

## Substâncias bioativas e atividade antioxidante de genótipos de milho com diferentes colorações de grãos

**Natália Alves Barbosa<sup>(1)</sup>; Maria Cristina Dias Paes<sup>(2)</sup>; Joelma Pereira<sup>(3)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Estudante de doutorado em Ciências dos Alimentos; Universidade Federal de Lavras; Lavras, Minas Gerais; nataliaalvesb@yahoo.com.br; bolsista de agência de fomento (CNPq); <sup>(2)</sup> Cientista de Alimentos; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo); cristina.paes@embrapa.br; <sup>(3)</sup> Professora associada; Universidade Federal de Lavras; joper@dca.ufla.br.

**RESUMO:** O milho apresenta diversidade genética, dando origem a um grande número de variedades com características fenotípicas distintas, como a pigmentação dos grãos. Recentemente, essa variação da coloração dos grãos de milho passou a ser de grande interesse devido à correlação da coloração dos alimentos com o conteúdo de compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides. Estas substâncias bioativas possuem função antioxidante e podem prevenir algumas doenças, proporcionando efeitos benéficos para a saúde humana. O objetivo desse estudo foi caracterizar quatro acessos de milho de coloração distinta de grãos quanto à composição de substâncias bioativas (fenólicos totais, antocianinas, carotenoides) e determinar a atividade antioxidante. Foram avaliados os acessos de milho de grãos coloridos TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661 do Banco Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (BAG). O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado. Foi possível verificar existência de variabilidade na concentração de compostos bioativos dos genótipos avaliados. O acesso TO002 apresentou maior concentração de fenólicos totais e antocianinas e a maior atividade antioxidante.

**Termos de indexação:** fenólicos totais, antocianinas, carotenoides.

### INTRODUÇÃO

Grãos de milho podem apresentar várias colorações, entretanto, milhos com pigmentação intensa (pretos, roxos, vermelhos, azuis e laranjas) tem recebido maior atenção devido à relação dessa característica com a presença de substâncias bioativas, como carotenoides (Hu & Xu, 2011; Aguayo-Rojas et al., 2012), e compostos fenólicos (Santiago et al., 2007; Li et al., 2008; Yang & Zhai, 2010; Hu & Xu, 2011; Zilić et al., 2012).

Diferenças consideráveis no conteúdo de fitoquímicos e na capacidade antioxidante, foram reportadas por Hu & Xu (2011) e Zilic et al. (2012) em diferentes genótipos de milho. Nestes estudos a distribuição de carotenoides ou antocianinas diferiu significativamente entre as classes de cores avaliadas. Portanto, milhos com diferentes origens, ainda precisam ser avaliados a fim de identificar um genótipo com maior destaque na composição destes fitoquímicos. Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar quatro acessos de milho com coloração intensa de grãos quanto à composição de substâncias bioativas (fenólicos totais, antocianinas, carotenoides) e atividade antioxidante, a fim de selecionar um genótipo com destaque para a composição destes fitoquímicos.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Tratamentos e amostragens

Foram avaliados quatro acessos de milho de grãos coloridos do Banco ativo Germoplasma (BAG) Milho da Embrapa Milho e Sorgo quanto à concentração de fenólicos totais, antocianinas, carotenoides e atividade antioxidante dos grãos TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661 (**Figura 1**).



**Figura 1** Acessos do BAG- Milho (Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG) avaliados no estudo.

Para as avaliações, os grãos de milho foram moídos em moinho tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba – SP) acoplado de peneira de abertura 0,5mm, sendo o material acondicionado em frascos

de vidro, tampados, lacrados com Parafilm M e envoltos em papel alumínio.

### Determinações analíticas

Todas as análises foram realizadas em ausência de luz e em temperatura ambiente de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

As análises químicas foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas-MG.

### Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi determinada de acordo com a metodologia de Singleton et al. (1999).

### Antocianinas

A composição de antocianinas foi determinada de acordo com a metodologia de Francis (1992) e adaptada por Lopes et al. (2012).

### Carotenoides

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich & Juvik (1999) com modificações (Barbosa, 2015). Os carotenoides foram quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Alliance Waters, modelo e-2695, equipado com coluna polimérica C30 da marca YMC ( $3 \mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 250 \text{ mm}$ , Waters, Milford, MA, USA) e acoplado a detector de arranjo de diodo (modelo 2998 Waters). O gradiente de eluição foi conduzido a  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  em condições de gradiente 80:20 a 20:80 de metanol: éter metil *tert*-butil em 16 minutos, seguido por constante de 80:20 em 4 minutos, finalizando com 6 minutos de equilíbrio. A temperatura de forno utilizada foi de  $30^\circ\text{C}$ , comprimento de onda  $450 \text{ nm}$  e volume de injeção de  $40 \mu\text{L}$ . A temperatura do laboratório foi mantida a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura ( $\alpha$ -caroteno), mamão formosa ( $\beta$ -criptoxantina), seguindo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), e os padrões comerciais de luteína (Lutein 40 mg, Vision Health), zeaxantina (Swanson, ZeaGold zeaxanthin 4 mg (from paprika) e  $\beta$ -caroteno (Beta Carotene (vitamina A) 25,000 IU Supplement, Swanson SW007). Os resultados da análise de carotenoides foram expressos em base seca.

### Determinação da capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia de Roesler et al. (2007).

### Delineamento e análise estatística

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

As análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados submetidos estatisticamente à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi realizado teste de média Least Significant Difference (LSD), estabelecendo-se o nível de 5% de significância.

Para análise dos dados, utilizou-se o programa Sisvar versão 5.3 (Build 77) (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os fitoquímicos fenólicos totais e antocianinas houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grãos dos genótipos de milho pigmentados (**Tabela 1**).

**Tabelas 1** - Médias da concentração de compostos bioativos presentes nos grãos de milho de genótipos pigmentados.

Genótipos	Concentração ( $\text{mg}\cdot 100\text{mg}^{-1}$ ) nos grãos $\pm$ DP	
	Fenólicos totais	Antocianinas
TO 002	959,6 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	72,26 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
ES 006	860,8 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	64,17 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>
RO 013	756,3 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	58,40 $\pm$ 0,38 <sup>bc</sup>
BAG 0661	690,0 $\pm$ 0,38 <sup>d</sup>	50,84 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

<sup>2</sup>DP: Desvio padrão.

Os grãos do acesso TO 002 apresentaram maior concentração de fenólicos totais e antocianinas quando comparados aos demais materiais.

Montilla et al. (2011), estudando a composição de fenólicos totais em diferentes cultivares de milho roxo encontrou variação de  $(311,0 \text{ a } 817,6 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1})$ . Del Pozo-Insfran et al. (2006), De La Parra et al. (2007) e Mora-Rochin et al. (2010) relataram médias de  $40,0 \text{ a } 266,0 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de fenólicos totais em milho de diferentes colorações. Entretanto, Urias-Lugo et al. (2015), encontraram teores de  $1039,0 \text{ e } 1331,3 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , existindo, portanto, variações na composição de bioativos em materiais de diferentes locais.

Quanto ao teor de carotenoides, também houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos pigmentados (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Concentração de carotenoides expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  (base seca) em grãos de milho de genótipos pigmentados.

Carotenoides	Concentração de carotenoides $\mu\text{g g}^{-1}$ $\pm$ DP			
	Genótipos pigmentados			
	TO 002	ES 006	RO 013	BAG 0661
Luteína	*	0,96 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 1,08 <sup>c</sup>	1,16 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>
Zeaxantina	*	0,87 $\pm$ 1,03 <sup>ab</sup>	0,94 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>
$\beta$ -criptoxantina	0,13 $\pm$ 1,04 <sup>d</sup>	0,62 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>	0,31 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>
$\beta$ -caroteno	0,19 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,31 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
$\alpha$ -caroteno	*	*	*	*
Carotenoides totais	0,32 $\pm$ 1,07 <sup>c</sup>	3,24 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	1,97 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

<sup>2</sup>DP: Desvio padrão.

\* Abaixo do limite de quantificação

O genótipo ES 006 se destacou quanto à concentração de carotenoides totais, seguidos dos genótipos RO 013 e BAG 0661. Já o genótipo TO 002 obteve a menor concentração de carotenoides totais nos seus grãos.

A concentração de carotenoides está também relacionada com a pigmentação da cor do grão de milho, uma vez que grãos com coloração amarela intensa ou laranja apresentam maior concentração de carotenoides totais quando comparados a grãos amarelos claros e brancos (Cardoso et al. 2009). Porém, quanto aos carotenoides totais, o genótipo ES 006 (grãos roxos), apresentou maior concentração inclusive maior que o genótipo BAG 0661 (alguns grãos amarelos).

O genótipo BAG 0661 apresentou maior concentração de luteína e o RO 013 maior concentração de zeaxantina. Estes carotenoides estão associados à prevenção de degeneração macular e catarata (Torres et al. 2008). Porém, ES 006 contém os maiores teores de Beta-criptoxantina e Beta-caroteno (pró-vitâmicos A). E apesar de TO 002 apresentar mais fenólicos totais e antocianinas, é o genótipo que apresentou a menor concentração de carotenoides totais.

Para a variável atividade antioxidante, diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pôde ser notada para os grãos dos genótipos pigmentados (Tabela 3).

**Tabela 3** - Atividade antioxidante dos grãos de milho de genótipos pigmentados.

Genótipos	Atividade antioxidante (%) $\pm$ DP
TO 002	74,31 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
ES 006	65,19 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
RO 013	51,16 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
BAG 0661	52,88 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

<sup>2</sup>DP: Desvio padrão.

Em ordem crescente os genótipos que mais se destacaram quanto à atividade antioxidante foram: TO 002, ES 006, RO 013 e BAG 0661.

O genótipo TO 002 apesar de apresentar a menor concentração de carotenoides totais apresentou maior atividade antioxidante, indicando que os fenólicos totais e antocianinas podem estar relacionados à maior atividade antioxidante deste genótipo.

## CONCLUSÕES

Acessos de milho de grãos com colorações distintas apresentam variabilidade na concentração de compostos fenólicos, antocianinas e carotenoides, diferindo na resposta de atividade antioxidante. Dentre os genótipos estudados, o acesso de grãos pretos TO002 apresenta maior concentração de fenólicos totais, antocianinas e maior atividade antioxidante.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Milho e Sorgo pelo financiamento da pesquisa e ao CNPq pela bolsa de doutorado.

## REFERÊNCIAS

- AGUAYO-ROJAS, J.; MORA-ROCHÍN, S.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O.; SERNA-SALDIVAR S, O.; GUTIERREZ-URIB. Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process of whole pigmented mexican maize. **Plant Foods Hum Nutrition**, v. 67, p. 178-185, 2012.
- BARBOSA, N. A.; PAES, M. C. D.; GUIMARAES, P. O.; PEREIRA, J. Carotenoid retention in minimally processed biofortified green corn stored under retail marketing conditions. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras, v. 39, n. 4, p. 363-371, 2015.
- CARDOSO. W. S.; PAES, M, C. D.; GALVÃO, J, C, C.; RIOS, S, A.; GUIMARÃES, P, E, O.; SCHAFFERT, R, E.; BORÉM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 2, 2009.
- DE LA PARRA, C.; SERNA SALDIVAR, S. O.; LIU, R. H. Effect of processing on the phytochemical profiles and

- antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, p. 4177–4183. 2007.
- 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**, v. 39, p. 696–703. 2006.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2000.
- FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.), **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p. 181-207, 1992.
- HU, Q. P.; XU, J. G. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 59, p. 2026-2033, 2012.
- KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1948-1955, 1999.
- LI, CHUN-YING.; KIM, HEE-WOONG.; WON, SE-RA.; MIN, HWANG-KEE.; PARK, KI-JIN.; PARK, JONG-YEOL.; AHN, MUN-SEOB.; RHEE, HAE-IK. Corn husk as a potential source of anthocyanins. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 11413-11416, 2008.
- LOPES, M. M. A.; MIRANDA, M. R.A.; MOURA, C. F. H.; ENÉAS FILHO, J. Compostos bioativos e atividade antioxidante total de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale L.*) durante o amadurecimento de clones de cajueiro anão-precoce. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 325-332, 2012.
- MONTILLA, E. C.; HILLEBRAND, S.; ANTEZANA, A.; WINTERHALTER, P. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays L.*) cultivars. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 7068-7074, 2011.
- MORA-ROCHIN, S.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; SÁNCHEZPEÑA, P.; REYES-MORENO, C.; MILÁN-CARRILLO, J. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. **Journal of Cereal Science**, v. 52, p. 502–508, 2010.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO L, C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27: p. 53-60, 2007.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2). Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/sites/default/files/tech02.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- SANTIAGO, R.; REID, L. M.; ARNASON, J. T.; ZHU, X.; MARTINEZ, N. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to Gibberella stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 5186-5193, 2007.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocateau reagent. **Methods Enzymology**. San Diego, v. 29, p. 152- 178, 1999.
- TORRES, R. J. A.; PRÉCOMA, D. B.; MAIA, M.; KAIBER, F.; PRIM, C.; LUCHINI, A.; MATOS, R. S.; FARAH, M. E. Current concepts and perspectives in the prevention of age-related macular degeneration. **Rev. bras.oftalmol**, Rio de Janeiro, v. 67, n.3, p. 142-155. 2008.
- URIAS-LUGO, D. A.; HEREDIA, J. B.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; MUY-RANGEL, M. D.; VALDEZ-TORRES, J. B. Total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity of native and elite blue maize hybrids (*Zea mays L.*). **CyTA - Journal of Food**, v.13, p. 336-339, 2015.
- 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**, v. 11, p. 169-176, 2010.
- ZILIĆ, S.; SERPEN, A.; AKILLIOĞLU, G.; GÖKMEN, V.; VANČETOVIĆ, J. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays L.*) kernels. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 60, p.1224-1231. 2012



# XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,  
mercados e segurança alimentar"

---