compostos fenólicos podem ser observadas nos extratos metanólicos foliares destes genótipos, como, por exemplo, os derivados do ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico, já abordados no **capítulo 2** do presente trabalho.

Todavia, sem dúvida alguma a maior classe dentre os compostos fenólicos é formada pelos flavonóides, com mais de 4000 estruturas químicas já identificadas (HEIM et al., 2002). Possuem em comum um núcleo de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), referenciados como A, B e C (**Fig. 1A**).

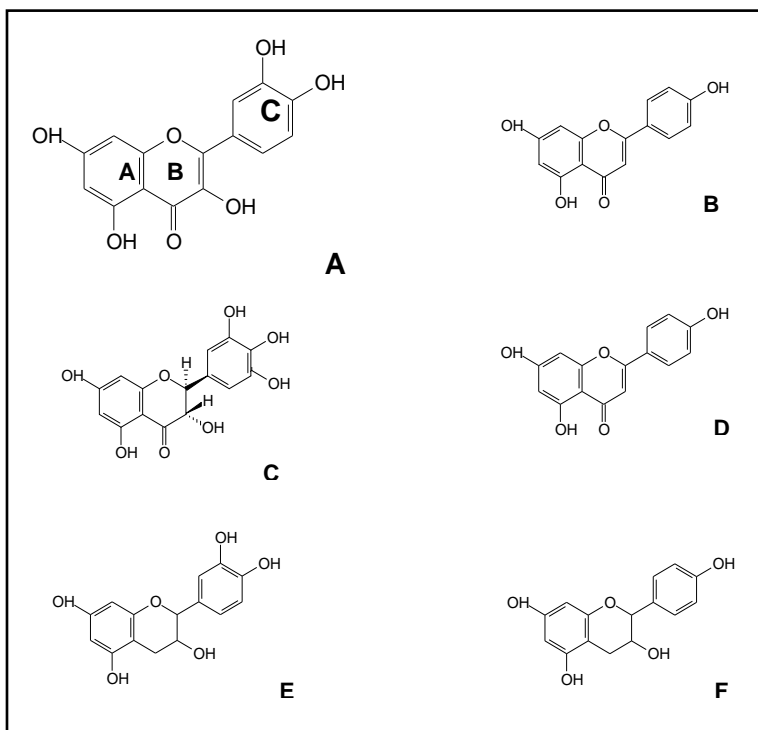


Figura 1: Detalhes estruturais de alguns flavonóides encontrados em tecidos de *Zea mays*: querquetina (A), caempferol (B), naringenina (C), apigenidina (D), cianidina (E) e pelargonidina (F).

(TSAO, DENG, 2004; KUHNEN, 2007).

Diferenças no grau de saturação e no nível de oxidação do anel C são características diagnósticas entre as várias classes de flavonóides, enquanto a combinação de diferentes radicais nos anéis A e B é responsável pela identidade dos compostos dentro de cada uma das classes (WODJILO et al., 2007). Os flavonóides são divididos em (HEIM et al., 2002):

- **flavonóis (flavon-3-óis):** como a **quercetina (Fig. 1A)** observada em verduras escuras, alho, tomate, vinho tinto e no chá (*Camelia sinensis*), o **campferol (Fig. 1B)**, encontrado em verduras escuras, suco de uva e chá preto e a **miricetina**, presente no vinho tinto;
- **flavanonas:** como a **taxifolina**, a **hesperidina** e a **naringenina (Fig. 1C)**, todas já observadas em frutas cítricas;
- **flavonas:** como a **apigenina**, encontrada na salsa e no salsão (aipo) e a **luteolina**, já detectada na pimenta vermelha;
- **antocianinas:** como a **luteolinidina** e **apigenidina (Fig. 1D)**, antocianidinas derivadas dos flavan-4-óis e encontradas em frutas e cereais; e também a **cianidina (Fig. 1E)** e a **pelargonidina (Fig. 1F)**, antocianidinas derivadas dos flavan-3,4-dióis e presentes em flores, frutos e folhas de diversas espécies.

Dentre os flavonóides, as antocianinas merecem destaque por atuarem como pigmentos, sendo responsáveis pela coloração laranja, vermelha, rosa, roxa, púrpura e azul de flores, frutos e de algumas folhas (MOL et al., 1998; KAZUMA et al., 2003; FOSSEN et al., 2005; KOES et al., 2005; MACZ-POP et al., 2006; TIAN et al., 2006). Possuem um papel essencial na atração de agentes polinizadores e dispersores, pois além da cor, estão envolvidas com o sabor e com o aroma das estruturas reprodutivas (SIMMONDS, 2003; GRUBESIC et al., 2005). Além disto, atuam na resposta a diferentes situações de estresse biótico (HIPSKIND et al., 1996; SIMMONDS, 2003; SEKHON et al., 2006) e abiótico (HICHEN, et al., 2009; EFEGLU et al., 2009; SAVIRANTA et al., 2010). Atuam como agentes antioxidantes (WANG et al., 1997; GABRIELSKA et al., 1999; HEIM et al., 2002; TSAO, DENG, 2004; TIAN et al., 2006) e também na proteção dos tecidos vegetais contra danos causados

pela exposição à radiação ultravioleta (BACHEREAU et al., 1998; ALEXIEVA et al., 2001).

Adicionalmente, diversos autores demonstraram que as antocianinas apresentam vários efeitos benéficos sobre a saúde humana, em função de suas atividades antioxidante (WANG et al., 1997; HEIM et al., 2002; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; KANG et al., 2010; JEONG et al., 2010), antimutagênica (YOSHIMOTO et al., 1999), antitumoral (FIRMOGNARI et al., 2004; HOU et al., 2005; JEONG et al., 2010; MARI et al., 2010) e também protetora e terapêutica sobre distúrbios cardiovasculares (WANG et al., 1997, JUSTESEN et al., 1998; KRIS-ETHERTON et al., 2004).

Nos últimos anos, os pigmentos antocianínicos vêm sendo pesquisados pela indústria alimentícia como uma alternativa ao uso dos corantes (LAPORNIK et al., 2005; MACZ-POP et al., 2006; YANG, ZHAI, 2010) e dos antioxidantes sintéticos (WANG et al., 1997; HEIM et al., 2002; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004). Diversos estudos indicam a possibilidade de obtenção de extratos ricos em antocianinas ($\approx 35\%$ do volume total) a partir de grãos roxos de milho (CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2003; CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2004; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; CORTÉS et al., 2006; PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007), bem como a partir do sabugo da espiga de variedades onde estas biomassa apresentam intensa coloração roxa (YANG et al., 2008; YANG, ZHAI, 2010).

Deste modo, existe a possibilidade adicional de obtenção de extratos ricos em flavonóides a partir das folhas de milho, agregando mais uma alternativa de aproveitamento para esta biomassa, especialmente no caso de algumas das VCM, em função do seu fenótipo peculiar de coloração.

MATERIAL E MÉTODOS

Material foliar de *Zea mays*

Foram consideradas as variedades crioulas de milho: Mato Grosso Palha Roxa (MG), Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC), Língua de Papagaio (LP) e MPA 01 (MP) e também, duas variedades comerciais como testemunha, BRS 1030 (BR - híbrido simples) e Fortuna (FO - variedade de polinização aberta).

Os estudos utilizaram amostras de material foliar desidratadas em estufa (n = 4 repetições), oriundas de cultivo na safra 2007/ 2008,

efetuado na fazenda experimental da Ressacada (CCA-UFSC), localizada em Florianópolis-SC.

Coleta e preparo do material foliar

O material foliar foi coletado no estágio de emissão das flores femininas, aproximadamente uma semana após a emissão do pendão masculino. Para tal, a quinta folha (ápice → base) foi selecionada. Apenas o terço mediano do limbo foliar foi considerado (10g/planta, peso fresco). O material foi desidratado em estufa (42-45°C, até peso constante) e conservado em recipientes plásticos (ausência de luz, em temperatura ambiente). Sendo que para cada variedade de milho foram consideradas 4 repetições (n = 4).

Obtenção do extrato metanol acidificado (MeOH-HCl 1%)

Amostras ($0,150 \pm 0,001$ g, peso seco) foram adicionadas de 10 mL de metanol (MeOH) acidificado (HCl 1%, v/v) e mantidas a 40°C (banho-maria), durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados em suporte de celulose, sob vácuo, e armazenados a -20°C, em frascos âmbar, cuja atmosfera interna foi substituída por N₂ gasoso.

Espectrofotometria de varredura UV-visível

O extrato bruto foi submetido à espectrofotometria de varredura UV-visível (Shimadzu 2301), abrangendo a faixa espectral de 200 a 700 nm, em intervalo de 1 nm.

Quantificação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado via espectrofotometria UV-visível, com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu, conforme descrito previamente (RANDHIR et al., 2002). Os resultados foram expressos em função de uma curva de calibração externa (1 a 243 mg/mL, $r^2 = 0,999$), tendo o ácido gálico (Sigma) como composto padrão.

Semi-purificação das amostras

A remoção de compostos indesejados presentes no extrato metanólico acidificado (MeOH-HCl 1%) bruto foi realizada através da

evaporação do solvente sob fluxo de N_2 e posterior re-solubilização do resíduo em 2 mL de etanol: água (70:30, v/v).

Quantificação das antocianinas

O conteúdo de antocianinas foi determinado através da fórmula de Lambert-Beer, utilizando as absorvâncias em 530 nm das soluções amostrais e o coeficiente de extinção molar da cianidina 3,5-diglicosídeo ($\varepsilon = 30.100.M.cm^{-1}$ - MADHAVI et al., 1996).

Detecção dos flavonóides por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

A detecção dos compostos fenólicos foi realizada com injeção direta de alíquotas do extrato metanólico 100% (1 μ L) em espectrômetro de massa equipado com interface de desorção/ionização assistida por laser e analisador de tempo de voo, (MALDI-TOF – PerSeptive Biosystems Voyager), conforme descrito previamente (MARASCHIN et al., 2001). Para efeitos da análise qualitativa dos extratos, foram considerados apenas os sinais $m/z \geq 250$.

Análise quimiométrica

Os dados espectrais da espectrofotometria de varredura UV-vis (290 a 700 nm, 10 nm/ponto amostral) dos extratos brutos foram utilizados para a construção de matrizes de correlação e de covariância para efeitos de análise de componentes principais (PCA), com o auxílio dos programas Excel (Microsoft Office, 2003), GraphPad Prism 2.01 e Fitopac Shell Program (2008).

Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à ANOVA, considerando o modelo: $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$, onde Y_{ij} é a observação da i -ésima variedade ($i = 1, 2, \dots, 8$) da j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, 4$); μ , equivale à média geral; g_i é o efeito do tratamento, supostamente aleatório, normal e independente, distribuído com média zero e variância σ_g^2 ; b_j é o efeito das repetições e e_{ij} é o erro experimental. Variáveis que apresentarem significância $P \leq 0,05$ foram submetidas a testes de separação das médias através do método *post-hoc* LSD (*least squares difference*). Foram utilizados os programas estatísticos Excel (Microsoft Office, 2003) e GraphPad Prism 2.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento inicialmente adotado para a extração dos flavonóides do tecido foliar das variedades crioulas de milho (VCM) utilizou metanol acrescido de 1% de ácido clorídrico (MeOH-HCl 1%) e repouso (30 min) em banho úmido, a 40^o C. Este procedimento foi adaptado a partir do trabalho de Randhir et al. (2002), que caracterizaram esta classe de pigmentos em feijões do tipo fava. Além disso, um protocolo similar foi adotado na caracterização dos compostos fenólicos das flores femininas destas mesmas VCM (KUHNNEN, 2007). O metanol é reconhecido como um solvente eficaz para a extração de flavonóides (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; TSAO, DENG, 2004; LAPORNIK et al., 2005; SULTANA et al., 2007), enquanto o aquecimento e a acidificação do meio objetivaram a hidrólise de flavonóides esterificados (DEL POZO-INSFRAN et al., 2009) e o aumento da estabilidade dos pigmentos antocianícos (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; CORTÉS et al., 2006), já que tais compostos usualmente são mais estáveis em pH ácido.

A ocorrência de flavonóides no extrato MeOH-HCl 1% foi indicada nas varreduras espectrofotométricas (**Figura 2**) por valores mais elevados de absorbâncias na região entre 380 a 430 nm, faixa de absorção típica para flavonóis, como a quercetina, o caempferol e a miricetina (TSAO, DENG, 2004). Além disto, absorbâncias (≥ 1) nas janelas espectrais de 520-530 nm e 560-570 nm indicaram a presença de antocianinas derivadas dos flavan-3,4-dióis (e.g., cianidina e a pelargonidina) e de antocianinas derivadas dos flavan-4-óis (e.g., apigenidina e luteolinidina), respectivamente (BODDU et al., 2005). Adicionalmente se ressalta que todos os genótipos apresentaram valores elevados na região de absorção dos derivados do ácido cinâmico (≈ 320 nm) e do ácido caféico (≈ 360 nm - TSAO, DENG, 2004), bem como para comprimentos de onda característicos dos carotenóides (410 a 470 nm) e das clorofilas (640 a 680 nm - SCHOEFS, 2004; TSAO, DENG, 2004). Os perfis espectrofotométricos indicaram uma menor variação entre as repetições analisadas para cada variedade na faixa entre 380 e 430 nm, comparativamente àquela região espectral de absorção das clorofilas, i.e., 640 e 680 nm, por exemplo. Estes resultados sugerem, portanto, uma maior uniformidade composicional detectada a partir dos comprimentos de onda relacionados à região característica de absorção dos flavonóides (**Fig 2**).

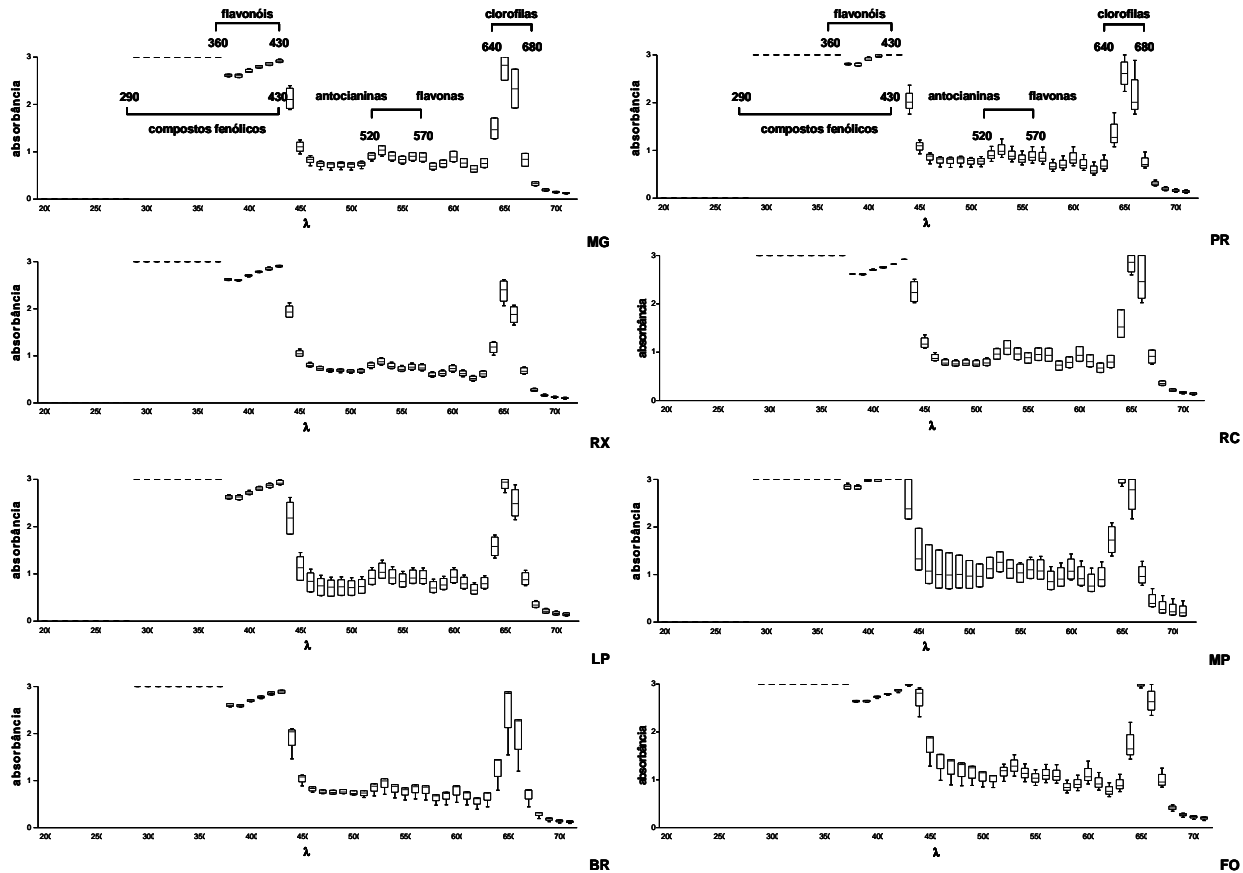


Figura 2: Perfil espectrofotométrico UV-visível ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar das variedades crioulas de milho ($n= 4$ repetições).

MG = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio, **MP** = MPA 01, **BR** = BRS 1030 e **FO** = Fortuna

No que concerne à faixa espectral de máxima absorção das antocianinas, i.e., 520 e 570 nm, a variação existente entre as repetições se mostrou dependente do genótipo considerado, com MPA (MP) apresentando uma maior variação, enquanto a variedade Roxo (RX) mostrou maior uniformidade (**Fig. 2**).

Alíquotas do extrato MeOH-HCl 1% foram utilizadas para a determinação do conteúdo total de compostos fenólicos. Todavia, a reação colorimétrica característica (reativo de Folin-Ciocalteu) não ocorreu, apesar de ser esperada, principalmente em função dos elevados valores de absorbância nos comprimentos de onda típicos para estes compostos (290 – 430 nm – **Fig. 2**). Sugere-se que este fato esteja associado à presença de compostos apolares (carotenóides e clorofilas) no extrato MeOH-HCl 1%, os quais estariam dificultando o acesso do reativo às hidroxilas dos compostos fenólicos. De fato, em havendo dúvidas quanto à presença de compostos lipofílicos nas amostras de interesse, um protocolo de limpeza do extrato (semi-purificação) deve ser adotado, previamente à análise do teor de compostos fenólicos (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004). Para avaliar tal questão, um procedimento visando à retirada de possíveis compostos indesejados foi testado. O efeito positivo que tal procedimento surtiu sobre a reação colorimétrica típica do método de análise apontou como correta a premissa levantada sobre a interferência dos metabólitos apolares.

Os perfis espectrofotométricos UV-vis dos extratos MeOH-HCl 1% após o procedimento de semi-purificação (**Fig. 3**) confirmaram a retirada dos carotenóides (410 a 450 nm) e das clorofilas (640 a 680 nm). Todavia, tal procedimento contribuiu, em alguma extensão, à diminuição da concentração de flavonóis (360 a 430 nm), comparativamente aos perfis do extrato MeOH-HCl 1% não pré tratado (**Fig 2**). Além disto, uma significativa redução de absorbância na região entre 520 e 570 nm, característica dos pigmentos antocianínicos, foi constatada (**Fig. 3**).

A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos foi repetida após a semi-purificação dos extratos (**Fig. 4**). Os resultados revelaram um teor médio igual a $39,905 \pm 4,968$ mg/g de folha, com as variedades RX (média = $47,513 \pm 9,735$ mg/g) e FO ($44,999 \pm 10,996$ /g) mostrando as maiores concentrações, ainda que diferenças significativas ($P \leq 0,05$) tenham sido detectadas apenas entre a variedade RX e os genótipos PR e MP. A variedade FO não diferiu significativamente das demais, muito provavelmente em função do elevado grau de variação entre as suas repetições

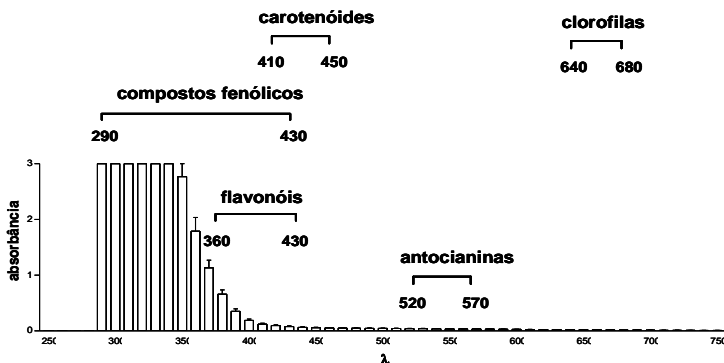


Figura 3: Perfil espectrofotométrico UV-visível ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% foliar da variedade Palha Roxa, após o procedimento de semi-purificação.

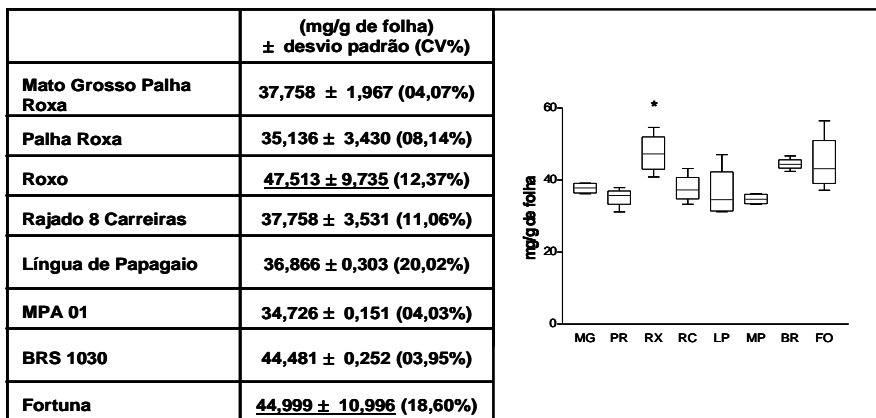


Figura 4: Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de folha \pm desvio-padrão) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar de variedades de *Zea mays* L. ($n = 4$ repetições).

(*) $P \leq 0,05$ – ANOVA.

(CV% = 18,60%). A maior fração da variância deste conjunto de dados foi observada entre as variedades (quadrado médio tratamento = 98,74), com o QM entre as repetições igual a 7,824 e o QM residual igual a 26,38 ($F = 3,744$ e $R^2 = 0,555$). Considerando o teor de compostos fenólicos observado para as variedades crioulas (média = 38,30 mg/g) e aquele observado para as variedades testemunha (média = 44,74 mg/g), percebe-se que as crioulas mostraram um conteúdo ligeiramente inferior, porém não significativo ($P \leq 0,05$, teste *t-student*).

Ao se compararem os teores de fenóis totais do extrato MeOH-HCl 1% (**Fig 4**) média igual a 39,90 mg/g de folha, aos obtidos para o extrato MeOH 100% (**Fig 3 – capítulo 2**) média igual a 10,28 mg/g de folha, percebe-se claramente que a acidificação do meio e a extração efetuada com auxílio de calor parecem influenciar positivamente o processo extrativo, corroborando resultados anteriores observados para os tecidos de *Zea mays* (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; BARRIÈRE et al., 2008; HICHEN et al., 2009; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009). No entanto, o uso de MeOH-HCl 1% também permitiu a extração mais eficiente de carotenóides e clorofilas, os quais influenciaram negativamente a reação de Folin-Ciocalteu, sendo necessária a adoção de limpeza prévia do extrato. Sugere-se que o menor teor de compostos fenólicos detectado no extrato MeOH 100% possa decorrer, pelo menos em parte, da presença de compostos apolares (**Fig. 2 – capítulo 2**) que prejudicaram a quantificação utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu, uma vez que no caso do extrato MeOH 100% a quantificação foi realizada sem a adoção de um procedimento prévio de limpeza (semi-purificação).

O teor médio de compostos fenólicos observado no extrato MeOH HCl 1% foliar, igual a 39,90 mg/g de folha (**Fig. 4**) se mostrou quase 3 vezes superior aos valores obtidos para as folhas de outros genótipos de milho, média igual a 13,350 mg/g (HICHEN et al., 2009). Tal trabalho utilizou MeOH aquoso 70% para a extração, obtendo média similar àquela aqui observada para o extrato MeOH 100% (**Fig 3 – capítulo 2**). Para *Zea mays*, valores próximos a 30 mg de compostos fenólicos totais/g foram observados para os grãos roxos de uma variedade mexicana analisadas por Lopez-Martinez et al. (2009) e para as flores femininas de três genótipos da Sérvia (MAKSIMOSIĆ et al., 2005). O primeiro estudo utilizou etanol aquoso 80% para a extração dos compostos fenólicos e o segundo, uma solução aquosa de acetona 70%. Em estudo prévio, Kuhnen (2007) empregando MeOH HCl 1%, detectou cerca de 45 mg fenóis

totais/g de flores femininas para a variedade RX e teores relativamente menores para LP (24 mg/g) e MG (22 mg/g).

A análise da composição química de resíduos da agroindústria alimentícia, e.g., cascas resultantes do processamento de frutas como a groselha e a uva, indica a possibilidade de aproveitamento destas biomassas para a obtenção de compostos fenólicos (LAPORNIK et al., 2005). Estes autores avaliaram a eficiência da extração utilizando metanol 70%, etanol 70%, ou água, com destaque para a solução metanólica. Extratos metanólicos de groselha negra (*Ribes nigrum* var. Rosenthal) apresentaram teores médios de 8 mg de compostos fenólicos totais/mL, enquanto valores de 1 mg/mL e 3,2 mg/mL foram observados para os resíduos de groselha vermelha (*Ribes rubrum* var. Rondon) e de uva (*Vitis vinifera* var. Pinot Noir), respectivamente. Em comparação aos teores de compostos fenólicos nos extratos MeOH-HCl 1% das folhas das variedades de milho, como 5,2 mg/mL (MP) e 7,1 mg/mL (RX), percebem-se valores bastante atraentes, similar ao observado para as biomassas residuais de groselha vermelha e da uva *Pinot Noir*. Sendo assim, reitera-se a proposta de obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir das folhas de milho. Outro estudo sugere o aproveitamento de resíduos do beneficiamento de frutos de abacate (*Persea americana*) para obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. Valores médios de 35 mg/g foram observados para as sementes, enquanto cerca de 9 mg/g foram detectados nas cascas desta espécie (WANG et al., 2010).

A acidificação do metanol e a extração a quente (40^o C) pareceram agir positivamente também sobre a retirada das antocianinas da matriz foliar das VCM em estudo, já que valores de absorvância mais elevados foram obtidos entre 530-570 nm nos extratos MeOH HCl 1%, comparativamente ao extrato MeOH 100% (**Fig. 2**). Todavia, os extratos MeOH HCl 1% após o processo de semi-purificação mostraram uma redução drástica na absorvância nesta região (**Fig 3**). Sendo assim, a quantificação das antocianinas derivadas dos flavan-3,4-dióis foram efetuadas com os valores de absorvância em 530 nm obtidos para os extratos MeOH HCl 1% antes do procedimento de semi-purificação.

A concentração de antocianinas totais observada para as variedades FO (média = 0,175 mg/g) e MP (média = 0,171 mg/g) foram significativamente superiores ($P \leq 0,05$) aos demais genótipos (média = 0,145 ± 0,019 mg/g – **Fig. 5**), exceção feita à variedade LP. As variedades testemunha (BR e FO) mostraram um teor não significativamente superior (média = 0,150 mg/g), àquele observado

para as variedades crioulas (média = 0,143 mg/g). A variância (QM) contida entre os tratamentos foi igual a 4,036, a observada entre as repetições igual a 0,246 e o efeito do resíduo foi de 0,467 ($F = 0,527$ e $R^2 = 0,0268$).

Estudos visando a caracterização das antocianinas em plântulas do milho falharam ao utilizar MeOH-HCl 1% como solução extratora, pois aparentemente a acidificação do meio de extração acelerou a degradação dos pigmentos antociânicos (HIPSKIND et al., 1996). Os autores afirmaram que tal observação indica a existência, nos tecidos do milho, de antocianinas com os seus resíduos de açúcar esterificados a um ou mais ácidos dicarboxílicos, como o malonil. De forma similar, outros autores mencionam a ocorrência de hidrólise de antocianinas, principalmente aquelas esterificadas ao ácido malônico, nos extratos acidificados com HCl (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

Comparando o teor médio de antocianinas observado nas folhas do milho (**Fig. 5**), com os valores encontrados na literatura para os grãos deste cereal, nota-se que o teor foliar foi quase sempre inferior em ca. duas vezes em relação à média obtida para os grãos azuis (0,272 mg de antocianinas/g de farinha) por Cortés et al. (2006) e Del-Pozo Insfran et al. (2006), com média de 0,314 mg/g. Outro estudo obteve como concentração média de antocianinas para as variedades de grãos roxos 3,658 mg/g, grãos negros 1,055 mg/g, grãos azuis 0,995 mg/g e grãos vermelhos 0,951 mg/g. Genótipos de grãos amarelos e alaranjados e aqueles de grãos brancos mostraram médias iguais a 0,504 mg/g e 0,015 mg/g, respectivamente (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

Empregando metanol e um período de extração de 24 horas, foram recuperados ≈ 17 mg de antocianinas totais/g de farinha, nos grãos roxos de uma variedades originária do Peru (CEVALLOS-CASALS, CISNEROS-ZEVALLOS, 2003) e ≈ 40 mg/g de farinha, em grãos roxos similares, utilizando água como solvente extrator (PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Supondo que o processo de extração aqui relatado para o tecido foliar tivesse duração similar (24 h) e que a eficiência de recuperação de pigmentos se mantivesse igual e constante, com média observada para 30 minutos, igual a 0,145 mg/g, ainda assim, o teor de antocianinas não ultrapassaria cerca de 7 mg/g, significativamente, inferior ao teor observado nestes dois últimos trabalhos.

A dosagem de antocianinas em amostras de sabugos de variedades de milho de coloração roxa revelou um teor médio de 0,680 mg de antocianinas totais/g no extrato aquoso (YANG et al., 2008), cerca de 4,68 vezes superior ao teor médio observado no

presente trabalho para o tecido foliar das VCM. Quando da utilização de MeOH 100% e incubação das amostras de grãos e sabugo por 24 h, uma média de $0,558 \pm 0,015$ mg/g foi observada para os grãos roxos e uma média de $0,923 \pm 0,021$ mg/g foi obtida para o sabugo, novamente, valores substancialmente superiores aos teores aqui obtidos para o tecido foliar do milho (**Fig 5**).

Segundo Lapornik et al. (2005), aproximadamente 6 mg/mL de antocianinas totais podem ser obtidos no extrato metanólico 100% de resíduos de groselha negra, 2 mg/mL para o extrato de uva tinta e 0,260 mg/L para os resíduos de groselha vermelha. Comparando estes valores aos obtidos para as folhas de milho se constata que FO e MP, por exemplo, apresentaram teores médios de ca. 0,026 mg de antocianinas/mL, um valor cerca de 10 vezes inferior aos resíduos de groselha vermelha. Assim, considerando apenas este conjunto de informações se assume que as folhas das VCM não são uma fonte atraente de antocianinas, ao menos em comparação com os valores obtidos para os compostos fenólicos não-antociânicos discutidos anteriormente (**capítulo 2**).

Todavia, os resultados da quantificação das antocianinas não coincidem de modo algum com a análise visual do padrão fenotípico de pigmentação das folhas das variedades sob estudo (**Fig. 6**). De fato, as variedades que mostram intensa pigmentação roxa ou avermelhada nas suas folhas com frequência relativamente elevada (acima de 50%), como MG, PR e RX, mostraram teores de antocianinas menores que aquelas variedades que não apresentaram pigmentação visível, como MP e FO. De forma interessante, resultados similares foram observados por Kuhnen (2007) em análise dos componentes antociânicos nos grãos destas mesmas VCM. Utilizando solução de butanol-HCl 1%, variedades com grãos altamente pigmentados como Roxo do Emílio (RX, no presente estudo) apresentaram teor médio daqueles metabólitos de ca. 2 mg de antocianinas/100 g de farinha. Este valor é considerado baixo, comparativamente à variedade Língua de Papagaio (LP), com menor número de grãos pigmentados, mas com teor de ca. 10 mg/100 g de farinha. Segundo aquela autora, estes resultados podem se relacionar com as formas distintas de complexação dos compostos antociânicos aos polissacarídeos da parede celular nos grãos de milho.

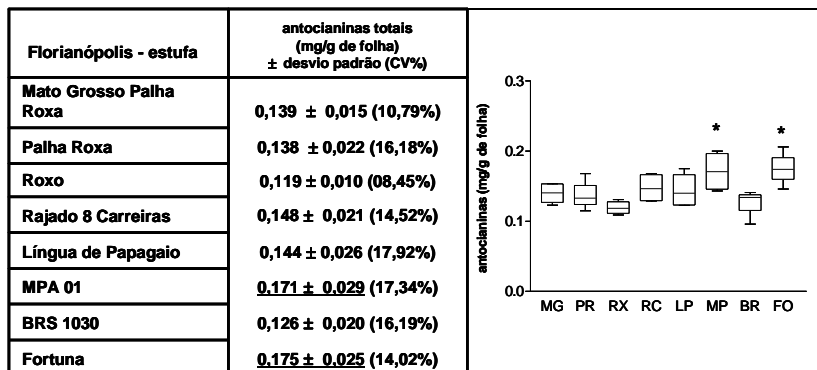


Figura 5: Concentração média de antocianinas totais (mg/g de folha) ± desvio padrão (CV%) determinada espectrofotometricamente (530 nm), para o extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar de variedades de milho (n = 4 repetições)

ANOVA (*) P ≤ 0,05.

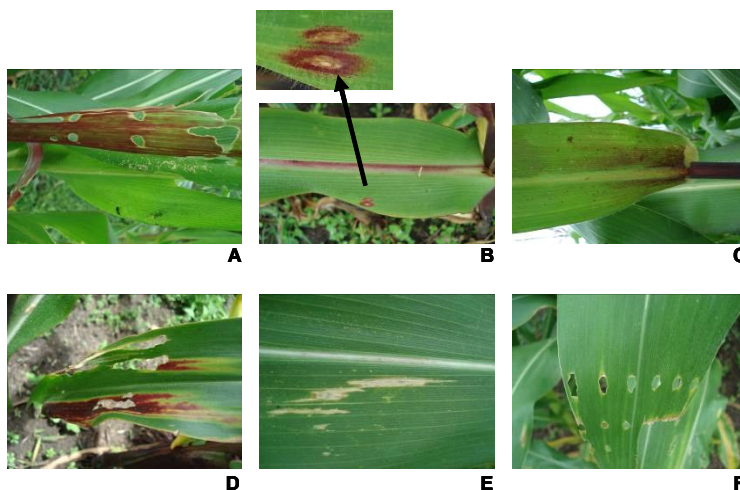


Figura 6: Detalhes da pigmentação foliar tentativamente associada à presença de antocianinas em áreas lesionadas do tecido foliar das variedades de milho em estudo.

A) Mato Grosso Palha Roxa, B) Palha Roxa, C) Roxo, D) Língua de Papagaio, E) MPA e F) Fortuna.

Algumas hipóteses foram formuladas para tentar explicar a diferença observada entre a quantificação das antocianinas (**Fig. 5**) e o fenótipo de pigmentação das folhas (**Fig. 6**). A primeira é de que os pigmentos antociânicos estejam mais fortemente associados à matriz foliar, *i.e.* polissacarídeos da parede celular, no caso de variedades como MG, PR e RX (**Fig. 6**), o que dificultaria a sua extração, apesar das condições adotadas (MeOH-HCl 1%, 40^o C, 30 min), serem relativamente agressivas. Outros autores já relataram dificuldade para extração dos pigmentos nos tecidos do milho (ANDERSON, EMERSON, 1923; STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; KUHNEN, 2007).

A segunda hipótese é que estas mesmas condições de extração possam ser responsáveis pela degradação dos pigmentos, de modo diferencial consoante ao genótipo. Neste contexto, variedades que possuem um maior conteúdo de derivados antociânicos esterificados a ácidos dicarboxílicos seriam mais suscetíveis à acidificação com HCl, conforme observado por alguns autores (HIPSKIND et al., 1996; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

Uma terceira hipótese considera que não apenas as condições de extração geraram a aparente incongruência entre os resultados, mas que os pigmentos majoritários presentes nas folhas de algumas das variedades talvez não sejam antocianinas com máximo de absorção de luz em 530 nm. De fato, relatos indicam a existência de uma bifurcação na via de síntese dos flavonóides (**Fig. 7**), sendo que a partir da naringenina, e dependendo da necessidade metabólica, serão sintetizados os pigmentos antociânicos ou então, os flobafenos (MOL et al., 1998; STAFFORD, 1998; KOES et al., 2005). A **Fig. 7** mostra que antocianidinas como a cianidina, a pelargonidina e a delphinidina são sintetizadas a partir de diferentes dihidro-flavonóis (flavan-3,4-dióis). Por sua vez, os pigmentos flobafênicos são provavelmente resultantes da polimerização não enzimática dos flavan-4-óis, apiforol e luteoforol (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005; SEKHON et al., 2006). Estes mesmos flavan-4-óis são precursores na síntese das 3 deoxi-antocianidinas apigenidina e luteolinidina que, em *Sorghum bicolor*, atuam como fitoalexinas associadas à resposta local à infecção por fungos (LO et al., 1996; CHOPRA et al., 2002; DYKES et al., 2009). Antocianinas e flobafenos parecem ser sintetizados no retículo endoplasmático e posteriormente transportados para os diferentes compartimentos celulares em que serão acumulados. Estudos de imunolocalização sugerem o acúmulo de antocianinas preferencialmente em vacúolos e de

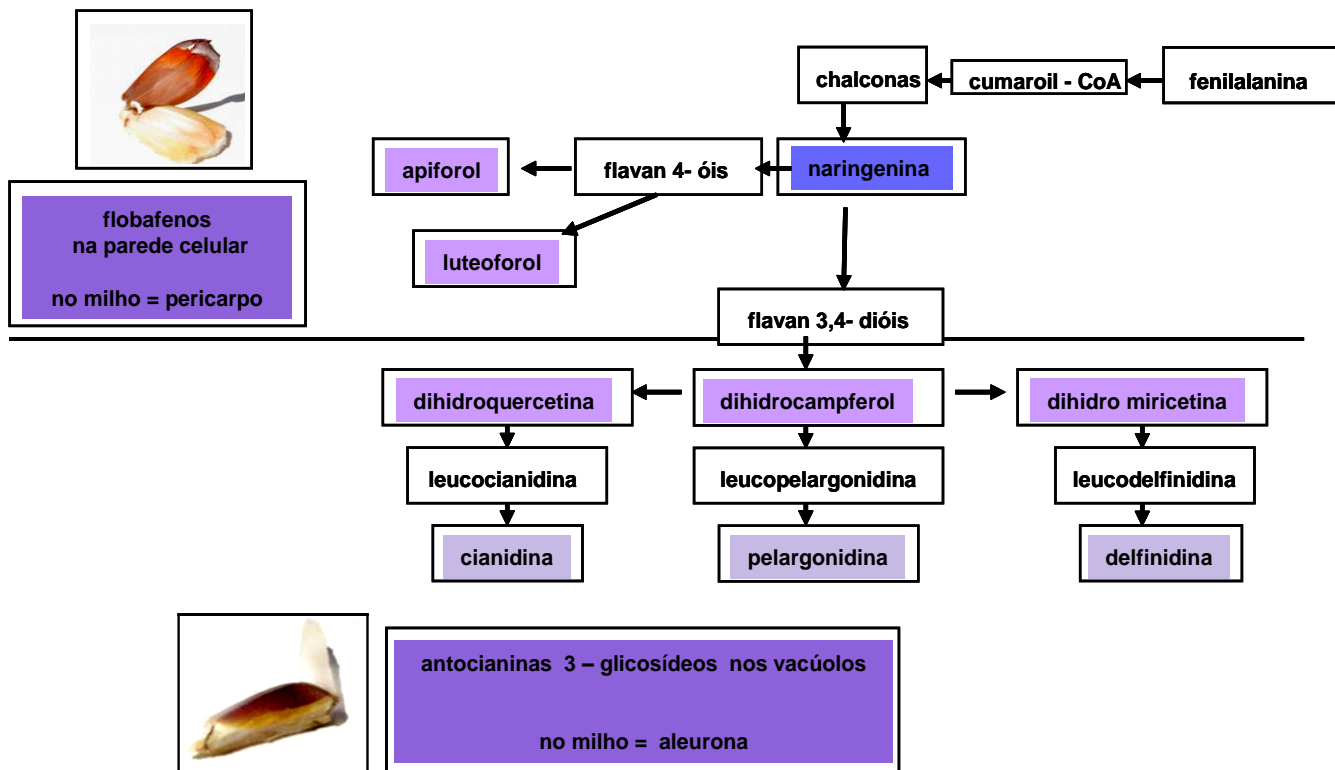


Figura 7: Via de síntese dos principais flavonóides observados em grãos do milho (*Zea mays* L.).
 (Esquema baseado em STAFFORD, 1998; KOES *et al.*, 2002; HALBWIRTH *et al.*, 2003).

flobafenos nas paredes celulares do milho (MOL et al., 1998; KOES et al., 2005). Estudos prévios indicam que os pigmentos acumulados na camada de aleurona do endosperma dos grãos de milho são derivados de antocianinas, enquanto aqueles acumulados no pericarpo são comumente flobafenos (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005; SEKHON et al., 2006).

Considerando estas informações e o fenótipo de coloração dos grãos das variedades de milho aqui analisadas (**Fig. 8**), foi possível perceber padrões distintos de deposição dos pigmentos, com as variedades MG, PR, RX e RC mostrando pigmentação no pericarpo, sendo sugerido, portanto, que acumulem preferencialmente flobafenos. A variedade LP mostrou pigmentação purpúrea (cor da língua do papagaio) na camada mais externa do endosperma de alguns de seus grãos, sendo proposto neste caso o acúmulo de antocianinas derivadas de flavan-3,4-dióis. Já as variedades MP e as testemunhas BR e FO não apresentaram pigmentação nem no pericarpo, nem no endosperma.

Sendo verdadeira, esta proposta poderia explicar os resultados aparentemente contraditórios da quantificação espectrofotométrica, ou seja, variedades altamente pigmentadas (**Fig 6**), com baixo teor de pigmentos antocianínicos (**Fig. 5**). Primeiro porque a grande maioria das VCM altamente pigmentadas, aqui estudadas, apresenta acúmulo de pigmentos no pericarpo de seus grãos (**Fig 8**) e os flobafenos não absorvem seu máximo de luz em 530 nm. Em segundo lugar porque os flobafenos são pigmentos fortemente associados aos polissacarídeos da parede celular (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005), sendo praticamente insolúveis em água, alcoóis, benzeno e solventes similares, dissolvendo-se apenas em ácido sulfúrico (ANDERSON, EMERSON, 1923; STAFFORD, 1998). Sendo assim, as condições aqui adotadas foram muito brandas para a retirada eficiente dos flobafenos das folhas do milho. Já a variedade LP, cuja pigmentação se mostrou concentrada no endosperma (**Fig 8**), associada portanto, a antocianinas derivadas dos flavan 3,4-dióis, teria seus pigmentos retirados com mais facilidade da matriz foliar, nas condições aqui adotadas (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005).

Ressalta-se que nas amostras de tecido foliar os teores mais elevados de antocianinas foram detectados para as variedades MP e FO (**Fig. 5**), que geralmente não apresentam pigmentação, nem na aleurona, nem no pericarpo de seus grãos, de modo similar aos

grãos de BR (**Fig. 8**). A análise visual do padrão de coloração das espigas colhidas das plantas que tiveram suas folhas aqui estudadas pode auxiliar a elucidar esta observação. Pois neste caso se constatou que genótipos como MP e FO também podem acumular pigmentos antociânicos em seus grãos (**Fig. 9**), de modo similar ao observado para a variedade LP, sugerindo a possibilidade de ativação da via de síntese destes pigmentos em seus tecidos.

Estudos indicam que, no milho, as vias de síntese dos pigmentos antociânicos apresentam expressão e ativação tecido específica (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH *et al.*, 2003; BODDU *et al.*, 2005). Portanto, não se exclui a possibilidade de variedades sem pigmentação antociânica nos grãos apresentarem as vias de síntese destes mesmos compostos, ativas em seu tecido foliar.

Também é relatada a existência de genótipos de milho que acumulam apenas flobafenos, ou apenas antocianinas, em seus tecidos, bem como variedades que acumulam ambas as formas (HALBWIRTH *et al.*, 2003). A presença simultânea destes pigmentos no mesmo indivíduo de *Z. mays* é factível porque as duas formas são sintetizadas pela mesma enzima, com atividades de flavanona 4-redutase e dihidro-flavanona 4-redutase. Tal enzima apresenta maior afinidade ($V_{m\acute{a}x}/K_m$) pelas dihidro-flavanonas (flavan-3,4-dióis), favorecendo a síntese destas antocianinas. Todavia, se o genótipo apresentar a enzima flavanona 3-hidroxilase inativa, ou o tecido apresentar tal enzima com baixa atividade, poderá ocorrer o acúmulo de substratos promovendo a síntese dos derivados de flavan-4-óis (HALBWIRTH *et al.*, 2003). Além da pigmentação no pericarpo, as variedades MG e PR também apresentam os tecidos da palha de suas espigas altamente pigmentados de roxo. E alguns trabalhos apontam que as principais antocianinas acumuladas na palha da espiga roxa de certos genótipos de milho são derivadas da cianidina (GAVAZZI *et al.*, 1985; HALBWIRTH *et al.*, 2003).

Além disso, no milho, diversos *loci* relacionados ao padrão de pigmentação de seus grãos e tecidos vegetativos estão sujeitos a mecanismos de controle epigenético. Por exemplo, o *loci red* (*r*), um complexo de genes codificadores para fatores de transcrição que regulam a atividade de vários genes envolvidos diretamente com a síntese de antocianinas de coloração vermelha, como a pelargonidina, está sujeito a controle epigenético via paramutação (MARTIESSEN, 1996; MOL *et al.*, 1998; GERING, HENIKOFF, 2007). Outro exemplo é o locus *b1* que codifica para fatores de transcrição que também promovem a síntese de antocianinas, mas agora de coloração roxa, como os derivados da cianidina. Este *locus*

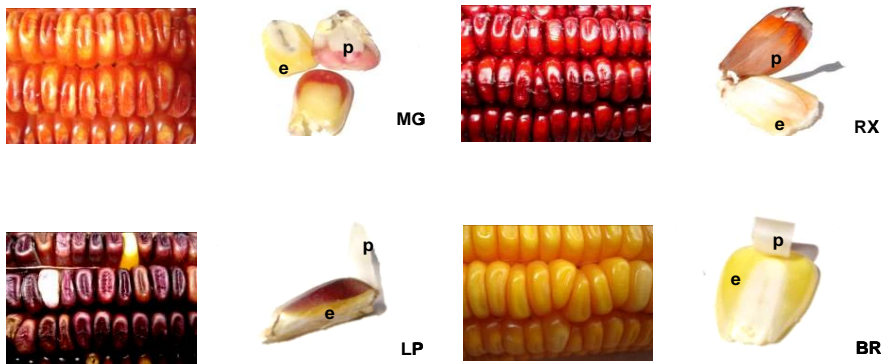


Figura 8: Detalhes do padrão de coloração dos grãos das variedades de milho em estudo. Pericarpio (p) e endosperma (e).

MG = Mato Grosso Palha Roxa, **RX** = Roxo, **LP** = Língua de Papagaio e **BR** = BRS 1030.



Figura 9: Detalhe da diversidade de coloração de grãos de espigas oriundas das mesmas plantas, cujos tecidos foliares foram alvos do presente estudo.

As setas indicam pigmentação provavelmente associada à presença de antocianinas na camada de aleurona dos grãos.

LP = Língua de Papagaio, **MP** = MPA e **FO** = Fortuna.

também está sujeito a paramutação e quando em homozigose, os alelos B1 resultam em alta expressão do fator *b1* e em intensa coloração roxa, enquanto as plantas homozigóticas para os alelos B', são menos pigmentadas (CHANDLER, 2004; BOND, FINNEGAN, 2007). A análise dos diversos *loci* reguladores da biosíntese dos flavonóides apontam para a organização em duas famílias proteicas distintas, uma representada por fatores de transcrição com um domínio MYB característico (família c1) e outra família representada por fatores de transcrição com um motivo básico hélice-loop-hélice (família r). Em conjunto, estas duas famílias de fatores de transcrição ativam todos os genes já identificados, relacionados à via de síntese dos flavonóides. Proteínas da família c1 controlam a síntese dos flobafenos, enquanto proteínas da família r controlam a síntese das antocianinas derivadas dos flavan 3,4-dióis (MOL et al., 1998; STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005; KOES et al., 2005).

É sugerido que a existência de controle através de paramutação possa ter propiciado o surgimento de pigmentação nos grãos das espigas de variedades como MP e FO (**Fig. 9**), das mesmas plantas cultivadas para a análise do tecido foliar. A alteração do padrão de pigmentação pode ter ocorrido através do contato com novos epialelos presentes no pólen de outras variedades, como LP, por exemplo, ativando os conjuntos gênicos anteriormente silenciados nestas variedades.

Identificação dos flavonóides foliares através de espectrometria de massa MALDI-TOF

Dando continuidade à caracterização dos flavonóides, alíquotas do extrato MeOH-HCl 1% foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (EM MALDI-TOF). Porém não se logrou êxito, inicialmente, já que os resultados preliminares revelaram uma degradação relevante das antocianinas nestes extratos. Em função disto, a análise de EM MALDI-TOF para a caracterização dos flavonóides utilizou alíquotas de extrato MeOH 100% foliar, de modo similar ao efetuado para a caracterização dos derivados benzóicos e cinâmicos, no **capítulo 2**.

A busca de identidade de compostos considerou diversos intermediários na via de síntese dos flavonóides (**Fig. 7**), como a naringenina (273 m/z), o caempferol (287 m/z), a quercetina (303 m/z) e a miricetina (319 m/z). Considerou também as seis antocianidinas mais abundantes na natureza, derivadas dos flavan-

3,4-dióis, e.g., pelargonidina (271 m/z), cianidina (287 m/z), peonidina (301 m/z), delphinidina (303 m/z), petunidina (317 m/z) e malvidina (331 m/z), e também aquelas derivadas dos flavan-4-óis, como a apigenidina (255 m/z) e luteolinidina (271 m/z). A m/z esperada para tais metabólitos também foi calculada, considerando seus derivados esterificados a um ou mais resíduos de açúcar, bem como a diferentes ácidos orgânicos. Segundo Escribano-Bailón et al. (2004), os açúcares mais comumente observados associados às antocianidinas são as hexoses glucose e galactose (ambos, + 162 m/z) e as pentoses xilose (+ 132 m/z), arabinose (+ 132 m/z) e ramnose (+ 146 m/z). De forma similar, os ácidos orgânicos mais comuns são o ácido acético (+ 42 m/z), o malônico (+ 86 m/z), o cumárico (+ 164 m/z) e o caféico (+ 180 m/z).

Estudos que utilizaram a EM MALDI-TOF para a identificação das antocianinas consideraram que os seus diferentes ésteres podem se fragmentar durante o processo de ionização das amostras, resultando em padrões distintos de sinais m/z. Por exemplo, um monoglucosídeo como a cianidina 3-glucosídeo, após a fragmentação apresenta sinais de m/z referentes ao éster não fragmentado (íon molecular), à cianidina aglicona e ao resíduo de açúcar. Se esta mesma antocianidina estiver diglucosilada (cianidina 3,5-diglucosídeo), provavelmente serão observados vários sinais de m/z, e.g., um referente ao íon molecular, dois relativos aos fragmentos da antocianidina esterificada a cada um dos resíduos de açúcar (cianidina 3-glucosídeo e cianidina 5-glucosídeo), um para a antocianidina aglicona e também um sinal do resíduo de açúcar. Já no caso da antocianidina se mostrar esterificada a um dissacarídeo (e.g. cianidina ramosil-glucosídeo), normalmente a ligação entre os resíduos de açúcar não se rompe com a energia da ionização, resultando, portanto, em três sinais: o éster não fragmentado (íon molecular), a antocianidina aglicona e o resíduo de dissacarídeo. De modo similar, quando a molécula analisada é malonada, geralmente a ligação entre o ácido orgânico e o resíduo de açúcar também não se rompe. Assim, os sinais resultantes da fragmentação da cianidina 3-glucosídeo malonada, caso o ácido orgânico esteja ligado ao resíduo de açúcar, devem ser aqueles referentes ao éster não fragmentado, ao sinal da cianidina aglicona e ao sinal do resíduo de açúcar malonado (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

Os resultados da identificação dos flavonóides detectados nos espectros de massa adquiridos em modo positivo, a partir dos extratos MeOH 100%, são apresentados no conjunto de tabelas que formam a **Figura 10**.

Todos os espectros analisados apresentaram sinais m/z que indicaram a presença de flavonóides no tecido foliar do milho. Com uma média de 39 sinais m/z por variedade, sendo ampla a variação para o número de sinais, com variedades como FO apresentando apenas 2 sinais m/z , enquanto RC mostrou 68 m/z , seguido por MP, com 54 m/z e BR, também com 54 m/z . As variedades crioulas mostraram um número maior de sinais, média igual a 43, comparado às variedades testemunha, média igual a 28 sinais (**Fig. 10**).

Em quase todos os espectros analisados (exceto FO), foram identificados sinais relacionados aos intermediários da via de síntese dos flavonóides (**Fig. 7**). Quase todas as variedades (exceto FO) mostraram sinais de ésteres da naringenina (**Fig 10**), indicando sua associação a resíduos de açúcar, como no caso da naringenina ramnosil glicosídeo (580 m/z) e também associação ao ácido malônico, como na naringenina di-malonada glicosídeo (607 m/z). De modo similar, em quase todas as variedades (exceto FO) foram detectados sinais de derivados da quercetina (**Fig. 10**), como por exemplo, quercetina glicosídeo (499 m/z), quercetina ramnosídeo (484 m/z) e quercetina di-malonada glicosídeo (637 m/z). Apenas nas variedades MG, RC, LP e BR foram observados sinais de ésteres da miricetina como, miricetina malonil ramnosídeo (551 m/z) observada em MG e RC, miricetina di-malonada ramnosídeo (637 m/z) detectada em RC e LP e miricetina malonada xilosil glicosídeo (699 m/z), observada apenas em BR (**Fig 10**). Sinais de derivados do campferol foram observados somente nos extratos de RC, MP e BR, como o campferol malonado glicosídeo (535 m/z) detectado nas três variedades, o campferol di-malonado xilosil glicosídeo (753 m/z) observado apenas nos extratos de RC e o campferol di-malonado ramnosídeo (605 m/z) detectado somente nos extratos de BR (**Fig 10**).

As variedades PR, RX, MP e BR mostraram um sinal de m/z 287 que pode ser o campferol na sua forma livre. Além deste sinal, a variedade MP também apresentou dois sinais 289 m/z e 303 m/z , associados ao eriodictiol e à quercetina, respectivamente (**Fig. 10**). A variedade com maior número de sinais indicando intermediários na síntese dos flavonóides foi RC, com 20 sinais, seguido por BR, com 13 sinais. Curiosamente, a última variedade apresenta espigas de grãos amarelos, enquanto RC apresenta certa percentagem de plantas com espigas de grãos amarelos. A naringenina e a quercetina mostraram o número mais elevado de sinais, com média de cerca de 2 ésteres por variedade. Por fim, destaca-se que o tecido foliar de RC apresentou um total de 8 ésteres da naringenina e 4 ésteres da quercetina em seus espectros de EM (**Fig 10**).

Mato Grosso Palha Roxa	
	naringenina + glicose (M+ = 435,335)
	naringenina + xilose + ramnose (M+ = 551,5435)
	miricetina + malonil + ramnose (M+ = 551,5435)
	quercetina + xilose (M+ = 435,335)
	quercetina + malonil (M+ = 551,5435)
	quercetina + xilose + glicose + ramnose (M+ = 743,5832)
	cianidina + glicose (M+ = 449,1533)
	cianidina + malonil + malonil (M+ = 459,1951)
	cianidina + malonil + glicose (M+ = 535,2564)
	cianidina + xilose + xilose (M+ = 551,5435)
peonidina aglicona (M+ = 301,0487)	
	peonidina + ramnose (M+ = 447,1983)
	peonidina + glicose (M+ = 463,1436)
	peonidina + malonil + ramnose (M+ = 533,1932)
	peonidina + ramnose + ramnose (M+ = 593,1868)
	peonidina + glicose + ramnose (M+ = 609,263)
	delfinidina + xilose (M+ = 435,335)
	delfinidina + ramnose (M+ = 449,1533)
	delfinidina + glicose (M+ = 465,2125)
	delfinidina + malonil + glicose (M+ = 551,5435)
	petunidina + ramnose (M+ = 463,1436)
	petunidina + glicose + glicose (M+ = 641,2847)
	petunidina + malonil + glicose + glicose (M+ = 727,1932)
malvidina aglicona (M+ = 331,0666)	
	malvidina + xilose (M+ = 463,1436)
	malvidina + acetil + glicose (M+ = 535,2564)
	malvidina + ramnose + glicose (M+ = 639,2394)
	malvidina + glicose + ácido cinâmico (M+ = 641,2847)
	malvidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 665,1848)
	malvidina + malonil + malonil + ramnose + ramnose (M+ = 795,2361)

Figura 10(A): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade **Mato Grosso Palha Roxa (MG)**.

Mato Grosso Palha Roxa - Continuação	
apigenidina + malonil + glicose	(M+ = 503,1997)
apigenidina + xilose + ramnose	(M+ = 533,1932)
apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 594,2574)
metoxi apigenidina + xilose + xilose	(M+ = 533,1932)
metoxi apigenidina + ramnose + glicose	(M+ = 577,0649)
metoxi apigenidina + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 587,112)
metoxi apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 593,1868)
dimetoxi apigenidina + malonil + malonil + xilose	(M+ = 587,112)
luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 594,2574)
metoxi luteolinidina + glicose	(M+ = 547,1983)
metoxi luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 593,1868)
dimetoxi luteolinidina + xilose + glicose	(M+ = 593,1868)
dimetoxi luteolinidina + malonil + malonil + glicose + glicose	(M+ = 795,2361)

Figura10(A): Flavonóides, variedade Mato Grosso Palha Roxa

Palha Roxa	
	naringenina + ramnose + glicose (M+ = 580,257)
kaemferol (M+ = 287,0552)	
	quercetina + ramnose (M+ = 484,3198)
	quercetina + glicose (M+ = 499,6085)

Figura 10(B): Sinais massa/carga (m/z) de compostos flavonóides detectados no extrato metanólico de folhas da variedade **Palha Roxa (PR)**, por EM-MALDI-TOF. Para detalhes veja Material e Métodos.

Palha Roxa - Continuação	
pelargonidina aglicona (M+ = 271,0045)	
	pelargonidina + xilose (M+ = 403,1923)
	pelargonidina + ramnose (M+ = 417,1114)
	pelargonidina + glicose (M+ = 433,2253)
	pelargonidina + malonil + glicose (M+ = 519,0487)
cianidina aglicona (M+ = 287,0552)	
	cianidina + ramnose (M+ = 433,2253)
	cianidina + glicose (M+ = 449,0458)
	cianidina + malonil + glicose (M+ = 535,047)
peonidina aglicona (M+ = 301,0178)	
	peonidina + glicose (M+ = 463,068)
	peonidina + acetil + glicose (M+ = 505,2257)
	peonidina + malonil + ramnose (M+ = 533,2439)
	peonidina + malonil + glicose (M+ = 549,2262)
	peonidina + ramnose + ramnose (M+ = 593,3076)
	delfinidina + ramnose (M+ = 449,0458)
	delfinidina + glicose (M+ = 465,2138)
	petunidina + ramnose (M+ = 463,068)
	petunidina + glicosídeo (M+ = 479,2248)
	petunidina + xilosil + ramnose (M+ = 592,3154)
malvidina aglicona (M+ = 331,0878)	
	malvidina + malonil (M+ = 417,1114)
	malvinidina + glicose (M+ = 493,222)
	malvidina + acetil + glicose (M+ = 535,047)

Figura10(B): Flavonóides, variedade Palha Roxa

Palha Roxa - Continuação	
	apigenidina + glicose (M+ = 417,1114)
	apigenidina + malonil + glicose (M+ = 503,2352)
	metoxi apigenidina + glicose (M+ = 431,1135)
	metoxi apigenidina + ramnose + ramnose (M+ = 561,2456)
	metoxi apigenidina + glicose + glicose (M+ = 593,3076)
	dimetoxi apigenidina + xilose + ramnose (M+ = 561,2456)
	dimetoxi apigenidina + malonil + malonil + ramnose (M+ = 601,1842)
luteolinidina aglicona (M+ = 271,0045)	
	luteolinidina + ramnose (M+ = 417,1114)
	luteolinidina + glicose (M+ = 433,2253)
	metoxi luteolinidina + xilose (M+ = 417,1114)
	metoxi luteolinidina + ramnose (M+ = 431,1135)
	metoxi luteolinidina + malonil + glicose (M+ = 533,2439)
	metoxi luteolinidina + ramnose + glicose (M+ = 593,3076)
	dimetoxi luteolinidina (M+ = 299,0545)
	dimetoxi luteolinidina + xilose + glicose (M+ = 593,3076)

Figura10(B): Flavonóides, variedade Palha Roxa

Roxo	
	naringenina + malonil + malonil + glicose (M+ = 607,2572)
kaemferol (M+ = 287,0881)	
	quercetina + malonil + malonil + xilose (M+ = 607,2572)

Figura 10(C): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade Roxo (RX).

	Roxo - Continuação	
	pelargonidina + malonil + malonil	(M+ = 443,0043)
cianidina aglicona (M+ = 287,0881)		
peonidina aglicona (M+ = 301,0826)		
	peonidina + malonil + ramnose	(M+ = 533,2912)
	peonidina + ramnose + ramnose	(M+ = 593,3218)
	delfinidina + malonil + malonil + xilose	(M+ = 607,2572)
	petunidina + xilose + ramnose	(M+ = 592,3155)
malvidina aglicona (M+ = 331,089)		
	apigenidina + xilose + ramnose	(M+ = 533,2912)
	metoxi apigenidina + ramnose	(M+ = 415,1194)
	metoxi apigenidina + xilose + xilose	(M+ = 533,2912)
	metoxi apigenidina + ramnose + ramnose	(M+ = 561,1503)
	metoxi apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 593,3218)
dimetoxi apigenidina (M+ = 283,0982)		
	dimetoxi apigenidina + xilose	(M+ = 415,1194)
	dimetoxi apigenidina + xilose + ramnose	(M+ = 561,1503)
	dimetoxi apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 607,2572)
	metoxi luteolinidina + malonil + glicose	(M+ = 533,2912)
	metoxi luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 593,3218)
dimetoxi luteolinidina (M+ = 299,085)		
	dimetoxi luteolinidina + glicose + xilose	(M+ = 593,3218)
	dimetoxi luteolinidina + glicose + ramnose	(M+ = 607,2572)

Figura10 (C): Flavonóides, variedade Roxo.

Rajado 8 Carreiras	
naringenina + ramnose	(M+ = 419,0847)
naringenina + malonil + xilose	(M+ = 491,2304)
naringenina + xilose + ramnose	(M+ = 551,2875)
naringenina + xilose + glicose	(M+ = 567,2825)
naringenina + malonil + malonil + glicose	(M+ = 607,2804)
naringenina + malonil + xilose + ramnose	(M+ = 637,9711)
naringenina + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 666,0386)
naringenina + malonil + malonil + ramnose + glicose	(M+ = 753,0032)
kaemferol + xilose	(M+ = 419,0847)
kaemferol + malonil + glicose	(M+ = 535,2849)
kaemferol + malonil + malonil + xilose + glicose	(M+ = 753,0032)
quercetina + malonil + ramnose	(M+ = 535,2849)
quercetina + malonil + malonil + xilose	(M+ = 607,2804)
quercetina + ramnose + glicose	(M+ = 611,3189)
quercetina + malonil + malonil + glicose	(M+ = 637,9711)
miricetina + malonil + malonil	(M+ = 491,2304)
miricetina + malonil + xilose	(M+ = 537,1792)
miricetina + malonil + ramnose	(M+ = 551,2875)
miricetina + malonil + glicose	(M+ = 567,2825)
miricetina + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 637,9711)
pelargonidina + xilose	(M+ = 403,0412)
pelargonidina + ramnose	(M+ = 417,0849)
pelargonidina + malonil + malonil	(M+ = 442,9935)
pelargonidina + malonil + xilose + xilose	(M+ = 535,2849)
pelargonidina + malonil + ramnose + ramnose	(M+ = 649,5677)

Figura 10(D): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade **Rajado 8 Carreiras (RC)**.

Rajado 8 Carreiras - Continuação	
	cianidina + xilose (M+ = 419,0847)
	cianidina + malonil + glicose (M+ = 535,2849)
	cianidina + xilose + xilose (M+ = 551,2875)
	cianidina + glicose + glicose (M+ = 611,3189)
	cianidina + malonil + xilose + xilose (M+ = 637,9711)
	cianidina + malonil + malonil + xilose + glicose (M+ = 753,0032)
peonidina aglicona (M+ = 301,0849)	
	peonidina + malonil (M+ = 387,2184)
	peonidina + ramnose + ramnose (M+ = 593,2889)
	peonidina + ramnose + glicose (M+ = 609,2655)
	delfinidina + malonil + ramnose (M+ = 535,2849)
	delfinidina + malonil + glicose (M+ = 551,2875)
	delfinidina + xilose + xilose (M+ = 567,2825)
	delfinidina + malonil + malonil + xilose (M+ = 607,2804)
	delfinidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 637,9711)
	delfinidina + malonil + malonil + xilose + ramnose (M+ = 753,0032)
	petunidina + malonil (M+ = 403,0412)
	petunidina + ramnose + ramnose (M+ = 609,2655)
malvidina aglicona (M+ = 331,11)	
	malvidina + malonil (M+ = 417,0849)
	malvidina + xilose + ramnose (M+ = 609,2655)
	malvidina + malonil + malonil + ramnose (M+ = 649,5677)

Figura10 (D): Flavonóides, variedade Rajado 8 Carreiras.

Rajado 8 Carreiras - Continuação	
	apigenidina + glicose (M+ = 417,0849)
	apigenidina + malonil + ramnose + glicose (M+ = 649,5677)
	apigenidina + malonil + malonil + xilose + xilose (M+ = 691,7512)
	metoxi apigenidina + ramnose + ramnose (M+ = 561,2416)
	metoxi apigenidina + glicose + glicose (M+ = 593,2889)
	metoxi apigenidina + malonil + xilose + glicose (M+ = 649,5677)
	dimetoxi apigenidina + malonil + glicose (M+ = 531,2884)
	dimetoxi apigenidina + xilose + ramnose (M+ = 561,2416)
	dimetoxi apigenidina + glicose + glicose (M+ = 607,2804)
	luteolinidina + ramnose (M+ = 417,0849)
	luteolinidina + xilose + xilose (M+ = 535,2849)
	luteolinidina + malonil + ramnose + ramnose (M+ = 649,5677)
	metoxi luteolinidina + xilose (M+ = 417,0849)
	metoxi luteolinidina + ramnose + glicose (M+ = 593,2889)
	metoxi luteolinidina + glicose + glicose (M+ = 609,2655)
	metoxi luteolinidina + malonil + xilose + ramnose (M+ = 649,5677)
dimetoxi luteolinidina (M+ = 299,1016)	
	dimetoxi luteolinidina + malonil + ramnose (M+ = 531,2884)
	dimetoxi luteolinidina + xilose + glicose (M+ = 593,2889)
	dimetoxi luteolinidina + ramnose + glicose (M+ = 607,2804)
	dimetoxi luteolinidina + malonil + xilose + xilose (M+ = 649,5677)

Figura10 (D): Flavonóides, variedade Rajado 8 Carreiras.

Lingua de Papagaio	
	naringenina + malonil + xilose + ramnose (M+ = 637,6183)
	quercetina + malonil + malonil + glicose (M+ = 637,6183)
	miricetina + malonil + malonil + ramnose (M+ = 637,6183)
	pelargonidina + malonil + glicose (M+ = 519,174)
	pelargonidina + glicose + glicose (M+ = 595,2382)
	cianidina + malonil + glicose (M+ = 535,2082)
	cianidina + ramnose + glicose (M+ = 595,2382)
	cianidina + glicose + glicose (M+ = 637,6183)
	cianidina + malonil + xilose + xilose (M+ = 637,6183)
	peonidina + malonil + ramnose (M+ = 533,2643)
	peonidina + ramnose + ramnose (M+ = 593,2001)
	peonidina + ramnose + glicose (M+ = 609,2397)
	delfinidina + ramnose + glicose (M+ = 611,1993)
	delfinidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 637,6183)
	petunidina + malonil + malonil + glicose + glicose (M+ = 813,4467)
malvidina aglicona (M+ = 331,1118)	
	malvidina + acetil + glicose (M+ = 535,2082)

Figura 10 (E): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade **Lingua de Papagaio (LP)**.

Lingua de Papagaio - Continuação	
metoxi apigenidina + ramnose + ramnose	(M+ = 561,1102)
metoxi apigeninidina + glicose + glicose	(M+ = 593,2001)
dimetoxi apigeninidina + xilose + ramnose	(M+ = 561,1102)
metoxi luteolinidina + malonil + glicose	(M+ = 533,2643)
metoxi luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 593,2001)
dimetoxi luteolinidina + glicose	(M+ = 461,2841)
dimetoxi luteolinidina + xilosil + glicose	(M+ = 593,2001)

Figura10 (E): Flavonóides, variedade Língua de Papagaio.

MPA	
	naringenina + malonil (M+ = 521,2487)
	naringenina + malonil + malonil (M+ = 607,3284)
kaemferol (M+ = 287,0937)	
	kaemferol + malonil + glicose (M+ = 535,3247)
eriodictiol (M+ = 289,2476)	
quercetina (M+ = 303,1015)	
	quercetina + malonil + xilose (M+ = 521,2487)
	quercetina + malonil + ramnose (M+ = 535,3247)
	quercetina + malonil + malonil + xilose (M+ = 607,3284)

Figura 10 (F): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade MPA 01 (MP).

	MPA - Continuação	
	pelargonidina + malonil + malonil	(M+ = 442,9951)
	pelargonidina + malonil + xilose + xilose	(M+ = 535,3247)
	pelargonidina + ramnose + ramnose	(M+ = 563,0629)
	pelargonidina + malonil + malonil + xilose + ramnose	(M+ = 721,9164)
cianidina aglicona (M+ = 287,0937)		
	cianidina + malonil + malonil	(M+ = 459,2007)
	cianidina + malonil + glicose	(M+ = 535,3247)
	peonidina + malonil + ramnose	(M+ = 533,3353)
	peonidina + ramnose + ramnose	(M+ = 593,2901)
	peonidina + ramnose + glicose	(M+ = 609,3372)
	peonidina + glicose + glicose	(M+ = 625,3386)
delfinidina aglicona (M+ = 303,1015)		
	delfinidina + malonil + xilose	(M+ = 521,2487)
	delfinidina + malonil + ramnose	(M+ = 535,3247)
	delfinidina + malonil + malonil + xilose	(M+ = 607,3284)
	petunidina + ramnose + ramnose	(M+ = 609,3372)
	petunidina + ramnose + glicose	(M+ = 625,3386)
	petunidina + malonil + malonil + glicose + glicose	(M+ = 813,5835)
malvidina aglicona (M+ = 331,1035)		
	malvidina + malonil + ramnose	(M+ = 563,0629)
	malvidina + xilose + ramnose	(M+ = 609,3372)
	malvidina + xilose + glicose	(M+ = 625,3386)

Figura 10 (F): Flavonóides, variedade MPA 01.

MPA - Continuação	
	apigenidina + xilose + ramnose (M+ = 533,3353)
	apigenidina + ramnose + glicose (M+ = 563,0629)
	apigenidina + malonil + ramnose + ramnose (M+ = 633,8413)
	apigenidina + malonil + malonil + xilose + glicose (M+ = 721,9164)
	metoxi apigenidina + xilose + xilose (M+ = 533,3353)
	metoxi apigenidina + xilose + glicose (M+ = 563,0629)
	metoxi apigenidina + glicose + glicose (M+ = 593,2901)
	metoxi apigenidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 633,8413)
	dimetoxi apigenidina + glicose + glicose (M+ = 607,3284)
	dimetoxi apigenidina + malonil + xilose + xilose (M+ = 633,8413)
	luteolinidina + xilose + xilose (M+ = 535,3247)
	luteolinidina + ramnose + ramnose (M+ = 563,0629)
	luteolinidina + malonil + malonil + xilose + ramnose (M+ = 721,9164)
	metoxi luteolinidina + malonil + glicose (M+ = 533,3353)
	metoxi luteolinidina + xilose + ramnose (M+ = 563,0629)
	metoxi luteolinidina + ramnose + glicose (M+ = 593,2901)
	metoxi luteolinidina + glicose + glicose (M+ = 609,3372)
	metoxi luteolinidina + malonil + malonil + xilose + xilose (M+ = 721,9164)
dimetoxi luteolinidina (M+ = 299,0886)	
	dimetoxi luteolinidina + xilose + xilose (M+ = 563,0629)
	dimetoxi luteolinidina + xilose + glicose (M+ = 593,2901)
	dimetoxi luteolinidina + ramnose + glicose (M+ = 607,3284)
	dimetoxi luteolinidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 633,8413)

Figura 10 (F): Flavonóides, variedade MPA 01.

BRS 1030	
	naringenina + malonil + ramnose (M+ = 505,2544)
	naringenina + malonil + malonil + ramnose (M+ = 591,3239)
	naringenina + malonil + malonil + glicose (M+ = 607,2964)
kaemferol (M+ = 287,0815)	
	kaemferol + malonil + xilose (M+ = 505,2544)
	kaemferol + malonil + glicose (M+ = 535,3002)
	kaemferol + malonil + malonil + xilose (M+ = 591,3239)
	kaemferol + malonil + malonil + ramnose (M+ = 605,1029)
	quercetina + malonil (M+ = 389,006)
	quercetina + malonil + ramnose (M+ = 535,3002)
	quercetina + malonil + malonil + xilose (M+ = 607,2964)
	miricetina + malonil + xilose (M+ = 537,3226)
	miricetina + malonil + xilose + glicose (M+ = 699,4275)

Figura 10 (G): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade **BRS 1030 (BR)**.

BRS 1030 - Continuação	
	pelargonidina + malonil + malonil (M+ = 442,9382)
	pelargonidina + malonil + xilose + xilose (M+ = 535,3002)
	pelargonidina + malonil + malonil + glicose (M+ = 605,1029)
cianidina aglicona (M+ = 287,0815)	
	cianidina + malonil + malonil (M+ = 459,2525)
	cianidina + malonil + xilose (M+ = 505,2544)
	cianidina + malonil + glicose (M+ = 535,3002)
	cianidina + malonil + malonil + xilose (M+ = 591,3239)
	cianidina + malonil + malonil + ramnose (M+ = 605,1029)
	peonidina + malonil + ramnose (M+ = 533,2873)
	peonidina + ramnose + ramnose (M+ = 593,3163)
	peonidina + malonil + malonil + xilose (M+ = 605,1029)
	peonidina + ramnose + glicose (M+ = 609,3133)
	peonidina + glicose + glicose (M+ = 625,3161)
	delfinidina + malonil (M+ = 389,006)
	delfinidina + malonil + ramnose (M+ = 535,3002)
	delfinidina + malonil + malonil + xilose (M+ = 607,2964)
	petunidina + ramnose + ramnose (M+ = 609,3133)
	petunidina + ramnose + glicose (M+ = 625,3161)
malvidina aglicona (M+ = 331,0753)	
	malvidina + xilose + ramnose (M+ = 609,3133)
	malvidina + xilose + glicose (M+ = 625,3161)

Figura 10 (G): Flavonóides, variedade BRS 1030.

BRS 1030	
apigenidina + xilose + ramnose	(M+ = 533,2873)
apigenidina + malonil + xilose + xilose	(M+ = 605,1029)
metoxi apigenidina + xilose + xilose	(M+ = 533,2873)
metoxi apigenidina + ramnose + ramnose	(M+ = 561,3281)
metoxi apigenidina + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 587,0611)
metoxi apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 593,3163)
dimetoxi apigenidina + malonil + glicose	(M+ = 531,2012)
dimetoxi apigenidina + xilose + ramnose	(M+ = 561,3281)
dimetoxi apigenidina + malonil + malonil + xilose	(M+ = 587,0611)
dimetoxi apigenidina + ramnose + glicose	(M+ = 591,3239)
dimetoxi apigenidina + malonil + malonil + ramnose	(M+ = 601,051)
dimetoxi apigenidina + glicose + glicose	(M+ = 607,2964)
luteolinidina + xilose + xilose	(M+ = 535,3002)
metoxi luteolinidina + malonil + glicose	(M+ = 533,2873)
metoxi luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 593,3163)
dimetoxi luteolinidina + glicose	(M+ = 460,9787)
dimetoxi luteolinidina + ramnose + ramnose	(M+ = 591,3239)
dimetoxi luteolinidina + xilose + glicose	(M+ = 593,3163)
dimetoxi luteolinidina + ramnose + glicose	(M+ = 607,2964)

Figura 10 (G): Flavonóides, variedade BRS 1030.

Fortuna	
	pelargonidina + malonil + malonil (M+ = 442,8999)
petunidina aglicona (M+ = 317,9978)	

Figura 10(H): Sinais massa carga (m/z) relacionados aos flavonóides, observados nos espectros de MALDI-TOF para o extrato MeOH do tecido foliar da variedade Fortuna (FO).

A naringenina é um intermediário chave na síntese dos flavan-4-óis, que originam os flobafenos, e também na síntese dos flavan-3,4,-dióis que originam as antocianinas (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003). Sendo assim, faz sentido que este intermediário tenha sido observado no tecido foliar de todos os genótipos analisados. Já a dihidro-quercetina é um composto intermediário na síntese da cianidina, enquanto o dihidro-campferol e a dihidro-miricetina são intermediários na síntese da pelargonidina e da delfinidina, respectivamente (STAFFORD, 1998; HALBWIRTH et al., 2003; BODDU et al., 2005; SEKHON et al., 2006). A presença de sinais relacionados às formas não dihidroxiladas destes metabólitos pode indicar que a via de síntese das antocianinas derivadas dos flavan 3,4-dióis se encontra ativa no tecido foliar de todas as variedades analisadas. Resultados similares no que se refere à presença de quercetina e campferol nos extratos dos grãos de milho roxo proveniente do Peru têm sido relatados (PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

As análises de EM MALDI-TOF dos extratos metanólicos foliares das VCM em estudo também revelaram a presença das seguintes antocianidinas derivadas dos flavan-3,4-dióis (**Fig. 7**): pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina. A variedade RC mostrou o maior número de sinais m/z (27) relacionados com os derivados destas antocianidinas, semelhante ao observado para as variedades MG e PR, ambas com 24 sinais e MP e BR, com 22 sinais (**Fig. 10**).

A caracterização dos extratos MeOH 100% partiu do pressuposto que a presença do sinal m/z indicando a forma aglicona da antocianidina auxilia na elucidação da identidade dos pigmentos antociânicos. Quase todas as variedades (exceto FO) mostraram sinais relacionados à malvidina aglicona (331 m/z). Outras antocianidinas também foram detectadas como agliconas, a cianidina (287 m/z – variedades PR, RX, MP e BR), a peonidina (301 m/z – variedades MG, PR, RX e RC), a pelargonidina (271 m/z – variedade PR), a delfinidina (303 m/z - variedade MP) e a petunidina (317 m/z – variedade FO). A variedade PR mostrou o maior número de sinais m/z relacionados com agliconas das antocianidinas (**Fig. 10**).

Ésteres da pelargonidina foram detectados para quase todas as variedades (exceto MG), com RC, PR e MP apresentando o maior número de sinais m/z relacionados a eles. Ésteres da cianidina também foram detectados para quase todos os espectros, exceto aqueles de RX e FO, com as variedades RC, BR e MG apresentando a maior diversidade de seus derivados. Quase todas

as variedades (exceto FO) mostraram sinais relacionados à peonidina, com o maior número sendo detectado para MG, PR e BR. Derivados da delfinidina também foram observados para quase todas as variedades (exceto FO), com o maior número de sinais sendo visualizados nas variedades RC e MG. Já os ésteres da petunidina, observados em quase todas as amostras (exceção para FO), tiveram MG, PR e MG, mostrando o maior número de diferentes ésteres. Ésteres da malvidina foram detectados nos tecidos foliares de quase todas as variedades, exceção para FO e RX. Curiosamente esta última variedade mostrou um sinal associado a malvidina aglicona, sem a presença de seus ésteres. A variedade MG mostrou o maior número de sinais de derivados da malvidina (**Fig. 10**).

Dando continuidade ao estudo, foi efetuada uma análise preditiva dos fragmentos que podem ter se originado durante o processo de ionização das amostras. Por exemplo, para MG foi observado um sinal para a peonidina di ramnosídeo (593 m/z), que após a fragmentação pode ter originado os sinais da peonidina ramnosídeo (447 m/z) e da peonidina aglicona (301 m/z), simultaneamente observados nos espectros de EM (**Fig 10**). A detecção do monoglicosídeo, peonidina ramnosídeo, permite ainda inferir que os dois resíduos de açúcar devem estar ligados a antocianidina e não formando um dissacarídeo. Nesta mesma variedade, a detecção simultânea da peonidina glicosil ramnosídeo (609 m/z) e dos monoglicosídeos, peonidina ramnosídeo (447 m/z) e peonidina glicosídeo (463 m/z), parecem indicar a ligação independente de cada resíduo de açúcar, a estrutura da antocianidina (**Fig. 10**). No caso da variedade PR, para cada aglicona detectada (pelargonidina, cianidina, peonidina e malvidina) foram observados os seus ésteres 3-glicosilados (e.g. pelargonidina 3-glucosídeo) e também os ésteres glicosilados e malonados (e.g. pelargonidina malonil glucosídeo), indicando um claro padrão de fragmentação. Os espectros da variedade RC evidenciaram sinais relacionados à malvidina di malonada ramnosídeo (649 m/z), bem como, sinais da malvidina malonada (417 m/z) e da malvidina aglicona. Nos espectros de MP, os sinais da delfinidina aglicona e da delfinidina malonil xilosídeo (521 m/z) podem ter se originado a partir da fragmentação da delfinidina di malonil xilosídeo (607 m/z). De forma similar, o sinal observado para BR, cianidina di malonil xilosídeo (591 m/z), pode ter originado os sinais da cianidina malonil xilosídeo (505 m/z) e da cianidina aglicona (**Fig. 10**).

Hipskind et al. (1996) estudando a resistência do milho ao fungo *Maydis bipolaris* que infecta o mesófilo das folhas, notaram o

acúmulo de antocianinas, principalmente cianidina 3-glicosídeo malonada e a cianidina 3-glicosídeo dimalonada, na presença deste patógeno. Além disto, estes pigmentos se acumularam nas células saudáveis ainda não infectadas, circundando a região ao redor da área lesionada. No presente estudo foi observado um padrão similar de acúmulo de pigmentos no tecido foliar de MG, PR, RX e LP, na proximidade de lesões causadas por patógenos (**Fig. 6B**) ou causadas pelo ataque de herbívoros (**Fig. 6A e 6D**). O detalhe em maior aumento, mostrando o acúmulo de pigmentos avermelhados ao redor da lesão no tecido foliar de PR (**Fig. 6B**) é semelhante ao observado por Hipskind et al., (1996). Sugere-se, portanto, que nas variedades MG, PR, RX e LP, ocorra o acúmulo de derivados da cianidina como parte da resposta de resistência a infecção com fungos, ou ao ataque de herbívoros. De fato, as análises por EM MALDI-TOF comprovaram a presença da cianidina aglicona nos tecidos foliares das variedades PR, RX, MP e BR, bem como de sinais m/z associados a seus ésteres, para todas as variedades, exceto RX e FO (**Fig. 10**).

Escribano-Bailón et al. (2004) descreveram a ocorrência de antocianinas em cereais e, no caso de *Zea mays*, a presença nos tecidos foliares de cianidina 3-glucosídeo (48% das antocianinas totais), cianidina 3-glucosídeo malonada (26%), cianidina-3-glucosídeo dimalonada (16%) e também peonidina 3-glucosídeo (2%). Estes autores destacaram a elevada atividade inibitória destas antocianinas sobre a síntese de aflotoxinas, oriundas de *Aspergillus flavus* e *A. subtilis*. De forma similar, grãos roxos de uma variedade originária do Peru mostraram a presença de cianidina 3-glucosídeo, pelargonidina 3-glucosídeo e peonidina 3-glucosídeo, além de seus derivados malonados. A cianidina 3-glucosídeo dimalonada também foi detectada. Em termos quantitativos, a cianidina 3-glucosídeo representou 44% do extrato (ca. 15 mg/g), a cianidina-3-(6" malonil glucosídeo) 26,8% do extrato (\approx 10 mg/g) e a peonidina 3-glucosídeo aproximadamente 10% (\approx 4 mg/g), com seu derivado malonado perfazendo 11% do extrato (\approx 5 mg/g). A pelargonidina 3-glucosídeo representou apenas 3% do extrato e seu derivado malonado 4,6% (AOKI et al., 2002; PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Todos estes ésteres também foram observados no tecido foliar das variedades crioulas de milho objetos deste estudo (**Fig. 10**).

A análise de grãos azuis de variedades de milho provenientes do México indicaram derivados de malvidina e de cianidina como seus componentes majoritários. De outra forma, a cianidina se mostrou em maior concentração em genótipos de grãos vermelhos,

seguida pela pelargonidina e pela malvidina. Neste caso, os principais ésteres detectados foram a cianidina 3-glucosídeo, a pelargonidina 3-glucosídeo e a malvidina 3-glucosídeo (CORTÉS et al., 2006). A análise de duas variedades de milho de grãos azuis, provenientes do México e do EUA, revelou a presença apenas de derivados da cianidina, e.g., cianidina 3-glucosídeo, sendo esta responsável por cerca de 75% do teor de antocianinas totais (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006).

Comparando-se os resultados da EM obtidos para as antocianinas presentes nas folhas do milho (**Fig. 10**), com as informações descritas na literatura (HIPSKIND et al., 1996; AOKI et al., 2002; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007) se percebe uma certa congruência. Primeiramente, todas as variedades (exceto FO) apresentaram derivados da cianidina, da pelargonidina e da peonidina nos seus espectros (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004; DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). E com exceção de FO, as folhas das variedades de milho apresentaram diversas formas de ésteres de malvidina (**Fig. 10**). Sendo esta antocianidina anteriormente detectada em variedades de grãos azuis do México (CORTÉS et al., 2006). Adicionalmente se destaca a presença de derivados de delphinidina em todas as amostras foliares das VCM, sendo no genótipo MP detectada também a sua ocorrência na forma aglicona (**Fig. 10**). Escribano-Bailón et al. (2004) relataram a presença de derivados de delphinidina nos grãos de milho, conjuntamente com derivados da cianidina, pelargonidina e peonidina.

A busca de identidade para os sinais observados nos espectros de massa (MALDI-TOF - **Fig. 10**) revelou a presença de ésteres de antocianidinas como a apigenidina e a luteolinidina, derivadas dos flavan-4-óis nas folhas das VCM (**Fig. 7**). Apenas FO não mostrou sinais (m/z) associados à apigenidina ou a luteolinidina. Para todas as outras VCM foram observados sinais referentes a seus ésteres, bem como aos seus derivados metoxilados e dimetoxilados (**Fig. 10**). A variedade MP mostrou o número mais elevado de ésteres destas antocianidinas (23 sinais m/z), seguido por RC (21 sinais) e BR (19 sinais). Considerando a presença de sinais relacionados às agliconas destas antocianidinas se contata que nos espectros de PR foi observado um sinal (271 m/z) tentativamente atribuído à luteolinidina aglicona. Nos espectros de RX, foram observados dois sinais, 283 m/z e 299 m/z , referentes à dimetoxi-apigenidina e a dimetoxi-luteolinidina, respectivamente.

Para RC e MP, apenas a dimetoxi-luteolinidina foi observada. Já para as variedades MG, LP, BR e FO não foram detectados sinais de agliconas das antocianidinas derivadas dos flavan-4-óis (**Fig. 10**). Apenas para os genótipos LP e FO não foram observados ésteres da apigenidina na sua forma não metoxilada, enquanto as variedades MP, MG e RC apresentaram o maior número de seus ésteres. Os ésteres de apigenidina metoxilada e da apigenidina dimetoxilada foram observados para todas as variedades (exceto FO - **Fig. 10**). Apenas RX e LP não mostraram ésteres de luteolinidina não metoxilada, sendo que ésteres de luteolinidina metoxilada e da luteolinidina dimetoxilada foram observados no tecido foliar de quase todas as variedades (exceto FO). Novamente, a forma monometoxilada da luteolinidina parece ser mais freqüente (**Fig. 10**). Um sinal em 593 m/z observado para todas as variedades (exceto FO) pode indicar a presença da peonidina di ramnosídeo, ou a presença da metoxi-apigenidina di glicosídeo, ou da metoxi-luteolinidina ramnosil glicosídeo ou ainda, da dimetoxi-luteolinidina xilosil glicosídeo.

O eriodictiol, curiosamente detectado apenas nos extratos de MP (**Fig. 10**), origina o luteoforol, monômero provavelmente utilizado na montagem dos flobafenos (HALBWIRTH et al., 2003). Além disso, origina a luteolinidina, composto que teve seus derivados anteriormente observados nas folhas do milho, os quais foram denominados de maisina (GUELDNER et al., 1992), sendo indicados como o principal fator de resistência à infestação pelas lagartas de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*. Diferenças relevantes entre os genótipos de milho com relação ao teor de maisina também foram relatadas. Em sua revisão, Simmonds (2003) menciona a presença da maisina no milho, inibindo neste caso o desenvolvimento das larvas de *Heliothis zea*. Além da presença nas folhas, a ocorrência de derivados da apigenidina e da luteolinidina tem sido relatada no tecido floral do milho. Embora as antocianidinas derivadas dos flavan-4-óis sejam relativamente raras na natureza, sua presença já foi relatada nos tecidos do sorgo, onde atuam como fitoalexinas e também nos tecidos das flores da família *Gesneriaceae*, onde atuam como pigmentos (HALBWIRTH et al., 2003).

Embora as condições de operação do espectrômetro MALDI-TOF não sejam quantitativas, foi possível perceber diferenças marcantes na intensidade dos sinais massa/carga nos espectros obtidos para o extrato MeOH 100% do tecido foliar das diferentes variedades de milho (**Fig. 4 –capítulo 2**).

Os sinais mais intensos foram detectados para as agliconas das antocianinas, com a variedade MG mostrando sinais intensos para 301 m/z (peonidina aglicona) e 331 m/z (malvidina aglicona). Já PR mostrou sinais com maior intensidade em 287 m/z (cianidina aglicona) e 331 m/z. No caso da variedade RX, os sinais mais intensos foram 331 m/z, 299 m/z (dimetoxi luteolinidina aglicona) e 593 m/z (peonidina di ramnosideo, metoxi apigeninidina di glicosideo, metoxi luteolinidina ramnosil glicosídeo e/ou dimetoxi luteolinidina xilosil glicosídeo). A variedade RC mostrou o maior número de sinais intensos em seus espectros, 331 m/z, 535 m/z (cianidina malonada glicosideo, delfinidina malonada ramnosideo, pelargonidina malonada di xilosídeo, quercetina malonada ramnosideo, campferol malonado glicosídeo e/ou luteolinidina di xilosideo), 551 m/z (delfinidina malonada glicosídeo, cianidina di xilosideo, quercetina malonada, miricetina malonada ramnosideo e/ou naringenina xilosil ramnosideo), 593 m/z, 607 m/z (delfinidina di malonada xilosideo, naringenina di malonada, quercetina di malonada xilosideo, dimetoxi apigeninidina di glicosideo e/ou dimetoxi luteolinidina ramnosil glicosídeo) e 609 m/z (peonidina ramnosil glicosídeo, petunidina di ramnosideo, malvidina xilosil ramnosideo e/ou metoxi luteolinidina di glicosideo). As variedades LP e BR mostraram 331 m/z e 593 m/z como os sinais associados aos flavonóides de maior intensidade. A variedade MP apresentou dois sinais, 299 m/z e 593 m/z e FO, apenas um sinal intenso, 443 m/z, associado com a pelargonidina dimalonada (**Fig. 10**).

Quimiometria

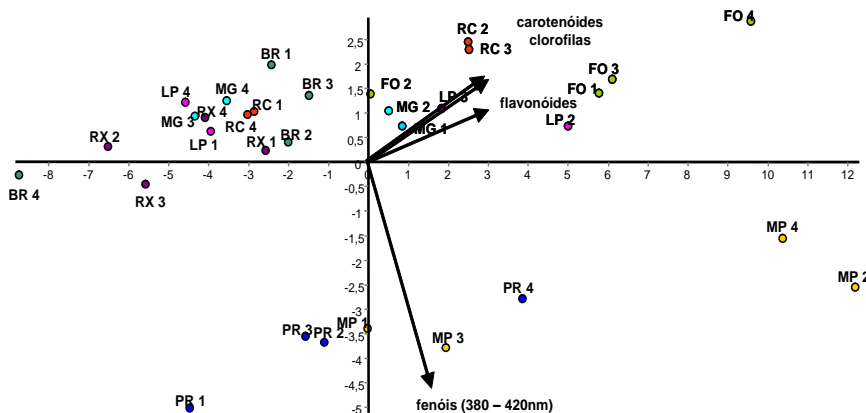
A análise quimiométrica dos perfis espectrais de varredura UV-visível dos extratos MeOH-HCl 1% e MeOH 100% utilizou a análise dos componentes principais (PCA), como estratégia para a prospecção de biomassas com conteúdo fenólico ou antocianico diferenciado.

Os resultados de PCA revelaram para o extrato MeOH-HCl 1% uma menor influência dos autovalores associados aos compostos fenólicos, comparativamente à influência dos carotenóides, flavonóides e clorofilas nas duas formas de cálculo utilizadas, i.e., via matrizes de correlação e de covariância (**Fig. 11**). A menor influência dos comprimentos de onda relacionados aos compostos fenólicos se deve ao fato de que as absorvâncias na janela espectral entre 290 e 370 nm foram descartadas automaticamente durante a análise de PCA, por apresentarem valor igual para todas as variedades (absorvância = 3). Infelizmente, a

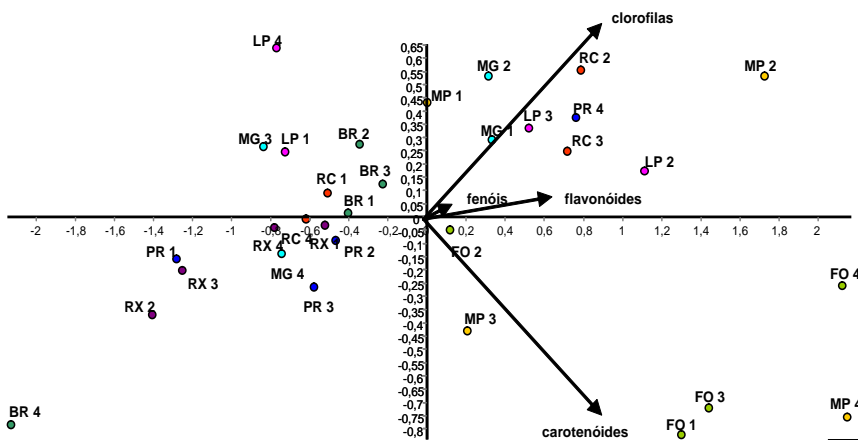
região descartada se refere a janela espectral de máxima absorvência dos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico (TSAO, DENG, 2004). Não foi adotada a diluição do extrato MeOH HCl 1% previamente a análise, pois a influência dos comprimentos de onda de máxima absorção da grande maioria dos flavonóides foi mantida, sendo estes compostos os alvos principais da caracterização de que trata o **capítulo 3**.

O cálculo dos PCA através de matrizes de correlação revelou que PC1 e PC2 resolveram 86,35% da variabilidade do conjunto de dados (**Fig. 11A**). Nesta representação, as variedades que mostraram agrupamentos consistentes entre as quatro repetições foram FO e MP, com todos os autovalores localizados em PC1 e PC2 positivo e PC1 positivo e PC2 negativo, respectivamente. Os comprimentos de onda entre 430 e 710 nm apresentaram correlação positiva ($\geq 0,7$) com PC1 e os autovetores entre 380 e 420 nm influenciaram a distribuição dos objetos ao longo do segundo componente principal, destacando as variedades MP e PR, em PC2 negativo. Um teor mais elevado de compostos como os flavonóis, campferol e quercetina, que absorvem luz entre 380 e 420 nm (TSAO, DENG, 2004), pode ser responsável pelo afastamento de MP e PR, das demais variedades. A análise visual do perfil espectral UV-vis destas variedades (**Fig. 2**) confirma que elas se destacam por apresentarem um valor de absorvência levemente mais elevado entre 380 e 420 nm, comparativamente às demais variedades. E os resultados de EM-MALDI/TOF indicaram para estas duas variedades sinais associados ao campferol aglicona (287 m/z) e também a ésteres glicosilados e malonados do campferol e da quercetina (**Fig. 10**).

Outros genótipos de milho também mostraram alguma tendência de agrupamento, com todas as repetições de RX e BR se localizando em PC1 negativo, todas as repetições de MG, RC, LP e FO restritas a PC2 positivo e todas as repetições de PR concentradas em PC2 negativo (**Fig. 11A**). Conforme mencionado anteriormente (**capítulo 1**), estas tendências de agrupamentos, no caso da análise utilizando matrizes de correlação, refletem similaridades na composição do tecido foliar. Ressalta-se que considerando estes resultados, as variedades MG, RC, LP e FO são mais similares entre si, diferindo significativamente dos extratos foliares das variedades PR e MP (**Fig. 11A**).



A



B

Figura 11: Análise dos Componentes Principais (PCA) a partir dos dados espectrais de varredura UV-visível (250 a 700 nm) do extrato MeOH-HCl 1% do tecido foliar das variedades de milho.

A) PCA utilizando cálculo via matrizes de correlação, B) PCA utilizando cálculo via matrizes de covariância.

Autovalores: MG = Mato Grosso Palha Roxa, PR = Palha Roxa, RX = Roxo, RC = Rajado 8 Carreiras, LP = Língua de Papagaio e MP = MPA1.

As setas indicam a direção de **autovetores** associados a comprimentos de onda de interesse.

Os resultados de PCA gerados através matrizes de covariância (**Fig. 11B**) demonstraram que esta análise englobou 92,43% da variabilidade dos dados, proporção superior ao observado para o cálculo de PCA utilizando matrizes de correlação. Alguns dos agrupamentos formados na análise anterior (**Fig. 11A**), foram mantidos, e.g., as variedades FO, BR e LP (**Fig. 11B**), enquanto outras tendências de agrupamentos (PR, MP e MG) se mostraram menos evidentes. Sugere-se que a variação na magnitude da absorbância, ou seja, na concentração dos metabólitos, influencie negativamente o agrupamento das repetições no caso destas variedades.

A análise de PCA via matrizes de covariância (**Fig. 11B**) apontou os comprimentos de onda entre 440 e 710 nm como aqueles melhor correlacionados ($\geq 0,7$) à PC1, englobando portanto as regiões de absorção dos carotenóides (≈ 450 nm), das antocianinas (≈ 530 nm) e das clorofilas (entre 640 e 680 nm). Não foram observados comprimentos de onda correlacionados de forma significativa ao segundo componente principal (PC2).

As informações geradas através análise de PCA dos extratos MeOH HCl 1% concordam com a quantificação espectrofotométrica em 530 nm, das antocianinas (**Fig. 5**). Nas duas formas de cálculo de PCA, os autovetores associados aos flavonóides destacam as variedades FO, MP, RC e LP como possuidoras de um conteúdo interessante (**Fig. 11**), de forma congruente ao observado na **Fig. 5**.

No caso da análise de PCA efetuada nos extratos MeOH 100%, toda a faixa de comprimentos de onda utilizada nas varreduras (290 a 700 nm) foi considerada, não apresentando valores que foram desconsiderados automaticamente pela ferramenta de análise dos dados. Era esperado, portanto, que a análise de PCA nestes extratos mostrasse maior influência dos comprimentos de onda associados aos compostos fenólicos (290 a 430 nm), comparativamente com os resultados de PCA referentes aos extratos MeOH-HCl 1%. Tal fato foi comprovado, com os autovetores de maior influência na distribuição dos objetos ao longo dos componentes principais sendo aqueles associados a esta classe de compostos (**Fig. 12**).

Considerando o cálculo de PCA empregando matrizes de correlação, 86,92% da variação contida nos perfis UV-vis foi visualizada nos dois primeiros componentes. Neste caso, apenas as variedades FO e LP mostraram uma maior similaridade entre suas repetições, com todos os seus autovalores localizados em PC1 negativo (**Figura 12A**). Com relação às outras variedades

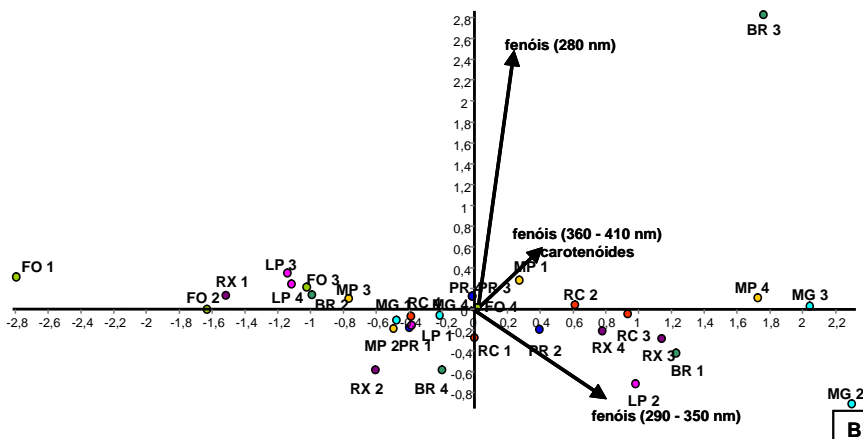
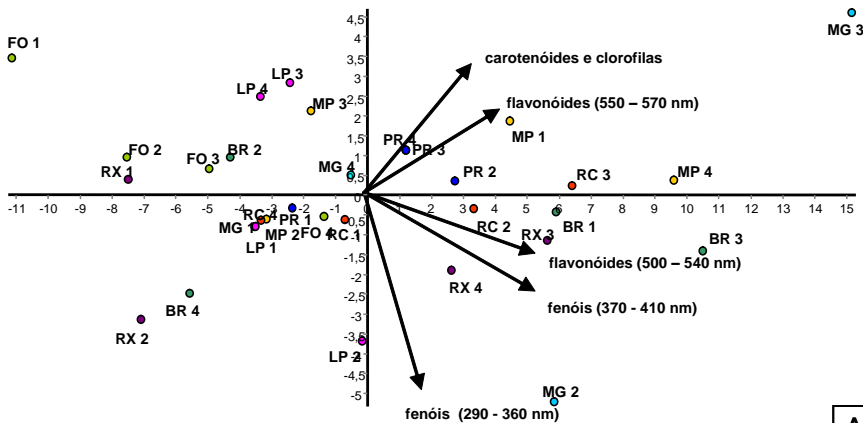


Figura 12: Análise dos Componentes Principais (PCA) originada a partir da varredura espectrofotométrica (250 a 700 nm) do extrato MeOH 100% do tecido foliar das variedades de milho.

A) PCA utilizando cálculo via matrizes de correlação, B) PCA utilizando cálculo via matrizes de covariância.

Autovalores: MG = Mato Grosso Palha Roxa, PR = Palha Roxa, RX = Roxo, RC = Rajado 8 Carreiras, LP = Língua de Papagaio e MP = MPA1.

As setas indicam a direção de **autovetores** associados a comprimentos de onda de interesse.

estudadas, as diferentes repetições se mostraram tão diversas que não permitiram o reconhecimento de tendências de agrupamento. Praticamente todos os comprimentos de onda (340 a 700 nm) mostraram alta correlação com PC1 e nenhum comprimento de onda se mostrou altamente correlacionado a PC2.

Na análise de PCA efetuada através de matrizes de covariância, uma fração ligeiramente inferior da variabilidade 82,13%, foi resolvida pelos dois primeiros componentes. Nesta representação, todos os objetos se associaram muito proximamente com o primeiro componente, distribuindo-se ao longo do eixo de PC1 de forma confusa (**Fig. 12B**). Não foi identificada nenhuma tendência de agrupamento consistente entre as repetições das diferentes variedades. Sendo sugerido que as diferentes repetições mostraram uma amplitude de variação, tão grande, com relação à composição e a concentração de compostos que absorvem luz entre 290 a 430 nm, que a visualização das relações existentes entre o tecido foliar das diferentes variedades de milho ficou dificultada.

Comparativamente ao uso das ferramentas quimiométricas (PCA) utilizadas na prospecção de biomassas com teor interessante de carotenóides (**capítulo 1**), o emprego destas mesmas ferramentas analíticas, não obteve tanto sucesso no caso da prospecção de biomassas com teor relevante de compostos fenólicos e flavonóides.

CONCLUSÕES

A escolha do sistema de solventes se mostrou crucial para a extração dos flavonóides, indicando uma grande diferença entre o emprego do MeOH 100% ou do MeOH HCl 1%. E apesar dos resultados promissores aqui obtidos, os protocolos de extração adotados ainda não foram os mais adequados para a caracterização dos flavonóides do tecido foliar destas variedades de milho.

A varredura espectrofotométrica UV-vis, a quimiometria (PCA) e a quantificação através de Folin-Ciocalteu indicaram uma maior eficiência do MeOH HCl 1% para obtenção de compostos fenólicos, com média de cerca 40 mg/g de folha (Folin-Ciocalteu), comparativamente a 10 mg/g, média do extrato MeOH 100%.

Apesar de mostrar um teor mais elevado de compostos fenólicos e de antocianinas, o extrato MeOH HCl 1% ofereceu uma série de obstáculos para a execução das diferentes técnicas analíticas escolhidas para a sua caracterização, em comparação ao extrato MeOH 100%. Em primeiro lugar, foram encontrados

problemas com o uso do reativo de Folin-Ciocalteu, sendo necessária a adoção de um protocolo de semi-purificação para a retirada de compostos indesejados (carotenóides e clorofilas) presentes nestes extratos. Em segundo lugar, a presença de metabólitos indesejados também dificultou a execução da CLAE, sendo que a adoção dos protocolos de semi purificação acabou retirando grande parte dos flavonóides destes extratos, impossibilitando o emprego desta técnica para identificação e quantificação dos flavonóides, principalmente das antocianinas. No caso da EM MALDI-TOF, o emprego do MeOH HCl 1% causou a degradação dos pigmentos antociânicos presentes, sendo escolhida a extração com MeOH 100%.

A quantificação dos compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) nos extratos MeOH HCl 1% indicou um teor acima da média para a variedade crioula RX (47,513 mg/g de folha) e para as variedades testemunhas, FO (44,999 mg/g) e BR (44,481 mg/g). A quantificação dos pigmentos antociânicos apontou um teor significativamente mais elevado para FO e MP.

Uma hipótese foi formulada para explicar a aparente contradição entre os resultados da quantificação das antocianinas no extrato MeOH HCl 1% e o padrão de coloração observado para as folhas das VCM. Postula uma natureza distinta para os pigmentos existentes nas folhas de certos genótipos. Com algumas VCM acumulando flobafenos no pericarpo de seus grãos (e.g. RX), pigmentos estes que usualmente se encontram fortemente associados aos polissacarídeos da parede celular, sendo praticamente insolúveis em MeOH HCl 1%. A presença de flobafenos como os pigmentos majoritários nas folhas de RX, explicaria, por exemplo, a dificuldade de extração dos pigmentos e/ou os baixos valores de absorbância em 530 nm nesta VCM, já que os flobafenos não apresentam seu máximo de absorção de luz nesta região.

Apesar de enriquecedores para a caracterização das VCM, os resultados da EM MALDI-TOF não auxiliaram muito na elucidação de qual a classe de pigmentos majoritários presentes em cada variedade, se flobafenos ou antocianinas derivadas dos flavan-3,4-dióis. Já que todas as variedades (exceto FO) apresentaram sinais m/z que podem ser associados às duas formas de antocianinas. Com a continuidade da análise das folhas destas variedades, a descoberta de quais as enzimas mais ativas neste tecido, se aquelas relacionadas à síntese dos flobafenos, ou àquelas responsáveis pela síntese das antocianidinas 3,4 hidroxiladas, seria

muito interessante e auxiliaria na elucidação da via de síntese dos flavonóides nestes genótipos de milho.

Diversas singularidades metabólicas foram acessadas com a técnica de EM MALDI-TOF, principalmente considerando a composição de pigmentos antociânicos foliares nestas variedades de milho. Foram observados sinais m/z que apontam a presença da cianidina, da pelargonidina, da peonidina, da malvidina, da delfinidina e da petunidina e também de inúmeros de seus ésteres. Com as folhas das diferentes VCM aparentemente apresentando uma composição antociânica única.

Além de sinais m/z que podem ser associados a antocianinas supracitadas, a análise de EM MALDI-TOF indicou a presença de antocianinas sintetizadas a partir dos flavan-4-óis, como a apigenidina e a luteolinidina, nos espectros de quase todas as variedades (exceção para FO). Tais antocianidinas são compostos proximamente relacionados àqueles encontrados na estrutura química dos flobafenos.

Os resultados indicam a existência de relação entre a composição de flavonóides nas folhas e a cor dos grãos das variedades de milho sob análise. Pois foi observado um maior número de sinais m/z indicando intermediários da via de síntese dos flavonóides (naringenina, quercetina, caempferol e miricetina) e também sinais de derivados da apigenidina e luteolinidina, nas variedades BR e RC. A primeira apresenta como fenótipo normal dos grãos a ausência de pigmentação antociânica e RC, apresenta certa porcentagem dos grãos com pigmentação antociânica e certa porcentagem, sem pigmentação. Talvez nas variedades que apresentam grãos e folhas com forte pigmentação antociânica (LP, RX, MG e PR), estes intermediários não se acumulem, mas sejam direcionados para a síntese dos seus pigmentos finais, antocianinas ou então, flobafenos.

O resultado conjunto obtido para os extratos MeOH HCl 1% e MeOH 100% permite afirmar que as VCM apresentam clara distinção com relação ao seu conteúdo de flavonóides. E que o nível de diversidade metabólica ainda se mantém bastante elevado nestes genótipos, fortalecendo a idéia de que as práticas de seleção e manejo adotadas pelos agricultores familiares que conservam este germoplasma parecem adequadas.

A análise quimiométrica (PCA) das varreduras UV-vis também apontou diferenças claras entre os extrato MeOH HCl 1% e o extrato MeOH 100%. No caso do extrato MeOH HCl 1% a distribuição dos autovalores sofreu uma menor influência dos comprimentos de onda associados aos ácidos fenólicos e uma maior influência daqueles

associados aos flavonóides. Neste caso, variedades como FO e MP formaram agrupamentos mais consistentes, recebendo tal destaque em função de valores de absorvância mais elevados em 530 nm, corroborando as informações obtidas com a quantificação espectrofotométrica (Lambert-Beer). Já as variedades MP e PR se destacaram das demais em PC2 negativo, sob influência de valores de absorvância superiores entre 380 e 420 nm, região característica dos flavonóis, campferol e quercetina. Considerando estes resultados foi sugerido que as variedades MG, RC, LP e FO são mais similares entre si, que PR e MP. Utilizando covariância, o cálculo de PCA manteve alguns dos agrupamentos anteriormente observados (FO, BR e LP), enquanto outras tendências de agrupamentos (PR, MP e MG) se mostraram menos evidentes, sugerindo uma influência negativa da magnitude (concentração) sobre o agrupamento das repetições. É interessante notar que para a variedade RX, ao contrário, a inserção da informação sobre a magnitude da absorvância, auxiliou no agrupamento de suas repetições.

A análise de PCA efetuada nos extratos MeOH 100% mostrou uma maior influência dos comprimentos de onda associados aos compostos fenólicos (290 a 430 nm). Utilizando matrizes de correlação, as variedades FO e LP mostraram maior similaridade entre as suas repetições, já com emprego de matrizes de covariância, nenhuma tendência de agrupamento foi identificada. Sugere-se que para este extrato, as quatro repetições mostraram uma amplitude de variação, tão grande, que a visualização das relações existentes entre o tecido foliar dos diferentes genótipos ficou dificultada.

O uso de ferramentas quimiométricas não obteve tanto sucesso, no caso da prospecção de biomassas com teor relevante de compostos fenólicos e antocianinas, comparativamente, a sua aplicação na prospecção de carotenóides. Todavia a análise de PCA conseguiu destacar variedades como FO e MP, que apresentaram teor de antocianinas superior, comparativamente as outras variedades.

Considerando as informações combinadas da EM e da espectrofotometria, a variedade RC recebeu destaque como aquela que combinou o conteúdo mais diversificado de flavonóides, com um teor elevado de antocianinas. Sendo seguida por MP, com teor ainda mais elevado de antocianinas e teor ligeiramente menos diversificado de flavonóides.

Finalmente, chama atenção o pequeno número de trabalhos científicos encontrados sobre a caracterização dos pigmentos antociânicos e flavonóides presentes nas folhas do milho, apesar do forte indicativo do envolvimento destes compostos na resistência deste tecido a infecção com diferentes patógenos e ao ataque de herbívoros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERDINGS, E.; RALPH, J.; SCHATZ, P. F.; GNICHWITZ, D.; STEINHART, H.; BUNZEL, M. Isolation and structural identification of diarabinylosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. **Phytochemistry**, 66: 113–124 (2005).

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effects of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, 24: 1337-1344 (2001).

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**, 1074: 99-105 (2005).

ANDERSON, E.G.; EMERSON, R.A. Pericarp studies in maize. I. The inheritance of pericarp colors. *Genetics*, 8: 466-477 (1923).

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

BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Physiologia Plantarum**, 104: 203-210 (1998).

BARRIÈRE, Y.; THOMAS, J.; DENOUE, D. QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 X F286. **Plant Science**, 175 (4): 585-595 (2008).

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**, 169: 542–552 (2005).

BOND, D.M.; FINNEGAN, E.J. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. **TRENDS in Plant Science**, 12 (5): 211-216 (2007).

BUNZEL, M.; RALPH, J.; FUNK, C.; STEINHART, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. **Tetrahedron Letters**, 46: 5845–5850 (2005).

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 3313-3319 (2003).

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stability of anthocyanins-based aqueous extract of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. **Food Chemistry**, 86: 69-77 (2004).

CHANDLER, V.L. Paramutation: From Maize to Mice. **Cell** 128, February 23: 641-645 (2007).

CORTÉS, G.A.; SALINA, M.Y.; SAN 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**, 43: 57–62 (2006).

CHOPRA, S.; GEVENS, A.; SVABEK, C.; WOOD, K. V.; PETERSON, T.; NICHOLSON, R. L. Excision of the *Candystripe* 1 transposon from a hyper-mutable Y1-cs allele shows that the sorghum Y1 gene controls the biosynthesis of both 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and phlobaphenes pigments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60: 321-330 (2002).

DEL POZO-INSFRAN, 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**, 39: 696–703 (2006).

DYKES, L.; SEITZ, L.M.; ROONEY, W.L.; ROONEY, L.W. Flavonoid composition of red sorghum genotypes. **Food Chemistry**, 116: 313–317 (2009).

EFEÖĞLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany**, 75: 34–42 (2009).

ESCRIBANO-BAILÓN, M.T., SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**, 1054: 129–141 (2004).

FIMOGNARI, C.; BERTI, F.; NÜSSE, M. O.; CANTELLI-FORTI, G.; HRELIA, P. Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-glucopyranoside. **Biochemical Pharmacology**, 67: 2047–2056 (2004).

FOSEN, T.; SLIMESTAD, R.; ANDERSEN, O.M. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canary grass (*Phalaris arundinaceae*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: 2318-2331 (2001).

FOSEN, T.; RAVVYAN, S.; HOLMBERG, M. H.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, O. M. Acylated anthocyanins from leaves of *Oxalis triangularis*. **Phytochemistry**, 66: 1133-1140 (2005).

FUNK, C.; RALPH, J.; STEINHART, H.; BUNZEL, M. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. **Phytochemistry** 66 (2005) 363–371

GABRIELSKA, J.; OSZMIANSKI, J.; KOMOROWSKA, M.; LAGNER, M. Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effects. **Z. Naturforsch.** 54: 319-324 (1999).

GAVAZZI, G. A.; MIKEREZI, I.; PAPINUTTI, P.; TONELLI, C. Light induced effects on tissue specific gene expression in *Zea mays* L. **Maydica**, XXX: 309-319 (1985).

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA methylation dynamics in plant genomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1769: 276–286 (2007).

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**, 40: 1211–1213 (1992).

GRUBESIC, R. J.; VUKOVIC, J.; KREMER, D.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 39: 837–842 (2005).

HALBWIRTH, H.; MARTENS, S.; WIENAND, U.; FORKMANN, G.; STICH, K. Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. **Plant Science**, 164: 489–495 (2003).

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13: 572–584 (2002).

HICHEM, H.; MOUNIR, D.; NACEUR, E.A. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. **Industrial Crops and Products**, 30: 144–151 (2009).

HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* race O. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49: 247–256 (1996).

HOU, D.; TONG, X.; TERAHARA, N.; LUO, D. & FUJII, M. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 440: 101–109 (2005).

JEONG, J; JUNG, H.; LEE, S.; LEE, H.; HWANG, K.T.; KIM, T. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the

extracts from black raspberry fruits and wine. **Food Chemistry**, 123: 338–344 (2010).

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 799: 101–110 (1998).

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G.S.; SCHAUSS, A.Z.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, 122: 610–617 (2010).

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 64: 1133-1139 (2003).

KIMURA, M.; KOBORI, C.N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, 100: 1734–1746 (2007).

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **TRENDS in Plant Science**, 10 (5): 236-242 (2005).

KRIS-ETHERTON, P.M.; LEFEVRE, M.; BEECHER, G.R.; GROSS, D.; KEEN, C.L.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. **Annual Reviews of Nutritional**, 24: 511–38 (2004).

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.). **Tese em Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC** (2007).

LAPORNIK, B.; PROŠEC, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, 71: 214 – 222 (2005).

LO, S. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: Identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49: 21-31 (1996).

LOPEZ-MARTINEZ, L.X; OLIART-ROS, R.M.; VALERIO-ALFARO, G.; LEE, C.; PARKIN, K.L.; GARCIA, H.S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **LWT - Food Science and Technology**, 42 1187–1192 (2009).

MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZALEZ-PARAMÁS. Natural occurrence of free anthocyanins aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, 94: 448-456 (2006).

MADHAVI, D.L.; JUTHANGKON, S.; LEWEN, K.; BERBER-JIMENEZ, M.D.; SMITH, M.A.L. Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa Cell cultures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 44: 1170-1176 (1996).

MAKSIMOVIC, Z.; MALENCIC, D.; KOVACEVIC, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**, 96: 873–877 (2005).

MARASCHIN, M., PASSOS, R.; DUARTE DA SILVA, J. M. O.; DIAS, P. F.; ARAÚJO, P. S.; OLTRAMARI, A. C.; FONTANA, J. D.; CARO, M. S. B. Isolation and trans-resveratrol analysis in Brazilian red wine by 1H-nuclear magnetic resonance. In: **Magnetic resonance in food science – a view to the future**. (WEBB et al., Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp.136-141 (2001).

MARI, A.; TEDESCO, I.; NAPPO, A.; RUSSO, G.L.; MALORNI, A.; CARNONE, V. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. **Food Chemistry**, 123: 157–164 (2010).

MARTIESSEN, R. Epigenetic phenomena: Paramutation and gene silencing in plants. **Current Biology**, 6 (7): 810-813 (1996).

MITCHELL, K. A.; MARKHAM, K. R.; BOASE, M. R. Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. **Phytochemistry**, 47 (3): 355-361 (1998).

MOL, J.; GROTEWOLD, E.; KOES, R. How genes paint flowers and seeds. **Trends in Plant Science**, 3 (6): 212-217 (1998).

MUETZEL, S.; BECKER, K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affect by drying procedures. **Animal feed Science and Technology**, 125 (1-2): 139-149 (2006).

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

PONELEIT, C. G. Breeding White Endosperm Corn. In: HALLAUER, A. R. **Specialty corns**. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida - USA (2001).

RANDHIR, R; PREETHI, S; KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 37: 1247-1256 (2002).

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, 22: 19–34 (2002).

SAVIRANTA, N.M.M.; JULKUNEN-TIITTO, R.; OKSANEN, E.; KARJALAINEN, R.O. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone. **Environmental Pollution**, 158: 440–446 (2010).

SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1054: 217–226 (2004).

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M.; HEBER, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16: 360–367 (2005).

SEKHON, R. S.; KULDAU, G.; MANSFIELD, M.; CHOPRA, S. Characterization of *Fusarium*-induced expression of flavonoides and

PR genes in maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 69: 109–117 (2006).

SEO, H.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OH, M.; KIM, H.; KIM, J.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris* herba. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–12 (2003).

SIMMONDS, M.S.J. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, 64: 21–30 (2003).

STAFFORD, H.A. Teosinte to maize - Some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoids pathways. **Phytochemistry**, 49: 285-293 (1998).

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, 104: 997–1005 (2007).

TIAN, Q.; GIUSTI, M. M.; STONE, G. D.; SCHWARTZ, S. J. Characterization of a new anthocyanins in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 94: 465-468 (2006).

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, 812: 85–99 (2004).

YANG C. Y., LANDAU, J. M.; HUANG, M.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, 21: 381-406 (2001).

YANG, Z.; HAN, Y.; GU, Z.; FAN, G.; CHEN, Z. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9: 341–347 (2008).

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11: 169–176 (2010).

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

WANG, C.; WANG, J.; LIN, W.; CHU, C.; CHOU, F.; TSENG, T. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 38(5): 411-416 (2000).

WANG, W.; BOSTIC, T.R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, 122: 1193-1198 (2101).

WODJILO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, 105: 940-949 (2007).

ZIELINSKI, H. Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1-20 (2003).

CAPÍTULO 4 – Perfil metabólico e potencial antioxidante *in vitro* do extrato aquoso foliar de variedades crioulas de milho

INTRODUÇÃO

A humanidade sempre buscou na natureza os meios para suprir suas necessidades básicas e o primeiro registro do uso de plantas no tratamento de doenças aparece na Mesopotâmia, há cerca de 6700 anos e se refere ao emprego dos óleos de *Cedrus* spp. (cedro), *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora* spp. (mirra) e *Papaver somniferum* (papoula). Tais óleos eram indicados para os mais diversos males, como resfriados, tosses, infecções parasitárias e processos inflamatórios (GURIB-FAKIM, 2006). O conhecimento popular sobre as propriedades medicinais das plantas foi adquirido, muito provavelmente, através de tentativa e erro, durante centenas de milhares de anos e constitui a base da medicina alopática moderna (RASKIN et al., 2002; BUENZ et al., 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Na medicina tradicional, as plantas são administradas na forma de extratos de preparo simples como, por exemplo, tinturas, cataplasmas e chás (BALICK, COX, 1997). Acredita-se que o efeito benéfico sobre a saúde humana, neste caso, se deva ao fato destes extratos conterem uma grande diversidade de compostos químicos que atuam aditivamente ou sinergisticamente, restaurando o equilíbrio do organismo. Esta diversidade química também permite que um mesmo extrato apresente atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibiótica e diurética (BUENZ et al., 2004; GURIB-FAKIM, 2006). A forma mais prática e frequente de preparo de remédios caseiros é, sem dúvida alguma, o chá, que consiste de um extrato aquoso obtido através de infusão ou decocção de flores, folhas e raízes, dependendo da espécie vegetal considerada (BÜYÜKBALCI, NEHIR EL, 2008).

Estudos etnobotânicos mencionam o emprego do chá de flores femininas (estigmas/estiletos) do milho (*Zea mays* L.) no tratamento de distúrbios relacionados ao sistema urinário, sendo seu uso como diurético citado em pelo menos 93 livros de fitoterapia, publicados em 13 países (VELÁZQUEZ et al., 2005). Tal extrato aquoso também é recomendado para o tratamento de hiperplasia de próstata, cistite, gota, nefrite crônica e distúrbios similares, principalmente, em função de sua atividade antiinflamatória, sendo ainda útil no controle da pressão arterial (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; MAKSIMOVIĆ et al., 2005; WRIGHT et al., 2007). A atividade farmacológica desta biomassa parece tão

relevante, que atualmente, existe no mercado dos EUA um produto designado de Herbal Maydis Stigma®, consistindo de flores de milho, desidratadas e fragmentadas. Tal fitofármaco vem sendo recomendado pela medicina popular e também pela alopatia, como um diurético moderado (MAKSIMOVIC et al., 2005).

O efeito benéfico sobre a saúde humana observado para os chás de algumas espécies vegetais pode ser relacionado ao seu conteúdo de compostos fenólicos e à sua atividade antioxidante (PUNYASIRI et al., 2004; BÜYÜKBALCI, NEHIR EL, 2008). A análise de flores femininas de milho cultivadas no Brasil indicou um elevado teor de compostos fenólicos e a presença de derivados do ácido benzóico, do ácido cinâmico e de flavonóides. Tais estudos também indicaram a existência de grande variação no conteúdo de compostos fenólicos totais, entre os diferentes genótipos de milho (VELÁZQUEZ et al., 2005, KUHNEN, 2007). Adicionalmente, foi sugerido que a atividade farmacológica do extrato aquoso das flores femininas do milho esteja diretamente relacionada à presença de um alto teor de compostos fenólicos (MAKSIMOSIC et al., 2005).

A análise comparativa da constituição antociânica das flores e das folhas do milho cultivado na Inglaterra revelou que tais tecidos são similares (FOSSEN et al., 2001). Este antecedente levou à formulação da hipótese de que o chá (extrato aquoso) obtido a partir das folhas do milho pode apresentar um conteúdo de compostos fenólicos totais elevado e atividade antioxidante proeminente, similar ao observado para suas flores femininas, indicando, portanto, um possível efeito benéfico para a saúde humana.

Desta forma, o extrato aquoso obtido a partir do tecido foliar das variedades crioulas de milho (VCM) foi analisado com relação à composição de compostos fenólicos totais, sendo a quantificação efetuada através da reação de Folin-Ciocalteau (RANDHIR et al., 2002) e a identificação realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antioxidante (ensaio DPPH* - KIM et al., 2002) e o teor de proteínas totais (BRADFORD, 1976) também foi determinado para estes extratos.

Dados comparativos com relação ao chá de amostras comerciais das flores de milho, também serão apresentados. E por último, serão discutidos os resultados de experimentos para determinação do efeito da composição de solventes na solução extratora, i.e., água, metanol, tampão fosfato salino e solução hidroalcoólica.

É importante salientar que cerca de 80% dos seres humanos ainda utilizam as plantas medicinais como sua primeira opção terapêutica (MORALES, 1996; RASKIN et al., 2002) e neste

contexto, a possibilidade de ampliação do uso medicinal do milho, cereal extensivamente cultivado em âmbito mundial, através da inserção do aproveitamento da biomassa foliar para o preparo de chás, parece adequada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material foliar de *Zea mays*

Foram consideradas as variedades crioulas de milho: Mato Grosso Palha Roxa (MG), Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC), Língua de Papagaio (LP) e MPA 01 (MP) e também, duas variedades comerciais como testemunha, BRS 1030 (BR - híbrido simples) e Fortuna (FO - variedade de polinização aberta).

Os estudos utilizaram amostras de material foliar desidratadas em estufa ($n = 4$ repetições), oriundas de cultivo na safra 2007/ 2008, efetuado na fazenda experimental da Ressacada (CCA-UFSC), localizada em Florianópolis-SC.

Coleta e preparo do material foliar

O material foliar foi coletado no estádio de emissão das flores femininas, aproximadamente uma semana após a emissão do pendão masculino. Para tal, a quinta folha (ápice \rightarrow base) foi selecionada. Apenas o terço mediano do limbo foliar foi considerado (10g/planta, peso fresco). O material foi desidratado em estufa (42-45°C, até peso constante) e conservado em recipientes plásticos (ausência de luz, em temperatura ambiente). Sendo que para cada variedade de milho foram consideradas 4 repetições ($n = 4$).

Obtenção dos extratos aquosos

Amostras ($1,0 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$, peso seco) foram adicionadas em 100 mL de água ultrapura e levadas à fervura (100°C), durante 15 minutos. Os extratos foram filtrados sob vácuo, alíquotados (50 mL para liofilização e 5 x 10 mL para análises imediatas) em frascos âmbar e armazenados a -20°C, sob atmosfera de N_2 gasoso.

Paralelamente à caracterização dos extratos aquosos das folhas, foi realizada análise similar nos extratos aquosos obtidos a partir de

duas amostras comerciais de flores femininas de milho. Tais amostras foram adquiridas junto a estabelecimentos comerciais especializados na manipulação de fitofármacos.

Obtenção dos extratos etanólicos

Amostras ($0,150 \pm 0,001$ g, peso seco) foram adicionadas de 10 mL de soluções hidroalcoólicas (etanol: água, v/v), em diferentes proporções, a saber: 90:10, 70:30, 50:50 e 30:70. Seguido de repouso a temperatura ambiente por 30 min, filtração sob vácuo e armazenamento a -20°C , em frascos âmbar com a atmosfera interna substituída por N_2 gasoso.

Obtenção dos extratos em tampão fosfato salino

Amostras ($0,300 \pm 0,001$ g, peso seco) de tecido foliar foram extraídas exaustivamente (3 x, 1h e 1 x, 16h) em solução de metanol: clorofórmio (1: 1, v/v). O sobrenadante foi descartado após cada etapa de extração. Ao fim deste processo, as amostras foram secas (45°C , peso constante), trituradas e adicionadas de 10 mL de tampão fosfato salino (10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl e 137 mM de NaCl; pH 6,8) enriquecido com 100 μM do inibidor de protease (fluoreto de fenil-metil-sulfonil - PMSF - Sigma). Foram então mantidas em repouso durante 30 minutos (4°C), filtradas e armazenadas (-18°C) até o momento da análise.

Espectrofotometria UV-visível

Os extratos foram submetidos à varredura em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu 2301), abrangendo uma faixa espectral de 200 a 700 nm, com intervalo de leitura de 1 nm.

Quantificação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado via espectrofotometria, utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu, conforme descrito previamente (RANDHIR et al., 2002). O cálculo dos valores de concentração destes metabólitos secundários utilizou uma curva de calibração externa (1 a 243 mg/mL, $r^2 = 0,999$), tendo o ácido gálico (Sigma) como composto padrão.

Deteção de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A remoção de compostos indesejados (semi-purificação) foi realizada particionando-se o extrato aquoso com heptano, na proporção de 2:1 (heptano: extrato). Após a agitação (vórtex, 20 s), a solução permaneceu em repouso (10 min) e o sobrenadante foi descartado. Tal procedimento foi repetido 2 vezes.

Após a semipurificação dos extratos aquosos, alíquotas de 10 μL foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C_{18} (Shim-Pack CLC-ODS, 250 mm x 4,6mm \varnothing) e detector espectrofotométrico UV-visível ($\lambda = 280 \text{ nm}$). A eluição utilizou H_2O : AcOH: η -BuOH (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min, sendo a identificação dos compostos de interesse (i.e., ácidos gálico, ferúlico, caféico, cinâmico, clorogênico e *p*-cumárico) efetuada via comparação com os tempos de retenção dos picos de interesse e co-cromatografia de compostos padrões, sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração externa (0,06 a 2 mg/mL, $r^2 = 0,999$), tendo o ácido gálico (Sigma), como padrão.

Quantificação das antocianinas

O conteúdo de antocianinas foi determinado através da fórmula de Lambert-Beer utilizando os valores de absorvância das soluções amostrais em 530 nm, considerando o coeficiente de extinção molar da cianidina 3,5-diglicosídeo ($\epsilon = 30.100 \text{ M.cm}^{-1}$ - MADHAVI et al., 1996).

Quantificação das proteínas totais

Alíquotas (10 mL) do extrato aquoso e do extrato em tampão fosfato tiveram suas proteínas precipitadas com o auxílio de 30 mL de etanol puro, acrescido de 10 mM de DTT (di-tiotreitol), durante 24h (4°C). Após este período, as amostras foram centrifugadas (6000 rpm/ 15 min) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado 2 vezes com acetona acrescida de 10 mM de DTT (ditiotreitol) e as amostras centrifugadas (6000 rpm/ 15 min) entre cada lavagem. Em seguida, o precipitado foi ressolubilizado em 1 mL de tampão Tris 65 mM (pH 6,8) e o conteúdo de proteínas totais determinado através

do método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) para construção da curva-padrão (6 a 200 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,993$).

Avaliação da atividade antioxidante – ensaio de sequestro do radical DPPH

Uma solução estoque com 100 μM do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil – Sigma D9132) foi preparada em metanol, sendo diluída até a concentração do ensaio (1 μM) no momento da análise. O sistema de avaliação da atividade antioxidante consistiu da adição de 2,9 mL da solução do radical (1 μM) a 100 μL do extrato em avaliação, seguido de agitação (vórtex, 10 s) e leitura da absorbância (515 nm) em intervalos de 10 min. Considerando que os agentes antioxidantes causam um decréscimo na absorbância da solução de DPPH, a concentração remanescente do radical foi calculada para cada intervalo amostral (10 min, DPPH_t), através da fórmula $\text{DPPH}\% = [\text{DPPH}_t]/[\text{DPPH}_{t=0}]$, onde $\text{DPPH}_{t=0}$ é igual à absorbância no tempo zero (KIM et al., 2002). Os valores encontrados foram comparados com uma curva de calibração externa (0,02 a 0,4 mg/mL), empregando Trolox, um derivado da vitamina E, como composto antioxidante.

Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à ANOVA, considerando o modelo: $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$, onde Y_{ij} é a observação da i -ésima variedade ($i = 1, 2, \dots, 8$) da j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, 4$); μ , equivale a média geral; g_i é o efeito do tratamento, supostamente aleatório, normal e independente, distribuído com média zero e variância σ_g^2 ; b_j é o efeito das repetições e e_{ij} é o erro experimental. Variáveis que apresentarem significância $P \leq 0,05$ foram submetidas a testes de separação das médias através do método *post-hoc* LSD (*least squares difference*). As análises foram realizadas com apoio dos programas estatísticos Excel (Microsoft Office, 2003) e GraphPad Prism 2.01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Objetivando uma visão mais abrangente da composição química do chá resultante da decocção das folhas de milho, os extratos aquosos foram submetidos à varredura em espectrofotômetro UV-visível (**Fig. 1**). Os perfis obtidos indicaram a presença majoritária de metabólitos que absorvem luz na região entre 290 a 430 nm. Todas as variedades apresentaram absorvância igual ao limite de detecção em 290 nm, indicando a presença de derivados do ácido benzóico (290 – 300 nm). Além disto, absorvâncias relativamente elevadas (> 1) para o intervalo entre 300 – 360 nm foram detectadas, indicando a presença de derivados do ácido cinâmico (290 – 310 nm) e do ácido caféico (290 e 360 nm – TSAO, DENG, 2004). As principais distinções observadas entre as variedades parecem estar mais associadas à magnitude da absorvância, do que à composição qualitativa de seus extratos aquosos. Neste contexto, variedades como PR, LP e FO apresentaram valores médios de absorvância na janela espectral entre 300 e 350 nm, comparativamente menores que MG, RX e BR (**Fig. 1**).

Alíquotas de 1 mL do extrato aquoso foram utilizadas para a quantificação dos compostos fenólicos totais (reativo de Folin-Ciocalteu), sendo os resultados mostrados na **Figura 2**. A concentração média destes metabólitos nos extratos aquosos foi de $76,970 \pm 10,380$ mg de equivalente de ácido gálico/g de folha, não sendo detectadas diferenças significativas entre as variedades (ANOVA, $F = 0,992$ e $R^2 = 0,332$). Todavia se destacam os teores mais elevados observados para a variedade testemunha BR (média igual a $91,649 \pm 16,229$ mg/g) e para as variedades PR (média igual a $88,155 \pm 39,182$ mg/g) e RX (média de $85,660 \pm 16,780$ mg/g). A concentração média de compostos fenólicos totais observada para as variedades testemunha foi de 80,419 mg/g, ligeiramente superior à média observada para o extrato aquoso das folhas das VCM, igual a 75,820 mg/g (**Fig. 2**). A variância contida entre os tratamentos (quadrado médio = 323,3) virtualmente se igualou à variância observada para como resíduo da análise (QM = 325,8), sendo a variância entre as repetições (QM = 278,2) apenas ligeiramente inferior aos dois primeiros valores.

Tais resultados indicaram um teor de compostos fenólicos totais para os extratos aquosos foliares quase 2 vezes superior àquele observado para os extratos MeOH-HCl 1% (média 40 mg/g

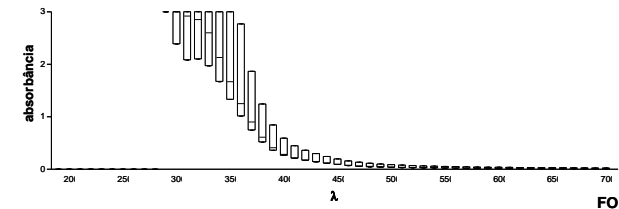
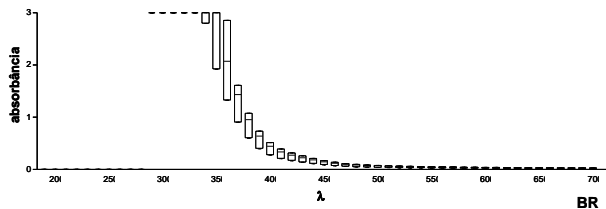
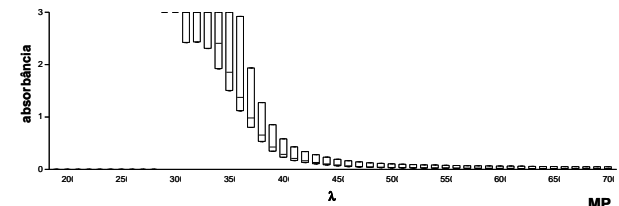
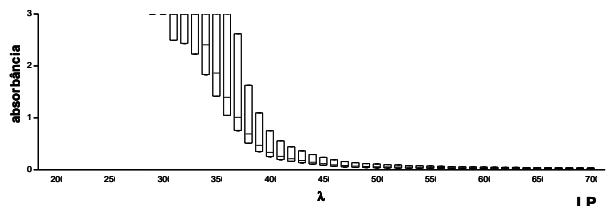
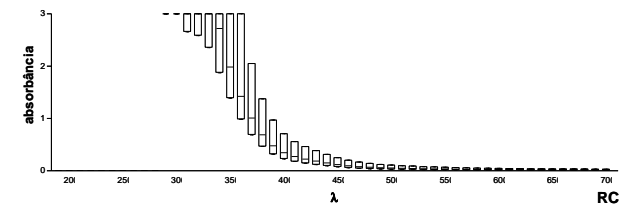
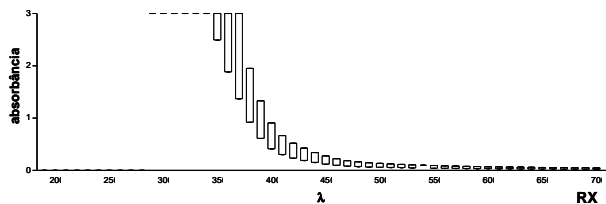
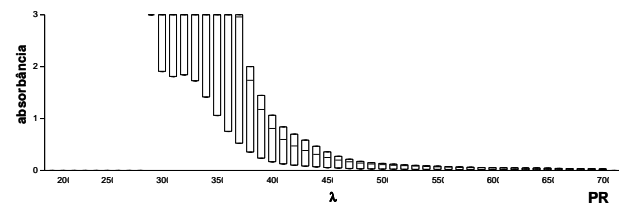
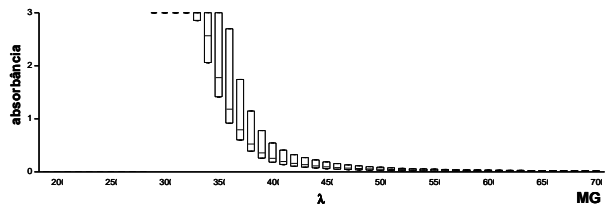


Figura 1: Perfil espectrofométrico ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato aquoso do tecido foliar desidratado em estufa das variedades crioulas de milho ($n = 4$ repetições).

MG = Mato Grosso Palha Roxa, **PR** = Palha Roxa, **RX** = Roxo, **RC** = Rajado 8 Carreiras, **LP** = Língua de Papagaio, **MP** = MPA 01, **BR** = BRS 1030 e **FO** = Fortuna

de folha - **capítulo 3**) e 7,5 vezes superior ao observado para o extrato MeOH 100% (média 10 mg/g de folha - **capítulo 2**). Considerando esta comparação se constata que a extração efetuada com água e uso de calor parece recuperar com maior eficiência os compostos fenólicos do tecido foliar, comparativamente ao uso de metanol. Infere-se que tais condições devem promover a liberação de compostos fenólicos esterificados, cuja ocorrência em tecidos foliares de *Zea mays* já foi detectada como, por exemplo, derivados dos ácidos ferúlico e cumárico, e também diversos taninos condensados formados por unidades de flavonóides (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006; BARRIÈRE et al., 2008; HICHEM et al., 2009; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009).

A análise visual dos perfis UV-vis obtidos para os extratos aquosos indicou a inexistência de conteúdo relevante de carotenóides (410 a 470 nm) e de clorofilas (640 e 680 nm – **Fig. 1**). Sugere-se que a ausência destes compostos tenha contribuído para que a reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu tenha ocorrido com maior eficiência nos extratos aquosos, comparativamente ao anteriormente observado para os extratos metanólicos.

Conforme mencionado anteriormente, o chá de “cabelo” ou “maçaroca” de milho, *i.e.*, o extrato aquoso das flores femininas de milho, é considerado medicinal, sendo amplamente recomendado como diurético e antiinflamatório (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; MAKSIMOVIĆ et al., 2005; WRIGHT et al., 2007). Os resultados da varredura UV-vis apontaram perfis similares para as duas amostras de flores femininas analisadas (**Fig. 3**). Em ambas foram observados valores de absorvância ultrapassando o limite de detecção do espectrofotômetro, entre 290 e 360 nm, indicando a presença de derivados dos ácidos benzóico, cinâmico e caféico (**Fig. 3**).

O conteúdo de compostos fenólicos totais também foi determinado para o extrato aquoso das amostras comerciais de flores femininas de milho utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu (**Fig 4**). Estes resultados indicaram teores menores destes metabólitos para as flores, comparativamente aos extratos aquosos foliares (**Fig. 2 e 4**). A amostra comercial de flores (A) mostrou teor médio de $51,864 \pm 1,517$ mg/g de flor, significativamente superior ($P = 0,0046$, teste *t*-student – $r^2 = 0,990$), ao conteúdo da amostra (B) (**Fig. 4**), mas inferior à variedade MP, que mostrou a menor média para o extrato aquoso foliar das VCM, igual a aproximadamente 60 mg/g de folha (**Fig. 2**).

A quantificação dos compostos fenólicos totais (reativo de Folin-Ciocalteu) foi também efetuada para as flores femininas

destas mesmas VCM, por Kuhnen (2007), tendo sido observado um teor médio de 45 mg de compostos fenólicos totais/g de flor para a variedade Roxo (RX) e teores inferiores para variedades Palha Roxa (PR = 13 mg/g) e Rajado 8 Carreiras (RC = 10 mg/g). Curiosamente, estes resultados indicaram um conteúdo de compostos fenólicos totais no tecido floral imediatamente após sua colheita (KUHNNEN, 2007), inferior àquele observado para as amostras comerciais de flores de milho, desidratadas e com maior período de conservação (**Fig. 4**). Assume-se que esta observação resulta, em alguma extensão, dos sistemas de solventes utilizados no presente trabalho (água ultrapura) e metanol acidificado (MeOH-HCl 1%) por Kuhnen (2007). Tal assertiva se baseia no fato de que uma maior eficiência na extração desta classe de metabólitos foi aqui observada para as folhas dos genótipos em estudo, com o emprego de água e aquecimento (100°C, 15 min – **Fig. 2**), comparativamente ao tratamento com MeOH-HCl 1% e aquecimento (40°C, 30 min - **capítulo 2**).

Ao se comparar a média de compostos fenólicos do extrato aquoso foliar (**Fig. 2**) aos valores relatados na literatura, uma média igual a 13,350 mg/g para o extrato metanólico do tecido foliar foi relatada (HICHEM et al., 2009). Novamente, a água parece ser um solvente mais eficiente para a extração destes metabólitos da matriz foliar, com a média aqui obtida sendo cerca de 5 vezes superior (**Fig. 2**). No milho, valores próximos a 30 mg/g de biomassa foram observados para os extratos etanólicos dos grãos roxos de uma variedade mexicana (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009) e para os extratos acetona 70% de flores femininas de três genótipos da Sérvia (MAKSIMOSIĆ et al., 2005). Salienta-se que um teor de aproximadamente 80 mg de compostos fenólicos totais/g de biomassa ainda não havia sido relatado para *Zea mays*, pelo menos considerando a literatura consultada até o momento.

O teor de compostos fenólicos das folhas do milho se equipara ao chá verde (*Camelia sinensis* - 80 mg/g) e se mostra superior ao chá preto (~ 40 mg/g, BÜYÜKBALCI, NEHIR EL, 2008). Outro estudo apontou um teor de até 200 mg de compostos fenólicos totais/g de extrato aquoso, para o chá verde (PUNYASIRI et al., 2004), sendo neste caso, mais que duas vezes, o valor médio observado para as folhas de milho. Um estudo similar avaliou o extrato metanólico foliar de artemísia (*Artemisia herba*), indicando

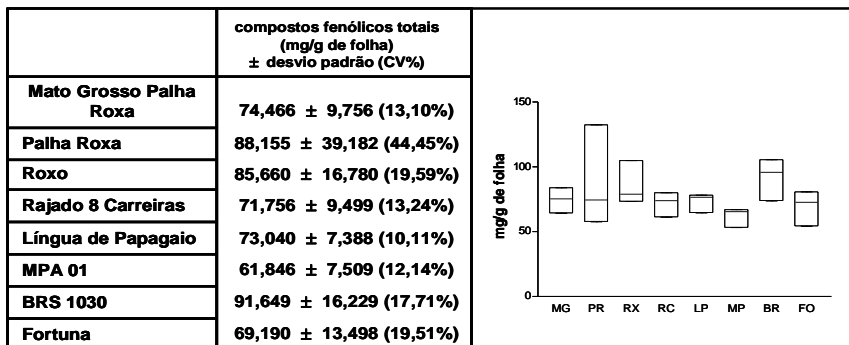


Figura 2: Concentração de compostos fenólicos totais (mg/g de folha) determinada através da reação de Folin-Ciocalteu, para o extrato aquoso das folhas das diferentes variedades de milho (n = 4 repetições).

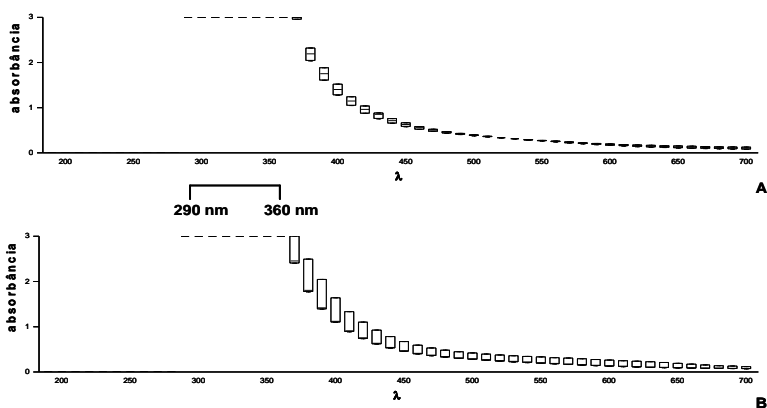


Figura 3: Perfil espectrofométrico de varredura ($\lambda = 200$ a 700 nm) do extrato aquoso das amostras comerciais de flores femininas de milho (n= 4 repetição).

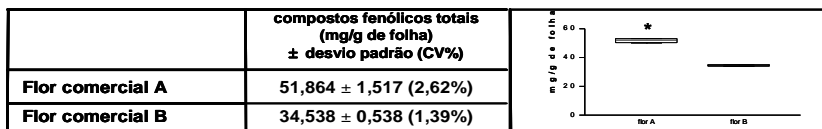


Figura 4: Concentração média de compostos fenólicos totais (mg/g de folha, Folin-Ciocalteu) do extrato aquoso de flores femininas de milho disponíveis comercialmente (n = 4 repetições).

um conteúdo de compostos fenólicos totais igual a $113,4 \pm 0,5$ mg/g de biomassa (SEO et al., 2003), i.e., 1,5 vezes superior ao observado para o chá das folhas de milho (**Fig. 2**). O teor observado para o chá das folhas das VCM foi superior aos valores relatados para os chás de tomilho (*Thymus vulgaris*), de sálvia (*Salvia officinalis*) e de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* - BÜYÜKBALCI, NEHIR EL, 2008).

Subsequentemente se procedeu à identificação dos compostos fenólicos do extrato aquoso das folhas do milho, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Um perfil cromatográfico revelando os principais compostos fenólicos identificados para o extrato aquoso foliar da variedade Palha Roxa (PR) é mostrado na **Figura 5**. A comparação com o tempo de retenção de compostos padrão permitiu a identificação dos seguintes picos: (1) quercetina, (2) ácido gálico, (3) ácido tânico, (4) ácido protocatecuíco, (5) ácido sinápico, (6) ácido clorogênico, (7) ácido hidróxi-benzóico, (8) ácido vanílico, (9) ácido siringico, (10) ácido caféico, (11) ácido cumárico, (12) ácido ferúlico e (13) ácido cinâmico. Chama atenção o elevado conteúdo de quercetina, de ácido gálico e de ácido clorogênico.

Estes ácidos fenólicos foram detectados pela CLAE em proporções distintas nos extratos aquosos foliares de todas as variedades em análise (**Fig. 6**). Os ácidos gálico, clorogênico e a quercetina figuraram como os compostos mais abundantes, correspondendo a cerca de 60% do conteúdo total. De modo interessante, dependendo do genótipo em questão, cada um destes compostos se mostrou como majoritário no extrato aquoso. As variedades RX, RC, LP, MP e FO, mostraram o ácido gálico em maior proporção, as variedades PR e BR, apresentaram o ácido clorogênico, enquanto a variedade MG mostrou a quercetina.

Os ácidos fenólicos detectados pela CLAE em maior proporção para o extrato MeOH 100% foram os mesmos, quercetina, ácido clorogênico e ácido gálico. Neste extrato também foi observada influência genotípica sobre o componente mais abundante. Mas apenas para a variedade MG, o mesmo composto (quercetina) se mostrou como o componente majoritário dos dois extratos.

Somando o conteúdo destes três compostos, àquele observado para o ácido tânico e para o ácido siringico, cerca de 75% dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso foliar são abrangidos (**Fig. 6**). Em termos médios, o ácido gálico foi detectado em maior proporção (23%), apresentando uma grande amplitude de variação, de 28% (FO) a 10% (BR). Já o ácido clorogênico e a

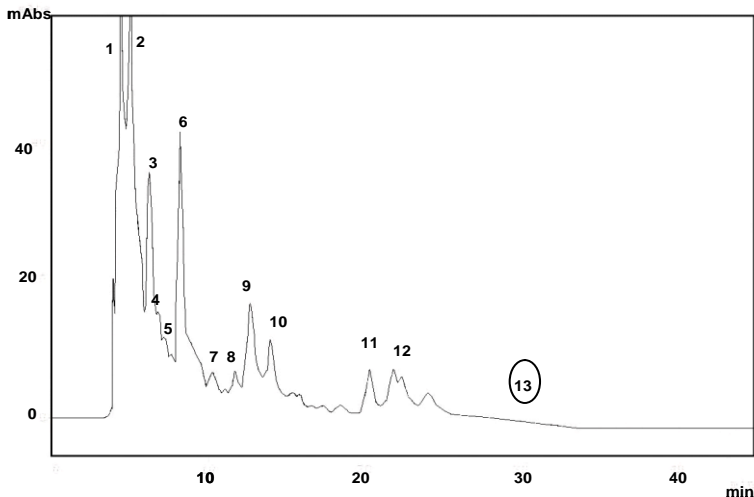


Figura 5: Perfil cromatográfico (CLAE) de ácidos fenólicos do extrato aquoso foliar da VCM Palha Roxa (PR). (1) quercetina, (2) ácido gálico, (3) ácido tânico, (4) ácido protocatecuico, (5) ácido sinápico, (6) ácido clorogênico, (7) ácido hidroxibenzoico, (8) ácido vanílico, (9) ácido siríngico, (10) ácido caféico, (11) ácido cumárico e (12) ácido ferúlico. O composto (13) não foi detectado neste espectro de PR em quantidades mensuráveis.

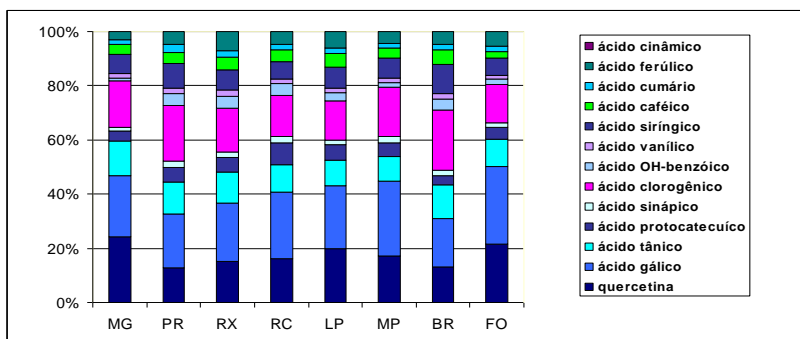


Figura 6: Proporção dos compostos fenólicos no tecido foliar, consoante às variedades de milho, determinada via CLAE.

quercetina representaram cada um, em média 17% dos compostos fenólicos, sendo que a variedade BR mostrou a maior proporção (22%), enquanto a variedade LP mostrou o menor valor (14%). Para a quercetina, MG se destacou pelo maior conteúdo (24%), enquanto a variedade PR apresentou a menor proporção (13%). O ácido tânico perfaz aproximadamente 11% dos extratos aquosos, variando entre o máximo observado para MG (13%) e o mínimo, para LP e MP (9%). Finalmente, o ácido siríngico representou \approx 8% dos compostos fenólicos, variando entre 10% para BR e 6% para as variedades RC e FO (**Fig. 6**).

O teor médio de ácido gálico foi igual a $1,832 \pm 0,275$ mg/g de folha, com as variedades FO e MP mostrando os maiores teores deste metabólito (**Fig. 7**). Nesta ANOVA ($F = 12,20$ e $R^2 = 0,859$), o quadrado médio (QM) para os tratamentos se mostrou igual a 0,226, maior que o QM para as repetições (0,024) e o QM residual (0,018). Para o ácido clorogênico, a média foi igual a $1,416 \pm 0,518$ mg/g, com BR (média = 2,349 mg/g) e PR (média = 1,939 mg/g) apresentando valores significativamente superiores. O QM para os tratamentos foi maior (0,803), que aquele observado para as diferentes repetições (0,016) e para o resíduo da análise (0,011). Apresentando F igual a 67,67 e R^2 igual a 0,971. Uma concentração média de quercetina igual a $1,388 \pm 0,402$ mg/g foi observada, com a variedade MG (2,259 mg/g) merecendo destaque. Esta análise ($F = 62,87$ e $R^2 = 0,969$) mostrou QM para as variedades igual 0,484, QM para as repetições igual a 0,029 e QM para o resíduo, de 0,007. O ácido tânico obteve média de $0,893 \pm 0,289$ mg/g, com diferenças significativas apenas para RC e LP (\approx 0,480 mg/g). Neste caso, o QM das variedades foi igual a 0,117, o QM das repetições igual a 0,017 e o QM residual igual a 0,016 ($F = 7.256$ e $R^2 = 0,592$). Para o ácido siríngico, uma média de $0,636 \pm 0,251$ mg/g foi observada, com BR (1,142 mg/g) mostrando os teores mais elevados. ANOVA ($F = 24,14$ e $R^2 = 0,923$) com QM para as variedades igual a 0,189, QM para as repetições igual a 0,021 e QM residual igual a 0,008 (**Fig. 7**).

Os compostos fenólicos identificados por CLAE como os principais componentes dos extratos aquosos foliares da maioria das variedades de milho aqui estudadas, *i.e.*, os ácidos gálico e clorogênico, já foram relatados anteriormente para este tecido (GUELDER et al., 1992; STAFFORD, 1998), bem como, a existência nas folhas de vários taninos condensados formados por unidades de ácido gálico (BARRIÈRE et al., 2008). A presença de quercetina, por outro lado, não havia sido anteriormente relatada

	MG	PR	RX	RC	LP	MP	BR	FO
quercetina	2,259 ± 0,014	1,210 ± 0,158	1,199 ± 0,032	0,933 ± 0,034	1,230 ± 0,011	1,248 ± 0,183	1,407 ± 0,149	1,615 ± 0,000
ácido gálico	2,117 ± 0,000	1,866 ± 0,238	1,710 ± 0,257	1,439 ± 0,149	1,460 ± 0,025	2,007 ± 0,026	1,911 ± 0,075	2,149 ± 0,039
ácido tânico	1,194 ± 0,030	1,125 ± 0,030	0,920 ± 0,185	0,586 ± 0,007	0,576 ± 0,004	0,674 ± 0,073	1,314 ± 0,066	0,757 ± 0,038
ácido protocatecuico	0,326 ± 0,055	0,506 ± 0,007	0,425 ± 0,019	0,470 ± 0,024	0,372 ± 0,002	0,362 ± 0,014	0,375 ± 0,067	0,340 ± 0,035
ácido sinápico	0,148 ± 0,030	0,196 ± 0,005	0,181 ± 0,017	0,137 ± 0,004	0,108 ± 0,005	0,165 ± 0,010	0,219 ± 0,024	0,104 ± 0,007
ácido clorogênico	1,590 ± 0,150	1,939 ± 0,060	1,281 ± 0,009	0,892 ± 0,051	0,885 ± 0,018	1,318 ± 0,161	2,349 ± 0,203	1,075 ± 0,051
ácido OH-benzóico	0,080 ± 0,091	0,414 ± 0,048	0,354 ± 0,069	0,249 ± 0,055	0,195 ± 0,018	0,126 ± 0,024	0,456 ± 0,112	0,159 ± 0,041
ácido vanílico	0,174 ± 0,023	0,190 ± 0,049	0,176 ± 0,051	0,114 ± 0,029	0,109 ± 0,012	0,129 ± 0,045	0,205 ± 0,079	0,101 ± 0,038
ácido síringico	0,643 ± 0,054	0,864 ± 0,089	0,579 ± 0,075	0,371 ± 0,067	0,480 ± 0,001	0,531 ± 0,099	1,142 ± 0,198	0,479 ± 0,078
ácido caféico	0,351 ± 0,027	0,390 ± 0,072	0,383 ± 0,107	0,248 ± 0,067	0,313 ± 0,047	0,271 ± 0,094	0,588 ± 0,236	0,177 ± 0,032
ácido cumárico	0,165 ± 0,054	0,285 ± 0,001	0,186 ± 0,059	0,126 ± 0,032	0,119 ± 0,001	0,123 ± 0,034	0,217 ± 0,052	0,131 ± 0,001
ácido ferúlico	0,280 ± 0,087	0,431 ± 0,029	0,567 ± 0,058	0,268 ± 0,082	0,387 ± 0,004	0,326 ± 0,118	0,489 ± 0,104	0,414 ± 0,003
ácido cinâmico	0,000 ± 0,000	0,008 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,009 ± 0,001	0,000 ± 0,000
total Σ	9,327	9,424	7,961	5,833	6,234	7,280	10,681	7,501

Figura 7: Concentração média e total dos ácidos fenólicos majoritários (mg/g de folha ± desvio padrão), determinada via análise cromatográfica (CLAE), do extrato aquoso foliar.

para o tecido foliar do milho. Todavia, também foi detectada como o componente majoritário da maioria dos extratos MeOH 100% foliares (exceção para RX e BR – **capítulo 2**). É mencionada como principal componente fenólico dos grãos roxos de uma variedade peruana, com média de 45 mg/g de farinha (PEDRESCHI, CISNEROS ZEVALLOS, 2007).

De forma similar ao observado para o extrato metanólico foliar, o somatório dos 13 compostos fenólicos identificados pela CLAE (**Fig. 7**) foi comparado aos resultados da quantificação através de Folin-Ciocalteu (**Fig. 2**). Os valores de concentração detectados pela reação colorimétrica foram sempre superiores ao observado pela CLAE, havendo uma correlação de 0,697 neste caso, entre as duas técnicas. Sugere-se que tais diferenças decorram da presença de metabólitos que interagem positivamente com o reativo de Folin-Ciocalteu e que não foram detectados pela CLAE. Alguns autores afirmam que a vitamina C pode reduzir (doar elétrons) o reativo acima mencionado, ocasionando a reação de cor, como se fosse um composto fenólico (SULTANA et al., 2007). Além disso, metabólitos como as antocianinas, que participam da quantificação dos compostos fenólicos totais através de Folin-Ciocalteu, não foram detectadas pela CLAE nas condições selecionadas para tal análise.

A absorvância em 530 nm das varreduras UV vis dos extratos aquosos foliares foram utilizadas para a quantificação das antocianinas, apresentando, todavia concentrações bem baixas, com média igual 0,006 mg/g de folha (dados não mostrados). Sendo, portanto refutada a hipótese anterior de que parte da discrepância observada entre a quantificação através de Folin-Ciocalteu (**Fig. 2**) e a quantificação através da CLAE (**Fig. 7**) decorresse de um teor relevante destes metabólitos. Talvez o extrato aquoso apresente outros metabólitos (e.g. vit. C) que são capazes de alterar a estrutura do reativo de Folin-Ciocalteu, causando a alteração de cor, mimetizando deste modo, a presença dos compostos fenólicos.

Aprofundando as informações associadas aos efeitos benéficos do extrato aquoso das folhas de milho, a atividade antioxidante destes extratos foi determinada através do ensaio de sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil), conforme metodologia adaptada de Kim et al. (2002). Os resultados obtidos indicaram uma inibição de aproximadamente 50% da oxidação do radical DPPH, após 30 minutos. Tais resultados apontaram capacidade antioxidante similar à observada para 0,160 mg de Trolox (análogo sintético da vitamina E). Não foram observadas

diferenças marcantes entre as variedades de milho quanto a esta variável em estudo, contudo, o genótipo MG mereceu certo destaque por seu efeito antioxidante ligeiramente superior às demais variedades (inibição de 66% - **Fig. 8**). As amostras comerciais de flores femininas apresentaram uma inibição da oxidação do DPPH ligeiramente inferior àquela observada para o tecido foliar, com média igual a 37%, similar a 0,120 mg de Trolox (**Fig. 9**).

A capacidade antioxidante de outros extratos foliares, que não àqueles aquosos também foi avaliada (dados não mostrados). Foi observado para algumas amostras do extrato MeOH 100% uma capacidade de inibição da oxidação do DPPH de aproximadamente 40%, inferior ao observado para o extrato aquoso (**Fig. 8**). Tal informação reforça a idéia de que análises sobre a atividade biológica das folhas do milho devam ser efetuadas no extrato aquoso.

Adicionalmente, amostras de suco de uva e do extrato aquoso obtido a partir da erva-mate mostraram capacidade de inibição da oxidação do radical DPPH de aproximadamente 70%, sendo neste caso superiores a média obtida para todas as variedades de milho, mas relativamente próximas ao valor obtido para o extrato aquoso das folhas da variedade MG (66%). Os extratos aquosos da erva mate e da uva são fontes reconhecidas de obtenção de compostos antioxidantes para a ingestão humana, principalmente, compostos fenólicos (LAPORNIK et al., 2005; VIEIRA et al., 2008).

O valor de 50% de inibição do DPPH observado para o extrato aquoso foliar de milho foi similar ao chá de tomilho e apenas inferior aos chás preto e verde de *Camelia sinensis* e ao chá de menta (BÜYÜKBALCI, NEHIR EL, 2008).

Não foi observada correlação satisfatória entre a atividade antioxidante dos extratos aquosos foliares e o teor de compostos fenólicos totais (dados não mostrados). No entanto, uma correlação interessante ($r = 0,725$) foi estabelecida entre a atividade antioxidante (ensaio DPPH – **Fig. 8**) e o teor de quercetina destes extratos (CLAE – **Fig. 7**). Talvez a quercetina seja o flavonóide detectado no extrato aquoso foliar com o maior número de hidroxilas (**Fig. 1A – capítulo 3**), atuando talvez como um agente antioxidante mais potente. Sabe-se que o extrato aquoso de *Ginkgo biloba*, espécie de reconhecido efeito benéfico sobre distúrbios circulatórios e cerebrais, é rico em derivados da quercetina (DUBBER et al., 2005).

Conforme já exposto, os perfis espectrofotométricos dos chás das folhas de milho mostraram a presença majoritária de metabólitos que absorvem luz entre 290 e 430 nm, janela típica dos

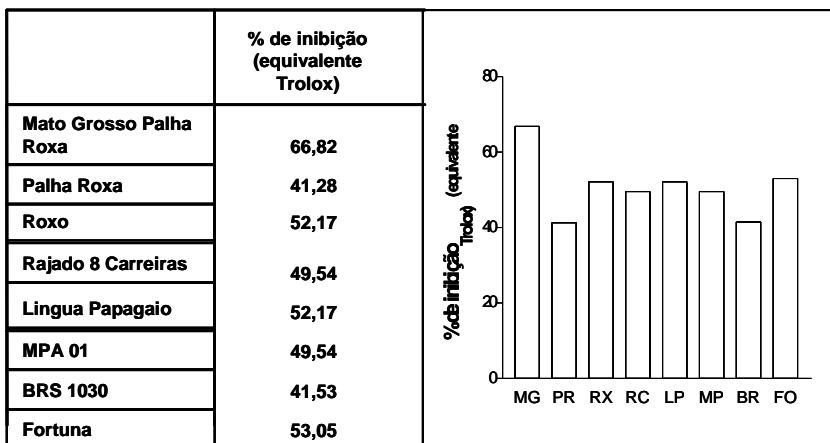


Figura 8: Porcentagem de inibição (equivalente Trolox) da oxidação do radical DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato aquoso das folhas das variedades de milho.

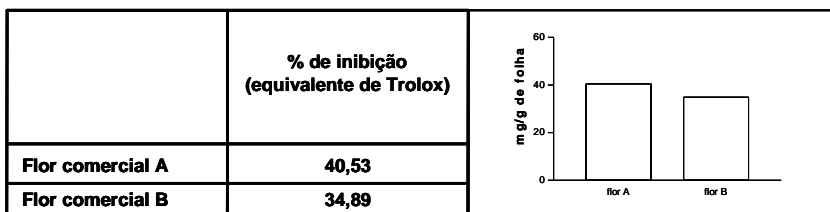


Figura 9: Porcentagem de inibição (equivalente Trolox) da oxidação do radical DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) obtida para o extrato aquoso das amostras comerciais de flores femininas de milho.

compostos fenólicos. Todavia, outros compostos, tais como as proteínas, também absorvem luz entre 190 e 380 nm (LAMBERT et al., 2001). Em função disto, a concentração de proteínas totais nos extratos aquosos foliares foi determinada através do método de Bradford (1976 - **Fig. 10**). Todas as variedades de milho apresentaram um teor relativamente elevado de proteínas totais, em média 363,03 µg/g de folha, para um intervalo de 292 µg/g de folha (variedade PR) e 463 µg/g de folha (variedade RX - **Fig. 10**). Não foram detectadas diferenças significativas de conteúdos de proteínas solúveis no chá das folhas para as variedades de milho em estudo ($F = 1,261$ e $r^2 = 0,558$).

A concentração de proteínas totais também foi determinada para o extrato aquoso obtido a partir das amostras comerciais de flores femininas de milho, obtendo-se 27 µg de proteínas totais/g e 74 µg de proteínas totais/g, respectivamente para as amostras (A) e (B) (dados não mostrados). As amostras de flores apresentaram um teor bastante inferior de proteínas em solução, comparativamente ao observado para o tecido foliar (**Fig. 10**).

O teor de proteínas solúveis nas folhas pode parecer interessante, mas ainda assim, é bastante inferior ao teor de compostos fenólicos existente nesta biomassa. Sendo assim, a hipótese de que a presença de proteínas ou peptídeos que reajam positivamente com o Folin-Ciocalteu, não pode ser utilizada para justificar a diferença observada entre os resultados desta técnica (**Fig. 2**) e da CLAE (**Fig. 7**). De modo similar, a absorbância elevada na região entre 290 e 430 nm (**Fig 1**), deve estar mesmo associada a presença de compostos fenólicos nestes extratos.

Um estudo efetuado no Quênia com a participação de agricultores familiares propõe o aproveitamento das folhas do milho para enriquecimento da ração de gado bovino leiteiro, principalmente em função do elevado teor de proteínas sugerido para esta biomassa (KIRUIRO et al., 2001).

Considerando esta informação, experimentos adicionais foram realizados utilizando tampão fosfato salino como solução extratora. Esta condição físico-química é mais próxima à saliva e deve auxiliar na extração das proteínas da matriz foliar, no caso da alimentação do gado. A análise visual dos perfis UV-vis dos extratos tampão fosfato salino foliares (**Fig. 11 A**) revelou semelhança com aqueles oriundos dos extratos aquosos foliares (**Fig. 1**), com absorbâncias elevadas na região compreendida entre 290 e 380 nm. E a determinação do conteúdo de proteínas totais no extrato tampão fosfato salino mostrou um teor médio de 577,567 µg/g de folha

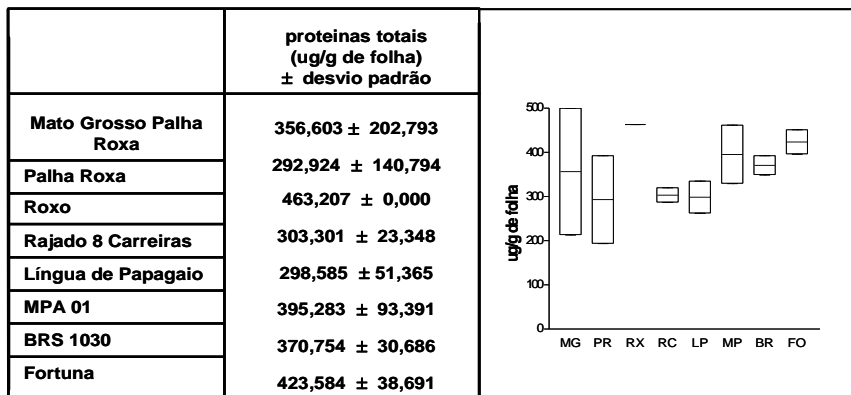


Figura 10: Concentração média de proteínas totais ($\mu\text{g/g}$ de folha) obtida para o extrato aquoso das folhas das variedades de milho.

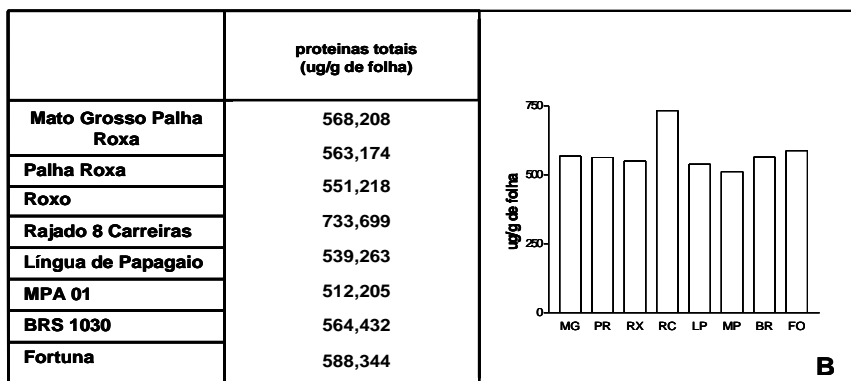
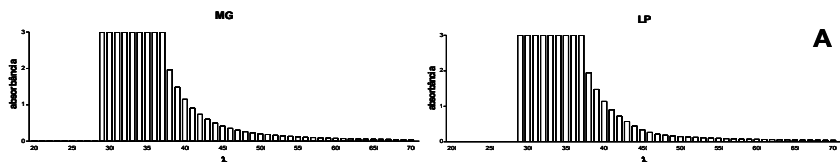


Figura 11: Em (A), perfis espectrofotométricos de varredura (200 a 700 ηm) do extrato foliar em tampão fosfato salino, variedades Mato Grosso Palha Roxa (MG) e Língua de Papagaio (LP). Em (B), concentração média de proteínas totais ($\mu\text{g/g}$ de folha) no extrato tampão fosfato salino.

(**Fig. 11B**). Sendo 1,5 vezes superior a média obtida para o extrato aquoso foliar, indicando que a adição de sais à solução extratora parece realmente ter efeito positivo sobre a extração das proteínas da matriz foliar. A variedade RC apresentou um conteúdo protéico 1,3 vezes superior ao teor médio das demais variedades, sugerindo um valor nutricional diferenciado para o seu tecido foliar.

Também foram efetuadas extrações das folhas utilizando diferentes proporções de etanol: água e os perfis UV-vis indicaram que todas as proporções foram eficientes na obtenção de compostos fenólicos, principalmente aqueles que absorvem luz entre 290 e 380 nm (**Fig. 12**), como os derivados do ácido benzóico e cinâmico. Diferenças entre as soluções hidroalcolicas se tornaram mais evidentes a partir de 390 nm, com o aumento na proporção de etanol melhorando a extração de antocianinas (530 nm) e também de carotenóides (410 a 470 nm) e clorofilas (640 a 680 nm).

Aparentemente as maiores diferenças entre os perfis UV-vis estão associadas à proporção de água ou etanol utilizada, não a variedade de milho em questão. Já que não foram observadas diferenças marcantes entre as variedades analisadas (**Fig 12**), apesar da seleção de fenótipos de coloração distintos, MPA com grãos de pericarpo incolor e endosperma sem pigmentação antociânica, Roxo com grãos de pericarpo pigmentado e Língua de Papagaio com grãos de endosperma com pigmentação antociânica.

Alíquotas dos extratos hidroalcolicos foram analisadas quanto ao conteúdo de fenóis totais (**Fig 13**) e o aumento na proporção de etanol na solução extratora acarretou em uma diminuição significativa no teor de compostos fenólicos detectados através da reação colorimétrica. Por exemplo, os extratos obtidos com o uso de solução etanol: água (30:70) apresentaram média de $32,548 \pm 7,114$ mg/g, enquanto os extratos etanol: água (90:10) apresentaram valor médio de $16,117 \pm 3,713$ mg/g (**Fig. 13**). Vale observar que os perfis UV-vis (**Fig 12**) indicaram um aumento na absorbância na região característica dos flavonóis (380 a 410 nm) e na região das antocianinas (530 nm), conforme a concentração de etanol no sistema de solventes foi sendo elevada. Todavia, apesar deste aumento na eficiência de extração de algumas classes de compostos fenólicos, não foi observado acréscimo no teor detectado através de Folin-Ciocalteu, muito pelo contrário (**Fig. 13**). Sendo novamente sugerido que o aumento no teor de compostos apolares nos extratos, como os carotenóides e as clorofilas, em função do acréscimo de etanol (**Fig. 12**), dificulte a interação do reativo com as hidroxilas dos compostos fenólicos existentes nas amostras.

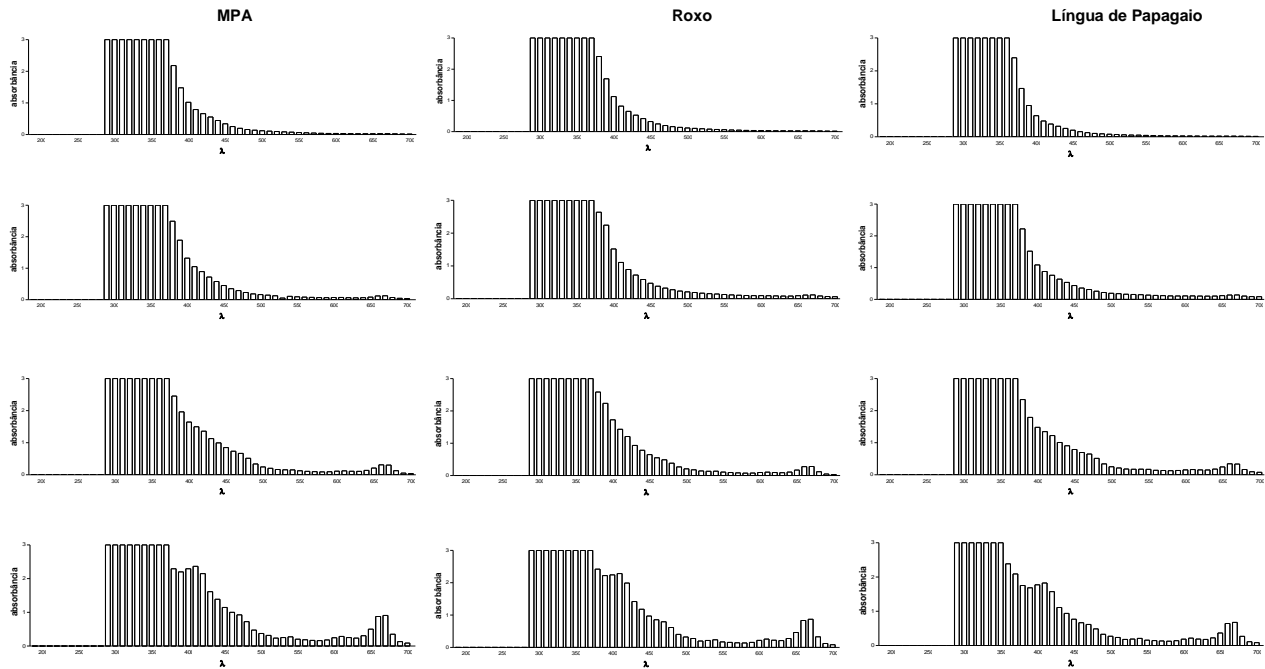


Figura 12: Perfil espectrofométrico de varredura ($\lambda = 200$ a 700 nm) dos extratos hidroalcolicos do tecido foliar das variedades crioulas de milho MPA, Roxo e Língua de Papagaio. Foram empregadas distintas proporções de etanol: água, a saber, do ápice para a base da figura: EtOH(30): água(70), EtOH(50): água(50), EtOH(70): água(30) e EtOH(90): água(10).

Ressalta-se que o teor de compostos fenólicos observado para os extratos hidroalcolicos foliares foi sempre inferior ao observado com o emprego de água e calor, reforçando o interesse no chá preparado com as folhas de milho.

Já o conteúdo de antocianinas se mostrou positivamente influenciado pelo aumento na concentração de etanol na solução extratora (**Fig. 14**). Com o uso de etanol: água (30:70) resultando em teores médios de $0,010 \pm 0,002$ mg de antocianinas/g de folha, enquanto que para os extratos etanol: água (90:10) foi observado um conteúdo médio superior em três ordens de magnitude, $0,030 \pm 0,004$ mg/g. Esta informação corrobora o anteriormente observado, já que os extratos aquosos apresentaram concentração média de antocianinas igual a $0,006$ mg/g de folha (dados não mostrados), inferior ao observado com o uso de metanol acidificado (MeOH-HCl 1% - $0,145 \pm 0,019$ mg/g de folha, **capítulo 3**).

	compostos fenólicos totais (mg/g de folha) ± desvio padrão
etanol:água (30:70)	32,548 ± 7,114
etanol:água (50:50)	35,306 ± 7,306
etanol:água (70:30)	30,004 ± 5,036
etanol:água (90:10)	16,117 ± 3,713

Figura 13: Concentração média de compostos fenólicos totais (mg/g de folha - Folin-Ciocalteau) dos extratos hidroalcolicos das folhas. Os valores se referem a média observada para as três variedades avaliadas MPA, Roxo e Língua de Papagaio.

	antocianinas totais (mg/g de folha) ± desvio padrão
etanol:água (30:70)	0,010 ± 0,002
etanol:água (50:50)	0,017 ± 0,008
etanol:água (70:30)	0,021 ± 0,003
etanol:água (90:10)	0,030 ± 0,004

Figura 14: Concentração média de antocianinas (mg/g de folha) dos extratos hidroalcolicos das folhas. Os valores se referem a média observada para as as três variedades avaliadas MPA, Roxo e Língua de Papagaio.

CONCLUSÕES

Um conteúdo considerado elevado de compostos fenólicos totais foi observado para os extratos aquosos das folhas das VCM, com teor médio de 77 mg/g. Sendo similar àquele observado para o chá verde de *Camelia sinensis* e para o chá de menta (*Mentha piperita*). Além disso, mostrou ser quase 2 vezes superior àquele obtido com o emprego de metanol ou de etanol, como solvente. As análises efetuadas nas amostras comerciais de flores femininas de milho, biomassas reconhecidamente utilizadas para fins medicinais, mostraram um conteúdo de compostos fenólicos totais inferior àquele observado para os extratos aquosos foliares.

Os resultados da CLAE indicaram o ácido gálico, o ácido clorogênico e a quercetina, como os principais compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de milho, respondendo por quase 60% do conteúdo total. Aparentemente, o derivado fenólico mais abundante nestes extratos sofre influencia genotípica, com RX, RC, LP, MP e FO mostrando o ácido gálico em maior proporção, PR e BR, o ácido clorogênico e a variedade MG, a quercetina.

Chama atenção a diferença observada entre os resultados da quantificação através de Folin-Ciocalteu e a quantificação através da CLAE, com a primeira técnica indicando um conteúdo 10 vezes superior, comparativamente a segunda. Foi sugerido que esta observação possa estar relacionada à presença nos extratos aquosos de metabólitos que interagem positivamente com o reativo de Folin-Ciocalteu (e.g. vitamina C) que não foram determinados pela CLAE.

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos aquosos (ensaio DPPH) indicou uma inibição média de 50% para as folhas de milho, ligeiramente inferior ao observado para o chá verde e para o chá preto de *Camelia sinensis* e também, para o chá de menta. A inibição da oxidação exercida pelo extrato aquoso da variedade Mato Grosso Palha Roxa (MG) se mostrou similar àquela exercida pelo suco de uva e também pelo extrato aquoso da erva-mate.

Salienta-se que a atividade antioxidante dos extratos aquosos foliares não apresentou uma correlação satisfatória com o conteúdo de compostos fenólicos totais, apesar de ser extensivamente relatada pela literatura esta correlação, principalmente para chás com efeito benéfico sobre a saúde humana. Todavia, a atividade antioxidante dos chás das folhas de milho mostrou uma correlação interessante ($r = 0,725$), com o conteúdo de quercetina detectado nestes chás. Vale ressaltar que a presença de quercetina já foi

associada aos efeitos benéficos que o chá de *Ginkgo biloba* apresenta sobre distúrbios circulatórios e cerebrais.

Incongruências entre as informações geradas pela varredura UV-vis e pela reação de Folin-Ciocalteu foram observadas para os extratos hidroetanólicos foliares, de modo similar ao relatado para os extratos metanólicos (**capítulos 2 e 3**). A adição de etanol parece ocasionar uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos detectada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocateu. Intrigante considerando as informações dos perfis UV-vis, pois o uso do etanol levou a uma melhoria na retirada dos flavonóides da matriz foliar. Sugere-se que neste caso, o aumento da concentração de compostos apolares, como carotenóides e clorofilas, atrapalhe a interação do reativo com as hidroxilas dos compostos fenólicos em suspensão.

O conjunto de resultados obtido para o chá das folhas do milho indica um elevado conteúdo de compostos fenólicos totais, principalmente, ácido gálico, ácido clorogênico e quercetina e uma atividade antioxidante relevante.

Um teor proeminente de compostos fenólicos nas folhas do milho interessa agronomicamente, pela relação direta existente entre este conteúdo e a resistência da planta do milho à ocorrência de pragas e doenças, conforme exposto anteriormente. Não interessa, todavia, apenas agronomicamente, pois, conforme mencionado, o efeito benéfico sobre a saúde humana de alguns chás se relaciona diretamente a um conteúdo elevado de compostos fenólicos.

Sendo assim, é sugerido que o chá das folhas de milho possua efeito benéfico sobre a saúde humana. Sendo obviamente necessária uma caracterização muito mais aprofundada deste extrato aquoso, com a continuidade da pesquisa sobre o tecido foliar de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALICK, M.J.; COX, P.A. **Plants, people and culture: The science of ethnobotany**. Scientific American Library, New York, 208p. (1997).

BARRIÈRE, Y.; THOMAS, J.; DENOUE, D. QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 X F286. **Plant Science**, 175 (4): 585-595 (2008).

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**, 72: 248-254 (1976).

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA. **Corn Silk**, British Herbal Medicine Association, 64p. (1996).

BUENZ, E. J.; SCHNEPPLE, D. J.; BAUER, B. A.; ELKIN, P. L.; RIDDLE, J. M.; MOTLEY, T. J. Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, 25, 494-498. 2004.

BÜYÜKBALCI, A.; NEHIR EL, S. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. **Plant Foods for Human Nutrition**, 63: 27-33 (2008).

DEL POZO-INSFRAN, 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**, 39: 696–703 (2006).

DUBBER, M.J.; SEWRAM,V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G.S.; KANFER, I. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37: 723–731 (2005).

FOSSSEN, T.; SLIMESTAD, R.; ANDERSEN, O. M. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canary grass (*Phalaris arundinaceae*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49: 2318-2331 (2001).

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**, 40: 1211-1213 (1992).

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, 27: 1–93 (2006).

HICHEM, H.; MOUNIR, D.; NACEUR, E.A. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. **Industrial Crops and Products**, 30: 144–151 (2009).

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology** 172: 149–156 (2002).

KIRUIRO, E.M.; KIHANDA, F.; OKURO, J.O. Maize leaves as fodder: the potentials for enhancing feed availability on smallholder farms in Kenia. **Seventh Eastern and Southern Africa Regional Maize Conference**, 457-462 (2001).

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.)**. Tese em Recursos Genéticos Vegetais. CCA. UFSC (2007).

LAMBERT, J. B.; SHURVEL, H. F.; LIGHTNER, D. A.; COOKS, R. G. **Organic structural spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568p. (2001).

LAPORNIK, B.; PROŠEC, M.; WONDRÁ, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, 71: 214 – 222 (2005).

LOPEZ-MARTINEZ, L.X; OLIART-ROS, R.M.; VALERIO-ALFARO, G.; LEE, C.; PARKIN, K.L.; GARCIA, H.S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **LWT - Food Science and Technology**, 42 1187–1192 (2009).

MADHAVI, D.L.; JUTHANGKON, S.; LEWEN, K.; BERBER-JIMENEZ, M.D.; SMITH, M.A.L. Characterization of anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa Cell cultures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 44: 1170-1176 (1996).

MAKSIMOVIĆ, Z.; MALENCIĆ, D. AND KOVAČEVIĆ, N., Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**, 96, 873–877 (2005).

MORALES, R., **Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica**. In: Monografías del Jardín Botánico. Ed Córdoba, 3, 93-98 (1996).

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

PUNYASIRI, P. A. N.; ABEYSINGHEA, I. S. B.; KUMARB, V.; TREUTTERC, D.; DUYD, D.; GOSCHD, C.; MARTENSE, S.; FORKMANN, G.; FISCHERD, T. C. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 431: 22–30 (2004).

RANDHIR, R; PREETHI, S; KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 37: 1247-1256 (2002).

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, 20: 222-232 (2002).

RODRIGUES-CASO, C.; RODRÍGUEZ AGUDO, D.; SÁNCHEZ JIMÉNEZ, F.; MEDINA, M. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60, 1760–1763 (2003).

SAVITRI KUMAR, N.; MADUWANATHA B. WIJEKOON, W.M.A.; KUMAR, V.; NIMAL PUNYASIRI, P.A.; SARATH B. ABEYSINGHE, I. Separation of proanthocyanidins isolated from tea leaves using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4295–4302.

SEO, H.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; OH, M.; KIM, H.; KIM, J.; NAGATA, T. Extraction and identification of antioxidant components from *Artemisia capillaris* herba. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58: 1–12 (2003).

STAFFORD, H.A. Teosinte to maize - Some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoids pathways. **Phytochemistry**, 49: 285-293 (1998).

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, 104: 997–1005 (2007).

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, 812: 85–99 (2004).

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**, 12: 363–369 (2005).

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; DE SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2) 4637-4642 (2008).

WRIGHT, C. I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C. I.; KONING, M. M. G. Herbal medicine as diuretics: A review of the scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 114:1-31 (2007).

CONCLUSÕES FINAIS

A perda de genótipos tradicionais de milho, como as variedades crioulas resgatadas no município de Anchieta-SC e aqui analisadas, não pode acontecer. Principalmente porque tais variedades fazem parte do legado cultural dos agricultores familiares que as cultivam. E tal perda criaria uma lacuna irreparável no conhecimento e nas tradições destas pessoas.

O cultivo do milho remonta há pelo menos 7000 anos, tendo sua origem e domesticação ocorrido na América Latina, portanto, em nosso continente. Muitos autores sugerem que a expansão humana nas Américas só foi possível em função do conhecimento e da prática de cultivo do milho pelos nossos ancestrais. O milho ocuparia para tais habitantes, o mesmo papel chave que o trigo ocupou para o desenvolvimento da civilização ocidental e o arroz, para o desenvolvimento das civilizações orientais. Sugere-se que os indígenas habitantes do Brasil já conheciam o milho há pelo menos 1500 anos antes da chegada dos colonizadores europeus. Com tais variedades locais brasileiras cultivadas pelos povos indígenas do ramo Tupi-Guarani formando, provavelmente, a base genética das variedades crioulas de milho aqui analisadas. Sendo assim, tais variedades de milho e o conhecimento relacionado ao seu cultivo e manejo podem remontar há milhares de anos de cultura humana, cuja perpetuação no presente e a transmissão para as futuras gerações vêm sendo assegurada pelas iniciativas de agricultores familiares brasileiros, no Extremo-Oeste de Santa Catarina.

Surpreende que tais variedades crioulas de milho ainda continuem sendo cultivadas pelos agricultores familiares na atualidade. Seus grãos não são utilizados na confecção de rações, nem alimentam os animais das grandes granjas. Fato que decorre principalmente do fenótipo não usual de coloração de seus grãos, o que também impede a comercialização para o setor industrial alimentício humano. Tais milhos não são comprados por serem diferentes das variedades de grão amarelo, consideradas normais. E a falta de rentabilidade econômica destas variedades tradicionais leva muitas vezes ao desestímulo do agricultor familiar, que acaba abandonando o seu cultivo, substituindo-as por variedades sintéticas de milho (melhoradas, híbridas ou transgênicas), por serem comercialmente aceitas.

A perda dos genótipos crioulos não poderia acontecer, porém, infelizmente, no decorrer dos quatro anos de duração desta pesquisa, a obtenção de sementes de algumas das VCM aqui analisadas, como Mato Grosso Palha Roxa (extrato aquoso foliar

com atividade antioxidante proeminente) e Palha Roxa (extrato hexano: acetona rico em luteína e β -caroteno) se tornou bastante difícil. Os agricultores familiares que até então as conservavam *in situ*, pararam de cultivá-las neste período. Não sendo mais cultivadas e não existindo em algum banco de conservação de germoplasma, tais variedades serão um legado permanentemente perdido.

Acredita-se, todavia, que este quadro possa ser mudado e que o risco iminente de perda de tais genótipos de milho deva ser evitado. Esta tese de doutoramento se insere dentro da parceria estabelecida entre a UFSC e as organizações que representam os agricultores familiares de Anchieta-SC. Esta parceria surgiu em busca de soluções que auxiliem na preservação destes genótipos de milho crioulo e no fortalecimento da agricultura familiar da região. A idéia central deste projeto foi a aplicação de um conjunto de técnicas analíticas para obtenção do quadro metabólico parcial do tecido foliar destas VCM e também de duas variedades comerciais. Visando ampliar o conhecimento sobre a bioquímica do tecido foliar do milho, auxiliando em uma melhor caracterização deste germoplasma e também, buscando novas formas de aproveitamento desta biomassa, desejando ampliar o leque de possibilidades comerciais dos agricultores familiares da região Extremo-Oeste de Santa Catarina. É proposto que se os agricultores familiares tiverem um maior número de possibilidades economicamente rentáveis para o uso destas variedades crioulas de milho, continuarão cultivando-as e deste modo, garantirão sua preservação para as futuras gerações.

Duas categorias principais de métodos podem ser empregadas para a valorização da atividade agrícola familiar, os métodos não-comerciais e os comerciais (BRUSH, 2001).

Os métodos não-comerciais incluem o desenvolvimento de novas variedades através de melhoramento participativo, ações de educação, conscientização ambiental e de pesquisa básica. Ações desta natureza vêm sendo estabelecidas pela parceria entre o Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio), CCA-UFSC e as organizações representativas dos agricultores familiares de Anchieta-SC. Como o melhoramento participativo de variedades crioulas, entre elas, MPA 01 que já sofreu alguns ciclos de seleção visando o aprimoramento de características agrônomicas selecionadas pelos agricultores familiares. Bem como, ações em práticas de cultivo orgânico e agroecológico.

Os métodos comerciais (BRUSH, 2001) apontam para a produção e comercialização de produtos orgânicos, agroecológicos

e vinculados ao território. Também propõe o cultivo de variedades diferenciadas que apresentam maior valor nutricional ou efeito benéfico sobre a saúde humana, ao invés das *commodities* convencionais, visando assim, um retorno econômico mais substancial para os pequenos agricultores. Em consonância a este quadro, iniciativas voltadas para a comercialização de produtos derivados dos grãos destas VCM, como farinhas, biscoitos, pães e bolos vem sendo estabelecidas em Anchieta-SC, com a aquisição de um novo moinho financiada pelo governo brasileiro. Além disso, o reconhecimento da relação profunda existente entre estes produtos derivados das VCM e as características do território em que são cultivadas, deverá ser buscado através da certificação de origem geográfica ou de procedência garantida para estes produtos derivados do milho crioulo, por estes agricultores familiares. O estabelecimento do perfil metabolômico foliar se insere neste contexto permitindo uma melhor caracterização deste germoplasma, auxiliando no processo de melhoramento participativo e viabilizando novas alternativas para o uso destas variedades.

Três hipóteses foram levantadas na época da construção do projeto e testadas ao longo dos últimos quatro anos, sendo elas:

Hipótese 1: de que as variedades crioulas de milho apresentam distinção entre seus perfis metabolômicos do tecido foliar;

Hipótese 2: de que as folhas das variedades crioulas apresentam um perfil mais interessante de metabólitos, qualitativamente e/ou quantitativamente, em comparação ao tecido foliar das variedades comerciais de milho;

Hipótese 3: de que os extratos foliares das variedades crioulas são ricos em compostos fenólicos e carotenóides e apresentam atividade benéfica relacionada ao tratamento do câncer.

A primeira hipótese se baseava na premissa de que a aparente diversidade genética apresentada por estas variedades de milho, inferida em função da presença de fenótipos morfológicos bem distintos, possa estar relacionada a uma elevada diversidade química presente no seu tecido foliar. A hipótese 1 se mostrou verdadeira, já que os resultados obtidos indicaram claramente que os genótipos de milho possuem uma composição química bastante distinta e singular nas suas folhas. Distinta o suficiente para que as

folhas das variedades Roxo e MPA 01, por exemplo, possam ser discriminadas com facilidade, apenas considerando a sua composição química. Singulares, pois parecem claramente apontar para uma relação direta entre o perfil de metabólitos e a identidade genética destas variedades.

Os resultados da caracterização dos carotenóides (**capítulo 1**) indicaram que as maiores diferenças entre o tecido foliar das variedades de milho parecem ser de ordem quantitativa. As variedades crioulas Língua de Papagaio (LP), Rajado 8 Carreiras (RC) e Palha Roxa (PR) se destacaram como possuidoras de teores mais elevados de carotenóides, LP e PR com concentração elevada de luteína e de β -caroteno e RC, com teor mais elevado de luteína.

Já o conjunto de resultados obtido para a caracterização dos compostos fenólicos derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, presentes nas folhas do milho (**capítulo 2**), apontou um teor mais elevado e/ou composição mais interessante para as variedades crioulas Palha Roxa (PR), Roxo (RX), Rajado 8 Carreiras (RC) e Língua de Papagaio (LP). Adicionalmente, a existência de sinais m/z específicos para a maioria dos genótipos analisados, reforça a idéia da singularidade na composição química do tecido foliar. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicou a quercetina como o composto proporcionalmente mais abundante para a maioria das variedades (exceto para RX e BR). As variedades RX e BR mostraram o ácido clorogênico como ácido fenólico mais abundante.

A análise dos flavonóides existentes no tecido foliar (**capítulo 3**) também apontou diferenças significativas na composição química das folhas das variedades de milho. Com variedades como Roxo (RX), Fortuna (FO) e BRS 1030 (BR) mostrando uma concentração superior de compostos fenólicos totais em relação às variedades crioulas. No que concerne às antocianinas, os genótipos Fortuna (FO) e MPA 01 (MP) mostraram teores significativamente superiores aos demais.

O conjunto de dados obtido não foi suficiente para elucidar a origem biossintética das antocianinas do tecido foliar de milho, i.e., se derivadas dos flavan-3,4-dióis, ou dos flavan-4-óis, pois a presença das duas formas de antocianinas foi detectada na maioria dos genótipos. Além disto, foi observada grande diversidade entre as variedades de milho aqui estudadas com relação à composição das antocianinas presentes nas folhas, não tendo sido identificada uma antocianina predominante às amostras crioulas, por exemplo.

A relação entre a composição química das folhas e a cor dos grãos dos genótipos em análise é sugerida, uma vez que genótipos de grãos amarelos (e.g., BR e RC) apresentaram maior número de

intermediários da via de síntese dos flavonóides e um maior número de derivados da apigenidina e luteolinidina, comparativamente às variedades com pigmentação antociânica de grãos e folhas (LP, RX, MG e PR, por exemplo), onde estes intermediários talvez sejam rapidamente convertidos nos produtos biossintéticos finais, como as antocianinas, pelargonidina e cianidina.

Adicionalmente, chama atenção a possibilidade de se elegerem variedades de milho possuidoras de alto teor de compostos fenólicos em seus grãos, ao se empregar a análise destes metabólitos no extrato metanólico do tecido foliar deste vegetal (alta correlação, $r = 0,98$).

No que tange aos compostos fenólicos, a CLAE demonstrou serem os ácidos gálico, clorogênico e a quercetina os compostos majoritários dos extratos aquosos foliares, correspondendo a ca. 60% do conteúdo total destes metabólitos. Esta característica também se mostrou genótipo dependente, com o ácido gálico sendo detectado em concentrações superiores nas variedades RX, RC, LP, MP e FO, enquanto PR e BR se destacaram pelo conteúdo de ácido clorogênico e MG, pelo teor de quercetina. Como proposta de continuidade dos estudos, sugere-se a aplicação de métodos quimiométricos que permitam identificar, por exemplo, de que VCM determinada folha se originou, sem a necessidade de conhecimento prévio de sua origem.

A segunda hipótese formulada no projeto de tese considerou que as VCM apresentam um teor mais elevado de certos metabólitos e/ou uma composição mais interessante em seus tecidos foliares, comparativamente às variedades comerciais analisadas. Neste contexto, diferenças relevantes de conteúdos médios e de composição de carotenóides, compostos fenólicos e antocianinas entre as VCM e as variedades testemunha não foram detectadas. Assim, ressalta-se que as VCM se caracterizam como fonte de metabólitos secundários de interesse à saúde humana de forma similar às variedades comerciais analisadas no presente estudo.

Finalmente, a terceira hipótese considerou que a partir das folhas das variedades crioulas poderão ser obtidos extratos ricos em compostos fenólicos e carotenóides e que tais extratos apresentam atividade pró-apoptótica e/ou antiproliferativa sobre células tumorais *in vitro*.

Considerando a obtenção de extratos ricos em carotenóides se propõe que as folhas de todas as variedades de milho aqui analisadas podem ser aproveitadas para obtenção de extratos ricos, com as variedades crioulas Língua de Papagaio (LP) e Palha Roxa

(PR) mostrando destaque em função de teores elevados de luteína e de β -caroteno. Se o tecido foliar de milho apresentar rendimento em mg/g de biomassa, similar ao observado neste estudo, é possível competir com biomassas como a calêndula e a cenoura, fontes usuais destes compostos para indústria. Poderão, portanto, ser obtidos extratos ricos em carotenóides totais ou semi-purificados, dependendo do genótipo de milho considerado, a partir da biomassa foliar.

A luteína vem sendo recomendada clinicamente com sucesso para o tratamento e a profilaxia do câncer, bem como na prevenção da catarata e da degeneração macular associadas ao envelhecimento. Extratos ricos em carotenóides obtidos a partir da biomassa foliar da variedade MP mostraram atividade inibitória sobre a formação de novos vasos em ensaios realizados *in ovo* (FERIGO et al., 2008). Sendo que a inibição da neo-vascularização pode auxiliar no tratamento de processos tumorais ainda em seu início.

No que se refere ao emprego do β -caroteno, há uma busca em escala mundial por fontes alimentares e não alimentares ricas em compostos pró-vitamina A. Já que uma fatia significativa da população mundial apresenta deficiência nutricional desta vitamina, principalmente crianças nos países da América Latina e do Caribe. Rodriguez-Amaya et al (2008) apontaram o papel estratégico que os recursos genéticos vegetais brasileiros possuem como fontes em potencial de carotenóides para a alimentação humana e para o aproveitamento industrial. As folhas do milho poderiam enriquecer naturalmente o conteúdo de carotenóides da farinha dos grãos de milho. Sugere-se que tal “multi-mistura” seria útil enriquecendo a merenda escolar brasileira, ou a alimentação dos idosos, por exemplo.

Os resultados obtidos apontaram para a presença de um teor elevado de compostos fenólicos nas folhas destas variedades de milho, sendo similar, no caso do extrato aquoso, àquele observado para o chá verde de *Camelia sinensis* e para o chá de menta (*Mentha piperita*). De acordo com esta informação se sugere que as folhas do milho poderiam ser avaliadas visando à confecção de um chá medicinal, de modo similar ao que já acontece com suas flores femininas, cuja infusão é prescrita para o tratamento de processos tumorais localizados no trato urogenital, segundo informações da medicina tradicional obtidas em levantamentos etnofarmacológicos. Além disso, tais extratos aquosos ricos em compostos fenólicos podem interessar aos setores industriais da alimentação e

farmacêutico, visando à obtenção de antioxidantes e anti-inflamatórios naturais.

Adicionalmente, a atividade antioxidante dos extratos aquosos do tecido foliar do milho foi avaliada através do ensaio DPPH, indicando uma inibição média de 50%, ligeiramente inferior ao observado para os chás verde e preto de *Camelia sinensis* e também, para o chá de menta. A inibição da oxidação exercida pelo extrato aquoso foliar da variedade MG se mostrou similar ao observado para o suco de uva e para o extrato aquoso da erva-mate. A atividade antioxidante do extrato aquoso foliar de milho se correlacionou ($r = 0,725$) em alguma extensão ao teor de quercetina presente nestes extratos.

A execução deste projeto de tese gerou um volume significativo de conhecimento científico novo sobre estas variedades de milho, aprofundando o conhecimento sobre as suas singularidades metabólicas e contribuindo para uma caracterização mais detalhada deste germoplasma. Complementando os resultados previamente obtidos no LMBV, concernentes à análise do perfil metabólico de grãos e flores femininas de 26 variedades de milho (KUHNNEN, 2007). Reforçando a assertiva de que as folhas mantêm um estreito vínculo fisiológico do tipo fonte-dreno com os grãos e também com as flores, influenciando deste modo, a formação e o desenvolvimento destes órgãos.

Destaca-se que a clara distinção existente entre os genótipos crioulos de milho com relação ao conteúdo de carotenóides e de compostos fenólicos no seu tecido foliar possibilita uma ampla gama de possibilidades de aproveitamento. Sendo assim, a princípio, os agricultores poderão aproveitar todos estes genótipos para produção de folhas, objetivando o fornecimento de matéria-prima para a indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica. Já que as peculiaridades químicas das variedades crioulas de milho podem e devem ser aproveitadas, gerando um leque mais amplo de possibilidades para os agricultores familiares brasileiros.

Dentre os fatores de destaque que sugerem o aproveitamento das folhas de milho mencionam-se: 1) resíduo agrícola produzido em elevada quantidade (≈ 5000 Kg/ha), 2) produção em paralelo aos grãos e 3) conteúdo interessante de carotenóides e de compostos fenólicos, fitoquímicos com reconhecido valor de mercado.



















	Mato Grosso Palha Roxa (MG): carotenóides totais (CLAE) = 9,4 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 9,3 mg/g de folha				
	Palha Roxa (PR): carotenóides totais (CLAE) = 15,5 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 9,4 mg/g de folha				
	Roxo (RX): carotenóides totais (CLAE) = 11,7 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 7,9 mg/g de folha				
	Rajado 8 Carreiras (RC): carotenóides totais (CLAE) = 14,3 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 5,8 mg/g de folha				
	Língua de Papagaio (LP): carotenóides totais (CLAE) = 18,8 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 6,2 mg/g de folha				
	MPA 01 (MP): carotenóides totais (CLAE) = 15,4 mg/g de folha fenóis totais (extrato aquoso-CLAE) = 7,3 mg/g de folha				
					
(MG)	(PR)	(RX)	(RC)	(LP)	(MP)

Figura 1: Concentração média de carotenóides totais (mg/g de folha) e compostos fenólicos totais (mg/g de folha) obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para os extratos foliares das variedades crioulas de milho.

