

Perfil de antocianinas de acessos de genótipos de milho de grãos coloridos

Maria Cristina Dias Paes⁽¹⁾; Edy Sousa de Brito⁽²⁾

⁽¹⁾ Cientista de Alimentos; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo) cristina.paes@embrapa.br; ⁽²⁾ Pesquisador, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical).

RESUMO: Apesar da importância do milho colorido na dieta de várias populações, a composição de antocianinas de genótipos não comerciais mantidos em Bancos de Germoplasma ainda é pouco conhecida. O objetivo desse estudo foi determinar o perfil de antocianinas de genótipos de milho com coloração distinta de grãos. Foram avaliados dez acessos de milho de grãos coloridos. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado com três repetições. Quatro genótipos do total avaliado apresentaram antocianinas na composição, sendo cianidina-3 glucosídeo e cianidina-3-6''-malonilglucosídeo as classes de antocianinas mais abundantes nessas amostras. O acesso TO002 de grãos pretos, apresentou a maior concentração dessas substâncias. Genótipos de milho de grãos de colorações distintas diferem no perfil de antocianinas, podendo essas estar presentes ou não nesses materiais. Grãos de milho pretos e roxos apresentam maiores concentrações de antocianinas.

Termos de indexação: compostos bioativos, milho colorido, pigmentos

INTRODUÇÃO

Grande variabilidade para cor de grãos ocorre em milho, sendo compostos químicos, como antocianinas e carotenoides os principais responsáveis por essa pigmentação. A ação antioxidante dessas substâncias as caracterizam como bioativas, atuando no controle de radicais livres associados ao estresse oxidativo relacionado à degeneração celular e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Milhos com pigmentação intensa (pretos, roxos e azuis) têm sido caracterizados para vários fitoquímicos, sendo antocianinas identificadas como um dos principais nesses materiais (Aguayo-Rojas et al., 2012; Del Pozo-Insfran et al., 2006; Hu & Xu,

2012; Montila et al., 2011; Urias-Logo et al. 2015; Yang & Zhai, 2010; Zilić et al., 2012). Há significativa diferença na distribuição de antocianinas entre as classes de cores, com relação entre a coloração escura dos grãos e a concentração de antocianinas (Zilić et al. 2012), podendo materiais com diferentes colorações de grãos de diferentes origens, apresentarem variações na composição de antocianinas (Zhao et al., 2009). Assim, o objetivo desse estudo foi determinar o perfil de antocianinas de genótipos de milho com coloração distinta de grãos mantidos no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram selecionados dez acessos de grãos coloridos variando de vermelho a preto mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Milho da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, MG. A imagem e identificação dos materiais são apresentados na **Figura 1**.



Figura 1. Imagem de grãos dos genótipos de milho analisados para perfil de antocianinas

Antocianinas

As amostras de grãos de milho foram moídas imediatamente antes do processo extrativo em moinho ciclone MA 020 (MARCONI, Piracicaba, SP) acoplado com peneira de abertura 0,5mm. O material moído foi acondicionado em frascos de

vidro, tampados, lacrados com parafilme e envoltos em papel alumínio. A cada amostra foram adicionados 5mL de uma solução de metanol: ácido fórmico 10% (v/v), seguido de extração utilizando banho ultrassom de 40 KHz (USC 1400, Unique, Indaiatuba, SP) durante 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Este processo foi repetido três vezes para cada amostra. Todo o sobrenadante composto foi concentrado em evaporador rotativo e em seguida foi adicionado de 2mL de água deionizada. Alíquotas (20µL) foram retiradas e filtradas para injeção em LC-MS.

Foi adotado o protocolo para determinação de fenólicos em plantas (Lin & Harnly, 2007) com modificações. O instrumento LC-DAD-ESI/MS utilizado foi o modelo Varian 250 HPLC (Varian Inc., Lake Forest, CA) com detector de arranjo de diodo (DAD) e espectrômetro de massa 500-MS IT (Varian Inc., Lake Forest, CA). A coluna utilizada na análise foi Symetry C18 (3 µm, 250 x 2 mm) (Varian Inc., Lake Forest, CA). O fluxo aplicado foi de 0.4 ml/min. Durante a corrida a temperatura do forno foi mantida a 30°C. A fase móvel consistiu da combinação dos solventes A (0.1% ácido fórmico em água) e B (0.1% ácido fórmico em acetonitrila). O gradiente linear adotado variou de 10% a 26% B (v/v) em 40 min, até 65% B em 70 min, passando para 100% B aos 71 min, sendo mantido até 75 min. O DAD foi programado a 270 e 512 nm para leitura em tempo real e o espectro UV/VIS de 190 a 650 nm, sendo coletado continuamente. O espectro de massa foi gerado simultaneamente usando ionização eletrospray nos modos de ionização positivo e negativo (PI and NI) em voltagem de fragmentação de 80 V para um intervalo de massa de 100–1000 amu. Foi utilizada pressão de gás de secagem de 35 psi, pressão de gás de nebulização de 40 psi, temperatura de secagem de gás de 370°C, voltagem de capilaridade de 3500 V para PI e 3500 V for NI, além de voltagens de campo de pulverização de 600V. O sistema LC system foi acoplado de MSD com uma divisão de 50%.

Tratamentos e amostragens

Foram avaliados dez acessos de milho de grãos coloridos selecionados do Banco Ativo de Germoplasma mantido na Embrapa Milho e Sorgo.. Todas as análises foram realizadas em ausência de luz e em temperatura ambiente de 21±1°C.

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 o teste de

F, foi realizado teste de média 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

Os resultados das análises do perfil de antocianinas dos dez acessos são apresentados na **Tabela 1**. Apenas quatro genótipos de milho apresentaram concentrações de antocianinas em quantidades significativas para detecção. Nos acessos MT024, BA125 e MG174 não foram detectadas essas substâncias, podendo a pigmentação dos grãos nesses materiais estarem associada à presença de carotenoides e outros compostos fenólicos.

O cromatograma gerado para o genótipo TO002 é apresentado na **Figura 2**, exemplificando o perfil de antocianinas dos quatro acessos com concentrações detectadas dessas substâncias.

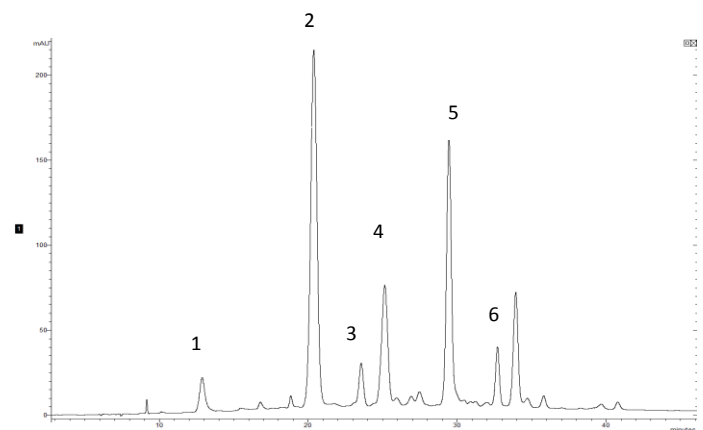


Figura 2. Perfil cromatográfico de antocianinas identificadas em amostras em milho de grãos pretos TO002 (512nm). Identificação dos picos segundo Tabela 1.

As formas cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-6''-malonilglucosídeo foram as antocianinas mais abundantes nas amostras analisadas (Tabela 1). O acesso TO002, cujos grãos possuem cor preta, apresentou a maior concentração dessas substâncias. Pesquisas anteriores permitiram a identificação das principais antocianinas no milho roxo como cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, pelargonidin-3-(6''-malonilglucosídeo), cianidina-3-(6''-malonilglucosídeo), e cianidina-3-(3'',6''-dimalonilglucosídeo), cianidina-3-(3'',6''-i), e

cianidina 3-(3",6"-dimalonylglucoside), sendo os derivados de cianidina os principais, respondendo por mais de 70% do total de antocianinas nos grãos (pericarpo e aleurona) (Aoki et al., 2002). Portanto, os resultados foram semelhantes aos obtidos para os acessos de coloração preta e roxa avaliados. O total de antocianinas reportadas para linhagens e materiais crioulos de milho de origem americana e europeia foi menor que o encontrado no atual estudo, variando a concentração de cianidina -3-glucosídeo de 308,24 a 547,49 mg kg⁻¹ (Licy et al. 2008; Zilic et al., 2012).

CONCLUSÕES

Acessos de milho com colorações intensas distintas dos grãos apresentam variabilidade no perfil de antocianinas, podendo haver presença ou não dessas substâncias em grãos coloridos de milho. Grãos de milho pretos e roxos apresentam maiores concentrações de antocianinas.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa pelo financiamento da pesquisa e à Fapemig pelo apoio.

REFERÊNCIAS

AOKI, H. , KUZE , N. , AND KATO , Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays L.*) . Foods and Food Ingredients **Journal of Japan** , 199 : 41 – 45, 2002.

AGUAYO-ROJAS J, MORA-ROCHÍN S, CUEVAS-RODRÍGUEZ EO, SERNA-SALDIVAR SO, GUTIERREZ-URIB. Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime-cooking extrusion process of whole pigmented mexican maize. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 67, p. 178-185, 2012.

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, 1039-1042, 2011. ISSN: 1413-7054. 2000.

HU QP, XU JG. 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.

LIN, L.-Z., & HARNLY, J. A standardized method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds in all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 1084–1096, 2007

LICY, K. H.W., WON, S.R.; MIN, H.K., PARK K.J. Corn husk as a potential source of anthocyanins. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.56, p. 11413-11416, 2008.

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**. 59, p. 7068-7074, 2011.

URIAS-LUGO. D.A.; J.B. HEREDIA,; S.O. SERNA-SALDIVAR,; M.D. MUY-RANGEL.; J.B. VALDEZ-TORRES. 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.

ZHAO, X.Y. , ZHANG, C. , GUIGAS, C. , MA, Y. , CORRALES, M. , TAUSCHER , B. , AND HU, X.S. Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays L.*) from China . **European Food Research and Technology** , 228 : 1438 – 2385, 2009

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.

Tabela 1. Identificação dos picos de antocianina das amostras de grãos de milho coloridos de distintos acessos mantidos em Banco Ativo de Germoplasma no Brasil

Pico	t_{\min}	[M-H] ⁺ (m/z)	MS n	λ_{\max} (nm)	Composto	mg antocianinas 100g ⁻¹ de grãos*						
						TO 002	RO 028	BA 066	RO 013	PR 031	MT 059	ES 016
1	13.07	899	735, 575	528, 280	(epi)catechin-cyanidin-3,5- diglucoside	2.5	nd	nd	nd	nd	nd	tr
2	20.66	449	287	515, 280	cyanidin-3-glucoside	30.4 a	tr	tr	2.0c	tr	1.2c	5.9b
3	23.75	433	271	501, 280	pelargonidin-3-glucoside	2.4	tr	tr	tr	nd	tr	
4	25.34	463	301	516, 279	peonidin-3-glucoside	9.3 a	tr	tr	tr	nd	nd	1.5b
5	29.69	535	287	517, 280	cyanidin-3-(6`- malonylglucoside)	17.6 a	tr	tr	2.4b	tr	1.4c	2.0b
6	32.90	519	271	505, 267	pelargonidin-3-(6`- malonylglucoside)	2.9	tr	tr	tr	nd	tr	tr
7	34.24	549	301	517, 280	peonidin-3-(6`- malonylglucoside)	6.8	tr	tr	tr	nd	nd	tr
8	34.97	621		519, 324, 278	cyanidin-3- (dimalonylglucoside)	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	36.03	621		519, 335, 280	cyanidin-3- (dimalonylglucoside)	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	40.00	605		520, 348	pelargonidin-3- (dimalonylglucoside)	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	41.07	635	301	525, 347, 270	peonidin-3- (dimalonylglucoside)	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd

tr < 1mgtr

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha diferem entre si ao nível de 5% probabilidade.