

Caroline Liboreiro Paiva

**ACIDOS FENÓLICOS E AMINAS BIOATIVAS
LIVRES E CONJUGADAS EM SORGO: TEORES E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2014

Caroline Liboreiro Paiva

**ACIDOS FENÓLICOS E AMINAS BIOATIVAS
LIVRES E CONJUGADAS EM SORGO: TEORES E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG.

2014

Dedico este trabalho a minha mãe, Carlota, ao meu esposo, Márcio, e ao meu filho Bernardo, por todo amor recebido.

“Senhor, ensina-nos a bem contar os nossos dias para alcançarmos o saber do coração”. Salmo 89, 12.

Agradecimentos

A Deus, obrigada pelas alegrias e dificuldades, pois em tudo está o Seu amor.

A minha mãe Carlota, pela dedicação, exemplo de fé e amor incondicional. Obrigada por todo sustento!

Ao Márcio, pelo amor traduzido em companheirismo, amizade e paciência. O seu equilíbrio e sabedoria me inspiram!

Ao Bernardo, obrigada por tanto afeto! Em você encontro força e alegria.

Ao meu pai e irmão, Guilhermes, pela presença em minha vida.

A minha sogra, Maria Narcisa, Maria de Lourdes, aos meus cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinha, pelo carinho.

À professora Maria Beatriz Abreu Glória, pela oportunidade do doutorado, pelas orientações e aprendizado. Pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao professor Ricardo José Alves, primeiramente pela competência na coordenação da síntese dos compostos, e também pela disponibilidade, ensinamentos e momentos de descontração.

A professora Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade de realização dos testes antioxidantes e pelo aprendizado.

Ao Marcos Gomes pelas contribuições na condução desse experimento e pela generosidade nos ensinamentos.

Ao Wagner Canhestro e ao Lucas Lopaordi, pela competência na condução das sínteses, disponibilidade e simpatia.

A Lorrana Martins pelo valioso auxílio nas análises de fenólicos e pela amizade.

A pesquisadora Valéria Aparecida Vieira Queiroz, da Embrapa Milho e Sorgo, pela oportunidade de trabalhar com este cereal, pelos ensinamentos e incentivos constantes.

A pesquisadora Déa Alécia Martins Netto, da Embrapa Milho e Sorgo, pela oportunidade e ensinamentos na germinação do sorgo.

A professora Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia, pela amizade e incentivo.

A minha amiga Lúcia Peret, pelos conselhos e frequentes auxílios. Admiro a sua garra!

A Christiane Paiva, por todo auxílio em minha vida e também na estatística. Obrigada pelas sugestões! Você é mais que amiga!

Aos colegas do LBqA, Bruno Dala Paula, Cecília Bandeira, Edinéia Xavier, Guilherme dos Reis, Juliana Rigueira, Letícia Guidi, Larissa Bontempo, Lorrana Martins, Patrícia Amaral, Pedro Prates, Regina Adão, Regina Carvalho, Rummenigge Oliveira e Warley

Evangelista pelo convívio, amizade, sugestões e colaboração durante a realização do trabalho. Obrigada pelos bate-papos, conselhos e por me proporcionarem tantas risadas!

Aos colegas novatos do LBqA, Flávia Custódio, Gisela Machado, José Maria, Paula Santiago, Raquel Braga, Arthur Magno e Ricardo Byrro pelas sugestões e colaboração ao trabalho.

Ao Rafael Miguel funcionário da Embrapa Milho e Sorgo, pela disponibilidade, presteza e atenção.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo aprendizado.

A todos os colegas da Pós-graduação em Ciência de Alimentos.

A secretária do Programa de Pós-Graduação Úrsula Martins pelos esclarecimentos e auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos que contribuíram, de alguma forma, para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO.....	20
OBJETIVOS.....	23
REVISÃO DA LITERATURA.....	25
1 SORGO.....	25
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	25
1.2 ASPECTOS NUTRICIONAIS.....	28
1.3 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	29
1.4 SORGO GERMINADO.....	33
2 AMINAS BIOATIVAS.....	34
2.1 DEFINIÇÃO.....	34
2.2 FORMAÇÃO.....	36
2.3 CATABOLISMO DE AMINAS BIOATIVAS.....	40
2.4 FUNÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS.....	41
2.5 TOXICOLOGIA E EFEITOS ADVERSOS DA INGESTÃO DE AMINAS BIOATIVAS.....	43
2.6 OCORRÊNCIA DE AMINAS BIOATIVAS EM ALIMENTOS.....	45
2.7 METODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES.....	46
3 AMINAS CONJUGADAS.....	49
3.1 DEFINIÇÃO.....	49
3.2 OCORRÊNCIA.....	51
3.3 BIOSÍNTESE DE AMINAS CONJUGADAS.....	52
3.4 FUNÇÃO DE AMINAS CONJUGADAS.....	53
3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE DE AMINAS CONJUGADAS EM ALIMENTOS.....	55
4 ÁCIDOS FENÓLICOS.....	58
4.1 DEFINIÇÃO.....	58
4.2 OCORRÊNCIA.....	58
4.3 BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	59
4.4 METABOLISMO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	60
4.5 FUNÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	62
4.6 MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS.....	63
5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS.....	67
PARTE EXPERIMENTAL.....	74
CAPÍTULO 1 - AMINAS BIOATIVAS EM SORGO: OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS, TANINO E ESTRESSE HÍDRICO.....	75

1	OBJETIVOS.....	75
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1	MATERIAL.....	75
2.1.1	Amostras.....	75
2.1.2	Reagentes, solventes e padrões de aminos.....	77
2.2	MÉTODOS.....	77
2.2.1	Delineamento experimental.....	77
2.2.2	Estudo da influência do ácido extrator, da granulometria e extrações sucessivas na recuperação das aminos bioativas de sorgo.....	78
2.2.3	Determinação de aminos bioativas por CLAE-par iônico.....	79
2.2.4	Análises estatísticas.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1	GRANULOMETRIA DO SORGO APÓS MOAGEM.....	80
3.2	INFLUÊNCIA DO ÁCIDO EXTRATOR, DA GRANULOMETRIA E DE EXTRAÇÕES SUCESSIVAS NA RECUPERAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS EM SORGO.....	80
3.3	PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES NO SORGO....	83
3.4	PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES COM E SEM TANINO.....	85
3.5	INFLUÊNCIA DO ESTRESSE HÍDRICO NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES NO SORGO.....	86
4	CONCLUSÕES.....	87

CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA GERMINAÇÃO NO PERFIL E NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SORGO..... 89

1	OBJETIVOS.....	89
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1	MATERIAL.....	89
2.1.1	Amostras.....	89
2.1.2	Reagentes, solventes e padrões de aminos.....	89
2.2	MÉTODOS.....	90
2.2.1	Germinação.....	90
2.2.2	Determinação do teor de umidade.....	91
2.2.3	Determinação de aminos bioativas.....	91
2.2.4	Análises estatísticas.....	92
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1	GERMINAÇÃO DO SORGO.....	93
3.2	PERFIL E TEORES DE AMINAS EM SORGO EM DIFERENTES PARTES DA PLÂNTULA DURANTE A GERMINAÇÃO.....	95
3.3	PERFIL E TEORES DE AMINAS NO COTILÉDONE DE DIVERSOS GENÓTIPOS DE SORGO DURANTE A GERMINAÇÃO.....	99
4	CONCLUSÕES.....	105

CAPÍTULO 3 – PERFIL E TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM SORGO..... 106

1	OBJETIVOS.....	106
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1	MATERIAL.....	106
2.1.1	Amostras.....	106

2.1.2	Reagentes, solventes e padrões.....	107
2.2	MÉTODOS.....	107
2.2.1	Determinação de fenólicos totais.....	108
2.2.2	Extração de ácidos fenólicos solúveis.....	108
2.2.3	Extração de ácidos fenólicos insolúveis.....	109
2.2.4	Determinação de ácidos fenólicos.....	110
2.2.5	Análises estatísticas.....	110
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
3.1	TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS EM SORGO.....	110
3.2	PERFIL DE ELUIÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	112
3.3	PERFIL E TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM SORGO.....	113
3.4	ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS E AMINAS BIOATIVAS LIVRES EM SORGO.....	118
3.5	ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FENÓLICOS TOTAIS.....	120
4	CONCLUSÕES.....	121

CAPÍTULO 4 – AMINAS CONJUGADAS EM SORGO: MÉTODO ANALÍTICO E OCORRÊNCIA.....

1	OBJETIVOS.....	123
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1	MATERIAL.....	123
2.1.1	Amostras.....	123
2.1.2	Reagentes, solventes e padrões.....	124
2.2	MÉTODOS.....	124
2.2.1	Síntese das aminas conjugadas.....	124
2.2.2	Caracterização das aminas conjugadas sintetizadas.....	125
2.2.3	Determinação do comprimento de onda para detecção dos compostos.....	125
2.2.4	Extração e quantificação de aminas conjugadas em sorgo.....	125
2.2.5	Análises estatísticas.....	126
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMINAS CONJUGADAS.....	126
3.2	AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMINAS CONJUGADAS SINTETIZADAS.....	131
3.3	PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMINAS CONJUGADAS.....	131
3.4	PERFIL E TEORES DE AMINAS CONJUGADAS EM SORGO.....	134
3.5	CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE AMINAS CONJUGADAS E LIVRES E ÁCIDOS FENÓLICOS EM SORGO.....	137
4	CONCLUSÕES.....	139

CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLIAMINAS, ÁCIDOS FENÓLICOS, AMINAS CONJUGADAS E EXTRATOS METANÓLICOS DE SORGO.....

1	OBJETIVOS.....	140
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	140
2.1	MATERIAL.....	140
2.1.1	Amostras.....	140
2.1.2	Reagentes, solventes e padrões.....	141
2.2	MÉTODOS.....	142

2.2.1	Preparo dos extratos.....	142
2.2.2	Atividade antioxidante frente ao radical DPPH.....	142
2.2.3	Atividade antioxidante frente ao radical ABTS.....	143
2.2.4	Poder de redução do ferro.....	144
2.2.5	Poder de redução do complexo de molibdênio.....	145
2.2.6	Avaliação da atividade antioxidante em Rancimat®.....	146
2.2.7	Análises estatísticas.....	147
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	147
3.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MODELOS QUÍMICOS.....	148
3.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEO DE SOJA FRENTE AOS DIFERENTES COMPOSTOS.....	152
3.3	ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES TOTAIS DE POLIAMINAS, DE ÁCIDOS FENÓLICOS E DE AMINAS CONJUGADAS EM EXTRATOS DE SORGO E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES MODELOS.....	153
4	CONCLUSÕES.....	155
	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	157
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
	APÊNDICE A.....	173
	APÊNDICE B.....	180

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

1	Atividade antioxidante ORAC de farelo e farinha de sorgo comparado com frutas e hortaliças.....	32
2	Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em cereais gramináceos.....	48
3	Aminas conjugadas a ácidos fenólicos comumente encontrados em alimentos.....	51
4	Métodos utilizados para determinação de aminas conjugadas em matrizes alimentícias.....	57
5	Métodos utilizados para determinação de ácidos fenólicos livres e conjugados.....	65
6	Regiões de absorção dos ácidos fenólicos no ultravioleta.....	67

CAPÍTULO I

I.1	Característica de cor do pericarpo dos genótipos de sorgo.....	76
I.2	Gradiente de eluição das fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio por CLAE para determinação de aminas bioativas livres.....	79
I.3	Porcentagem de recuperação de aminas livres extraídas de sorgo e adicionadas de 20 mg/100 g de solução padrão de dez aminas empregando dois ácidos (ácido tricloroacético – TCA e ácido clorídrico – HCl), dois tamanhos de partículas (420 e 840 µm) e três extrações sucessivas.....	82
I.4	Teores médios de aminas bioativas livres em diferentes genótipos de sorgo com e sem tanino.....	84

CAPÍTULO II

II.1	Teor de umidade de sementes e de diferentes estruturas da plântula durante a germinação de genótipos de sorgo com e sem tanino.....	94
II.2	Teores médios de aminas bioativas em sorgo com e sem tanino antes e após um dia (24 h) de germinação.....	95
II.3	Teores médios de aminas bioativas em diferentes partes da plântula de sorgo, com e sem tanino, do terceiro ao sétimo dia de germinação	97
II.4	Teores médios de aminas bioativas nos grãos de diversos genótipos de sorgo com e sem tanino antes e após um dia (24 h) de germinação.....	101

CAPÍTULO III

III.1	Teor médio de fenólicos totais (mg equivalente de ácido gálico/100 g) em sorgos cultivados ou não sob estresse hídrico.....	111
III.2	Ácidos fenólicos solúveis e insolúveis em diferentes linhagens de sorgo cultivadas com e sem estresse hídrico.....	116
III.3	Coeficientes de correlação de Pearson entre ácidos fenólicos e aminas bioativas em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico....	119

III.4	Equações lineares para as correlações significativas entre ácidos fenólicos na fração solúvel do grão (y) e aminas bioativas livres (x) em sorgos cultivados com irrigação.....	120
III.5	Coeficientes de correlação de Pearson entre ácidos fenólicos e fenólicos totais em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico.....	121

CAPÍTULO IV

IV.1	Rendimentos das reações de síntese das aminas conjugadas.....	128
IV.2	Pontos de fusão das aminas conjugadas sintetizadas.....	128
IV.3	Aminas conjugadas em genótipos de sorgo cultivados com irrigação e sob estresse hídrico.....	136
IV.4	Coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e livres em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico.....	138
IV.5	Coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e ácidos fenólicos em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico.....	138

CAPÍTULO V

V.1	Atividade antioxidante em diferentes modelos químicos de poliaminas, ácidos fenólicos, aminas conjugadas e de extratos metanólicos de sorgo expressos em g equivalentes de BHT.....	149
V.2	Coeficientes de correlação de Pearson entre a atividade antioxidante em diferentes modelos e os teores totais de poliaminas, de ácidos fenólicos, de aminas conjugadas e fenólicos totais detectados em extratos de sorgo.....	155

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

1	Foto ilustrativa do <i>Sorghum bicolor</i> (L.)	25
2	Produção agrícola de sorgo no Brasil.....	26
3	Estrutura química de algumas aminas bioativas.....	35
4	Reações envolvidas na síntese de aminas por meio da descarboxilação de aminoácidos utilizando a coenzima piridoxal fosfato (PLP).....	37
5	Formação da histamina (A) e da tiramina (B) por meio da descarboxilação dependente da coenzima piridoxal fosfato (PLP).....	37
6	Formação de amina através de transaminação.....	38
7	Biossíntese da putrescina, espermina e espermidina em plantas e animais.....	39
8	Catabolismo da putrescina e das poliaminas em plantas e animais.....	41
9	Reação do cloreto de dansila (A) e do <i>orto</i> -ftaldeído (B) com aminas primárias.....	49
10	Aminas conjugadas a ácidos hidroxicinâmicos detectadas em milho...	50
11	Biossíntese dos ácidos hidroxicinâmicos.....	52
12	Reação de formação de uma amina conjugada.....	53
13	Estrutura de ácidos fenólicos comumente presentes em plantas.....	58
14	Biossíntese de derivados dos ácidos benzoicos a partir de ácidos hidroxicinâmicos.....	60
15	Biossíntese do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico a partir do ácido clorísmico.....	61
16	Esquema do mecanismo de oxidação de lipídeos.....	68
17	Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺	70
18	Redução do íon ferricianeto para ferrocianato na presença de íon férrico.....	70
19	Redução do complexo de Cu ²⁺ pela interação com o antioxidante.....	71
20	Mudança de coloração na reação de estabilização do radical livre DPPH.....	72

CAPÍTULO I

1.1	Porcentagem de recuperação de aminas bioativas extraídas de sorgo moído (granulometria de 420 µm) empregando extrator TCA a 5%.....	81
1.2	Teores médios (desvios padrões) de aminas bioativas em linhagens de sorgo com e sem tanino cultivadas com e sem estresse hídrico.....	87

CAPÍTULO II

II.1	Estruturas da plântula de sorgo após 7 dias de germinação, cultivar BRS310.....	91
II.2	Foto ilustrativa da germinação de <i>Sorghum bicolor</i> L., cultivar BRS310.....	93
II.3	Contribuição, em porcentagem, da espermina, espermidina e putrescina no conteúdo total de aminas em sorgo sem tanino (A) e com tanino (B) antes da germinação, no primeiro dia e durante a germinação (3°, 5° e 7° dia) nas folhas, cotilédone e radícula.....	98
II.4	Teores de aminas bioativas no cotilédone (mg/100 g bs/ sorgo germinado) durante o período de germinação de linhagens sem tanino.....	103
II.5	Teores de aminas bioativas no cotilédone (mg/100 g bs/ sorgo germinado) durante o período de germinação de linhagens com tanino.....	104

CAPÍTULO III

III.1	Perfil cromatográfico de solução padrão contendo quatro ácidos fenólicos (A), de extrato solúvel da linhagem SC328 (B) e de extrato insolúvel da linhagem SC42 (C) de sorgo.....	112
III.2	Percentual de contribuição de ácidos fenólicos ao teor total em linhagens de sorgo irrigadas e cultivadas sob estresse hídrico.....	114
III.3	Ácidos fenólicos totais em linhagens de sorgo irrigadas e cultivadas sob estresse hídrico.....	115
III.4	Teores médios de ácidos fenólicos totais em linhagens de sorgo cultivadas em dois ambientes: com estresse hídrico (A) e irrigadas (B).....	118

CAPÍTULO IV

IV.1	Esquema da síntese das aminas conjugadas aos ácidos cumárico e ferúlico.....	127
IV.2	Espectro no infravermelho da diferuloiespermidina.....	129
IV.3	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da diferuloiespermidina...	130
IV.4	Espectro DEPT (50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da diferuloiespermidina.....	130
IV.5	Espectro de absorção, na região do ultravioleta, das aminas conjugadas sintetizadas.....	132
IV.6	Perfil cromatográfico de solução contendo seis aminas conjugadas (A) e de extrato de sorgo, linhagem SC192 (B).....	133
IV.7	Porcentagens de contribuição de aminas conjugadas ao total em linhagens de sorgo cultivadas em dois ambientes: com estresse hídrico e irrigadas (Controle).....	135
IV.8	Teores totais de aminas conjugadas em genótipos de sorgo cultivados em dois ambientes: com estresse hídrico e irrigados (Controle).....	137

CAPÍTULO V

V.1	Fatores de proteção do BHT, da associação BHT/BHA, de ácidos hidroxicinâmicos, de aminas conjugadas e de extratos metanólicos de diversas linhagens de sorgo.....	153
-----	---	-----

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	<i>2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride</i> - 2,2'-azobis amidinopropano dihidrocloreto
ABTS	[2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]
ADC	Arginina descarboxilase
AGM	Agmatina
ANOVA	Análise de variância
AQC	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil
BEHPA	<i>bis-2-ethylhexyl phosphate</i> - bis-2-etilhexilfosfato
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
β-PE	<i>β- phycoerythrin</i> - β-ficoeritrina
CAD	Cadaverina
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CFP	Cumaroilferuloilputrescina
CoA	Coenzima A
CNBF	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto
CUPRAC	<i>Cupric reducing antioxidant capacity</i> – Capacidade de redução do Cu (II)
DAD	Detector por arranjo de fotodiodos
DAO	Diamina oxidase
DCEPD	Dicumaroilespermidina
DFEPD	Diferuloilespermidina
DCEPM	Dicumaroilespermina
DFEPM	Diferuloilespermina
DCP	Dicumaroilputrescina
DFP	Diferuloilputrescina
DMQC-Qsu	Carbamato ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC	<i>European Community</i> - Comunidade Europeia
EDAC	Cloridrato de <i>N</i> -(3-dimetil-aminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodimida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> - Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos
EPD	Espermidina
EPM	Espermina
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - Ionização por eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> - Bombardeamento por átomos rápidos
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
FEM	Feniletilamina

FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> - Poder antioxidante redutor do ferro
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> - Ácido 4-aminobutírico
HIM	Histamina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana
IC ₅₀	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração do radical livre em 50%
IV	Infravermelho
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> - Extração líquido-líquido
MAO	Monoamina oxidase
EM	Espectrometria de massas
NAD	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NAT	N-1-acetiltransferase
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NQS	1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio
ODC	Ornitina descarboxilase
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> - Capacidade de absorver radicais de oxigênio
OSI	<i>Oil Stability Index</i> - Índice de Estabilidade Oxidativa
OPA	<i>Ortho-phthalaldehyde</i> - orto-ftalaldeído
PAO	Poliamina oxidase
PAL	<i>Phenylalanine ammonia liase</i> - Fenilalanina amônia liase
PHT	Putrescina hidroxicinamoil transferase
PLP	Coenzima piridoxal fosfato
PUT	Putrescina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
SAM	S-adenosil metionina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilase
SER	Serotonina
SGLT1	<i>Sodium-glucose transport protein</i> - Proteína cotransportadora Na ⁺ /glicose
TBARS	<i>Thiobarbituric acid-reactive substances</i> - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> - Ácido triclorácetico
TE	Trolox equivalente
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> - Ácido trifluorácetico
THF	Tetrahidrofurano
TIM	Tiramina
TOF	<i>Time of Flight</i> – Tempo de voo
TOSC	<i>Total Oxidant Scavenging Capacity</i> - Capacidade de antioxidante total
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar as condições de extração de aminos bioativas de sorgo, quantificar aminos bioativas livres e conjugadas e ácidos fenólicos em genótipos de sorgo e avaliar a atividade antioxidante desses compostos. O estudo relativo à avaliação das melhores condições para extração de aminos livres em sorgo triturado a 420 µm demonstrou que três extrações consecutivas com TCA a 5% permitiu obter recuperações satisfatórias de oito aminos testadas. Apenas putrescina, cadaverina, espermina e espermidina foram detectadas em sorgo. Verificou-se ainda que esse cereal é fonte de poliaminas e que o cultivo em ambiente com estresse hídrico impactou na diminuição da produção desses compostos. Durante sete dias de germinação, os teores de putrescina aumentaram significativamente, os de espermidina mantiveram-se constantes, sendo a espermina detectada em partes da plântula de alguns genótipos. Os teores de aminos durante a germinação de sorgo não foram afetados pela presença de tanino no grão. Quanto aos ácidos fenólicos, o cumárico e o ferúlico estiveram presentes em todas as linhagens de sorgo estudadas, sendo o ferúlico predominante. Mais de 90% dos ácidos hidroxicinâmicos encontram-se presentes no pericarpo. Quanto às aminos conjugadas, as derivadas da espermina foram as predominantes, seguidas das derivadas da espermidina. Algumas linhagens de sorgo apresentaram atividade antioxidante expressivas nos modelos DPPH e ABTS. Em Rancimat, os extratos metanólicos das linhagens testadas, mesmo possuindo concentrações pequenas de ácidos fenólicos e de aminos conjugadas, apresentaram atividades antioxidantes expressivas. Pôde-se concluir ainda, que para sorgos irrigados, mudanças nos teores de ácidos fenólicos na fração solúvel impactaram de maneira significativa nos teores de aminos bioativas livres nesses grãos e que quando há aumento de espermidina em sorgos irrigados, houve aumento significativo da amida diferúlica e dicumárica correspondentes.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor* L., poliaminas, compostos funcionais, síntese de aminos conjugadas, atividade antioxidante.

ABSTRACT

PHENOLIC ACIDS AND FREE AND CONJUGATED BIOACTIVE AMINES IN SORGHUM: LEVELS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. This work aimed to evaluate the conditions of sorghum bioactive amines extraction, identify the profile and levels of phenolic acids, and free and conjugated bioactive amines in sorghum genotypes and to evaluate the antioxidant activity of these compounds. The best conditions for the extraction of free amines from sorghum were 420 µm particle size and 3 consecutive extractions with 5% TCA. Only PUT, CAD, SPD and SPM were detected in sorghum and the levels of polyamines detected indicated that this cereal is a significant source of polyamines, mainly in sorghum grown under normal hydric conditions. After seven days of sorghum germination, the levels of PUT increased significantly, SPD remained constant and SPM was detected in cotyledon and radicle of some genotypes. It was also found that the changes on the levels of amines during germination were not affected by the presence of tannin in the grain. Among phenolic acids investigated, coumaric and ferulic acids were present in all studied lines, ferulic being the prevalent. More than 90% of the hydroxycinnamic acids were present in the pericarp. In relation to conjugated amines, derivatives of SPM were prevalent, followed by derivatives of SPD. Some genotypes of sorghum showed significant antioxidant activity by means of DPPH, ABTS and Rancimat®. For irrigated sorghum, the changes on the levels of phenolic acids in the soluble fraction affected significantly the levels of free amines in these grains. Linear regression studies indicated that when SPD levels increased, the levels of the corresponding diferulic and dicoumaric amides also increased.

Key Words: *Sorghum bicolor* L., polyamines, bioactive compounds, conjugated amines synthesis, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido o interesse pelas propriedades antioxidantes de vegetais devido ao fato dos radicais livres estarem relacionados a diversas doenças e ao processo de envelhecimento. As diferentes formas de oxigênio reativo provocam danos que incluem a mutação do DNA, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer, diabetes, arteriosclerose, inflamações e ao envelhecimento precoce (SILVA et al., 2005). Assim, o estudo da atividade antioxidante de espécies de plantas, especialmente daquelas que representam papel relevante na dieta humana ou animal, tem grande perspectiva de aplicação na promoção e na manutenção da saúde humana.

Diversos estudos sobre a atividade antioxidante de compostos fenólicos e de poliaminas livres têm sido relatados. Sabe-se que nos vegetais, grande parte das poliaminas não se encontra livre, mas sim conjugadas a ácidos hidroxicinâmicos, como aos ácidos cumárico, ferúlico e caféico. Além da conjugação dessas poliaminas regular o nível de amins livres nos vegetais, alguns estudos já demonstraram a capacidade das poliaminas de potencializar a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos a elas conjugados, aumentando a resistência dos vegetais ao estresse biótico e abiótico (WALTERS, 2003; CHOI et al., 2007; ALCÁZAR et al., 2010).

As amins bioativas ou biologicamente ativas são bases nitrogenadas de baixo peso molecular que exercem importantes funções metabólicas e fisiológicas em microrganismos, vegetais e animais. Comumente são classificadas com base na função fisiológica que exercem. As amins biogênicas são aquelas psicoativas, neuroativas ou vasoativas. Geralmente são formadas em proteinaceos e/ou em alimentos fermentados (GLÓRIA, 2005). Já as poliaminas são aquelas que desempenham importantes funções no metabolismo celular, no crescimento e diferenciação de organismos vivos, na resposta ao estresse, na estabilização de membranas, na maturação do trato gastrointestinal (WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005). Também a propriedade antioxidante de algumas poliaminas tem sido comprovada (BÉLLE

et al., 2004; MENDONÇA, 2009; KALAC, 2014). Nessa classificação, se enquadram as poliaminas espermina e espermidina.

Alguns trabalhos já demonstraram quantidades expressivas de poliaminas em cereais gramináceos da mesma família do sorgo, como o milho, o trigo e o arroz (CIPPOLA et al., 2007; CAO et al., 2010; MOHAMED et al., 2011). Há trabalhos que também comprovaram a presença de conteúdos expressivos de ácidos hidroxicinâmicos em sorgo (HAHN et al., 1983, SEVESSON et al., 2010; AFIFY et al., 2012; CHIREMBA et al., 2012; LUTHRIA & LIU, 2013). Como já descrito, a conjugação de ácidos fenólicos às aminas aumenta a capacidade antioxidante destes compostos. CHOI et al. (2007) isolaram as seguintes amidas de farelo de milho: dicumaroilputrescina (DCP), diferuloilputrescina (DFP) e cumariolferuloilputrescina (CFP) e comprovaram o potencial desses compostos como antioxidantes e antimelanogênicos. No entanto, não existem estudos que determinam aminas livres e aminas conjugadas a ácidos fenólicos em sorgo.

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é um cereal gramináceo que, em termos de produção, se destaca como o quinto cereal mais importante do mundo, superado apenas pelo trigo, arroz, milho e cevada. Pode ser cultivado em ambientes muito secos, onde a produtividade de outros cereais é antieconômica. Devido a essa facilidade de produção em regiões tropicais como na Índia e em países africanos, o sorgo é um cereal bastante produzido e utilizado na alimentação humana (DICKO et al., 2006). Em outras regiões, este cereal tem sido empregado basicamente na alimentação animal. No entanto, no Japão, China e EUA, o sorgo vem sendo processado também para a fabricação de massas alimentícias e produtos de panificação (AWIKA & ROONEY, 2004; DICKO et al., 2006). Além disso, por ser considerado fonte potencial de compostos bioativos (AWIKA & ROONEY, 2004, DYKES et al., 2005; DYKES & ROONEY, 2006), há diversos programas de melhoramento genético, principalmente desenvolvidos pela *Texas A&M University*, que visam selecionar genótipos de sorgo a fim de aumentar o uso do cereal na alimentação humana (AWIKA et al., 2005; AWIKA et al., 2009). No Brasil, apesar do crescimento da produção deste cereal, o sorgo ainda não foi incorporado pela indústria de alimentos. No entanto, diversos trabalhos de

pesquisa vêm sendo realizados pela Embrapa Milho e Sorgo ou em parceria com essa instituição, com o objetivo de avaliar o potencial dos genótipos brasileiros para emprego na alimentação humana (MORAES et al., 2012a e 2012b; QUEIROZ et al., 2014; CARDOSO et al., 2015).

Devido à escassez de pesquisas de identificação de amins livres e conjugadas em sorgo, e ainda por se acreditar que genótipos de sorgo introduzidos no Brasil também sejam fontes de compostos bioativos, além da facilidade de cultivo desse cereal em território brasileiro, esse estudo tem o propósito de identificar e caracterizar ácidos fenólicos, amins bioativas livres e conjugadas em genótipos introduzidos no Brasil e avaliar a atividade antioxidante desses compostos frente a diferentes modelos.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral determinar os perfis e teores de ácidos fenólicos, e de amins livres e conjugadas em diferentes genótipos de sorgo, além de investigar o potencial antioxidante dos respectivos extratos metanólicos e das amins livres e conjugadas.

Os objetivos específicos foram:

i) investigar a influência da granulometria do sorgo moído, do tipo de ácido extrator e do número de extrações sucessivas, na recuperação simultânea de dez amins bioativas livres (histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, feniletilamina, agmatina, espermidina, espermina, serotonina e triptamina) em amostras de sorgo; além de determinar o perfil e os teores de amins bioativas em alguns genótipos de sorgo desenvolvidos pela Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil;

ii) investigar o efeito da germinação em genótipos de sorgo com e sem tanino no perfil e teores de amins bioativas em diferentes partes da plântula;

iii) identificar e quantificar, através de cromatografia líquida de alta eficiência, os ácidos caféico, cumárico, ferúlico e sinápico em genótipos de sorgo cultivados em ambientes com e sem estresse hídrico;

iv) determinar os tipos e teores de poliaminas conjugadas em genótipos de sorgo;

v) avaliar a atividade antioxidante de amins, de ácidos hidroxicinâmicos, de amins conjugadas, quimicamente sintetizadas e de extratos metanólicos provenientes de sorgo, frente ao radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), frente ao radical [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (ABTS) e o poder desses compostos de reduzirem o ferro e o íon molibdênio, além de correlacionar os teores de amins conjugadas, ácidos fenólicos e amins livres nos extratos de sorgo com o potencial antioxidante; avaliar também a capacidade de ácidos hidroxicinâmicos, de amins conjugadas, quimicamente sintetizadas, e de extratos metanólicos provenientes de sorgo, em inibir a oxidação de óleo de soja, determinada em equipamento Rancimat® e

comparar a atividade antioxidante desses compostos com antioxidantes tradicionais, o butil hidroxitolueno (BHT) e o butil hidroxianisol (BHA), associados.

Para justificar estes objetivos, inicialmente foi apresentada, uma revisão da literatura apresentando o estado de arte da temática. Em seguida, cada objetivo específico gerou um experimento apresentado na forma de capítulo.

REVISÃO DE LITERATURA

1 SORGO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Fig.1) é um cereal gramináceo, pertencente à família *Poaceae* e originário da África ou Ásia. Quanto à produção, é um dos cereais mais importantes do mundo, superado apenas pelo trigo, arroz, milho e cevada (DICKO et al., 2006).



Figura 1. Foto ilustrativa do *Sorghum bicolor* (L.). Fonte: Dicko et al. (2006).

Os principais produtores mundiais de sorgo são os EUA, sendo também bastante cultivado na África (Nigéria, Sudão), Ásia (Índia e China), México, Argentina, Brasil e Austrália (DUARTE, 2011). Na África e na Índia, o sorgo é base alimentar da população por ter um aporte considerável de proteína e calorias e por ser uma cultura tolerante a condições ambientais secas e

quentes, onde o cultivo de outros cereais é antieconômico (TAYLOR & TAYLOR, 2011).

No Brasil, o sorgo foi introduzido no início do século XX, mas, desde então, tem sido visto como uma cultura marginal e, portanto, com dificuldades para ser comercializado, pelo fato do sorgo ser identificado como substituto do milho na elaborações de ração animal. Por esse motivo seu preço fica atrelado a este cereal ou é considerado de baixa qualidade por questões de preconceito ou falta de informação (DUARTE, 2011).

No entanto, de 2005 a 2013 houve um crescimento do cultivo do sorgo em termos de área total plantada, produção e rendimento médio anuais, sendo que a produção nacional da safra de 2012/13 foi de 2,1 milhões de toneladas. Praticamente todos os estados brasileiros produzem o cereal, com destaque para Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais, os quais são responsáveis por mais de 70% da área plantada com sorgo e por mais de 85% da produção nacional (Fig. 2) (CONAB, 2014).

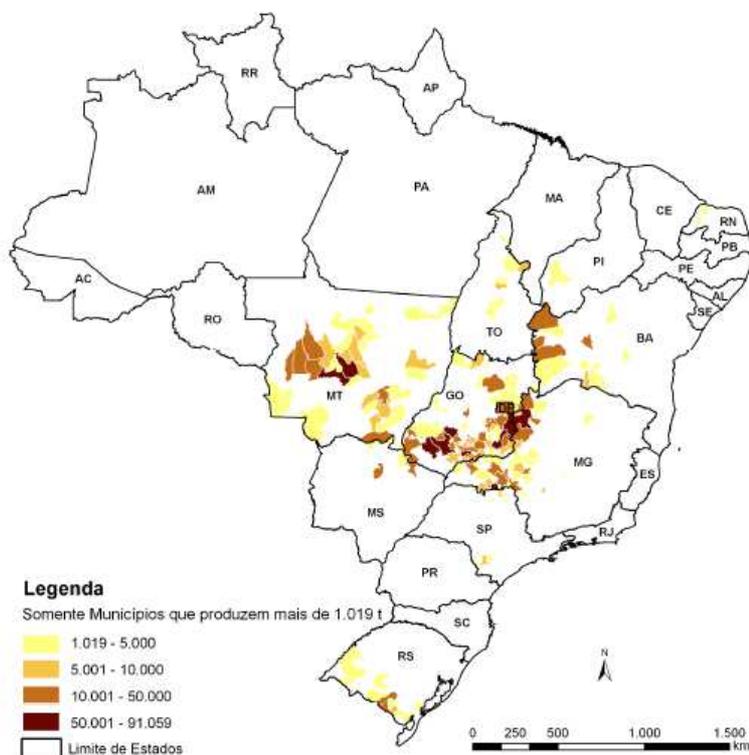


Figura 2. Produção agrícola de sorgo no Brasil. Fonte: CONAB (2014).

Segundo Duarte (2011), o crescente aumento das áreas plantadas com sorgo no Brasil se deve à criação, no início dos anos noventa, do Grupo Pró-

Sorgo, constituído por representantes de diversos setores, com o intuito de fomentar a produção de sorgo no país, por meio da divulgação das potencialidades da cultura e de tecnologias de produção. Aliado a isso, também foi importante o emprego do sistema de produção de plantio direto nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde o cereal foi utilizado em sistema de rotação com a soja e na produção de boa palhada necessária ao sistema. De outra forma, a maior tolerância do sorgo à seca reduz o risco do plantio no final do período chuvoso, sendo empregado para a produção da safra de inverno (segunda safra ou safrinha), resultando na maior oferta do grão em períodos de entressafra do milho, principalmente na região central do Brasil.

O principal destino da produção de sorgo é a alimentação animal, sendo a forragem empregada na nutrição de ruminantes e os grãos, na produção de ração (DICKO et al., 2006). Além da África e da Índia, onde o sorgo é consumido por mais de 300 milhões de pessoas, outros países como os EUA, Japão e China vêm empregando esse cereal em produtos de panificação, massas alimentícias e “snacks”, sendo que nos EUA ele é bastante utilizado em produtos para celíacos, pelo fato de não conter glúten (AWIKA & ROONEY, 2004; DICKO et al., 2006; TAYLOR et al., 2006). Ainda nos EUA, o sorgo preto, rico em tanino, tem sido direcionado a um mercado específico, preocupado com a saúde, devido à alta concentração de antioxidantes (TAYLOR et al., 2006).

Na elaboração de alimentos, o sorgo apresenta também vantagens sensoriais, pois a sua coloração não impacta negativamente na aparência dos produtos e ainda possui sabor neutro, diferentemente de outros cereais, como o milho, por exemplo. Além disso, por ser considerado fonte potencial de compostos bioativos (AWIKA & ROONEY, 2004; DYKES et al., 2005; DYKES & ROONEY, 2006), há diversos programas de melhoramento genético, com destaque para os trabalhos desenvolvidos pela *Texas A&M University*, que objetivam selecionar genótipos de sorgo visando aumentar o uso do cereal na alimentação humana (AWIKA et al., 2005; AWIKA et al., 2009). No Brasil, apesar do crescimento da produção deste cereal, o sorgo ainda não foi incorporado pela indústria de alimentos. No entanto, diversos trabalhos de pesquisa vêm sendo realizados pela Embrapa Milho e Sorgo ou em parceria

com essa instituição, com o objetivo de avaliar o potencial de genótipos introduzidos no Brasil para emprego na alimentação humana.

1.2 ASPECTOS NUTRICIONAIS

O valor nutricional do sorgo varia muito entre as cultivares e é semelhante aos do milho e do trigo, sendo uma boa fonte de energia, carboidratos, proteína, vitaminas e minerais. O valor energético total da farinha de sorgo é, em média, 350 kcal/100 g. O amido é o principal componente do grão de sorgo, correspondendo a cerca de 80% de sua composição nutricional (DICKO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2011). As fibras correspondem a mais de 6%, as quais são constituídas basicamente de arabinoxilanas, β -glucanas e lignanas (DICKO et al., 2006).

O teor em proteínas situa-se entre 7 e 15%, sendo o perfil de aminoácidos bastante variável entre as cultivares, por influência genética e do local de plantio. No entanto, as proteínas de sorgo são deficientes em arginina, glicina, tirosina, metionina e, principalmente, em lisina (QUEIROZ et al., 2011; MORAES et al., 2012b).

Além disso, as proteínas do sorgo podem apresentar baixa digestibilidade, devido a dois fatores: interação, principalmente com taninos, e possibilidade de polimerização das kafirinas após cocção do cereal (DUODU, et al., 2003; MORAES et al., 2012b). De acordo com a classificação mais simplificada e baseada na solubilidade, as proteínas dos grãos de sorgo são divididas em kaferinas (prolaminas) e não kaferinas, que representam as albuminas, globulinas e glutelinas. As kafirinas perfazem cerca de 70 a 80% do total de proteínas dos grãos (WONG et al., 2009). Estas são mais hidrofóbicas, o que facilita a formação de ligações dissulfeto intermoleculares, reduzindo a digestibilidade proteica. Após cocção úmida do sorgo, a conformação proteica é desfeita e a formação de ligações de dissulfeto se torna mais intensas reduzindo ainda mais a digestibilidade (DUODU et al., 2003; WONG et al., 2009).

Os taninos são compostos fenólicos presentes em alguns genótipos de sorgo. Estes compostos funcionam como fator de proteção contra o ataque pragas e pássaros na lavoura. Mas em termos nutricionais, são capazes de complexarem com proteínas, reduzindo em cerca de 5 a 30% a eficiência da digestão proteica (DYKES & ROONEY, 2006). No entanto, em todo o mundo, cultivares sem tanino têm sido desenvolvidas e comercializadas.

Vale destacar que estudos *in vitro* demonstraram deficiência em lisina, mas ao contrário do que se previa, o tratamento térmico dos cereais aumentou a digestibilidade proteica (MORAES et al., 2012b). Ainda, trabalhos de Taylor e Taylor (2011) sobre alimentos processados com sorgo modificado geneticamente, nos quais houve supressão de kaferinas, demonstraram aumento da digestibilidade proteica.

Quanto aos lipídios, estes representam cerca de 3% da composição nutricional. As concentrações dos principais ácidos graxos variaram de 31,1 a 48,9% de ácido oleico; 0,4 a 0,6% de palmitoleico; 27,6 a 50,7% de ácido linoleico; 1,7 a 3,9% de linolênico; 1,0 a 2,6% de esteárico e 11,7 a 20,2% de palmítico (QUEIROZ et al., 2011).

O sorgo também é rico em vitaminas do complexo B e vitaminas lipossolúveis e fonte de minerais como fósforo, potássio, enxofre, magnésio, zinco e cobre (DICKO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2011).

1.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Além da composição nutricional, diversos estudos têm apontado os benefícios à saúde promovidos pelos compostos bioativos dos grãos de sorgo, principalmente devido a elevada capacidade antioxidante (AWIKA & RONNEY, 2004; DYKES & ROONEY, 2006). Os compostos bioativos do sorgo incluem taninos condensados, 3-deoxiantocianinas, ácidos fenólicos, fitostéroides e policosanóis (AWIKA et al., 2005). Os teores de compostos bioativos em sorgo variam de acordo com o genótipo e com as condições de cultivo. Geralmente, os sorgos de pericarpo preto apresentam os teores mais elevados de compostos fenólicos, seguidos pelos sorgos de pericarpo vermelho, bronze e amarelo (DICKO et al., 2005; DYKES et al., 2005).

As antocianinas estão presentes em grande quantidade no pericarpo dos grãos de sorgo. As mais comuns no sorgo são as 3-deoxiantocianidinas, mais especificamente, a luteolinidina e a apigeninidina, encontradas em maiores quantidades em sorgos de pericarpo preto e avermelhado (AWIKA et al., 2004). Esses compostos, por não conterem uma hidroxila na posição 3 do anel C, apresentam boa estabilidade em diferentes valores de pH, o que permite o seu emprego como corantes naturais em alimentos (DYKES et al., 2005).

As 3-deoxiantocianidinas podem estar na forma metoxilada ou não metoxilada. Taleon et al. (2012) relataram que as formas metoxiladas têm apresentado forte atividade anticancerígena. Os pesquisadores encontraram em sorgo de pericarpo preto, níveis de 3-deoxiantocianidinas variando de 2,51 a 8,04 mg/100 g de sorgo.

Os taninos estão presentes no sorgo de testa pigmentada e estão na forma de taninos condensados. Os teores desses compostos variam entre as cultivares em valores próximos de 33 a 49 mg equivalente de catequina em grãos integrais, sendo que em grãos descortificados, esses valores são reduzidos em até 90%. Quanto à capacidade de inativar radicais livres, certamente grãos com tanino possuem maior atividade antioxidante (DLAMINI et al., 2007). Vale destacar que grande parte dos genótipos de sorgo produzidos nos EUA não possui tanino. No entanto, os sorgos com tanino são menos atacados por pássaros na lavoura e, portanto, a presença de tanino funciona como um controle natural de pragas.

Os ácidos fenólicos em sorgo podem estar na forma livre ou conjugada e incluem principalmente os ácidos ferúlico, cumárico, caféico e sinápico (HAHN et al., 1983; AFIFY et al., 2012a; CHIREMBA et al., 2012). Hahn et al. (1983) separaram no sorgo os ácidos fenólicos livres e conjugados e verificaram que o sorgo castanho continha uma maior quantidade de ácidos fenólicos em comparação com os grãos de pericarpo branco e amarelo. Chiremba et al. (2012) verificaram que sorgo duro também possui maior conteúdo de ácidos fenólicos em comparação com o sorgo macio. Nos estudos conduzidos por esses pesquisadores, os teores de ácidos fenólicos totais em sorgos sem tanino e de pericarpo vermelho foram em média de 41,40 mg/100 g de farelo de sorgo de pericarpo duro e de 27,11 mg/100 g de farelo de sorgo de

pericarpo macio. Na farinha refinada, ou seja, sem farelo, esses valores foram de 1,73 mg/100 g de farinha proveniente de sorgo duro e 1,24 mg/100 g de farinha proveniente de sorgo macio.

A correlação entre os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante ainda é controversa. Em alguns casos a literatura considera não haver esta correlação (MORAES, 2011), no entanto, em outros, houve correlação positiva. Os sorgos que possuem tanino apresentam alto poder antioxidante *in vitro* (DYKES et al., 2005; DLAMINI et al., 2007) e apresentam boa eficiência biológica, pois mesmo complexados com proteínas mantém 50% de sua atividade antioxidante (MORAES, 2011). Já os sorgos de pericarpo preto sem tanino e com expressiva quantidade de antocianinas, também apresentam boa atividade antioxidante (AWIKA et al., 2004). No entanto, o que merece destaque é o fato de alguns genótipos sem tanino e com baixos teores de compostos fenólicos apresentarem alta atividade antioxidante (MORAES, 2011).

A atividade antioxidante de extratos orgânicos de sorgo por meio de testes químicos tem sido relatada em vários estudos. Dykes e Rooney (2006) compararam a atividade antioxidante, por meio do teste ORAC (capacidade de absorver radicais de oxigênio), de sorgos com tanino e sem tanino com pericarpo preto, vermelho e branco e compararam com extratos de frutas e legumes (Tabela 1). Os resultados mostraram atividades antioxidantes expressivas dos extratos de farelo e farinha integral de sorgo com tanino, assim como dos extratos de farelo de sorgo preto e vermelho. No entanto, as atividades antioxidantes dos extratos de farinha integral desse cereal foram semelhantes ou até maiores que a de várias frutas e hortaliças.

Testes antioxidantes de extratos orgânicos de sorgo, com o radical ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico], comprovaram que os extratos de farelo de sorgo vermelho têm maior poder antioxidante que os dos extratos de sorgo branco e estes maiores que os dos extratos de farinha integral dos respectivos grãos de pericarpo vermelho e branco (AWIKA et al., 2005; CARBONNEAU et al., 2014). Da mesma forma, as pesquisas de Dlamini et al. (2007) com radicais ABTS e DPPH indicaram que a atividade antioxidante de extratos de farinha integral de sorgo foi maior que a de farinha refinada e

que essa atividade foi maior nos sorgos com tanino em comparação com os sorgos sem tanino, indicando que os compostos antioxidantes estão mais concentrados no pericarpo dos grãos e que os taninos possuem uma expressiva atividade antioxidante, fato que também é confirmado por Awika et al. (2003 e 2005), Dlamini et al. (2007) e Barros et al. (2013).

Tabela 1. Atividade antioxidante pelo método ORAC de farelo e farinha de sorgo comparado com algumas frutas e hortaliças

Alimento	ORAC ($\mu\text{mol TE}^*/\text{g}$, peso seco)
Farinha integral de sorgo com tanino	868
Farelo de sorgo com tanino	3124
Farinha integral de sorgo com pericarpo preto	219
Farelo de sorgo com pericarpo preto	1008
Farinha integral de sorgo com pericarpo vermelho	140
Farelo de sorgo com pericarpo vermelho	710
Farinha integral de sorgo com pericarpo branco	22
Farelo de sorgo com pericarpo branco	64
Mirtilo	842
Morango	402
Ameixa	495
Maçã	295
Laranja	137
Brocoli	173
Cenoura	108
Cebola roxa	93

*TE: Equivalente Trolox. Fonte: DYKES e ROONEY (2006).

Vários estudos com extratos ou produtos derivados de sorgo têm comprovado a capacidade de diminuir os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), atividade protetora contra doenças cardiovasculares (CARR et al., 2005), obesidade (AWIKA & ROONEY, 2004) e alguns tipos de câncer, especialmente, do sistema gastrointestinal (TURNER et al., 2006; AWIKA et al., 2009; YANG et al., 2012) e ainda a capacidade de inibir o processo inflamatório decorrente de doenças degenerativas (CHUNG et al., 2011).

No entanto, no Brasil, são praticamente inexistentes na literatura, informações sobre compostos bioativos de grãos de diferentes genótipos de sorgo produzidos no país.

1.4 SORGO GERMINADO

A germinação do sorgo é uma prática comum em países africanos. Os grãos germinados são empregados em alimentos para crianças em fase de desmame, na fabricação de cervejas e de pratos tradicionais, como o “*Hullu-Murr*” (ELKHALIFA & BERNHARDT, 2010). O processo de germinação é realizado fazendo inicialmente a imersão das sementes de sorgo em água por cerca de 24 h. Em seguida, as sementes são germinadas durante 72 h a temperatura ambiente. Depois de secos, a radícula e as folhas são manualmente removidas e o cotilédone moído (AFIFY et al., 2012b).

Como dito anteriormente, uma das limitações do uso do sorgo na alimentação humana está relacionado, principalmente, à indigestibilidade de suas proteínas, especificamente das kafirinas. A germinação é, portanto, uma alternativa tecnológica, pois desencadeia processos enzimáticos, levando à degradação de proteínas, carboidratos e lipídios em formas mais simples, aumentando, assim, a biodisponibilidade dos nutrientes (ELKHALIFA & BERNHARDT, 2010). Trabalhos têm sido publicados demonstrando a melhoria na qualidade proteica após a germinação do sorgo devido a maior solubilidade das proteínas, a maior quantidade de aminoácidos livres e a diminuição das kaferinas ligadas as gluteninas (AFIFY et al., 2012b). Além disso, a germinação melhora as propriedades funcionais da farinha de sorgo, promovendo maior estabilidade e maior capacidade de gelificação e de emulsificação (ELKHALIFA & BERNHARDT, 2010).

Pesquisas de Omary et al. (2012) demonstraram que os teores de nutrientes, compostos bioativos e antinutrientes em cereiais germinados variam com a espécie de cereal, com o tempo e a técnica de germinação. Embora os estudos sejam divergentes, há relatos de diminuição nos teores de proteínas em sorgo germinado por 72 h ou mais. Estes autores atribuem a diminuição de proteínas à perda de compostos nitrogenados durante a imersão e enxágue em

água, etapas normalmente realizadas previamente à germinação. Por outro lado, em cinco dias de germinação, a digestibilidade de carboidratos é aumentada em seis vezes e o conteúdo de aminoácidos livres em quatro vezes (CORREIA et al., 2008). Especificamente em espécies de *Sorghum bicolor* há um considerável aumento de minerais, inclusive com a maior biodisponibilidade de zinco e ferro (AFIFY et al., 2011). O conteúdo de antinutrientes como ácido fítico e tanino diminui durante o período de germinação (AFIFY et al., 2011; OMARY et al., 2012). No entanto, em períodos longos, há aumento de ácido cianídrico, devido à degradação de glicosídeos cianogênicos. Quanto aos teores de polifenóis, há aumento considerável em algumas espécies e em outras, decréscimo (OMARY et al., 2012). Porém, segundo Dicko et al. (2005), o conteúdo de fenólicos totais não é afetado com a germinação.

2 AMINAS BIOATIVAS

2.1 DEFINIÇÃO

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são compostos orgânicos nitrogenados que exercem importantes funções metabólicas e fisiológicas em microrganismos, vegetais e animais (GLÓRIA, 2005). São bases nitrogenadas de baixo peso molecular nas quais os hidrogênios da amônia são mono-, di- ou tri-substituídos por um grupo alquila, resultando, respectivamente, nas aminas primárias, secundárias ou terciárias.

As aminas podem ser classificadas de diferentes formas. De acordo com a quantidade de grupos amina, podem ser classificadas como monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina) ou, ainda, poliaminas, como a espermina, espermidina e agmatina (Fig. 3). Com relação à estrutura química, as aminas bioativas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina, triptamina e serotonina). Algumas aminas cíclicas

podem ser classificadas ainda como indolaminas (serotonina), e como imidazolaminas (histamina).

De acordo com GLÓRIA (2005), as amins bioativas também podem ser classificadas, de acordo com a via biosintética, em amins naturais, aquelas que são formadas durante a síntese *de novo*, ou seja, quando são requeridas no sistema vegetal ou animal. Podem também ser classificadas como biogênicas, sendo aquelas formadas pela descarboxilação de aminoácidos ou pela aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas. Como exemplos das amins naturais podem-se citar a espermina, espermidina e putrescina. A histamina é uma amina natural presente nos mastócitos dos tecidos conjuntivos ou nos basófilos sanguíneos. Pode também ser uma amina biogênica, quando resulta, por exemplo, da ação de bactérias ácido lácticas de vinhos (PRESTES et al., 2007).

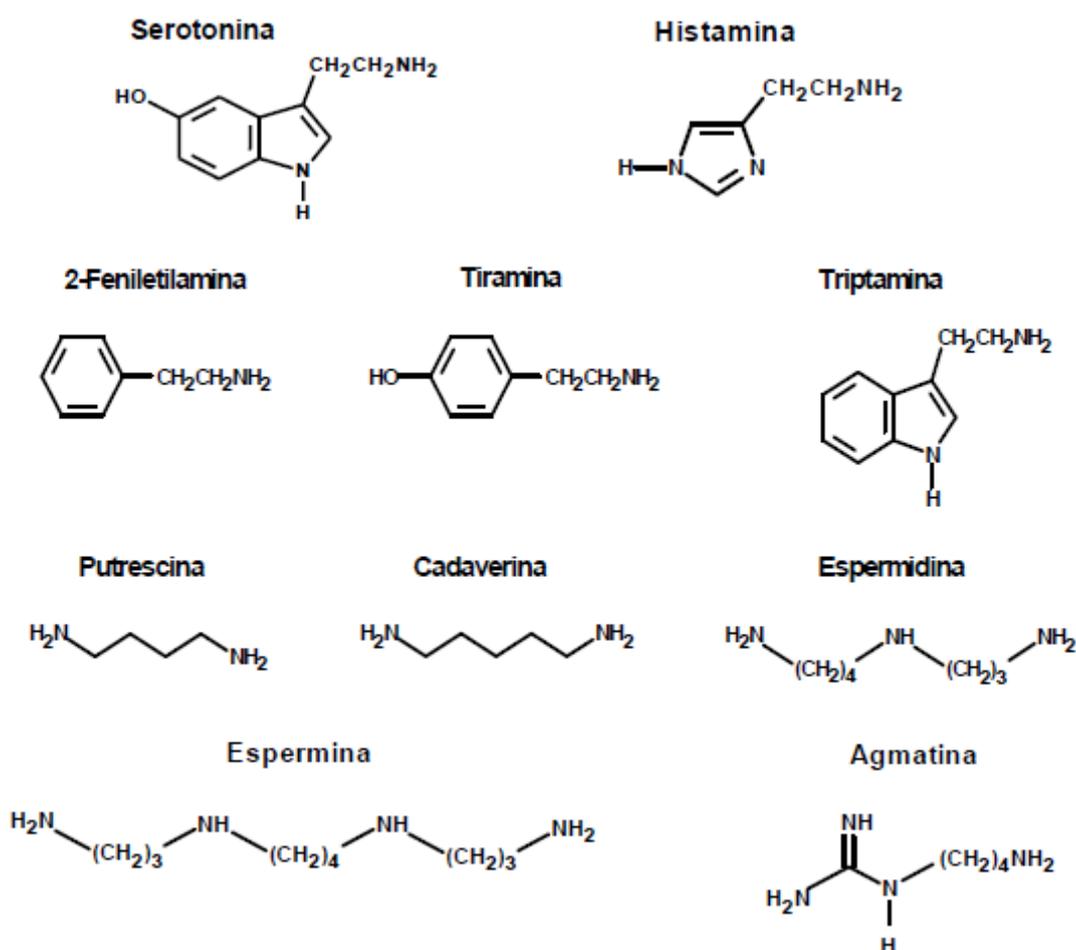


Figura 3. Estrutura química de algumas amins bioativas. Fonte: GLÓRIA (2005).

No entanto, a classificação mais usual das aminas bioativas é baseada na função fisiológica que exercem. Assim, as biogênicas são aquelas psicoativas, neuroativas ou vasoativas, e as poliaminas são aquelas que desempenham uma importante função no metabolismo celular, no crescimento e diferenciação de organismos vivos (GLÓRIA, 2005).

Além das formas livres, uma variedade de aminas conjugadas tem sido determinada em espécies vegetais. A conjugação entre ácidos hidroxicinâmicos, especificamente os ácidos caféico, ferúlico e cumárico com a diamina putrescina e com as poliaminas, espermidina e espermina, são as mais abundantes no reino vegetal, ocorrendo preferencialmente nos órgãos reprodutivos e sementes (BOUCHEREAU et al., 1999).

2.2 FORMAÇÃO

Algumas aminas biogênicas não são de ocorrência natural, pois podem originar da descarboxilação enzimática de aminoácidos conduzida por microrganismos intencionalmente inoculados no alimento, ou por microrganismos deterioradores, resultante da contaminação do produto. Desta forma, alguns pré-requisitos são indispensáveis para a sua ocorrência, como a presença de aminoácidos livres como substratos da reação, a presença de microrganismos descarboxilase positivos e condições propícias ao crescimento bacteriano e à atividade da enzima (GLÓRIA, 2005).

A biossíntese de aminas biogênicas ocorre através da descarboxilação de aminoácidos por meio de reações dependentes da coenzima piridoxal fosfato (PLP). Inicialmente ocorre a formação de uma imina entre o carbono aldeídico do piridoxal fosfato e o nitrogênio do aminoácido. Após a descarboxilação do composto formado, a imina é hidrolisada para a formação da amina e o PLP é reconstituído (Fig. 4). Essa reação é típica da síntese da histamina a partir da histidina e da tiramina a partir da tirosina (Fig. 5).

Da mesma forma, a triptamina é formada a partir do triptofano, a cadaverina da lisina e a agmatina da arginina (DEWICK, 2002; GLÓRIA, 2005). Pode-se destacar ainda que a descarboxilação de aminoácidos pode ser

realizada por enzimas de bactérias que contaminam os alimentos. Assim, a presença destes compostos no alimento pode determinar o grau de deterioração do alimento ou o nível de contaminação decorrente, por exemplo, de manipulação inadequada (GLÓRIA, 2005).

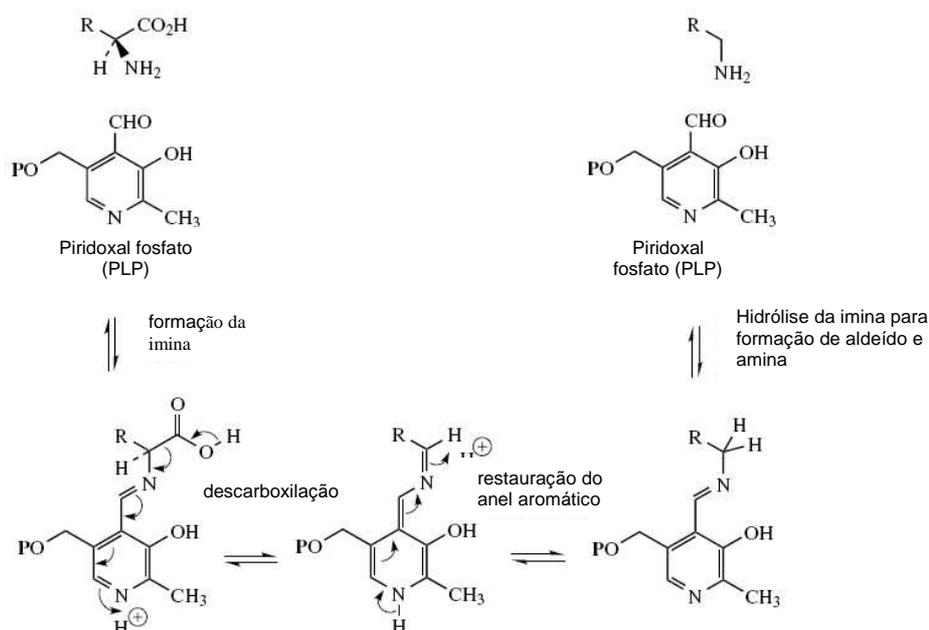


Figura 4. Reações envolvidas na síntese de aminas por meio da descarboxilação de aminoácidos utilizando a coenzima piridoxal fosfato (PLP).
Fonte: DEWICK (2002).

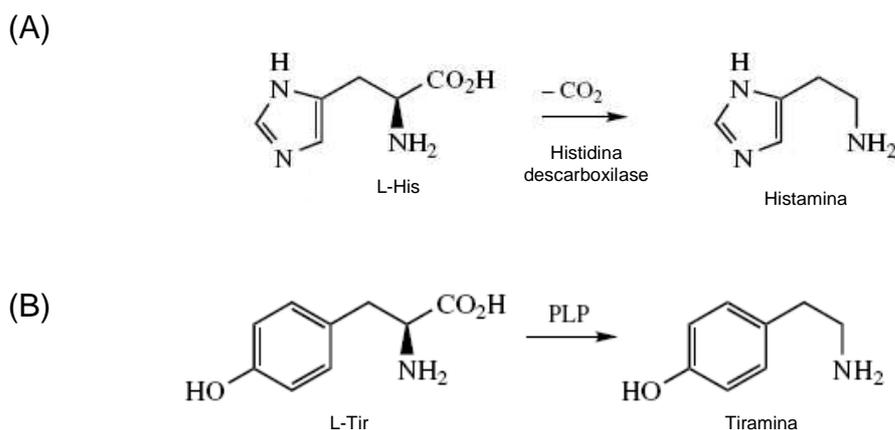


Figura 5. Formação da histamina (A) e da tiramina (B) por meio de descarboxilação dependente da coenzima piridoxal fosfato (PLP).
Fonte: DEWICK (2002).

De outro modo, a formação de amina pode ocorrer por meio da aminação de aldeídos conduzidas por transaminases aldeídicas (Fig. 6) (GLÓRIA, 2005).

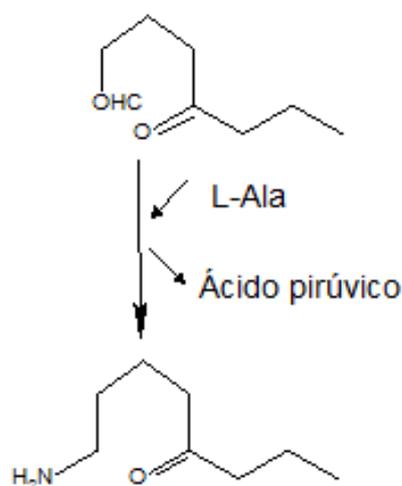


Figura 6. Formação de amina através de transaminação. Fonte: DEWICK (2002).

A biossíntese de poliaminas é um pouco mais complexa. Em animais e fungos, apenas uma via, leva a formação da putrescina, a descarboxilação da ornitina por meio da enzima ornitina descarboxilase (ODC; EC 4.1.1.17). Em alguns microrganismos e plantas, uma via alternativa para a produção de putrescina ocorre a partir da arginina, via arginina descarboxilase (ADC; EC 4.1.1.19), seguida da perda de dois grupos amino (Fig. 7) (WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005).

Para que ocorra a conversão de putrescina (PUT) em espermidina (EPD) e esta em espermina (EPM), uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases acontecem paralelamente (Fig. 7). A metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM) e, pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), forma a S-adenosil metionina descarboxilada, formando a EPD, pela espermidina sintase (EC 2.5.1.16), e, o mesmo grupamento à EPD formando a EPM, pela espermina sintase (EC 2.5.1.22) (WALTERS, 2003; GLÓRIA, 2005).

A regulação das poliaminas também é complexa e dependente de vários fatores. Em animais, a concentração intracelular é regulada pela síntese *de novo*, via ornitina descarboxilase e pela reconversão e degradação oxidativa de

poliaminas. A regulação extracelular é dependente das poliaminas originárias do lúmen intestinal via ingestão de alimentos ou via metabolitos originários das bactérias presentes no intestino grosso (GLÓRIA, 2005).

Em estudos de transgenia em plantas, verificou-se que o nível de putrescina nas células era dependente das expressões gênicas das enzimas ODC, ADC e SAMDC. WALTERS (2003) descreveu que o aumento da expressão dos genes que codificam a ODC e ADC leva a um aumento de putrescina, embora na maioria dos estudos, esse aumento de putrescina foi acompanhado por um pequeno incremento nos teores de espermidina e de espermina. Segundo este autor, isso sugere que os níveis de EPD e de EPM seguem uma regulação homeostática.

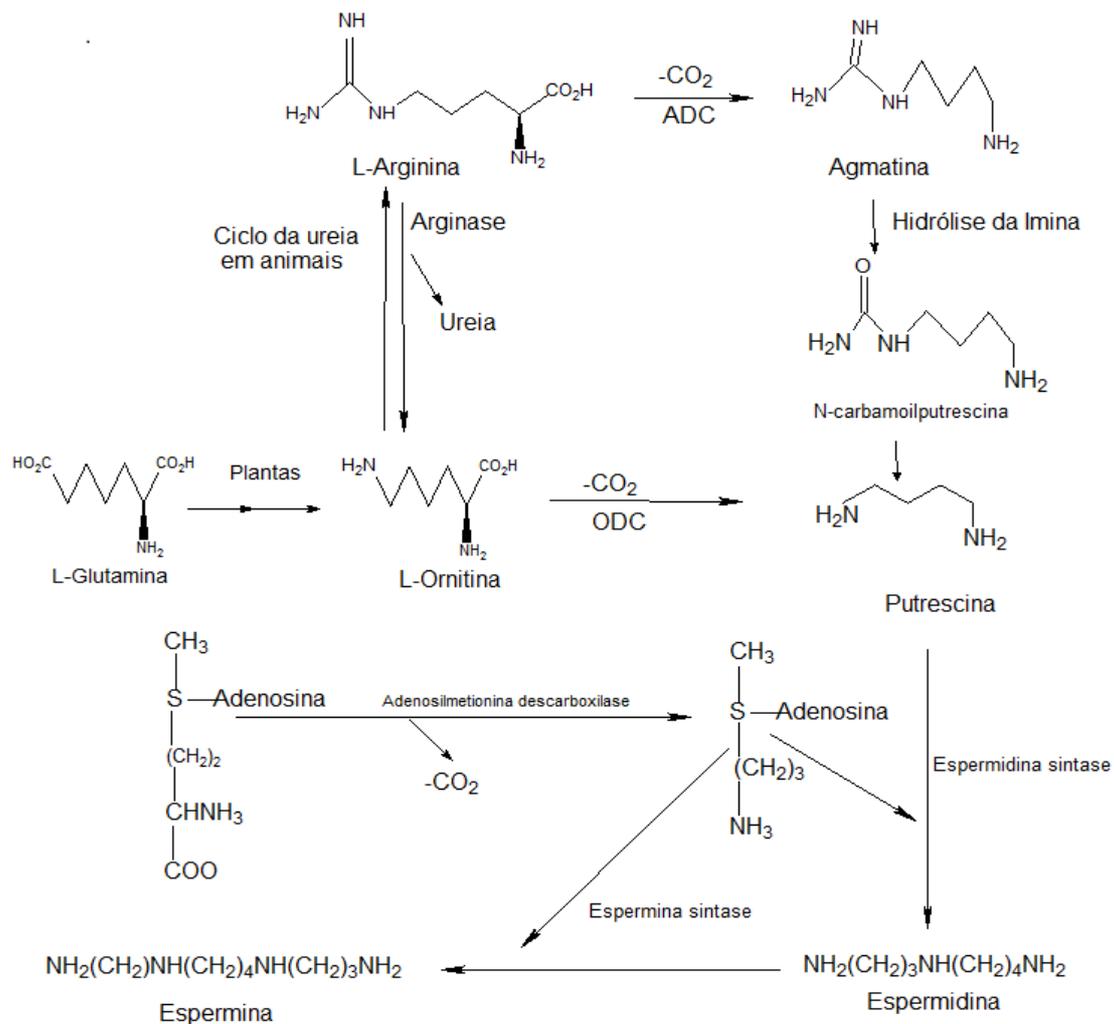


Figura 7. Biossíntese da putrescina, espermina e espermidina em plantas e animais. Fonte: Adaptado de DEWICK (2002) e WALTERS (2003).

Naka et al. (2010) demonstraram que algumas plantas não possuem o gene que expressa a enzima espermina sintase e assim essas plantas não sintetizam a espermina e sim um isômero, denominado de termoespermina.

2.3 CATABOLISMO DE AMINAS BIOATIVAS

Em muitos casos, a regulação do crescimento das plantas depende do *pool* de aminas livres, o que não está relacionado apenas com a sua síntese, mas também com vários outros processos, que incluem o catabolismo de aminas resultante da degradação oxidativa (deaminação), da conjugação e transporte das poliaminas (BOUCHEREAU et al., 1999). O catabolismo de aminas ingeridas na dieta se dá, de um modo geral, por meio de reações de acetilação e oxidação catalisadas pelo sistema enzimático (GLÓRIA, 2005).

No catabolismo de poliaminas, as poliaminas oxidases (PAO; EC 1.5.3.3) são as enzimas específicas para a degradação de poliaminas via oxidação do grupo amino secundário, tendo FAD como cofator. A degradação da EPD produz Δ_1 -pirrolina, 1,3-diaminopropano e peróxido de hidrogênio, enquanto que a oxidação da espermina produz 1,3-diaminopropano e peróxido de hidrogênio juntamente com 1,3-aminopropilpirrolina. Diaminopropano pode produzir β -alanina (Fig. 8).

Em relação à putrescina, a enzima diamina oxidase, DAO (EC 1.4.3.6) promove a deaminação dessa amina, podendo fazer o mesmo para a cadaverina. A putrescina é ciclizada a Δ_1 -pirrolina, com a perda de amônia e peróxido de hidrogênio e posteriormente a 4-aminobutiraldeído. Este pode ser oxidado para o ácido 4-aminobutírico (GABA) por uma dehidrogenase NAD pirrolina dependente (4ABD). Glória (2005) destacou que essa enzima tem sido encontrada em sistemas onde a atividade da DAO ou PAO está presente. O produto dessa reação pode ser transaminado e resultar no ácido succínico através do ciclo de Krebs (Fig. 8). Embora haja controvérsia, alguns estudos demonstram que pode haver também alguma conversão de EPD e EPM em putrescina por meio de acetilações das poliaminas promovidas pela espermidina/espermina N-1-acetiltransferase (NAT; EC 2.3.1.57). As

poliaminas acetiladas entram para o peroxissomo onde são oxidadas pela poliamina oxidase (PAO, EC 1.5.3.11) (GLÓRIA, 2005; KALAC, 2014).

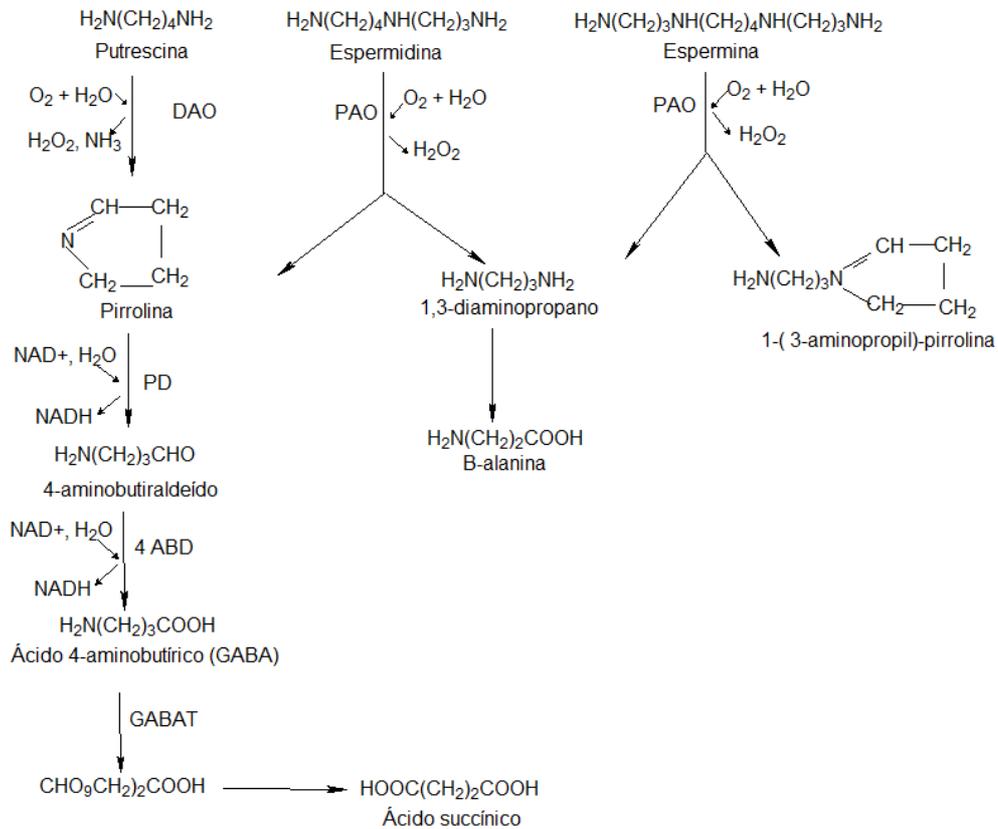


Figura 8. Catabolismo da putrescina e das poliaminas em plantas e animais. Fonte: GLÓRIA (2005).

2.4. FUNÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS

Muitas aminas biogênicas como a serotonina, feniletilamina, tiramina, histamina e triptamina fazem parte do metabolismo celular de humanos, desempenhando várias atividades fisiológicas, como controle da temperatura corporal e do volume estomacal (BARDÓCZ, 1995). A histamina e a serotonina exercem funções no sistema nervoso central pela ação nos neurotransmissores. São também vasoativas, pois agem diretamente ou indiretamente no sistema vascular. Já outras aminas biogênicas, como a tiramina, triptamina e feniletilamina, causam um aumento da pressão sanguínea pela constrição do sistema vascular, aumento da frequência cardíaca e da força de contração do coração (GLÓRIA, 2005). Nos vegetais,

as aminas biogênicas exercem a função de proteção da planta contra predadores (VIEIRA et al., 2007).

Outra classe de aminas bioativas, as poliaminas, estão envolvidas em inúmeros processos celulares, como na divisão e diferenciação celular, na síntese de ácidos nucléicos e proteínas, na estabilidade de membrana, na estabilização de radicais livres, na resposta ao estresse e no prolongamento da fase de senescência em frutas e vegetais (BARDÓCZ, 1995; VALERO et al., 2002; MOHAMED et al., 2011; KALAC, 2014). As poliaminas são importantes no crescimento de organismos vivos devido à interação que exercem com moléculas de DNA, RNA e proteínas, regulando e estimulando a síntese destes compostos. Podem controlar e inibir a translação e regulação destes compostos, estimular a associação da subunidade ribossômica e a síntese de RNA e DNA, e reduzir a taxa de degradação do RNA (GLÓRIA, 2005).

As poliaminas também são importantes na estabilidade das membranas celulares. O efeito protetor do leite materno para o intestino de recém-nascidos pode ser explicado pelo seu alto conteúdo de poliaminas. Foi comprovado que a maturação do epitélio intestinal de recém-nascidos é dependente do aumento das taxas de ornitina descarboxilase, da atividade de S-adenosil-L-metionina descarboxilase e da quantidade de putrescina, e das poliaminas espermidina e espermina. As poliaminas reduzem a permeabilidade de macromoléculas, como proteínas, na mucosa intestinal, prevenindo reações alérgicas, o que facilita o processo de maturação do intestino e do sistema imunológico dos recém-nascidos (GLÓRIA, 2005).

O poder antioxidante de algumas poliaminas também tem sido descrito em várias pesquisas (BELLÉ et al., 2004; GLÓRIA, 2005, KALAC, 2014). A espermina e espermidina têm sido indicadas como queladoras de radicais livres (MENDONÇA, 2009) e inibidoras da peroxidação lipídica (BELLÉ et al., 2004).

Entretanto, a função mais importante das poliaminas é agir na modulação da atividade de vários mensageiros intracelulares, como os hormônios e fatores de crescimento, o que as tornam indispensáveis para o metabolismo do organismo humano (BARDÓCZ, 1995; GLÓRIA, 2005). As necessidades de poliaminas são altas nos períodos de crescimento dos tecidos. Por exemplo,

nas fases de crescimento rápido de crianças e adolescentes, na recuperação pós-cirúrgica, na cicatrização de ferimentos, na regeneração do fígado. No entanto, em adultos saudáveis, a demanda de poliaminas não é comparativamente tão alta, apenas o suficiente para a reposição celular e para mediar a ação dos hormônios e fatores de crescimento (GLÓRIA, 2005).

Da mesma forma, em plantas, as poliaminas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo morfogênese, enraizamento, floração e senescência (KALAC, 2014). Em batata, o aumento dos teores de espermidina e espermina está relacionado ao processo de formação do tubérculo (MADER, 1995). Sementes de soja em germinação apresentaram aumento de cerca de 7 vezes nos teores de amins totais, com destaque para as poliaminas (GLÓRIA et al., 2005). Da mesma forma, em sementes de milho germinado, houve acréscimos expressivos de putrescina, espermina e espermidina (BANDEIRA et al., 2012). De acordo com Gloria et al. (2005), os vegetais germinadas podem conter níveis mais elevados de poliaminas, devido à proliferação celular rápida durante as primeiras fases de crescimento e/ou ao ambiente úmido predominante durante a germinação, o que afeta o desenvolvimento das sementes e favorece a descarboxilação de aminoácidos devido a ação de enzimas microbianas.

Liu et al. (2006) demonstraram que o aumento dos níveis de etileno em pêssego coincidiu com a diminuição dos níveis de putrescina, espermidina e espermina nos frutos. As sínteses de poliaminas e etileno têm em comum, um precursor, a SAM. Existem evidências de que a biossíntese de poliaminas é inibida pela biossíntese do etileno e vice-versa, em parte devido a fato de terem o mesmo precursor (BOUCHEREAU et al., 1999).

2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E EFEITOS ADVERSOS DA INGESTÃO DE AMINAS BIOATIVAS

Em baixas concentrações, as amins biogênicas são essenciais para muitas funções fisiológicas. No entanto, devido à propriedades psicoativas e vasoativas, algumas amins biogênicas, particularmente a tiramina e a

histamina, podem ter efeitos tóxicos quando presentes na dieta em concentrações muito elevadas. Casos de crises hipertensivas decorrentes do consumo de alimentos ricos em tiramina tais como queijos maturados, vinhos e cerveja já foram relatados. Em concentrações elevadas, a tiramina atua no sistema adrenérgico e causa uma grande liberação de noradrenalina, o que ocasiona hipertensão. A histamina bloqueia os receptores nas membranas celulares do sistema cardiovascular e de várias glândulas secretoras. Isso estimula o coração causando a contração e relaxamento de vários músculos lisos, estimulando os sistemas neuromotor e sensorial e controlando a secreção do ácido gástrico (GLÓRIA, 2005). Em decorrência, surgem sintomas como náuseas, falta de ar, palpitações cardíacas, ondas de calor, rubor facial, dor de cabeça e crise de hipo ou hipertensão (BARDÓCZ, 1995).

Segundo Proestos et al. (2008), geralmente ingestões de alimentos com teores de 8–40 mg de histamina causam intoxicação leve, um pouco acima de 40 mg, intoxicação moderada e acima de 100 mg, intoxicação grave. Já em relação à tiramina, ingestão acima de 100 mg costuma causar enxaqueca e acima de 1080 mg, efeitos mais graves. Esse efeito tóxico é potencializado quando os indivíduos estão em tratamento contra estresse, depressão, mal de Parkinson e Alzheimer ou tuberculose e ingerem drogas inibidoras da enzima monoamina oxidase (MAO). Da mesma forma, indivíduos com problemas respiratórios, coronários, com hipertensão e deficiência da vitamina B12 são mais sensíveis a pequenas doses das aminas biogênicas. Determinações da *European Food Safety Authority* (EFSA) (2011) são de no máximo 50 mg de histamina para indivíduos saudáveis. No entanto, esse limite deve ser mais baixo caso o indivíduo possua intolerância a histamina. O limite para tiramina é de 600 mg para indivíduos saudáveis, que não tomam medicamentos que inibam a monoamino oxidase (MAO) e de 50 mg para aqueles que tomam drogas que contenham inibidores de MAO de terceira geração ou de 6 mg para aqueles que tomam medicamentos com inibidores MAO convencionais.

Putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, ao contrário das aminas biogênicas, não exercem efeitos tóxicos diretos, mas podem competir com enzimas desintoxicantes (HALÁSZ et al., 1994) e ainda podem reagir

com o nitrito presente em alimentos e produzirem nitrosaminas voláteis, que são compostos carcinogênicos (ONAL et al., 2013).

Já em relação às poliaminas, sabe-se que estas estão envolvidas na proliferação celular, mas essa propriedade pode ser negativa em relação ao desenvolvimento de câncer. Tem sido demonstrado que o aumento dos níveis de poliaminas está associado ao aumento da expressão de genes que afetam a invasão tumoral e a metástase (MOHAMED et al., 2011).

2.6 OCORRÊNCIA DE AMINAS BIOATIVAS EM ALIMENTOS

Diversas aminas bioativas são sintetizadas nos organismos vivos e, por isso, estão naturalmente presentes nos alimentos, como em vegetais, carnes e derivados do leite. Certamente as aminas putrescina, espermidina e espermina estão presentes em todos os alimentos, mas outras também podem ocorrer naturalmente, como a feniletilamina, serotonina, triptamina, histamina, cadaverina, agmatina, adrenalina, noradrenalina, octopamina, sinefrina e aminas alifáticas voláteis (GLÓRIA, 2005).

Estudos relatam a ocorrência de tiramina em repolho, alface, chicória, rabanete, tomate, batata, cebolinha, espinafre, berinjela, abacate, banana, ameixa, uva, framboesa, abacaxi, laranja, limão e tangerina, embora os seus níveis em frutas sejam baixos, geralmente abaixo de 0,1 mg/100 g (GLÓRIA, 2005). As frutas são particularmente ricas em putrescina, enquanto que vegetais imaturos são ricos em espermidina (VALERO et al., 2002). As poliaminas são naturalmente encontradas em leite, carne e derivados, geralmente em maiores teores que nos cereais, legumes e frutas (GLÓRIA, 2005; KALAC, 2014).

Sinefrina é um constituinte comum em derivados cítricos, obtida principalmente da casca e da parte comestível de espécies do gênero *Citrus* (PELLATI & BENVENUTI, 2007). Segundo GLÓRIA (2005), octopamina também é comum em *citrus*, mas quantidades próximas a 24 mg/100 g foram observadas em pimentão. Altos níveis de noradrenalina e triptamina também foram encontrados em sucos de laranja (HALÁSZ et al., 1994).

Já a serotonina é encontrada em baixos níveis em mamão, maracujá, abacate, abacaxi, banana e em café. Cadaverina ocorre naturalmente apenas nas plantas da família *Leguminosae*. Em relação à histamina, níveis significativos têm sido encontrados em diversos alimentos, mas em frutas e vegetais os níveis são baixos, sendo a histamina especificamente encontrada na família *Solanaceae* (GLÓRIA, 2005).

A feniletilamina também é um constituinte natural de sementes de cacau e, conseqüentemente, está presente em seus derivados. Também é detectada em repolho, beterraba, couve-flor, rabanete, cenoura, milho e banana. Geralmente os seus níveis em frutas e vegetais estão abaixo de 0,1 mg/100 g. No entanto, níveis maiores foram encontrados no tubérculo rutabaga e uvas (GLÓRIA, 2005).

Em cerveja, os teores de amins variam e são dependentes do tipo de matéria-prima utilizada, da tecnologia de fabricação empregada e da ocorrência de contaminantes no processo. Agmatina e putrescina são encontradas com freqüência nesse produto, mas em altos teores, apenas a histamina e tiramina foram detectados (GLÓRIA, 2005).

Em vinhos, putrescina, tiramina, histamina e feniletilamina podem ser formadas e acumuladas durante o processamento e envelhecimento dessa bebida, enquanto que os níveis de espermidina decrescem. Em alguns países, níveis máximos de histamina em vinhos são recomendados. A Suíça sugere o máximo de 10 mg/L, a França 8 mg/L, a Bélgica 5 mg/L e a Alemanha 2 mg/L (GLÓRIA, 2005).

2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES

Vários métodos têm sido empregados para analisar amins bioativas em alimentos. Dentre eles, a cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré ou pós-coluna tem sido a mais frequentemente empregada para separação e quantificação desses compostos (ONAL et al., 2013). Previamente à análise cromatográfica, os compostos devem ser extraídos da

matriz. Certamente a extração é uma etapa crítica para a determinação de aminas, sendo a metodologia a ser empregada nesse processo dependente do tipo e natureza da amina e da matriz alimentícia a ser analisada (SARKER et al., 2006; ONAL et al., 2013).

A extração pode ser realizada em meio aquoso, com água a temperatura ambiente ou aquecida. Geralmente, a extração de aminas livres em meio ácido tem sido preferida. Os ácidos mais comumente empregados são os ácidos clorídrico (HCl), perclórico (HClO₄) e tricloroacético (TCA) (Cl₃COOH) (SILVEIRA, 2008; ONAL et al., 2013). No entanto, o ácido perclórico não é recomendado pelo fato de ser explosivo.

Em cereais, o ácido tricloroacético a 5% (m/v) tem sido o mais empregado na extração de aminas bioativas livres. Este foi utilizado para extração de aminas em milho, arroz, milho e alguns derivados. A Tabela 2 apresenta algumas condições empregadas para extração de aminas em cereais gramináceos.

Para a separação e quantificação das aminas em matrizes alimentícias, as cromatografias líquidas de ultra e de alta eficiência têm sido as mais empregadas, sendo a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) empregada em maior proporção. Como fase estacionária, coluna de fase reversa com grupos alquila octadecil (C18) ou octil (C8) tem sido utilizada. Para a fase móvel, os solventes mais comumente usados são água, metanol, etanol e acetonitrila (ONAL et al., 2013).

A detecção de aminas em matrizes complexas é difícil devido ao fato destas geralmente estarem presentes em baixas concentrações. Além disso, a maioria das aminas não apresentam absorção na região ultravioleta (UV) e nem fluorescem, tornando-se necessário um processo de derivação para aumentar a absorbância e, conseqüentemente, aumentar a seletividade e sensibilidade da detecção (PROESTOS et al., 2008; ONAL et al., 2013). Pode-se empregar derivação pré ou pós-coluna, ou seja, antes ou depois da separação cromatográfica. O uso de derivação pós-coluna é recomendado por ser o período de tempo, entre a formação do complexo e a detecção, curto e padronizado (PROESTOS et al., 2008). Para a reação de derivação, há relatos do emprego de um dos seguintes reagentes: 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto

(CNBF), 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), ácido 2,6-dimetil-4-quinolinocarboxílico éster de N-hidroxisuccinimida (DMQC-Osu), fluorescamina, cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (cloreto de dansila) e *orto*-ftalaldeído (OPA), sendo os dois últimos, os mais empregados (GLORIA, 2005; ONAL et al., 2013).

Tabela 2. Métodos de extração utilizados para determinação de aminas bioativas em cereais gramináceos

Cereal	Ácido extrator	Centrifugação	Referências
Arroz	Clorídrico (1N)	23.100 g a 4 °C / 20 mim	Lefèvre et al. (2001)
Arroz	Tricloroacético (5%)	2.000 g / 15 mim (sem controle de temperatura)	Nishibori et al. (2007)
Milho	Perclórico (5%)	23.000 g a 4 °C / 30 mim	Cao et al. (2010)
Milho	Tricloroacético (5%)	8.422 g a 4 °C / 20 mim	Bandeira et al. (2012)
Arroz e trigo	Perclórico (10%)	5.000 g a 4 °C / 10 mim	Cipolla et al. (2007)
Arroz, milho e milheto	Tricloroacético (5%)	4.000 g a 4 °C / 10 mim	Nishimura et al. (2006)

A reação de derivação ocorre pela interação do grupo amino com o reagente específico (Fig. 9). O cloreto de dansila reage com aminas primárias originando um produto de fluorescência amarela que pode ser detectado em pequenas quantidades em comprimentos de onda de 350 a 360 nm de excitação e de 495 a 510 nm de emissão. Já o OPA, em meio alcalino, reage com o grupo amino originando um composto fluorescente em comprimentos de onda de 330 a 360 nm de excitação e de 425 a 466 nm de emissão (CUSTÓDIO, 2006). A principal vantagem que o OPA apresenta em relação aos outros reagentes derivatizantes é que este reage com aminas rapidamente e possibilita a detecção de baixos níveis (PRESTES et al., 2007).

Após a derivação geralmente se emprega detecção por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta ou espectrofluorimetria. No entanto, a detecção fluorométrica é mais sensível que a ultravioleta (ONAL et al., 2013). Em trabalhos mais recentes, a detecção por espectrometria de massas (EM) tem sido utilizada. As técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas são uma poderosa

ferramenta para identificação e confirmação do analito, pois fornece informações como razão massa/carga (m/z) do íon do analito e abundância dos dados, ou seja, proporção dos analitos na amostra. Esse método de detecção é mais sensível em relação aos demais (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; ONAL et al., 2013).

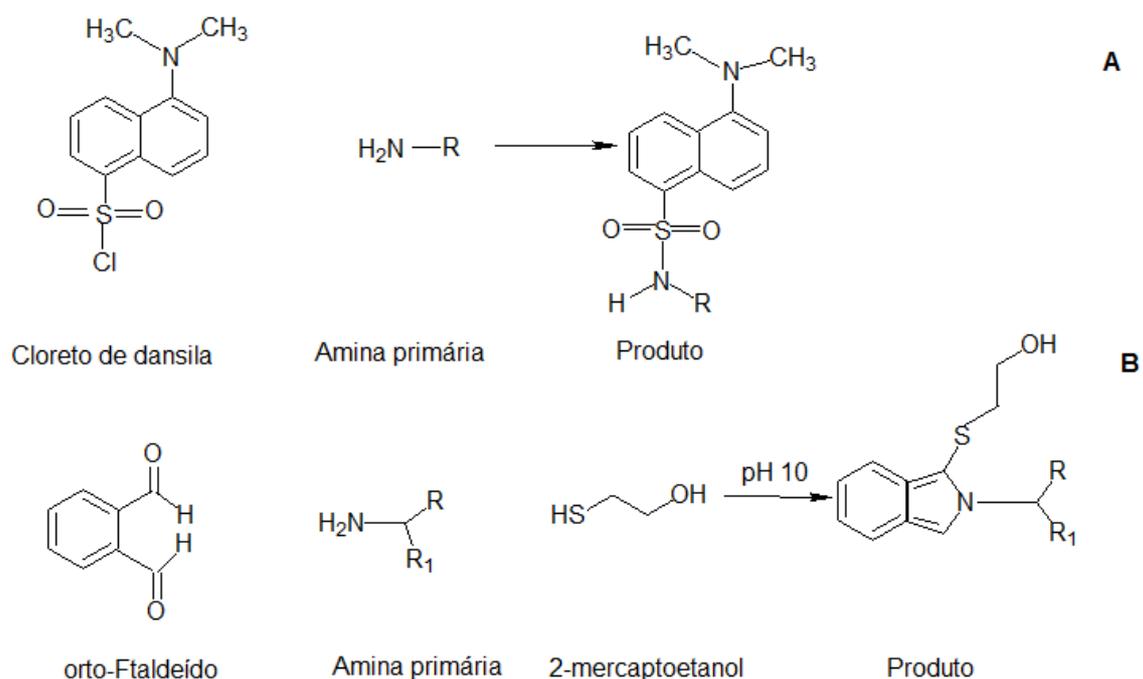


Figura 9. Reação do cloreto de dansila (A) e do *orto*-ftalaldeído (B) com aminas primárias. Fonte: Custódio (2006).

3 AMINAS CONJUGADAS

3.1 DEFINIÇÃO

Na natureza, as aminas bioativas podem ocorrer como uma base molecular livre, mas também podem estar associadas a outros compostos. Entre estas formas conjugadas, as mais comumente encontradas são as poliaminas espermidina e espermina e a diamina putrescina. Devido ao fato de serem moléculas básicas em pH fisiológico, as poliaminas comumente

interagem com macromoléculas, como ácidos nucleicos, fosfolipídios e vários tipos de proteínas, incluindo enzimas (MARTIN-TANGUY, 1997; RODRÍGUEZ et al., 2000; LIU et al., 2004). Essas interações são importantes para regular a estrutura e função de macromoléculas tanto em sistemas biológicos como para a sua síntese *in vivo*. A associação com proteínas se dá através de ligações covalentes, catalisadas por uma classe de enzimas conhecidas como transglutaminases, as quais estão localizadas tanto dentro como fora das células (MARTIN-TANGUY, 1997; LIU et al., 2006). No entanto, a forma mais comum de conjugação das aminas é covalentemente ligada a pequenas moléculas como aos ácidos hidroxicinâmicos, sendo detectadas em várias plantas (Fig. 10) (MARTIN-TANGUY, 1997; WALTERS, 2003; ALCÁZAR et al., 2010). Estudos de metabolismo sugerem que o nível de poliaminas nas células é regulado pela síntese, catabolismo e conjugação com os ácidos hidroxicinâmicos (ALCÁZAR et al., 2010).

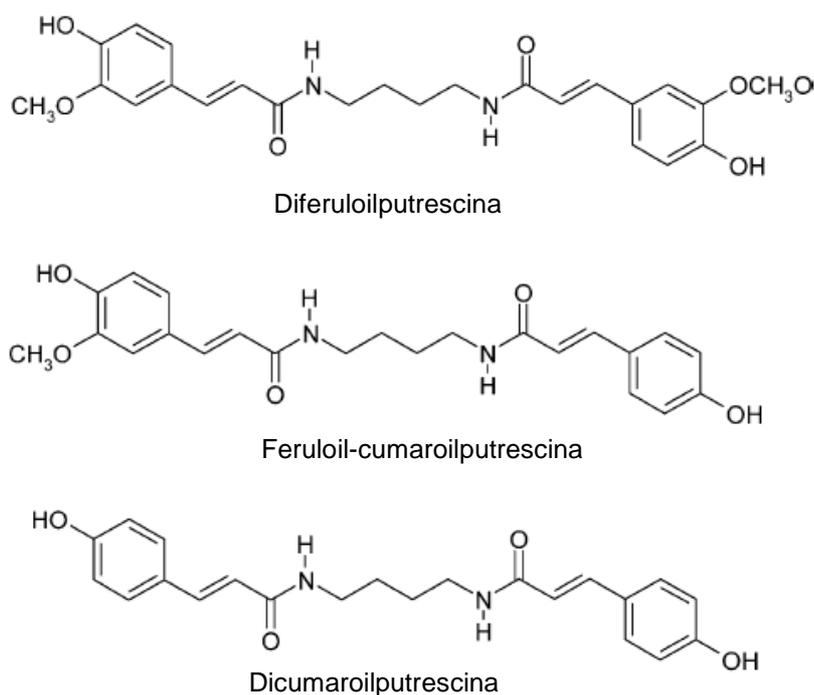


Figura 10. Aminas conjugadas a ácidos hidroxicinâmicos detectadas em milho. Fonte: CHOI et al. (2007).

3.2 OCORRÊNCIA

Uma variedade de aminas conjugadas é encontrada em espécies vegetais. A conjugação entre ácidos hidroxicinâmicos, especificamente com os ácidos caféico, ferúlico e cumárico com a diamina putrescina e as poliaminas, espermidina e espermina, são abundantes no reino vegetal, ocorrendo preferencialmente nos órgãos reprodutivos e sementes (WALTERS, 2003). Na Tabela 3 estão apresentadas algumas aminas conjugadas já detectadas em diversas matrizes alimentícias. Além das aminas listadas na Tabela 3, outras aminas têm sido encontradas conjugadas aos ácidos fenólicos como a octopamina, cadaverina, serotonina, triptamina, e noradrenalina (CASAL et al., 2004; LY et al., 2008).

Tabela 3. Aminas conjugadas a ácidos fenólicos comumente encontrados em alguns alimentos

Aminas conjugadas	Ocorrência	Referência
Diferuloilputrescina	Milho	Choi et al. (2007)
Cumaroil-feruloilputrescina		
Dicumaroilputrescina		
Cafecoiltiramina	Café	Son e Lewis (2002)
Cafecoildopamina		
Dihidrocafecoilespermina	Batata	Parr et al. (2005)
Dihidrocafecoilespermidina		
Dihidrocafecoil- dihidroferuloilespermidina	Batata	Narváez-Cuenca et al. (2012)
Dihidrocafecoilespermina		
Dihidrocafecoilespermidina		
Dihidrocafecoilespermina		
Feruloiloctopamina		
Cafecoilputrescina	Berinjela	Whitaker e Stommel (2003)
Dicafeicoilespermidina		
Feruloilputrescina	Laranja	Baldwin et al. (2010)

3.3 BIOSÍNTESE DE AMINAS CONJUGADAS

Como já descrito no item 2.2, a biossíntese da putrescina ocorre pela descarboxilação da ornitina ou da arginina, sendo estas reações catalisadas pela ornitina descarboxilase ou arginina descarboxilase. A espermina e a espermidina são formadas a partir da putrescina (Fig. 7) (GLÓRIA, 2005).

Fenilalanina e tirosina são os precursores imediatos dos ácidos fenólicos cinâmicos que incluem os ácidos hidroxicinâmicos. Em plantas, o primeiro passo da biossíntese é a eliminação da amônia da fenilalanina, reação catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL) formando o ácido cinâmico. A formação do ácido cumárico a partir da tirosina é mais limitada e comum apenas na família *Graminae/Poaceae*. Os outros ácidos cinâmicos são formados por meio de hidroxilações e metilações (Fig. 11) (DEWICK, 2002).

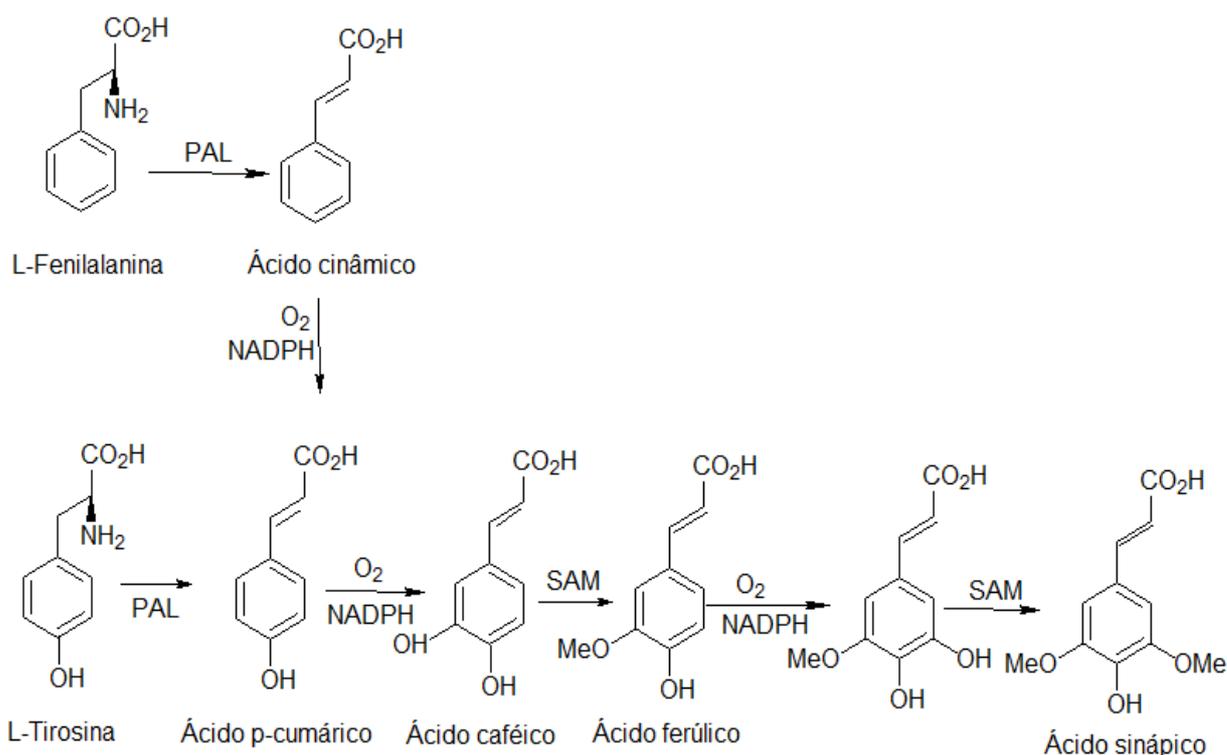


Figura 11. Biossíntese dos ácidos hidroxicinâmicos. Fonte: DEWICK (2002).

As aminas são conjugadas por uma ligação amida, na qual ésteres de coenzima A (CoA) fornecem o grupo carboxil ativado. Já a putrescina e a espermidina são conjugadas por transferases distintas, que diferem em sua

especificidade por meio dos derivados hidroxicinamoil-CoA. Desta forma, a enzima putrescina hidroxicinamoil transferase (PTH; EC 2.3.1) catalisa a transferência de ácidos hidroxicinâmicos entre a CoA e a putrescina (Fig. 12). Assim, a reação entre cafecoil-CoA e putrescina produz uma amida do ácido hidroxicinâmico denominada cafecoilputrescina (Fig. 12). A putrescina pode formar monômeros ácidos solúveis ou dímeros ácidos insolúveis com os ácidos cumárico, caféico e ferúlico (WALTERS, 2003).

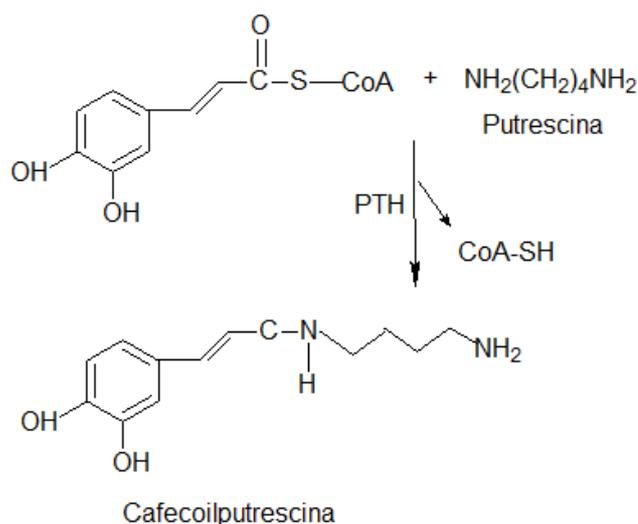


Figura 12. Reação de formação de uma amina conjugada. Fonte: WALTERS (2003).

3.4 FUNÇÃO DAS AMINAS CONJUGADAS

Grande parte das pesquisas se refere ao estudo de poliaminas livres em decorrência de injúrias por fatores externos. Esses compostos estão associados à patogenicidade em plantas, assim como a condições de estresse abiótico. É sabido que o principal armazenamento de poliaminas ocorre quando a planta sofre a falta de nutrientes ou está exposta a choques osmóticos, ao estresse salino, às altas temperaturas ou a poluentes atmosféricos (WALTERS, 2003).

Sabe-se também que a síntese de poliaminas conjugadas é extremamente importante nos processos de desenvolvimento da planta, tais como na indução floral, no processo reprodutivo e na formação da raiz

(MARTIN-TANGUY, 1997; WALTERS, 2003). Também têm sido associadas à resistência a doenças, especialmente naquelas provocadas por fungos e vírus, além de protegerem o pólen dos danos dos raios ultravioleta (WALTERS, 2003).

A conjugação das poliaminas pode regular suas interações com cátions inorgânicos tais como Ca^{2+} , os quais podem ser responsáveis pelo papel das poliaminas na estabilização das membranas. Por exemplo, a N-cumaroiltiramina é um composto acumulado pelas plantas em resposta ao ataque de patógenos. O acúmulo de N-cumaroiltiramina, em resposta ao ataque de patógenos, parece estar envolvido na fortificação da parede celular de plantas (WALTERS, 2003).

Da mesma forma que para as poliaminas livres, em vários casos, a produção de aminas conjugadas está associada a uma resposta do vegetal às injúrias abióticas ou à deficiência na nutrição mineral. RODRÍGUEZ et al. (2000) sugeriram que existe um limite de troca entre as poliaminas conjugadas e as livres e afirmaram que a conjugação com os ácidos cinâmicos pode ser uma forma de regulação do *pool* de poliaminas livres nas células das plantas. Também tem sido proposto que a conjugação pode ser um meio para a translocação de poliaminas e que elas podem ser substratos preferenciais das aminas oxidases. Ainda, esses compostos são bons substratos para peroxidases em células vegetais. As peroxidases que utilizam aminas conjugadas podem remover H_2O_2 no apoplasto. As reações de conjugação podem regular as funções das poliaminas como, por exemplo, afetar suas ligações e interações com proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios. Outra possibilidade é que a conjugação das poliaminas com grupos cinamoil poderia ser importante na desintoxicação de compostos fenólicos conhecidos por inibirem o crescimento. Ainda, os ácidos hidroxicinâmicos são antioxidantes e o acúmulo de fenilpropanóides poderia estar envolvido na prevenção da toxicidade por minerais (WALTERS, 2003). Foi proposto que o efeito protetor de poliaminas exógenas contra os danos da superoxidação é dependente da conversão para as formas conjugadas.

Aminas conjugadas têm sido isoladas de plantas e o seu emprego avaliado em diferentes áreas terapêuticas. A propriedade antimelanogênica de

aminas conjugadas foi comprovada por Okombi et al. (2006). Choi et al. (2007) destacaram a atividade antioxidante e também antimelanogênica de diversas aminas conjugadas isoladas de milho. Recentemente, Kim et al. (2014) comprovaram o potencial de uma dessas aminas conjugadas, a DFP, como agente antileucêmico. Estudos em sistemas celulares de Hong et al. (2013) demonstraram a alta atividade antioxidante de amidas fenólicas isoladas da fruta de *Tribulus terrestris*, popularmente conhecida no Brasil como Cruz de Malta, sugerindo uma ação antiinflamatória desses compostos.

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE DE AMINAS CONJUGADAS EM ALIMENTOS

As poliaminas e a diamina putrescina conjugadas a ácidos fenólicos são solúveis em água e solventes de baixa polaridade (WALTERS, 2003). Desta forma, as metodologias de extração utilizam, portanto, solventes de alta polaridade. Para a extração das aminas conjugadas em grãos de milho, Moreau et al. (2002) e Choi et al. (2007) empregaram soluções aquosas de etanol 80% e de metanol, com extrator com pressão de 69 bar por 10 min em temperatura de 40 e 100 °C, após a remoção das frações lipídicas com hexano. Para extração desses compostos em batata também foram empregadas soluções de metanol de 50 a 70%, e em alguns casos, soluções acidificadas com 0,5% de ácido acético (PARR et al., 2005; NARVÁEZ-CUENCA et al., 2012) (Tabela 4).

Muitas vezes antes da quantificação é necessário realizar a purificação dos extratos visando à eliminação dos interferentes. Essa etapa, geralmente, é a que mais consome tempo, é trabalhosa e propensa a erros de análise (SILVEIRA, 2008). A etapa de purificação reduz o limite de quantificação do método e evita interferências da matriz. Entretanto, a purificação extensiva dos extratos pode resultar na perda parcial de alguns compostos e aumentar as demandas de trabalho, o que gera aumento do custo. A purificação inadequada pode conduzir aos efeitos adversos relacionados à qualidade dos dados gerados, tais como co-eluição de componentes da matriz com picos do analito de interesse, ocorrência de picos falsos e quantificação incorreta.

A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica de preparo de amostras ainda muito utilizada. Essa extração é baseada no princípio de que um soluto ou analito pode distribuir-se em certa proporção entre dois solventes imiscíveis, sendo que um dos dois é normalmente água (fase aquosa) e o outro um solvente orgânico (fase orgânica). Na maior parte dos casos o analito pode ser movido para a fase orgânica. O objetivo dessa técnica é a purificação do extrato, enriquecimento do analito e melhoria da detecção (CASAL et al., 2002; SILVEIRA, 2008).

CASAL et al. (2002) testaram a técnica de extração líquido-líquido para a purificação dos extratos de café. Foram testados os solventes orgânicos: éter de etila, butanol, butanol/clorofórmio e o par iônico bis-2-etilhexilfosfato (BEHPA), sendo este último o mais eficiente. Para a purificação de aminas conjugadas em milho, CHOI et al. (2007) empregaram extração líquido-líquido com diclorometano, acetato de etila e n-butanol e MOREAU et al. (2002) empregaram diclorometano a 40 e 100 °C para os testes de purificação.

Em relação à quantificação de aminas conjugadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais empregada. Choi et al. (2007) empregaram a CLAE utilizando colunas de sílica contendo C18 para a determinação de aminas conjugadas em farelo de milho. Os pesquisadores empregaram ainda CLAE com fase ligada, empregando colunas de sílica-gel ODS-A e Sephadex LH-20. As aminas conjugadas de farelo de milho obtidas por cromatografia foram caracterizadas em espectrofotômetro UV e infravermelho, em espectrômetro de massas e de ressonância nuclear magnética.

As técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas são as mais empregadas, justamente porque as aminas conjugadas podem ser identificadas pela razão massa/carga (m/z), dispensando o emprego de padrões comerciais ou sintetizados. A Tabela 4 apresenta várias metodologias utilizadas na extração, quantificação e confirmação de aminas conjugadas em alimentos.

Tabela 4 - Métodos utilizados para determinação de aminas conjugadas em matrizes alimentícias

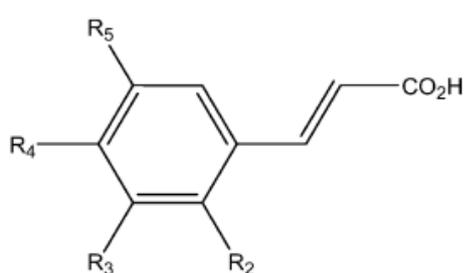
Amostra	Solvente extrator	Purificação	Quantificação em CLAE				Detecção				Referências
			Coluna	Eluente A	Eluente B	Fluxo $\mu\text{L}/\text{mim}$	Ionizador	Analizador	Modo de Ionização	Faixa de detecção	
Batata	Metanol (50%) + hidrólise alcalina	NA	Hypersyl Gold C18 (150 x 2,1 mm; 1,9 μm)	Água/Acetonitrila/ácido acético (99:1:0,1 v/v/v)	Acetonitrila/ ácido acético (100:0,1 v/v)	400	ESI	Triplo quadrupolo	Negativo	150-1500 m/z	Narváez- Cuenca et al. (2012)
Batata	Metanol (70%)	NA	Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm x 3 μm)	Água/Ácido trifluoroacético (1mmol/l)	Acetonitrila	700	ESI	Triplo quadrupolo	Positivo	50-1500 m/z	Parr et al. (2005)
Laranja	Metanol/ácido perclórico (5%)	NA	Waters XBridge C8 (150 x 4.6 mm x 3,5 μm)	Água/Acetonitrila/ácido fórmico (85:10:5 v/v/v)		750	ESI	Quadrupolo simples	Positivo	150-1600 m/z	Baldwin et al. (2010)
Milho	Etanol, metanol	Dicloro- metano	Prevail C18 (150 x 2,1 mm x 3 μm)	Água	Ácido acético/me- tanol (0,2% v/v)	200	FAB	NA	NA	NA	Choi et al. (2007)
Beringela	Metanol	NA	Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	Metanol	Água/ Ácido fosfórico (0,01% v/v)	NA	ESI	Triplo quadrupolo	Negativo	150-600 m/z	Whitaker e Stommel (2003)

NA: não apresentado. FAB: Bombardeamento por átomos rápidos. ESI: Ionização por eletrospray.

4 ÁCIDOS FENÓLICOS

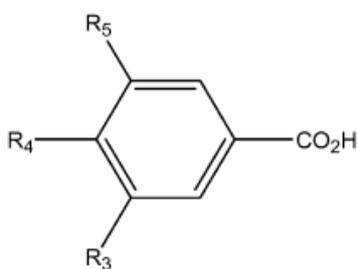
4.1 DEFINIÇÃO

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários, especificamente uma subclasse de compostos fenólicos, que possuem na estrutura um grupo funcional carboxílico e outro grupo fenólico, ou seja, um anel aromático substituído com pelo menos uma hidroxila. Estes podem ser classificados como ácidos hidroxicinâmicos ou hidroxibenzóicos. Também o anel fenólico pode estar substituído em várias posições por grupos hidroxilas e/ou metoxilas, o que distingue os diferentes compostos (Fig. 13).



Ácidos Hidroxicinâmicos

- R₂=OH, ácido o-cumárico
- R₃=OH, ácido m-cumárico
- R₄=OH, ácido p-cumárico
- R₃=R₄=OH, ácido caféico
- R₃=OCH₃ R₄=OH, ácido ferúlico
- R₃=R₅=OCH₃ R₄=OH, ácido sinápico



Ácidos Hidroxibenzóicos

- R₃=OH, ácido m-hidroxibenzóico
- R₄=OH, ácido p- hidroxibenzóico
- R₃=R₄=OH, ácido protocatéquico
- R₃=OCH₃ R₄=OH, ácido vanílico
- R₃=R₅=OCH₃ R₄=OH, ácido siríngico

Figura 13. Estrutura de ácidos fenólicos comumente presentes em plantas.
Fonte: LI et al. (2008).

4.2 OCORRÊNCIA

Os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos e seus derivados estão largamente distribuídos em vegetais comestíveis (frutas, hortaliças e grãos) de

forma não homogênea, ou seja, nas diversas estruturas das plantas, sementes, raízes, caules e folhas. Pequena fração desses ácidos se encontra livre nas estruturas dos tecidos vegetais. Normalmente estes estão ligados na forma de éster, éter e acetal a polifenóis (flavonoides), a estruturas insolúveis mais complexas como proteínas, taninos, celulose e lignina (ADOM & LIU, 2002; ROOIS, 2003; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Também são conjugados a moléculas orgânicas solúveis de baixo peso molecular como glucose, ácido quínico, málico, tartárico e aminas (ROBBIS, 2003; CHOI et al. 2007; LI et al., 2008). Sabe-se que as condições de cultivo e crescimento das plantas, como temperatura, radiação solar, disponibilidade de água e sais minerais, exercem grande influência no teor de ácidos fenólicos (ROBBINS, 2003; FERNANDEZ-OROZCO et al., 2010).

Em cereais há vários relatos da presença de ácidos fenólicos. Estes compostos ligados as estruturas da parede celular de grãos de sorgo e milho foi relatada por Chiremba et al. (2012). Em trigo, os ácidos fenólicos foram detectados por Li et al. (2008) e Nicoletti et al. (2013) e em arroz por Shao et al. (2014).

Pesquisas comprovam uma maior proporção de ácidos fenólicos na fração insolúvel dos grãos, ou seja, ligados a compostos como celulose e lignina (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Os ácidos fenólicos conjugados, presentes na fração insolúvel, correspondem a cerca de 75-80% do teor de ácidos fenólicos totais presentes nos grãos, o restante é composto por ácidos fenólicos solúveis (LI et al., 2008; FERNANDEZ-OROZCO et al., 2010). Em cereais, o ácido ferúlico geralmente é o mais abundante tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. No entanto, os ácidos sinápico, cumárico, caféico, vanílico e siríngico têm sido encontrados (LI et al., 2008; FERNANDEZ-OROZCO et al., 2010; CHIREMBA et al., 2012; NICOLETTI et al., 2013; SHAO et al., 2014).

4.3 BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos hidroxicinâmicos são originários da via do chiquimato, como descrito no item 3.3, na Figura 11. Já os derivados dos ácidos benzoicos têm

duas origens: a perda do acetato de um dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Fig. 14) ou a formação do ácido hidroxibenzoico a partir de um dos intermediários da via do chiquimato (Fig. 15) (HERRMANN, 1995; DEWICK, 2002; ROBBINS, 2003).

4.4 METABOLISMO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

De uma forma geral, o metabolismo de compostos fenólicos no trato digestivo depende se estão na forma livre ou conjugada. Se ligados a açúcares, a metabolização depende inicialmente da quebra da aglicona. As tecnologias de processamento de alimentos, como fermentação, maltagem, extrusão e hidrólises ácidas e alcalinas têm a capacidade de retirar os fenólicos das estruturas mais complexas (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014)

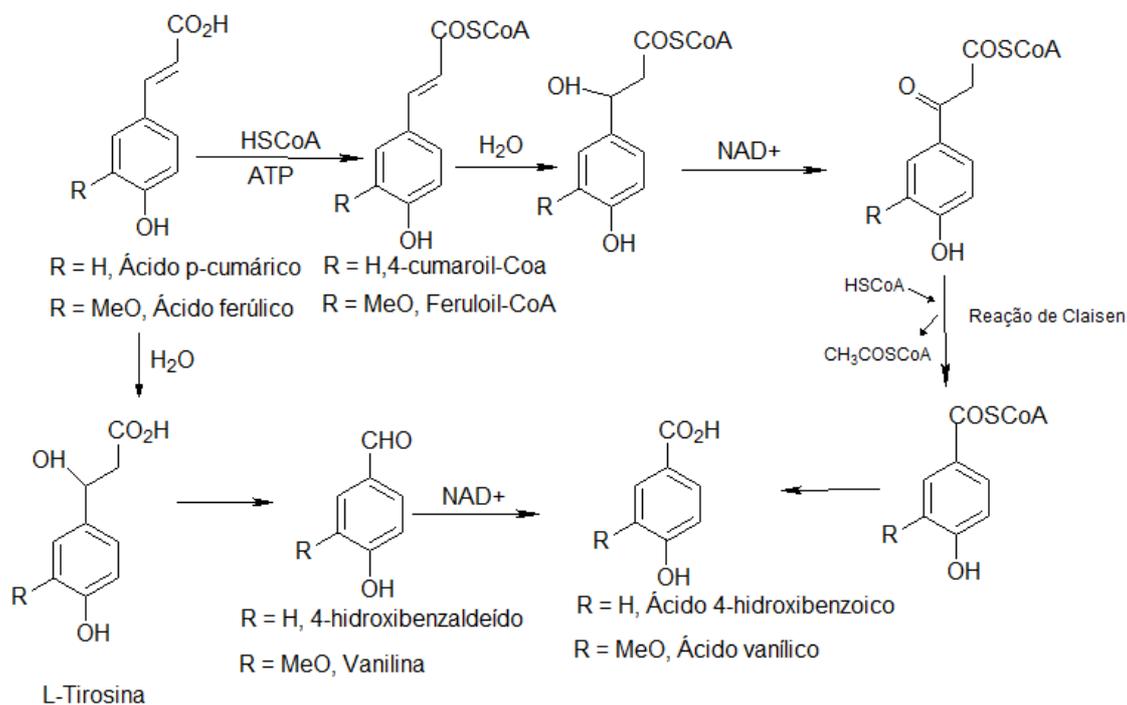


Figura 14. Biossíntese de derivados dos ácidos benzoicos a partir de ácidos hidroxicinâmicos. Fonte: DEWICK (2002).

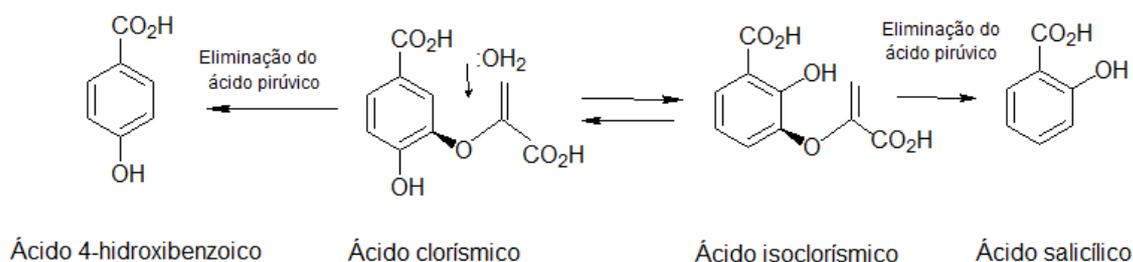


Figura 15. Biossíntese do ácido *p*-hidroxibenzoico a partir do ácido clorísmico. Fonte: DEWICK (2002).

Já no trato gastrointestinal humano, existem diferentes vias de absorção dos ácidos fenólicos. A hidrólise dos fenólicos conjugados solúveis ocorre nas células da mucosa por meio das cinamoil esterases. Segundo Acosta-Estrada et al. (2014), a absorção de ácidos hidroxicinâmicos se dá em maior proporção via as esterases presentes no intestino delgado na mucosa das células epiteliais. Outra via de hidrólise é por meio das lactases pirrolidinas hidrolases da borda em escova que também podem hidrolisar os compostos fenólicos conjugados solúveis. As agliconas formadas podem então ser absorvidas no epitélio. Alguns fenólicos são transportados para dentro dos enterócitos por meio da proteína cotransportadora Na⁺/glicose, SGLT1. Já os compostos fenólicos insolúveis resistem a digestão do estômago e do intestino delgado, chegando intactos ao cólon, onde as esterases e xilases dos microrganismos irão hidrolisar esses compostos insolúveis (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Liu (2007) propôs que os benefícios dos compostos fenólicos de grãos são maiores em comparação aos de frutas, devido à conjugação desses compostos com estruturas insolúveis, o que leva a sua metabolização tardia no cólon, contribuindo para a prevenção de câncer de cólon e de outras partes do sistema digestivo.

Assim, há benefícios promovidos pelo consumo tanto de fenólicos na forma livre, quanto conjugados na forma solúvel ou insolúvel. As formas conjugadas insolúveis serão benéficas na prevenção de doenças do cólon, enquanto que as formas livres e conjugadas solúveis serão rapidamente absorvidas no intestino delgado e distribuídas através do sangue, promovendo

outros benefícios como, por exemplo, inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

4.5 FUNÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

Nos vegetais, os ácidos fenólicos estão associados à maturação e ao desenvolvimento da cor (absorção de nutrientes, atividade enzimática e fotossíntese), à síntese de proteínas e de componentes estruturais. Em relação à alimentação humana, os ácidos fenólicos, presentes nos vegetais, além de estarem relacionados à qualidade nutricional, estão relacionados às propriedades sensoriais de cor, *flavor*, adstringência e dureza (ROBBINS, 2003).

Também para a saúde humana, esses compostos têm agregado função antioxidante, prevenindo o surgimento de doenças crônico-degenerativas. Essa propriedade está associada à capacidade do grupo fenol de doar o hidrogênio da hidroxila aos radicais livres, estabilizando-os. Ainda, a presença de outras hidroxilas no anel fenólico ou de outros substituintes afeta essa capacidade antioxidante. Testes químicos, celulares e em vivo têm comprovado a atividade antioxidante desses compostos (ZHAO et al., 2010; CHUNG & CHAMPAGNE, 2011; PIAZZON et al., 2012; YANG et al., 2012; DU et al., 2013; KILCI & GOCMEN, 2014; ZHANG et al., 2014). No entanto, o exato mecanismo de absorção e de prevenção de doenças relacionados a esses compostos ainda necessita ser mais bem compreendido (ROBBINS, 2003).

Outras propriedades dos ácidos fenólicos têm sido descritas. Por exemplo, o ácido caféico é um bloqueador seletivo na biossíntese de leucotrienos, componentes envolvidos em doenças imunoreguladoras como asma e reações alérgicas (CHUNG & CHAMPAGNE, 2005). Estudos demonstram também a capacidade antiviral do ácido caféico e de alguns de seus derivados, sendo efetivos na terapia contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) tipo 1 (KING et al., 1999).

Pesquisas relacionadas à atividade antioxidante de ácidos fenólicos extraídos de sorgo têm mostrado alta atividade antioxidante *in vitro* (AFIFY et al., 2012a; LUTHRIA & LIU, 2013) e em estudos celulares (YANG et al., 2012).

4.6 MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS

Certamente o método de Folin-Ciocalteu é o mais largamente utilizado para a quantificação de fenólicos totais e empregado como uma metodologia prévia para a identificação de ácidos fenólicos específicos. O método consiste em reduzir em solução alcalina, o fosfomolibdato presente no reagente a um complexo de cor azul com leitura em uma faixa de 720 a 765 nm, conforme descrito por Robbins (2003).

A extração de ácidos fenólicos de plantas e matrizes alimentícias depende de vários fatores como o método empregado, o tamanho da partícula, e a presença de interferentes (SARKER et al., 2006). Geralmente os ácidos fenólicos estão presentes nos vacúolos das plantas e podem ser facilmente removidos por álcool e compostos orgânicos. No entanto a escolha das substâncias extratoras está fortemente relacionada à forma como os ácidos fenólicos se encontram na matriz, livres ou ligados. Neste caso, a natureza química e o peso molecular do composto conjugado ao ácido fenólico, se carboidrato, proteína, tanino, antocianina, ou amina, é determinante para a escolha da substância extratora (ROBBINS, 2003). Ainda, etapas adicionais, como a saponificação com hidróxido de sódio, podem ser necessárias para a remoção de ceras, gorduras e pigmentos. Assim, não há um procedimento único que possa remover todos os ácidos fenólicos dos alimentos. Metanol, etanol, água, acetona e menos frequentemente, propanol são utilizados para a extração desses compostos. A adição posterior de etil acetato é necessária para a remoção de flavonoides. Também é comum realizar a hidrólise da ligação éster ou éter, através do emprego de ácido ou base concentrados, com o objetivo de romper a conjugação e facilitar a posterior quantificação e identificação dos ácidos fenólicos (Tabela 5).

As principais variáveis a serem avaliadas na hidrólise química é a concentração do ácido/base, o tempo e a temperatura de hidrólise. O tratamento com ácido quebra as ligações glicosídicas e liberam açúcares, mas deixam a ligação éster intacta (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). O emprego de ácidos em temperaturas elevadas pode levar à perda de fenólicos. Há relatos de perda de ácido cumárico, ferúlico e sinápico durante as reações de hidrólise (ROBBINS, 2003). Na realidade, o emprego de hidrólise alcalina é melhor que a ácida, pois reduz a perda desses compostos. Por exemplo, a hidrólise alcalina leva a perda de cerca de 5% dos ácidos ferúlicos, enquanto que na ácida essa perda corresponde a cerca de 78%. Geralmente a hidrólise alcalina acontece à temperatura ambiente em processos que podem demorar de 15 min a 24 h em concentrações de 1 a 4 M de NaOH. Em seguida, adiciona-se ácido ascórbico para prevenir a perda dos ácidos fenólicos (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

Reações enzimáticas para a remoção de carboidratos, celulose e lignina também têm sido descritos, embora com menor frequência (ROBBINS, 2003; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

A cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de fase reversa C18 é certamente o método mais empregado para a separação e quantificação de ácidos fenólicos extraídos de matrizes alimentícias (ROBBINS, 2003). Os gradientes empregados utilizam uma fase aquosa e outra orgânica. A fase aquosa é geralmente acidificada, a fim de suprimir a ionização do ácido fenólico e para evitar o alargamento do pico causado pela presença simultânea das formas protonadas e ionizadas desse analito (NICOLETTI et al., 2013). Como fase móvel orgânica comumente são empregados, metanol, acetonitrila e menos frequentemente, propanol, butanol e acetato de etila (Tabela 5). A detecção frequentemente é realizada na região do UV-visível com arranjo de fotodiodos em comprimentos de onda que variam de 190 a 380 nm. Na Tabela 6 estão apresentadas as faixas de absorção de alguns ácidos fenólicos.

Tabela 5. Métodos utilizados para a determinação de ácidos fenólicos livres e conjugados

Matriz	Solventes extratores	Quantificação em CLAE			Detecção por DAD	Detecção por Espectrometria de Massas				Referência
		Coluna	Eluente A	Eluente B	λ (nm)	Ionizador	Analisador	Modo de ionização	Faixa de detecção	
Arroz	Metanol (80%) + hidrólise com NaOH	RP 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	Água/Ácido acético (0,1%)	Metanol/Áci do acético (0,1%)	280	ESI	Quadrupo- lo simples	Nega- tivo	100-1000 m/z	Shao et al. (2014)
Batata doce	Metanol (80%) e água (1% ácido acético)	Hydro-Rp 80 Å (250 x 4,6 mm x 3 μ m)	Água/Ácido fórmico (0,1%)	Metanol (100%)	326	--	--	--	--	Grace et al. (2014)
<i>Jujubes</i> (fruta)	Metanol HCl 6 M NaOH 4 M Etil acetato	Atlantis T3 (150 x 4.6 mm x 3 μ m)	Água	Metanol (100%)	280	--	--	--	--	Du et al. (2013)
Girassol	Acetona (80%)	Thermo BDS C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água/Ácido fórmico (0,2%)	Acetonitrila (100%)	280	TOF	NA	Nega- tivo	100-1200 m/z	Liang et al. (2013)
Trigo	Acetona (80%) NaOH 2 M HCl 12 M	Amide C16 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água/Ácido acético (2%)	Acetonitrila (100%)	280	--	--	--	--	Fernandez- Orozco (2010)

Tabela 5. Métodos utilizados para a determinação de ácidos fenólicos livres e conjugados (continua)

Matriz	Solventes extratores	Quantificação em CLAE			Detecção por DAD λ (nm)	Detecção por Espectrometria de Massas				Referência
		Coluna	Eluente A	Eluente B		Ionizador	Analizador	Modo de ionização	Faixa de detecção	
Trigo durum	Etanol (80%) HCl 12 N Acetato de etila	Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água (2% ácido fórmico)	Acetonitrila (100%)	254, 280 e 320	--	--	--	--	Nicoletti et al. (2010)
Trigo	Etanol (80%) NaOH 2 M HCl 12 M Acetato de etila	Amide C16 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água (2% ácido acético)	Acetonitrila	280	--	--	--	--	Li et al. (2008)
Batata	Metanol (2 mM TFA)	Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água (1 mM de TFA)	Acetonitrila (100%)	220	ESI	Triplo-Quadrupolo	Positivo	50-1500 m/z	Defernez et al. (2004)
Sorgo	Metanol (80%) NaOH 2 M HCl 6 M Acetato de etila	ShimPack HR-ODS C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água (0,1% ácido acético)	Metanol (0,1% de ácido acético)	320	TOF	Quadrupolo	Negativo	100-1500 m/z	Chiremba et al. (2012)
Sorgo	Metanol (70%) HCl 2 M Acetato de etila	Luna C18 (250 x 4,6 mm x 5 μ m)	Água (2% ácido acético)	Acetonitrila (50%)	190-400	ESI	Quadrupolo	NA	NA	Svensson et al. (2010)

NA: não apresentado. .DAD: Detector por arranjo de fotodiodos. FAB: Bombardeamento por átomos rápidos. ESI: Ionização por eletrospray. TOF: Tempo de voo. TFA: ácido trifluoracético.

Tabela 6. Regiões de absorção de ácidos fenólicos no ultravioleta

Ácido fenólico	λ max (nm)
Gálico	217, 272
Caféico	220, 240, 294, 326
Vanílico	219, 261, 294 a 320
Cumárico	226, 312 a 361
Ferúlico	218, 236, 295
Sinápico	238, 326

Fonte: ROBBINS (2003).

5. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS

Nos últimos anos tem crescido o interesse pelas propriedades antioxidantes de compostos extraídos de plantas devido ao fato dos radicais livres estarem relacionados a diversas doenças e ao processo de envelhecimento. As diferentes formas de oxigênio reativo provocam danos que incluem a mutação do DNA, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer, de diabetes, de arteriosclerose, de inflamações e ao envelhecimento precoce (SILVA et al., 2005). Assim, o estudo da atividade antioxidante de espécies de plantas, especialmente daquelas que representam um papel relevante na dieta humana ou animal, tem grande perspectiva de aplicação na promoção da saúde humana.

Em alimentos, o processo químico de deterioração de lipídeos se dá basicamente de dois modos: por meio de reações hidrolíticas, geralmente promovidas por lipases próprias dos sistemas biológicos e/ou por aquecimento de alimentos em presença de água e por reações oxidativas resultantes da interação do oxigênio com os lipídeos (DAMODARAN et al., 2010). Nesse caso, os ácidos graxos insaturados, livres ou esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídeos, decompõem-se provocando o aroma e sabor rançoso dos

alimentos. O mecanismo de oxidação acontece em três etapas: iniciação, propagação e término (Fig. 16). Na etapa de iniciação um átomo de hidrogênio é retirado de um dos carbonos metilênicos do ácido graxo, formando o radical alquil. As reações iniciais têm alta energia de ativação e por isso não acontecem de forma espontânea. Para a sua formação há a necessidade de catalisadores, como: metaloproteínas, metais (Fe, Cu, Cr), energia luminosa e pigmentos fotossensíveis. Na etapa de propagação, os radicais livres formados reagem com o oxigênio, formando um radical peroxil e este se combina com outro ácido graxo insaturado, provocando reações em cadeia. As reações de propagação possuem energia de ativação baixa e por isso, não há como interrompê-las. O término ocorre com a combinação dos radicais livres, alquil e peroxil, levando à formação de aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos de cadeia curta, responsáveis pelo odor característico de ranço (DAMODARAN et al., 2010). Vale destacar, que o estresse oxidativo acontece não só em alimentos, mas em todos os organismos expostos a ambientes oxigenados.

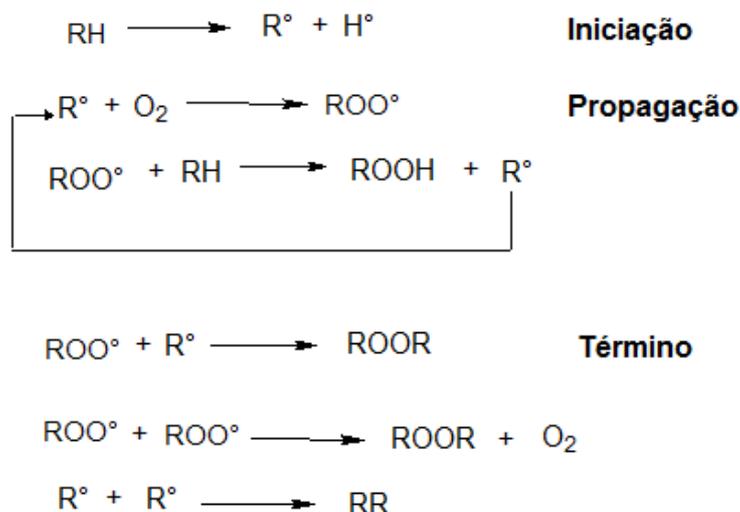


Figura 16. Esquema do mecanismo de oxidação de lipídeos. RH = ácido graxo insaturado; R[•] = radical livre; ROO[•] = radical peroxil; ROOH = hidroperóxido.

Os antioxidantes são compostos capazes de inibirem a oxidação. Esses podem reagir diretamente com os radicais formados, antes que os radicais oxidem os ácidos graxos, inibindo, portanto a iniciação e a propagação das reações deteriorativas. Além disso, os antioxidantes efetivos têm a capacidade de reagirem com os radicais livres e de produzirem radicais de baixa energia

em virtude da deslocalização por ressonância. Os compostos fenólicos são eficientes como antioxidantes por essa propriedade. Além disso, a efetividade dos compostos fenólicos como antioxidantes aumenta com a presença de grupos substituintes no anel fenólico (DAMODARAN et al., 2010).

Em relação aos ensaios para a determinação da capacidade antioxidante, diferentes métodos químicos podem ser empregados. Os métodos podem ser classificados em dois grupos: métodos em que ocorre a transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante estabilizando um radical livre e métodos nos quais ocorre a transferência de elétrons para reduzir um composto qualquer, seja um radical, íons metálicos ou carbonilas, os quais são monitorados por alterações de coloração quando o oxidante é reduzido (HUANG et al., 2005).

Os métodos de transferência de elétrons incluem: poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), redução do Cu (II) (CUPRAC) e sequestro do radical DPPH e do radical ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. As reações de transferência de hidrogênio incluem o teste de Crocin, e capacidade de absorver radicais de oxigênio (ORAC), inibição da oxidação do ácido linoleico. Outros métodos não incluídos nesses dois grupos são: capacidade de antioxidante total (TOSC), quimioluminescência e eletroquimioluminescência (HUANG et al., 2005).

Huang et al. (2005) sugerem que sejam escolhidos mais de um teste químico, ou seja, que sejam testadas várias condições de oxidação, em decorrência da complexidade da matriz alimentícia. Além disso, que sejam medidos os produtos iniciais e secundários da oxidação e testadas várias concentrações do antioxidante, quantificado o período de indução, e calculado o IC₅₀, definido como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração do radical livre em 50%. Alguns desses métodos serão descritos a seguir.

O teste FRAP (poder antioxidante redutor do ferro) é baseado na redução do complexo 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina férrico $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$ para o complexo ferroso de cor azul escura $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$ na presença de um antioxidante (Fig. 17). O composto formado pode ser avaliado em espectrofotômetro a 595 nm (HUANG et al., 2005).

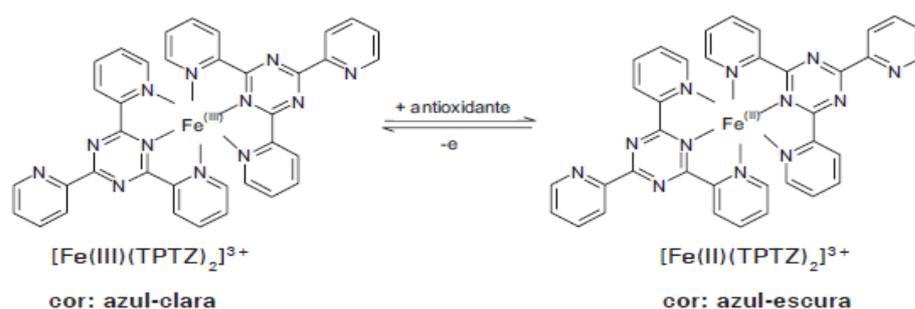


Figura 17. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . Fonte: HUANG et al. (2005).

Um método alternativo, que também avalia o poder antioxidante redutor do ferro é baseado na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que na presença de íon férrico, proveniente do cloreto férrico, forma uma solução colorida azul esverdeada (DOS SANTOS et al., 2007). O antioxidante irá reduzir o ferro II $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a ferro II $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Fig. 18).

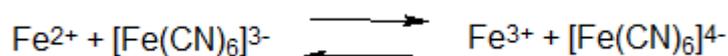


Figura 18. Redução do íon ferricianeto para ferrocianato na presença do íon férrico. Fonte: DOS SANTOS et al. (2007)

O método CUPRAC se baseia na variação da coloração dos complexos de Cu^{2+} para Cu^+ devido à interação com o antioxidante em meio etanólico (pH 7,0) na presença do reagente neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) (Fig. 19). O complexo formado com o Cu^+ possui absorção na região de 450 nm. Segundo Gülçin (2012), o método CUPRAC possui as vantagens de ter baixo custo, ser rápido, estável e adequado para uma variedade de antioxidantes, independentemente se este é hidrofílico ou lipofílico.

O poder de redução do provável antioxidante também pode ser avaliado pela redução do molibdênio. O ensaio baseia-se na redução de Mo (VI) para Mo (V) pelo antioxidante da amostra e a subsequente formação de um complexo verde de fosfato/Mo (V) em pH ácido. A formação desse complexo pode ser determinada espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO et al., 1999; HUANG et al., 2005).

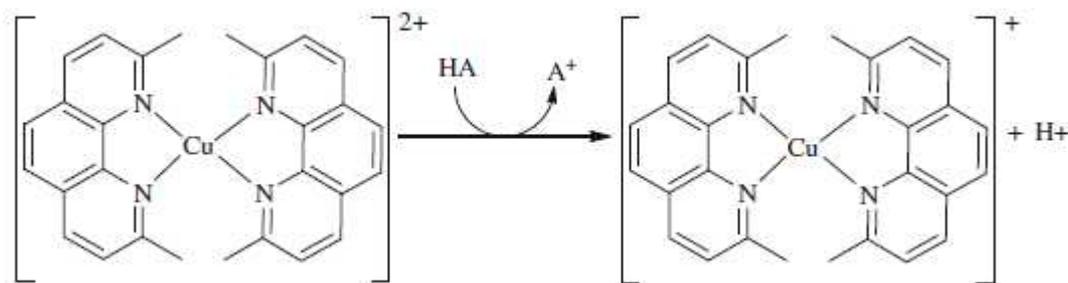


Figura 19. Redução do complexo de Cu^{2+} pela interação com o antioxidante. HA: antioxidante. Fonte: GÜLÇİN (2012).

O ensaio da reatividade face ao DPPH (1,1-difnil-2-picrilhidrazil) é um procedimento comumente empregado na análise química do potencial antioxidante em diversas matrizes. O DPPH é um radical livre estável, capaz de sequestrar um elétron ou um átomo de hidrogênio, tornando-se um composto dificilmente oxidável. Os estudos da capacidade antioxidante frente a esse radical fundamentam-se na propriedade do DPPH de apresentar uma forte absorção no espectro visível, no comprimento de onda de 517 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH é colocado na presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres, a absorção é inibida, resultando então em uma descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados. Independente de qualquer atividade enzimática, o grau de descoloração indica a capacidade de estabilizar o radical livre (Fig. 20). A velocidade da reação e a capacidade de captar radicais dependem da altura do pico e da taxa de desaparecimento da DPPH (HUANG et al., 2005).

A mudança de coloração é avaliada pela diminuição na absorvância a 517 nm registada de modo contínuo durante um certo tempo empregando um espectrofotômetro.

Os resultados do ensaio de DPPH têm sido apresentados de diversas maneiras. A maioria dos estudos exprimem os resultados como o valor de IC_{50} . Este valor é calculado plotando-se em gráfico a porcentagem de inibição versus a concentração da solução teste. O cálculo do valor de IC_{50} requer a

determinação da cinética da reação entre o DPPH e diferentes concentrações do antioxidante (DAWIDOWICZ et al., 2012).

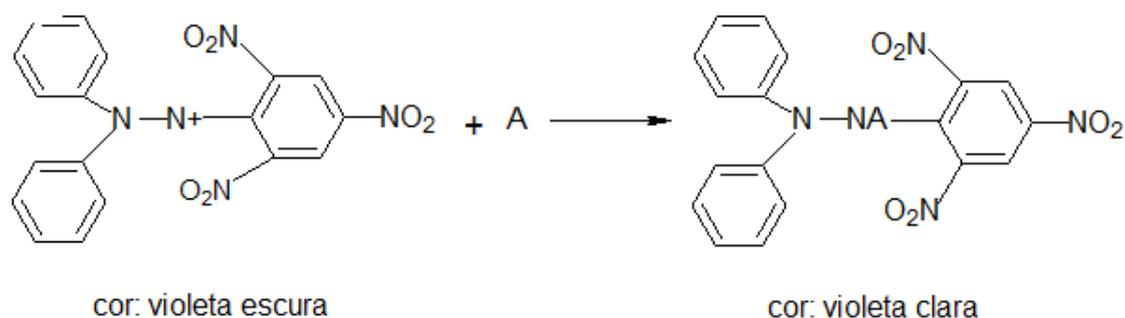


Figura 20. Mudança de coloração na reação de estabilização do radical livre DPPH. A: antioxidante. Fonte: HUANG et al. (2005).

Comparado com outros métodos, o ensaio de DPPH tem a vantagem da simplicidade e viabilidade (DAWIDOWICZ et al., 2012). Por isso, o método de DPPH tem sido bastante empregado como um dos passos básicos de rastreio para pesquisa de novos compostos antioxidantes extraídos com solventes orgânicos a partir de diversas matrizes, inclusive alimentícias.

O teste do radical ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] é baseado na ativação de metilmioglobina com peróxido de hidrogênio em presença de ABTS para produzir um cátion radical. Na preparação do ABTS⁺ podem ser empregados diferentes oxidantes. Esse cátion radical possui uma coloração intensa e a reação do antioxidante com o radical ABTS reduz a intensidade dessa coloração. Normalmente os resultados do teste do radical ABTS são expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, um análogo solúvel da vitamina E (HUANG et al., 2005; GÜLÇİN, 2012).

No teste ORAC (capacidade de absorver radicais de oxigênio) é medida a capacidade do antioxidante frente a diversos radicais livres, já que diferentes radicais podem ser gerados: radical hidroxil, peroxil e o Cu²⁺. O antioxidante reage com um indicador fluorescente, a fluoresceína sódica ou a β-ficoeritrina (β-PE), sendo o indicador previamente misturado com o 2,2-azobis amidinopropano dihidrocloro (AAPH), composto gerador de radicais livres, que diminuem a fluorescência do indicador. O antioxidante reduz esses danos

gerados. Assim, quanto maior for a capacidade antioxidante do composto, maior a intensidade da fluorescência (GÜLÇİN, 2012). A desvantagem do método é que ele requer um espectrofluorímetro para condução das reações

Além dos testes químicos, existem testes que avaliam a capacidade de um determinado composto de estabilizar a oxidação induzida de lipídeos. Dentre eles, citam-se o teste Swift, que mede o índice de peróxido ao longo de tempo e o método de avaliação da capacidade de estabilização da oxidação de óleos, determinado no equipamento Rancimat® (Metrohm AG, modelo 743, Herisau, Suíça) (MENDONÇA, 2009).

O Índice de Estabilidade Oxidativa do Óleo (OSI), determinado no equipamento Rancimat® têm sido bastante empregado pela facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo de operação (FARHOOSH, 2007). Um fluxo de ar passa através do óleo mantido sob aquecimento em temperatura elevada. Sob estas condições de aceleração da oxidação, os processos oxidativos iniciam produzindo hidroperóxido como primeiro produto. Em sequência, esse composto é degradado até a produção de ácidos voláteis de cadeia curta, incluído ácido acético e ácido fórmico, os quais são conduzidos para borbulhar em água deionizada, solubilizando, e conseqüentemente, aumentando a condutividade elétrica da água, medida automaticamente ao longo do tempo. Assim, a quantidade de amostra de óleo, o fluxo de ar a ser injetado na amostra e a temperatura de aquecimento do óleo são parâmetros a serem facilmente ajustados no Rancimat® (JAIN & SHARMA, 2011).

A partir da curva de condutividade elétrica versus tempo, constroem-se duas paralelas que interceptam num ponto correspondente, na escala de tempo, ao período de indução ou índice de estabilidade oxidativa. Abaixo deste ponto, praticamente não existe formação de compostos da oxidação (ANTONIASSI, 2001). A capacidade antioxidante de compostos pode ser medida e comparada avaliando-se os fatores de proteção de cada composto ou extrato.

PARTE EXPERIMENTAL

Para atender aos objetivos deste trabalho, o conteúdo foi dividido em capítulos equivalentes a cada um dos objetivos específicos.

Cada capítulo contém a metodologia empregada e os resultados obtidos.

O conteúdo do trabalho está apresentado nos seguintes capítulos:

I. Aminas bioativas em sorgo: otimização de método e influência dos genótipos, tanino e estresse hídrico;

II. Influência da germinação no perfil e teores de aminas bioativas em sorgo;

III. Perfil e teores de ácidos fenólicos em sorgo;

IV. Aminas conjugadas em sorgo: método analítico e ocorrência;

V. Atividade antioxidante de poliaminas, ácidos fenólicos, aminas conjugadas e extratos metanólicos de sorgo.

CAPÍTULO 1 - AMINAS BIOATIVAS EM SORGO: OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO E INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS, TANINO E ESTRESSE HÍDRICO

1 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo foram: i) investigar a influência da granulometria do sorgo triturado, do tipo de ácido extrator e do número de extrações sucessivas, na recuperação de aminos bioativas livres em amostras de sorgo; e ii) determinar o perfil e os teores de aminos bioativas em alguns genótipos de sorgo, com e sem tanino e cultivados em ambientes com e sem estresse hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Para os testes de extração, foi utilizado um híbrido experimental de sorgo desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Para a análise da influência da presença de tanino no grão sobre o perfil e os teores de aminos bioativas, foi realizado um estudo exploratório com 22 genótipos de sorgo (Tabela. I.1) desenvolvidos e cultivados nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo em Nova Porteirinha, MG, a partir de Junho até Outubro de 2010.

A fim de avaliar a influência do cultivo do sorgo em ambiente com estresse hídrico sobre o perfil e teores de aminos bioativas, foram utilizadas amostras provenientes de cinco linhagens, denominadas de SC328, RTx2783, SC103, SC42 e SC192 (Tabela. I.1). As plantas foram irrigadas por aspersão durante 2 h, uma vez por semana. A partir do 50º dia em diante, após o desenvolvimento foliar, a irrigação continuou apenas nas amostras controle até o estágio de enchimento de grão, enquanto que, após o 50º dia de cultivo, as amostras submetidas ao estresse hídrico, por falta de água, não foram mais irrigadas. As extrações das aminos bioativas nessas amostras foram realizadas em triplicata.

Tabela I.1. Característica de cor do pericarpo dos genótipos de sorgo

Sem tanino		Com tanino	
Genótipos	Cor	Genótipos	Cor
BRS310	vermelho	BR9929026	bronze
SC1017	creme	BAZ9504	marrom
SC566	bronze	SC603	marrom claro
SC373	amarelo	SC59	marrom claro
P898012	cinza	SC224	marrom
SC1033	bronze	CSM-63	cinza
SC22	creme	SC574	marrom claro
RTx431	bronze	SC115	marrom
SC214	bronze	SC103	marrom
RTx2783	bronze	SC328	marrom claro
SC42	marrom		
SC192	amarelo		

Todos os genótipos de sorgo foram cultivados com duas repetições de campo. Os grãos foram armazenados sob refrigeração (4 ± 2 °C), após fumigação com fosfina. As amostras provenientes de cada repetição foram homogeneizadas, moídas e armazenadas a -18 °C até a determinação de aminos bioativas.

2.1.2 Reagentes, solventes e padrões de aminas

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os solventes usados no CLAE (acetonitrila), que foram de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). As fases móveis foram filtradas em membrana de 47 mm de diâmetro e com tamanho do poro de 0,45 µm (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), tipos HAWP e HVLP para solventes aquosos e orgânicos, respectivamente.

Os padrões de aminas bioativas foram preparados com diidrocloreto de putrescina (PUT), diidrocloreto de cadaverina (CAD), diidrocloreto de histamina (HIM), hidrocloreto de tiramina (TIM), tetraidrocloreto de espermina (EPM), triidrocloreto de espermidina (EPD), complexo sulfato creatinina agmatina (AGM), hidrocloreto de 2-feniletilamina (FEM), hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina (serotonina – SRT), todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Delineamento experimental

Inicialmente foram levados em consideração dois fatores que poderiam influenciar a extração de aminas do sorgo, dentre eles, a granulometria do sorgo após moagem e o tipo de ácido extrator (ácido tricloroacético, 5% e ácido clorídrico, 1 mol/L). Posteriormente testou-se o número de extrações consecutivas (3 e 4 extrações). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com duas repetições cada.

2.2.2 Estudo da influência do ácido extrator, da granulometria e das extrações sucessivas na recuperação das aminos bioativas de sorgo

Os grãos de sorgo foram submetidos à trituração em moinho de facas (IKA A11 Basic, Alemanha) durante dois períodos de tempos: 10 e 20 segundos. Após cada moagem, pesou-se 100 g do material, os quais foram submetidos ao peneiramento nos tamises 4, 8, 16, 30, 50, 80 e 100 mesh, com abertura das malhas de 4,75; 2,36; 1,18; 0,60; 0,30; 0,18 e 0,15 mm, respectivamente. Para o peneiramento foi utilizado um agitador de peneiras (SOLOTEST Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP) com frequência de 15 hertz por 30 min. O diâmetro médio das partículas foi calculado segundo orientações da ISO 2591:1988, por meio da equação (I.1).

$$\text{Diâmetro médio das partículas} = (d_1 \times d_2)^{1/2} \quad (\text{I.1})$$

em que:

d_1 : diâmetro, em mm, da peneira com a maior massa retida, e

d_2 : diâmetro, em mm, da peneira com a segunda maior massa retida.

Para a extração das aminos do sorgo, foram pesados 5 g de cada amostra moída e, em seguida, procedeu-se a extração adicionando-se 7 mL do ácido extrator. Na etapa de extração, foram empregados os ácidos tricloroacético a 5% e o clorídrico (1 mol/L) para avaliar a eficiência de recuperação de aminos bioativas. Todas as extrações foram conduzidas em duplicata, utilizando-se farinha de sorgo com e sem adição de solução contendo dez aminos na concentração de 100 µg/mL, de forma a se obter adição de 20 mg de cada amina em cada 100 g da amostra.

As amostras foram agitadas em mesa agitadora (Tecnal TE – 140, Piracicaba, SP) por 10 min, centrifugadas a 11.180 g a 4 °C por 21 min e filtradas em papel de filtro qualitativo. A fim de se verificar a influência de extrações sucessivas, foram testadas três e quatro extrações consecutivas. Os filtrados foram combinados e o volume final registrado.

2.2.3 Determinação de aminas bioativas por CLAE-par iônico

Todos os extratos obtidos foram filtrados em membrana HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp. Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência por par iônico, empregando derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção fluorimétrica (BANDEIRA et al., 2012).

A análise foi efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Modelo LC-10 AD, Shimadzu, Kioto, Japão) conectado a detector espectrofluorimétrico (RF-10 AXL) a 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. Utilizou-se coluna de fase reversa Nova pak® C18 (3,9 x 300 mm, 4 µm) (Waters, Milford, MA, EUA). Duas fases móveis foram empregadas em gradiente de eluição: (A) 0,2 mol/L de solução padrão de acetato de sódio (pH 4,9) com 15 mmol/L de octanosulfonato de sódio e (B) acetonitrila a um fluxo de 0,5 mL/min segundo o gradiente apresentado na Tabela I.2. O reagente de derivação consistiu de 1,5 mL Brij-35, 1,5 mL mercaptoetanol e 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 500 mL solução de ácido bórico a 5% (m/v) e KOH a 4,4% (m/v) (pH 10.5). O reagente de derivação foi bombeado a 0,3 mL/min.

Tabela I.2. Gradiente de eluição das fases móveis acetonitrila e solução tampão acetato de sódio:octanossulfonato de sódio por CLAE para determinação de aminas bioativas livres

Tempo (min)	Solução tampão (%)	Acetonitrila (%)
0,1	85	15
1	94	6
16	74	26
22	84	16
26	67	33
27	82	18
30	62	38
31,5	85	15
68	85	15

A identificação das aminas foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos das aminas na amostra em relação aos da solução padrão e também pela adição de solução da amina suspeita à amostra. O cálculo da

concentração das aminas foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas.

2.2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR, versão 5.3 (UFLA, Lavras, MG, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GRANULOMETRIA DO SORGO APÓS MOAGEM

Por meio das massas de sorgo moído, retidas em cada peneira, verificou-se que o diâmetro médio das partículas após moagem de 10 e 20 segundos foi de 840 μm e 420 μm , respectivamente. Esses valores correspondem a partículas que passaram em peneiras de abertura de 16 e 30 mesh, respectivamente.

A granulometria do sorgo após moagem é um parâmetro importante que influencia a etapa de extração e subsequente quantificação de aminas bioativas. A redução do tamanho dos grãos de sorgo pode facilitar a extração de solutos, devido ao aumento da área de contato disposta entre os grãos e o agente extrator (SARKER, 2006). Esse fato também foi comprovado por Silveira (2008) que, ao avaliar a recuperação de aminas bioativas em amostras de café, verificou diferentes valores de recuperação de acordo com o diâmetro das partículas de café moído.

3.2 INFLUÊNCIA DO ÁCIDO EXTRATOR, DA GRANULOMETRIA E DE EXTRAÇÕES SUCESSIVAS NA RECUPERAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS EM SORGO

Segundo a Comunidade Européia (EC, 2002), para a determinação de analitos em matrizes alimentícias na concentração de 20 mg/100 g, as recuperações devem estar entre 80 e 110%. Assim o TCA a 5% foi eficiente para extrair oito das dez aminas analisadas. As exceções foram serotonina e triptamina que apresentaram recuperações abaixo de 50%.

Quando o TCA a 5% foi empregado na extração, o tamanho de partícula da amostra não influenciou na recuperação das aminas (Tabela I.3). Quando o HCl a 1 mol/L foi empregado em sorgo moído a 420 μm , as recuperações foram menos eficientes em comparação com o TCA a 5%. Já quando o HCl a 1 mol/L foi empregado em sorgo moído a 840 μm , as recuperações de histamina e cadaverina foram significativamente menores em comparação com o extrator TCA a 5%.

Assim, decidiu-se avaliar o número de extrações consecutivas empregando TCA a 5%. Por meio da análise estatística dos dados foi verificado que o número de extrações consecutivas não influenciou a recuperação das aminas, mas apenas três extrações consecutivas resultaram em recuperações dentro dos limites estabelecidos pela Comunidade Européia (EC, 2002) (Fig. I.1).

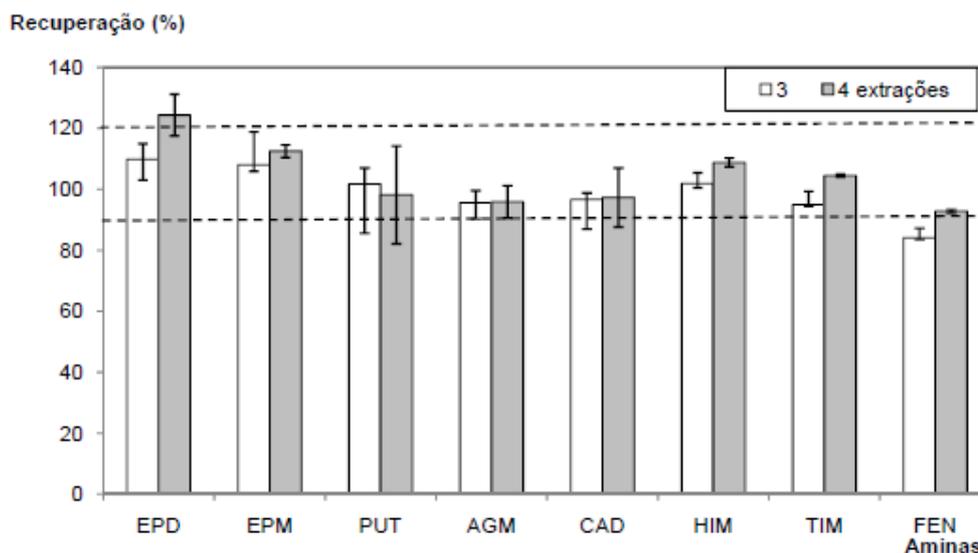


Figura I.1. Porcentagem de recuperação de aminas bioativas extraídas de sorgo moído (granulometria de 420 μm) empregando extrator TCA a 5%. EPD=espermidina; EPM=espermina; PUT=putrescina; AGM=agmatina; CAD=cadaverina; HIM=histamina; TIM=tiramina; FEM=feniletilamina.

Tabela I.3. Porcentagem de recuperação de aminas livres extraídas de sorgo e adicionadas de 20 mg/100 g de solução padrão de dez aminas empregando dois ácidos (ácido tricloroacético – TCA e ácido clorídrico – HCl), dois tamanhos de partículas (420 e 840 µm) e três extrações sucessivas

Extrator ácido	Tamanho partícula (µm)	Recuperação (%) de aminas (± desvio padrão)							
		EPD	EPM	PUT	AGM	CAD	HIM	TIM	FEM
5% TCA	420	109,9 ± 5,03	108,0 ± 10,81 ^a	101,7 ± 5,29 ^a	95,6 ± 3,97 ^a	96,6 ± 2,29 ^a	101,9 ± 3,55 ^a	94,9 ± 4,47 ^a	84,1 ± 3,17 ^a
	840	126,7 ± 2,23	127,0 ± 2,03 ^a	106,2 ± 1,42 ^a	102,4 ± 3,54 ^a	100,6 ± 3,68 ^a	106,6 ± 4,51 ^a	102,1 ± 2,66 ^a	90,6 ± 1,74 ^a
1 mol/L HCl	420	95,0 ± 6,42	84,7 ± 11,28 ^b	78,1 ± 1,83 ^b	64,9 ± 3,11 ^b	32,4 ± 1,38 ^c	57,5 ± 2,06 ^c	68,5 ± 5,31 ^b	62,3 ± 4,51 ^b
	840	104,5 ± 6,17	94,0 ± 2,73 ^{ab}	108,5 ± 1,39 ^a	93,0 ± 1,76 ^a	49,5 ± 3,85 ^b	94,6 ± 6,26 ^b	99,5 ± 2,43 ^a	90,5 ± 3,40 ^a

Médias seguidas de letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa (Teste de Tukey, p < 0,05).

EPD=espermidina; EPM=espermina; PUT=putrescina; AGM=agmatina; CAD=cadaverina; HIM=histamina; TIM=tiramina; FEM=feniletilamina.

3.3 PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES EM SORGO

Dentre as dez aminos investigadas, apenas as poliaminas espermidina e espermina e as diaminas putrescina, cadaverina foram encontradas nas amostras de sorgo estudadas. A amina predominante foi em alguns genótipos a espermina, seguida da espermidina e em outras, a espermidina seguida da espermina. A putrescina foi a terceira amina mais abundante. A cadaverina foi detectada em poucas amostras (Tabela I.4).

Os teores totais de aminos bioativas nos 22 genótipos de sorgo variaram de 0,58 a 4,14 mg/100 g (média, 2,50 mg/100 g). Os níveis de espermidina variaram de 0,05 a 1,87 mg/100 g, de espermina de 0,3 a 2,71 mg/100 g. Putrescina foi detectada em 70% das amostras no teor máximo de 0,72 mg/100 g. Já a cadaverina esteve presente em apenas três amostras, em pequenas quantidades, no máximo 0,06 mg/100 g (Tabela I.4). Esses resultados permitem concluir que o sorgo é uma fonte potencial de poliaminas, visto que em outros cereais esses valores são bem menores (KALAC, 2014).

As poliaminas, segundo os resultados, corresponderam de 60 a 100% das aminos presentes nos genótipos estudados. A espermina contribuiu em média com 54,5% do total de aminos no sorgo e a espermidina com cerca de 36%. A contribuição da putrescina foi pequena, e a da cadaverina, menor que a da putrescina.

Não foram encontrados dados de aminos livres em amostras de grãos de sorgo. Os únicos trabalhos relatam pesquisas de poliaminas em folhas e raízes de sorgo (ERDEI et al., 1996; YIN et al., 2014). Espermina, espermidina, putrescina e agmatina foram detectadas nas folhas, enquanto que espermina, espermidina e putrescina foram detectadas nas raízes. Espermina foi predominante nas folhas (50–70% do total de poliaminas), entretanto espermidina foi a amina mais abundante nas raízes (50–65% do total das poliaminas). De acordo com esses autores o acúmulo de poliaminas nas folhas e raízes é proporcional ao estresse osmótico.

Em outros cereais gramináceos há também predomínio de espermina, espermidina e putrescina nos grãos, embora os níveis de espermina e espermidina sejam na maioria das vezes, ligeiramente menores que no sorgo. Esse fato foi observado por Cao et al. (2010) em sementes de arroz maduras.

Os teores de putrescina e espermidina decresceram durante a maturação das sementes enquanto as concentrações de espermina aumentaram.

Tabela I.4 - Teores médios de aminas bioativas livres em diferentes genótipos de sorgo com e sem tanino

Genótipos de sorgo	Aminas (mg/100 g)				
	Espermidina	Espermina	Putrescina	Cadaverina	Total
Sem tanino					
BRS310	1,29	1,27	0,25	Nd	2,81
SC1017	1,09	2,71	0,27	Nd	4,07
SC566	0,76	1,66	0,14	0,05	2,61
SC373	0,48	1,64	0,07	Nd	2,19
P898012	0,63	2,29	0,15	Nd	3,07
SC1033	0,79	2,40	0,27	0,06	3,52
SC22	1,37	2,18	0,59	Nd	4,14
RTx431	0,70	2,06	0,21	0,05	3,02
SC214	1,07	1,89	0,20	Nd	3,16
SC42	0,99	0,36	0	Nd	1,35
SC192	1,87	1,03	0,65	Nd	3,55
RTx2783	0,51	0,82	0	Nd	1,6
Média (± dp)	0,96 ± 0,36	1,69 ± 0,70^a	0,23 ± 0,23	0,05 ± 0,08	2,92 ± 1,39^a
Com tanino					
BR9929026	0,70	1,87	Nd	Nd	2,57
BAZ9504	0,68	0,89	Nd	Nd	1,57
SC603	1,15	0,37	0,21	Nd	1,73
SC59	0,76	0,96	Nd	Nd	1,72
SC224	1,39	0,95	0,72	Nd	3,06
CSM-63	1,02	1,74	0,20	Nd	2,96
SC574	0,05	0,30	0,23	Nd	0,58
SC115	0,68	2,20	0,08	Nd	2,96
SC328	0,84	0,63	0,08	Nd	1,57
SC103	0,63	0,83	0,09	0	1,55
Média (± dp)	0,79 ± 0,41	1,07 ± 0,65^b	0,16 ± 0,22	0	2,03 ± 1,23^b

Nd = não detectado. Limite de quantificação: 0,04 mg/100g. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Cippola et al. (2007) encontraram em grãos de trigo, níveis de espermidina próximos a 1,50 mg/100 g, espermina de 0,73 mg/100 g e putrescina de 0,53 mg/100 g. Outros estudos com trigo reportaram níveis de espermidina de 1,58 mg/100 g, espermina de 0,45 mg/100 g e putrescina de 0,35 mg/100 g (MOHAMED et al., 2011). Em milheto os níveis de espermina e espermidina também foram próximos de 1 mg/100 g e de putrescina próximos a 0,2 mg/100 g (NISHIMURA et al., 2006). Bandeira et al. (2012) encontraram, em pesquisas com milho, teores de poliaminas próximos ao do sorgo: 2,79 mg/100 g para a espermina, 1,9 mg/100 g para a espermidina e 0,51 mg/100 g para a putrescina. Assim como no sorgo, também nas sementes de milho, os teores das poliaminas espermina e espermidina e da putrescina

corresponderam a uma grande fração do teor total de aminas, sendo a espermina a amina mais abundante. No sorgo a espermina foi mais abundante para algumas linhagens, SC103 e RTx2783, enquanto que em outras, SC328, SC42 e SC192, a espermidina foi a amina predominante (Fig. I.2).

A evidência de que os teores de putrescina são sempre menores que os de espermina e de espermidina em sementes maduras de cereais da família *Poaceae* pode ser explicada pelo fato da putrescina ser o composto precursor das poliaminas espermidina e espermina. Sabe-se que estas poliaminas são sintetizadas pela subsequente adição de um grupo aminopropil à putrescina e espermidina, respectivamente (BOUCHEREAU et al., 1999; GLÓRIA, 2005).

3.4 PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SORGO COM E SEM TANINO

Os genótipos de sorgo sem tanino apresentaram teores significativamente mais altos de aminas que os genótipos com tanino. Os teores totais de aminas em sorgos sem tanino variaram de 1,35 a 4,07 mg/100 g (média 2,92 mg/100 g), estatisticamente maiores que nos sorgos com tanino, cuja variação foi de 0,58 a 3,06 mg/100 g (média 2,03 mg/100 g). Espermina e espermidina foram detectadas em todas as amostras, sendo os níveis de espermina nas amostras de sorgo sem tanino significativamente maiores, variando de 0,36 a 2,71 mg/100 g. Nos genótipos com tanino, os valores de espermina variaram de 0,30 a 2,20 mg/100 g. Para as demais aminas detectadas, não houve diferença significativa entre os teores médios das amostras com e sem tanino, sendo a cadaverina detectada em apenas três amostras de sorgo sem tanino (Tabela I.4).

A contribuição de cada amina para o teor total também foi diferente entre os genótipos com e sem tanino. Nos genótipos com tanino, espermina contribuiu com 49,8% e espermidina com 40%, e a putrescina com apenas 10,2%. Entretanto, nos genótipos sem tanino, houve maior predominância de espermina (60%) seguida de espermidina (31,7%) e de putrescina (7,8%).

Com base nos resultados, verifica-se que sorgos sem tanino têm níveis maiores de aminas comparados aos sorgos com tanino. Assim, com base nos

resultados obtidos e partindo-se do fato de que as poliaminas são compostos com propriedades antioxidantes e que aceleram os processos de crescimento, sorgos sem tanino possuem qualidades nutricionais e agronômicas superiores em relação aos sorgos com tanino.

3.5 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE HÍDRICO NO PERFIL E TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SORGO

Os níveis de aminos em sorgos cultivados em ambientes com irrigação ideal e sob estresse hídrico estão apresentados na Figura 1.2.

Os teores de espermidina variaram de 0,51 a 1,87 mg/100 g de sorgo para as amostras irrigadas e de 0,39 a 1,69 mg/100 g de sorgo, para as amostras submetidas ao estresse hídrico. Já os teores de espermina variaram de 0,36 a 1,03 mg/100 g de sorgo, para as amostras irrigadas e de 0,26 a 1,02 mg/100 g de sorgo, para as amostras não irrigadas. Em relação à putrescina, nas amostras irrigadas, os teores variaram de 0 a 0,65 mg/100 g e nas amostras submetidas ao estresse hídrico, o teor máximo foi de 0,67 mg/100 g (Fig. 1.2).

O cultivo com estresse hídrico impactou de maneira significativa nos teores totais de aminos no grão, sendo esses teores significativamente menores nas linhagens com tanino submetidas ao estresse hídrico (RTx2783, SC42 e SC192). Nessas linhagens, os níveis de espermina foram significativamente menores para as amostras cultivadas sob estresse hídrico. Para a maioria das linhagens estudadas, independente da presença de tanino no grão, os teores de espermidina foram significativamente maiores nas amostras irrigadas. A exceção foi a linhagem SC42 que não apresentou diferença significativa entre os teores de espermidina na amostra irrigada e na submetida ao estresse hídrico. Dentre as cinco linhagens estudadas, em apenas três a putrescina foi detectada, havendo para a linhagem SC103, diminuição significativa no teor dessa amina, quando a planta foi submetida ao estresse hídrico. Para as demais linhagens, a diferença não foi significativa (Fig. 1.2).

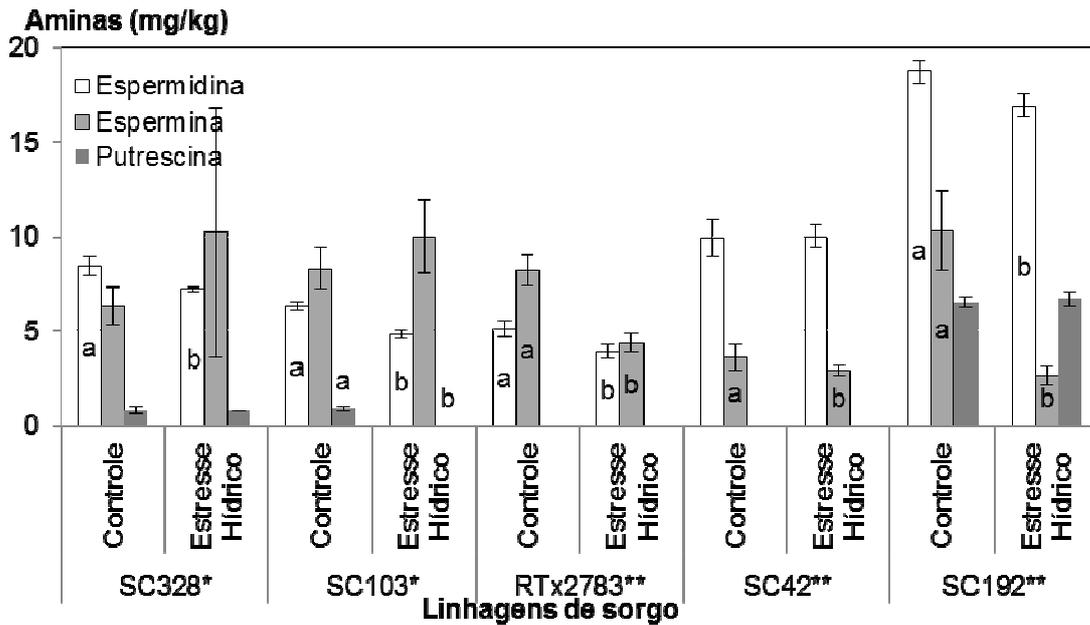


Figura 1.2. Teores médios (desvios padrões) de aminas bioativas em linhagens de sorgo com* e sem tanino** cultivados com e sem estresse hídrico. Limite de quantificação: 0,4 mg/Kg. Teores médios com letras diferentes dentro da linhagem diferem estatisticamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Geralmente, o aumento dos níveis de poliaminas está correlacionado com o aumento da capacidade da planta de superar os danos provocados por condições adversas do ambiente de cultivo. Pesquisas de Yin et al. (2014) com sorgo relataram que sob condições de estresse hídrico houve diminuição nos níveis de poliaminas nas folhas e aumento nos níveis de poliaminas nas raízes. Kusano et al. (2007) sugeriram que a diminuição dos níveis de espermina podem causar desregulação da rede de Ca^{2+} , resultando na falta de adaptação às condições de estresse. Assim o estresse induziu a produção de poliaminas em partes específicas da planta, de modo que estas pudessem modular a atividade de canais certos íons para adaptar o fluxo iônico em resposta às mudanças do meio. No estudo de grãos de sorgo, observou-se que o estresse hídrico teve efeito negativo no acúmulo de poliaminas.

4 CONCLUSÕES

O perfil e os teores de aminas em grãos de sorgo foram avaliados pela primeira vez. O método de extração foi otimizado, sendo o emprego de três

extrações consecutivas com TCA a 5% efetivo na recuperação das amins presentes em sorgo quando este foi triturado à granulometria de 420 μm . Apenas espermina, espermidina, putrescina e cadaverina foram detectadas nas 22 genótipos pesquisados. Em função do perfil e teores de amins livres no sorgo, este cereal pode ser considerado uma fonte de poliaminas, em comparação com outros cereais. Dentre os genótipos pesquisados, o SC22 e o SC1017 se destacam em relação ao conteúdo total de poliaminas. Outro fato importante é que a ausência de amins biogênicas em sorgo o caracteriza como ingrediente seguro para a alimentação humana. A presença de tanino impactou no perfil e teores de amins. Genótipos sem tanino possuem teores mais altos de amins, sendo os níveis de espermina significativamente mais altos em sorgos sem tanino. O cultivo de sorgo em ambiente com estresse hídrico impactou na diminuição da produção de espermidina no grão.

CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA GERMINAÇÃO NO PERFIL E NOS TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM SORGO

1 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi investigar a influência de genótipos com e sem tanino no perfil e nos teores de aminos bioativas em sorgo germinado e em diferentes partes da plântula.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Foram utilizadas oito amostras de sorgo desenvolvidas e cultivadas nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. As amostras incluíram duas cultivares: uma com tanino (BR9929026) e outra sem tanino (BRS310). Incluíram ainda, seis linhagens: três com tanino (SC59, SC603, BAZ9504) e outras três sem tanino (SC42, RTx2783 e SC192).

O cultivo de sorgo foi realizado em duas repetições, colhidas em março de 2012. Após a colheita, os grãos foram limpos, submetidos a aplicação de expurgo com fosfina e então armazenados sob a temperatura de 12 ± 1 °C e à 40% de umidade relativa até que o experimento fosse realizado.

2.1.2 Reagentes, solventes e padrões de aminos

Os reagentes usados foram de grau analítico, exceto os solventes utilizados para CLAE (acetonitrila), que foram de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultra-pura obtida pelo Milli-Q Plus system

(Millipore Corp, Milford, MA, EUA). Soluções padrão das aminas bioativas foram preparadas com espermina tetrahydroclorada, espermidina trihydroclorada, di-hidrocloro de putrescina, sulfato de agmatina, dicloridrato de cadaverina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), dicloridrato de histamina, hidrocloro de tiramina, 2-feniletilamina e cloridrato de triptamina que foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fases móveis foram filtradas através de membrana com tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore Corp, Milford, MA, EUA), tipos HAWP e HVLP para solventes aquosos e orgânicos, respectivamente.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Germinação

A germinação foi realizada como determinado pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Amostras de 100 sementes de sorgo por repetição foram germinadas em rolo de papel, a 20 ± 2 °C durante 16 h no escuro, seguido de 30 ± 2 °C durante 8 h na presença de luz (lâmpada tubular fluorescente) mantida em uma incubadora termostaticamente controlada (*Stults Scientific Engineering Corporation*, Springfield, IL, USA) a $92 \pm 2\%$ de umidade relativa. A germinação foi conduzida utilizando, em cada rolo, três folhas de papel (28 x 38 cm, Germitest®, J. Prolab, Paraná), umedecidos com água. Amostras foram colhidas em intervalos de 48 h até o 7º dia de germinação.

Dois experimentos foram conduzidos. No primeiro, as duas cultivares de sorgo, uma com tanino e outra sem, foram empregadas. Durante o período de germinação, amostras foram coletadas e manualmente separadas em radícula, cotilédone e material foliar (Fig. II.1). Cada amostra foi analisada em triplicata quanto aos teores de aminas bioativas e umidade.

No segundo experimento, seis amostras foram utilizadas: três com tanino e três sem tanino. Durante o período de germinação, a cada 48 h, os cotilédones das amostras em germinação foram separados e analisados, em triplicata, quanto ao teor de aminas bioativas livres e umidade.

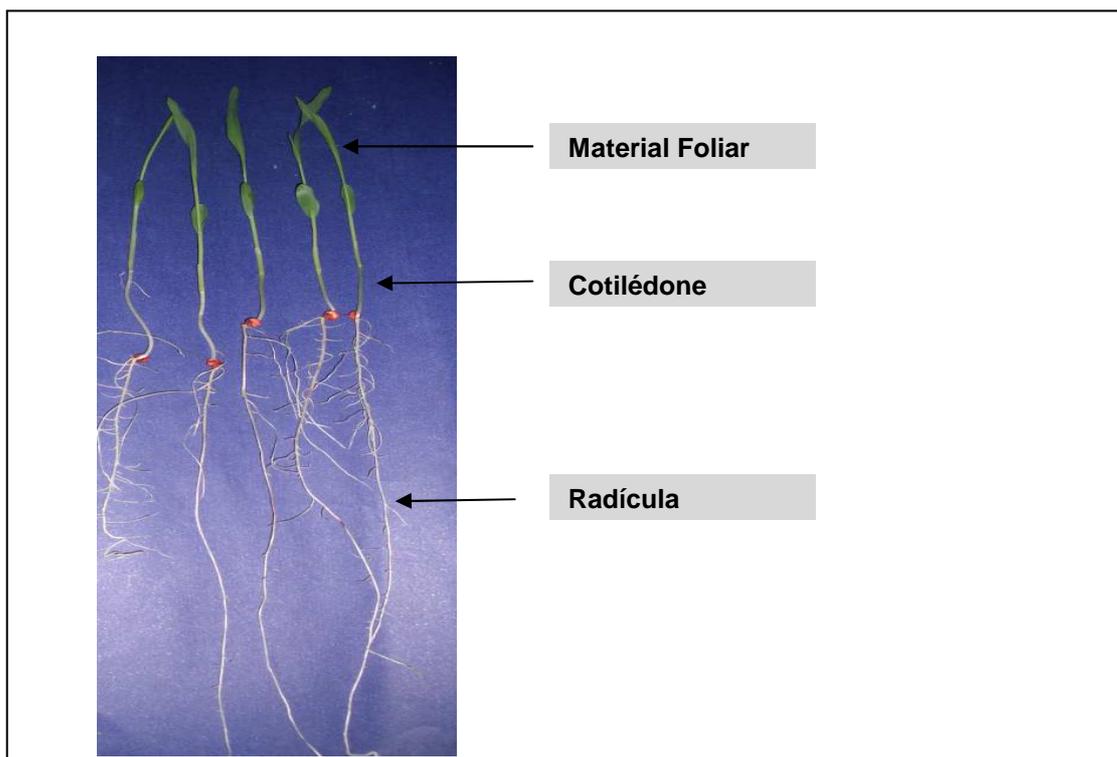


Figura II.1. Estruturas da plântula de sorgo após 7 dias de germinação, cultivar BRS310.

2.2.2 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a AOAC (2012). Esse valor foi utilizado para calcular os níveis de aminos bioativas e expressá-los em base seca.

2.2.3 Determinação de aminos bioativas

As extrações de aminos foram feitas a partir de sorgo germinado e de sementes de sorgo moídas a granulometria de 420 μm . Em 1 g de amostra foram adicionados 7 ml de ácido extrator, ácido tricloroacético (5%). As amostras foram homogeneizadas em mesa agitadora (TE Tecnal - 140, Piracicaba, SP, Brasil), durante 10 min e em seguida centrifugadas a 11.180 g, a 4 °C durante 21 min. Três extrações consecutivas foram realizadas e os filtrados foram combinados em balão volumétrico de 25 mL. O volume foi

completado com o ácido extrator. Todos os extratos foram filtrados através de filtros HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro (Millipore Corp Milford, MA, EUA). As aminas foram determinadas por CLAE, com derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção fluorimétrica. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo (Modelo LC AD-10, Shimadzu, Kioto, Japão) ligado a um detector RF AXL-10 espectrofluorométrico a 340 e 450 nm de excitação e de emissão, respectivamente. A coluna foi de fase reversa Nova pak® C18 de 3,9 x 300 mm, 4 µm (Waters, Milford, MA, EUA). Duas fases móveis foram utilizadas: (A) 0,2 mol/L de tampão de acetato de sódio (pH 4,9) com 15 mmol/L de octanosulfato de sódio e (B) acetonitrila. O fluxo foi de 0,5 mL/min no seguinte gradiente: 0 min, 15% B; 1 min, 6% B; 14 min, 6% B; 16 min, 26% B; 22 min, 16% B; 25 min, 16% B; 26 min, 33% B; 27 min, 18% B; 29 min, 18% B; 30 min, 38% B; 65 min, 38% B. O reagente de derivatização pós-coluna foi eluído a um fluxo de 0,3 mL/min. O reagente de derivação consistiu de 1,5 mL Brij-35, 1,5 mL mercaptoetanol e 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 500 mL solução de ácido bórico a 5% (m/v) e KOH a 4,4% (m/v) (pH 10.5).

A identificação das aminas foi feita por comparação dos tempos de retenção das aminas existentes nas amostras e da solução do padrão de amina. Os teores de aminas nas amostras foram determinados por interpolação em curvas de calibração externa com soluções padrão de 10 aminas bioativas ($R^2 \geq 0,9965$).

2.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o programa SISVAR, versão 5.3 (UFLA, Lavras, MG, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GERMINAÇÃO DO SORGO

Conforme ilustrado na Figura II.2, a germinação das sementes de sorgo durante os sete dias ocorreu da seguinte maneira: no primeiro dia (24 h), as sementes estavam túrgidas devido à absorção de água. No entanto, nenhuma estrutura de germinação podia ser vista. No segundo dia, foi possível ver a radícula e a estrutura foliar surgindo do cotilédone. A partir do terceiro dia foi possível observar a radícula maior e a estrutura foliar levemente esverdeada. Essas estruturas desenvolveram-se até o estágio de plântula madura, o que ocorreu no sétimo dia de germinação.

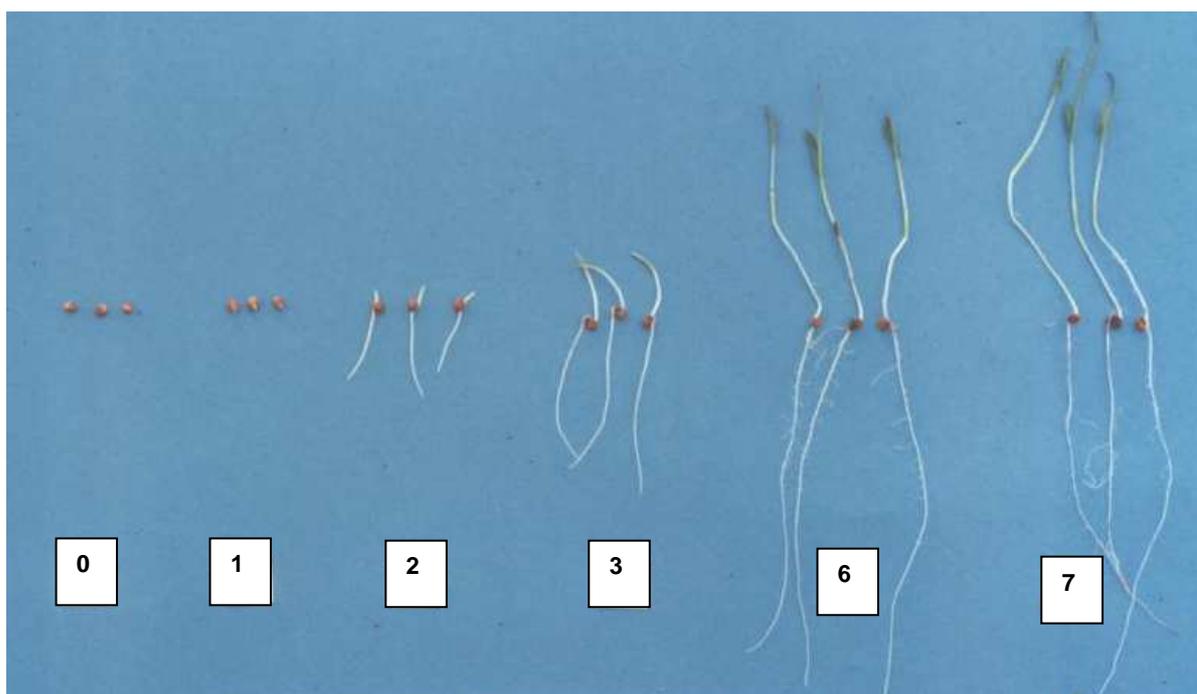


Figura II.2. Foto ilustrativa da germinação de *Sorghum bicolor* L., cultivar BRS310.

Condições da germinação: incubação a 20 ± 2 °C/16 h no escuro e 30 ± 2 °C por 8 h na presença de luz. Umidade relativa - $92 \pm 2\%$. Período: 7 dias.

Os teores de umidade das amostras mudaram significativamente durante a germinação. Inicialmente, a umidade do sorgo com tanino foi de 11,17 g/100 g e para o sorgo sem tanino de 10,75 g/100 g. Como mencionado anteriormente, com 24 h de germinação as sementes tornaram-se túrgidas e o

teor de umidade foi aumentado em 2,8 vezes em relação a semente *in natura*, o que correspondeu a umidade de 31,23 e 30,33 g/100 g para sorgo com e sem tanino, respectivamente. A partir do terceiro dia, quando as estruturas da plântula já podiam ser distinguidas, estas foram separadas e a umidade determinada para cada parte. Os teores de umidade para as folhas e radícula, no terceiro dia, foram de aproximadamente 90 g/100 g e permaneceram constantes até o sétimo dia de germinação (Tabela II.1). Entretanto, o teor de umidade do cotilédone aumentou significativamente. No terceiro dia era de aproximadamente 40 g/100 g, crescendo significativamente a uma taxa logarítmica [$R^2 = 0,9912$; ($y = 32,431\ln(x) + 4,9365$) e $R^2 = 0,9944$; ($y = 31,9\ln(x) + 4,989$)] para sementes com e sem tanino, respectivamente. Observa-se que houve uma mudança significativa no teor de umidade nas sementes no primeiro dia de germinação e também no cotilédone, do terceiro ao sétimo dia de germinação.

Tabela II.1. Teor de umidade de sementes e de diferentes estruturas da plântula durante a germinação de genótipos de sorgo com e sem tanino

Amostra	Teor de umidade (g/100 g) / germinação (dias)		
	3	5	7
Sorgo sem tanino (BRS310)			
Folha	89,50 ± 0,62	91,37 ± 0,45	90,65 ± 0,47
Cotilédone	40,50 ± 0,19 ^c	55,16 ± 0,96 ^b	67,77 ± 0,62 ^a
Radícula	88,33 ± 0,61	88,34 ± 0,92	87,48 ± 1,48
Sorgo com tanino (BR9929026)			
Folha	89,52 ± 0,52	92,75 ± 0,40	91,33 ± 0,32
Cotilédone	39,97 ± 1,01 ^c	58,63 ± 0,74 ^b	67,14 ± 1,09 ^a
Radícula	93,10 ± 0,15	91,74 ± 0,83	88,39 ± 0,79

n = 3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Condições da germinação: incubação a 20 ± 2 °C/16 h no escuro e 30 ± 2 °C/8 h na presença de luz. Umidade relativa de $92 \pm 2\%$. Período: 7 dias.

Glória et al. (2005) e Bandeira et al. (2012) encontraram mudanças similares nos teores de umidade durante a germinação de soja e milho, respectivamente. Essas pesquisas reforçam a necessidade de se expressar os

resultados em base seca, quando os teores de aminos são investigados em materiais em germinação.

3.2 PERFIL E TEORES DE AMINAS EM DIFERENTES PARTES DA PLÂNTULA DURANTE A GERMINAÇÃO

Nas análises realizadas durante todo o período de germinação, apenas as poliaminas espermidina e espermina e a diamina putrescina foram encontradas nas amostras de sorgo. Cadaverina, histamina, tiramina, agmatina, serotonina, feniletilamina e triptamina não foram detectadas.

Nas primeiras 24 h de germinação, houve diminuição significativa nos teores totais de aminos, tanto na amostra com quanto na sem tanino (Tabela II.2). Da mesma forma, para os dois genótipos, os teores de espermina diminuíram após 24 h de germinação. No genótipo com tanino também houve diminuição significativa de espermidina, no entanto, o teor de putrescina aumentou. Para o genótipo sem tanino, espermidina e putrescina não sofreram alterações significativas no primeiro dia de germinação.

Tabela II.2. Teores médios de aminos bioativas em sorgo com e sem tanino antes e após um dia (24 h) de germinação

Sorgo	Teores médios de aminos (mg/100 g, base seca)							
	Espermidina		Espermina		Putrescina		Total	
	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)
Com tanino								
BR99290266	0,76 ± 0,03 ^a	0,38 ± 0,02 ^b	2,08 ± 0,32 ^a	0,93 ± 0,09 ^b	Nd ^b	0,19 ± 0,00 ^a	2,73 ± 0,04 ^a	1,50 ± 0,09 ^b
Sem tanino								
BRS310	1,43 ± 0,29	1,71 ± 0,22	1,46 ± 0,29 ^a	0,94 ± 0,06 ^b	0,68 ± 0,27	0,57 ± 0,17	3,56 ± 0,32 ^a	2,90 ± 0,59 ^b

n = 3. Nd = não detectado. Limite de Quantificação: 0,04 mg/100 g.

Médias (± desvios-padrões) com letras diferentes na linha para uma determinada amina são significativamente diferentes (Teste de Tukey, p < 0,05). Condições da germinação: incubação a 20 ± 2 °C/16 h no escuro e 30 ± 2 °C/8 h na presença de luz. Umidade relativa de 92 ± 2%. Período: 7 dias.

No entanto, à medida que a plântula se desenvolveu, os teores de putrescina aumentaram significativamente ao longo do período de germinação, havendo acúmulo na radícula da plântula madura do sorgo com tanino e no cotilédone da plântula madura de sorgo sem tanino (Tabela II.3). Ainda em relação à putrescina, geralmente os teores dessa amina foram significativamente maiores para a amostra sem tanino.

Quanto à espermina, esta foi detectada apenas no cotilédone e radícula da plântula madura, ou seja, após o sétimo dia de germinação, do sorgo com tanino (Tabela II.3). Em relação à espermidina, no sorgo com tanino, os teores diminuíram significativamente na radícula, ao longo da germinação, mantiveram-se semelhantes na folha e variaram no cotilédone. Já para o sorgo sem tanino, ao longo do período de germinação houve aumento significativo de espermidina no cotilédone, enquanto que na radícula e na folha, os teores dessa amina diminuíram. Da mesma forma que para a putrescina, geralmente os teores de espermidina foram significativamente maiores nas diversas partes da plântula de sorgo sem tanino.

Na Figura II.3 está ilustrada a distribuição de cada amina nas diversas partes da plântula ao longo do período de germinação. Verifica-se assim, que existe espermina no sorgo apenas na semente, antes da germinação, e no primeiro dia de germinação. Acredita-se que nas 48 h seguintes, haja forte catabolismo dessa amina, pois ao terceiro dia a espermina não foi mais detectada em nenhuma parte da plântula.

De acordo com Glória (2005), a síntese da espermina se dá a partir da espermidina e desta, a partir da putrescina. A partir do terceiro dia de germinação do sorgo, há uma formação crescente de putrescina e uma conversão lenta desta amina em espermidina. Espermina não é formada até o sétimo dia de crescimento da plântula. Acredita-se que a formação mais intensa de espermina e de espermidina ocorra durante o crescimento da planta e não na germinação.

Tabela II.3. Teores médios de aminas bioativas em diferentes partes da plântula de sorgo, com e sem tanino, do terceiro ao sétimo dia de germinação

Amostra	Teor de Aminas (mg/100 g, base seca)			
	Espermidina	Espermina	Putrescina	Total
Sorgo com tanino (BR99290266)				
Folha				
3	4,31 ± 0,25 ^x B	Nd	26,34 ± 3,48 ^{bx}	30,65 ± 3,73 ^x
5	5,79 ± 1,59 ^x	Nd	26,66 ± 4,27 ^{bx}	32,45 ± 5,86 ^x
7	6,13 ± 0,33 ^{xA}	Nd ^y	34,69 ± 0,75 ^{ayA}	40,82 ± 1,08 ^{yA}
Cotilédone				
3	1,45 ± 0,24 ^{bz}	Nd	2,93 ± 0,33 ^{cyB}	4,38 ± 0,57 ^{czB}
5	3,02 ± 0,40 ^{ay}	Nd	16,28 ± 1,50 ^{byB}	19,30 ± 1,90 ^{bzB}
7	1,15 ± 0,22 ^{byB}	1,08 ± 1,86 ^y	27,61 ± 1,34 ^{azB}	29,84 ± 3,42 ^{azB}
Radícula				
3	3,18 ± 0,33 ^{ayB}	Nd ^b	2,48 ± 0,33 ^{cyB}	5,66 ± 0,66 ^{cyB}
5	Nd ^{bz}	Nd ^b	24,99 ± 0,33 ^{bxB}	24,99 ± 0,33 ^{byB}
7	Nd ^{bzB}	3,17 ± 0,15 ^{axA}	50,51 ± 0,33 ^{axA}	53,68 ± 0,48 ^{axA}
Sorgo sem tanino (BRS310)				
Folha				
3	5,27 ± 0,32 ^{ayA}	Nd	23,24 ± 3,16 ^{bx}	28,51 ± 3,48 ^y
5	5,67 ± 0,91 ^{ax}	Nd	23,36 ± 3,59 ^{by}	29,03 ± 1,23 ^y
7	Nd ^{byB}	Nd	29,43 ± 0,48 ^{azB}	29,43 ± 0,48 ^{zB}
Cotilédone				
3	1,40 ± 0,36 ^{cz}	Nd	9,52 ± 1,27 ^{cyA}	10,92 ± 1,63 ^{czA}
5	2,88 ± 0,88 ^{by}	Nd	32,77 ± 0,55 ^{bxA}	35,65 ± 1,43 ^{bxA}
7	5,00 ± 0,07 ^{axA}	Nd	54,22 ± 2,48 ^{axA}	59,22 ± 2,55 ^{axA}
Radícula				
3	9,65 ± 1,30 ^{axA}	Nd	30,42 ± 5,27 ^{xA}	40,07 ± 6,57 ^{xA}
5	Nd ^{bz}	Nd	34,21 ± 3,28 ^{xA}	34,21 ± 3,28 ^{xA}
7	Nd ^{by}	Nd ^B	36,64 ± 3,03 ^{yB}	36,64 ± 3,03 ^{yB}

n = 3. Nd = não detectado. Limite de quantificação: 0,04 mg/100 g.

Médias (± desvios-padrões) seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey, p < 0,05. Considerou-se a seguinte representação: parte específica da planta ao longo do período de germinação (a, b, c); mesmo período de germinação e diferentes partes da plântula (x, y, z); parte específica da plântula, para um mesmo período de germinação comparando sorgo com e sem tanino (A, B).

Condições da germinação: incubação a 20 ± 2 °C/16 h no escuro e 30 ± 2 °C/ 8 h na presença de luz. Umidade relativa de 92 ± 2%. Período: 7 dias.

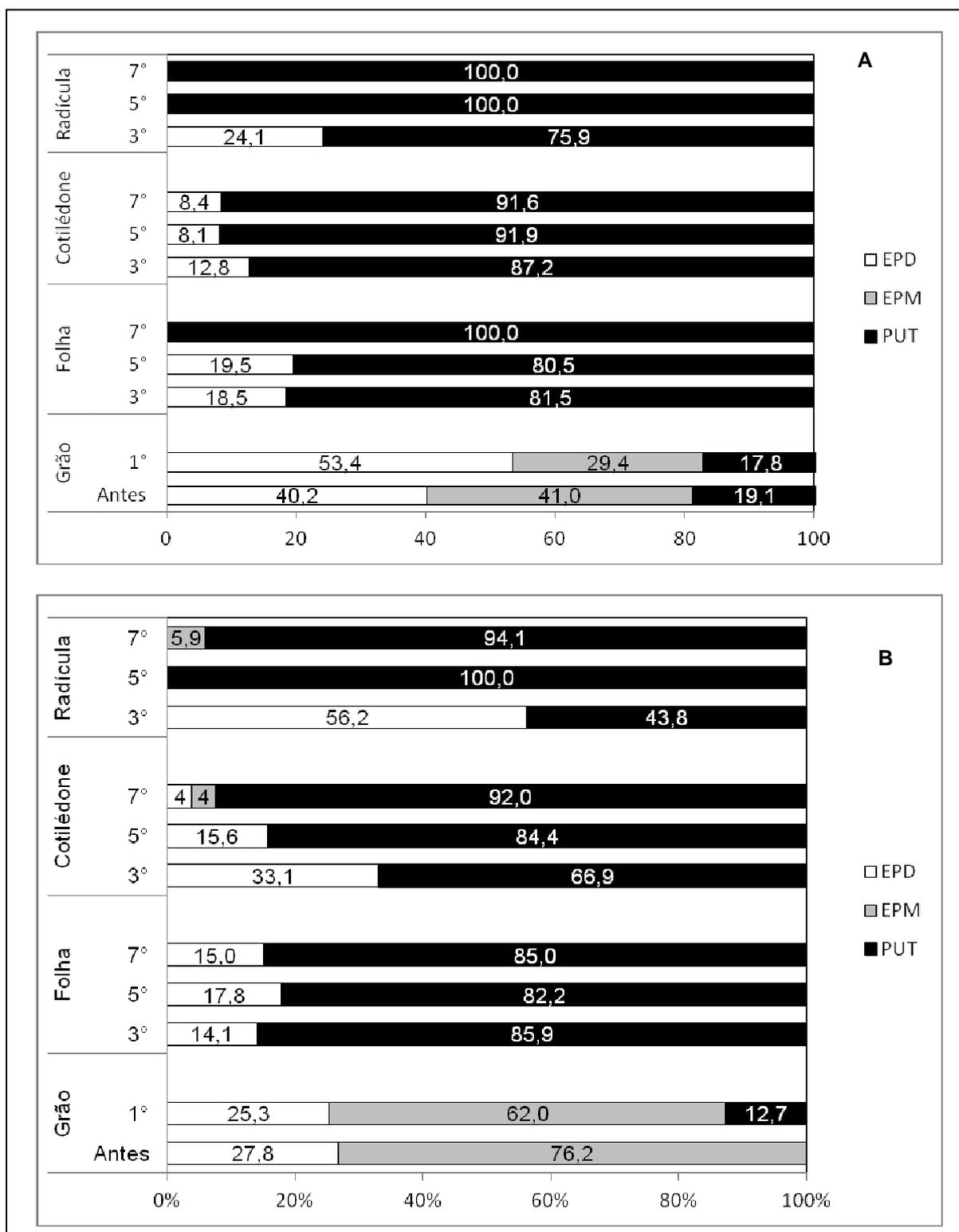


Figura II.3. Contribuição, em porcentagem, da espermina, espermidina e putrescina ao conteúdo total de aminas em sorgo sem tanino (A) e com tanino (B) antes da germinação, no primeiro dia e durante a germinação (3°, 5° e 7° dia) nas folhas, cotilédone e radícula.

Em pesquisa sobre aminas bioativas em soja durante quatro dias de germinação, cinco aminas foram encontradas. Houve predominância de espermidina, seguida de espermina, putrescina, agmatina, e cadaverina (GLÓRIA et al., 2005). Assim como no estudo com sorgo, em soja não houve uma alteração significativa nos teores de aminas durante os estágios iniciais da germinação. A partir do 2º dia de germinação até o 4º dia, os teores das aminas espermidina, espermina, putrescina e cadaverina aumentaram significativamente nas plântulas de soja. Espermidina e espermina acumularam-se no cotilédone, enquanto a cadaverina e a putrescina acumularam-se na radícula. No entanto, o conteúdo de aminas diminuiu após 96 h, fato que não foi observado para as sementes de sorgo germinadas durante 7 dias. Também em plântulas de sorgo, apenas putrescina aumentou de maneira significativa após o sétimo dia de germinação, como já relatado.

3.3 PERFIL E TEORES DE AMINAS NO COTILÉDONE DE DIVERSOS GENÓTIPOS DE SORGO DURANTE A GERMINAÇÃO

Nas primeiras 24 h de germinação ainda não havia formação das estruturas da plântula. Assim, os teores das aminas foram determinados nas sementes antes da germinação e nas sementes embebidas após 24 h de germinação. Na Tabela II.4 é possível observar que não houve diferença significativa nos teores de putrescina após 24 h, tanto para os genótipos com quanto nas sem tanino. Da mesma forma, os teores de espermina e de espermidina nos genótipos com tanino foram semelhantes ao se comparar antes e após 24 h de germinação. Já para alguns genótipos de sorgo sem tanino, houve decréscimo significativo nos teores de espermina e de espermidina após 24 horas de germinação.

Após a retirada do cotilédone das plântulas, fez-se a análise do teor de aminas. Houve um padrão de mudança comum para todas as linhagens, em relação aos teores de putrescina, os quais aumentaram significativamente a uma taxa linear a partir do 3º dia de germinação, tanto nas linhagens sem tanino, como nas linhagens com tanino, o que pode ser constatado nas Figuras

II.4 e II.5, respectivamente. O incremento no teor de putrescina foi em média 3 vezes maior no 7º dia em relação ao 3º dia (Fig. II.4 e II.5).

Em duas linhagens de sorgo sem tanino, SC42 e RTx2783, pequenas quantidades de espermina foram detectadas no cotilédone, apenas no 7º dia de germinação (Fig. II.4). Nas linhagens com tanino e na RTx2783, sem tanino, os teores de espermidina mantiveram-se constantes. Nas demais, SC192 e SC42 houve diminuição significativa de espermidina (Fig. II.4 e Fig. II.5).

Bandeira et al. (2012) estudando milho germinado, em menor período de germinação, observaram que da mesma forma que no sorgo germinado, houve um aumento significativo nos teores de putrescina. No entanto, as poliaminas aumentaram durante a germinação do milho, o que não aconteceu com o sorgo germinado.

Um estudo de Ohe et al. (2005) avaliou os teores de poliaminas e putrescina endógenas e exógenas em soja germinada por 8 dias. Os resultados do estudo mostraram que a putrescina exógena é rapidamente convertida em espermidina e, posteriormente, em espermina. Grandes quantidades de espermina foram acumuladas na raiz e parte aérea, embora a concentração endógena dessa poliamina tenha sido bastante baixa e diminuída ao longo do período de germinação. Em relação à espermina endógena houve ligeiro aumento no final do período de germinação. A diminuição das poliaminas, espermina e espermidina, durante as 18 h iniciais também foi atribuída à difusão por meio do gradiente de concentração. A translocação de poliaminas geralmente ocorre a partir do cotilédone para o embrião, ou seja, para a gêmula e radícula iniciais, durante as primeiras 18 h de germinação. Em plântulas de tomate e milho, a putrescina exógena é absorvida pelas raízes contra um gradiente de concentração e é translocada para as partes superiores da plântula dentro de 30 min. Uma certa proporção da putrescina absorvida é convertida em espermidina e espermina nestas plantas (RABITI et al., 1989). Esses estudos comprovam que a variação dos teores de poliaminas e putrescina, em plântulas, ocorre devido à síntese e translocação entre as partes.

Tabela II.4. Teores médios de aminos bioativas nos grãos de diversos genótipos de sorgo com e sem tanino antes e após um dia (24 h) de germinação

Genótipos	Teores médios de aminos (mg/100 g, base seca)							
	Espermidina		Espermina		Putrescina		Total	
	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)	0	1 (24 h)
Com tanino								
BAZ9504	0,73 ± 0,02	0,96 ± 0,24	0,97 ± 0,13	Nd	Nd	0,10 ± 0,11	1,70 ± 0,50	1,06 ± 0,35
SC603	1,28 ± 0,07	1,34 ± 0,07	0,41 ± 0,18	Nd	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,01	1,92 ± 0,26 ^a	1,62 ± 0,08 ^b
SC59	0,85 ± 0,14	0,95 ± 0,08	1,07 ± 0,17	Nd	Nd	0,19 ± 0,08	1,92 ± 0,31 ^a	1,14 ± 0,16 ^b
Sem tanino								
RTx2783	0,58 ± 0,08 ^b	2,24 ± 0,51 ^a	0,87 ± 0,03 ^a	Nd ^b	Nd	Nd	1,45 ± 0,11 ^b	2,24 ± 0,51 ^a
SC42	1,04 ± 0,18	0,86 ± 0,04	1,33 ± 0,23 ^a	Nd ^b	Nd	Nd	2,37 ± 0,41 ^a	0,86 ± 0,04 ^b
SC192	2,06 ± 0,13	1,68 ± 0,20	0,97 ± 0,27	Nd	0,73 ± 0,04	0,66 ± 0,10	3,76 ± 0,44	2,34 ± 0,57

n = 3. Nd = não detectado. Limite de Quantificação: 0,04 mg/100 g.

Médias (± desvios-padrões) com letras diferentes na linha para uma determinada amina são significativamente diferentes (Teste de Tukey, p < 0,05).

Condições da germinação: incubação a 20 ± 2 °C/16 h no escuro e 30 ± 2 °C/8 h na presença de luz. Umidade relativa de 92 ± 2%. Período: 7 dias.

Patene et al. (2012) avaliaram o desenvolvimento da radícula e da gêmula de sorgo submetido ao estresse salino e hídrico durante 48 h de germinação. Embora a pesquisa não tenha avaliado o teor de aminos nessas partes da plântula, os pesquisadores avaliaram o crescimento dessas estruturas. O efeito inibidor da germinação das sementes e do crescimento do embrião foi mais forte para as sementes submetidas ao estresse hídrico do que para aquelas submetidas ao estresse salino. Nas duas situações de estresse as cultivares testadas foram capazes de germinar, mas o crescimento da raiz e da parte aérea foi retardado. Esse fato pode estar relacionado à diminuição dos teores de poliaminas nas plântulas submetidas às condições de estresse, já que segundo Yin et al. (2014), o estresse hídrico diminui os teores de poliaminas e putrescina na raízes e folhas de plantas de sorgo.

A germinação é um passo essencial na preparação de alguns produtos à base de sorgo (DICKO et al., 2005). Diversos estudos comprovam que durante a germinação de sementes comestíveis, o teor de nutrientes aumenta e o de antinutrientes geralmente diminui. Em sorgo germinado, os teores de carboidratos e proteínas são aumentados e os de tanino diminuídos (OMARY et al., 2012). Embora os taninos apresentem capacidade antioxidante, esses compostos complexam-se com as proteínas, impedindo sua digestão e subsequente absorção (DYKES & ROONEY, 2006). Em relação às aminos bioativas, observou-se que nenhuma das biogênicas foram detectadas em sorgo germinado. Já em relação às poliaminas, consideradas antioxidantes, não houve formação expressiva desses compostos no sorgo germinado, por sete dias.

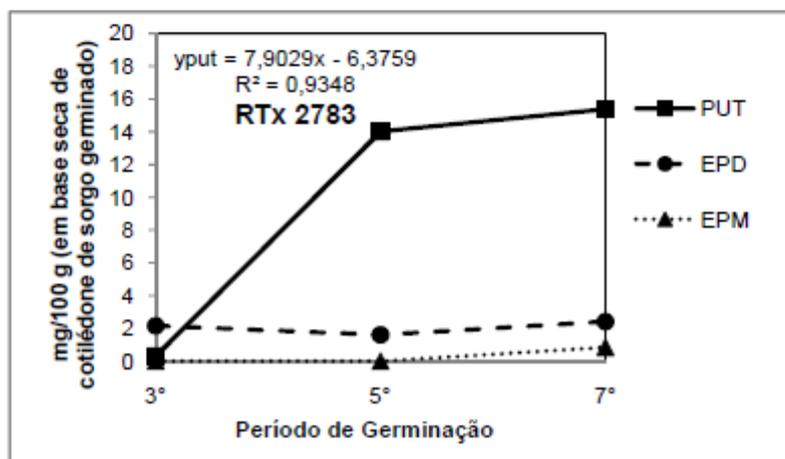
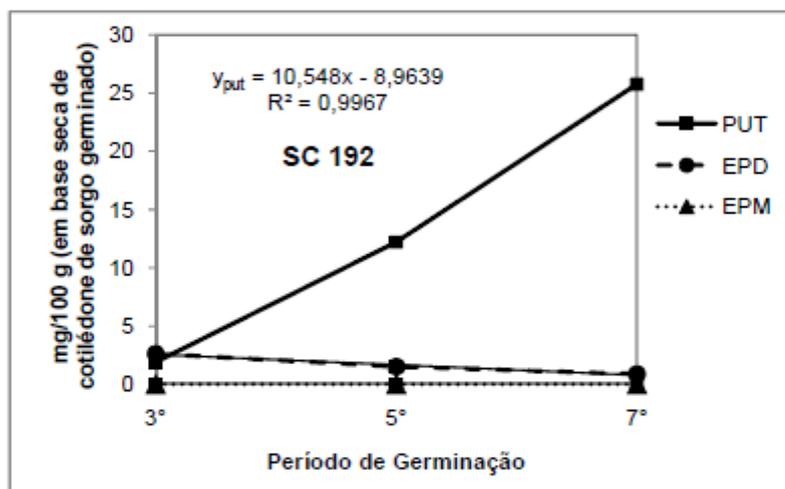
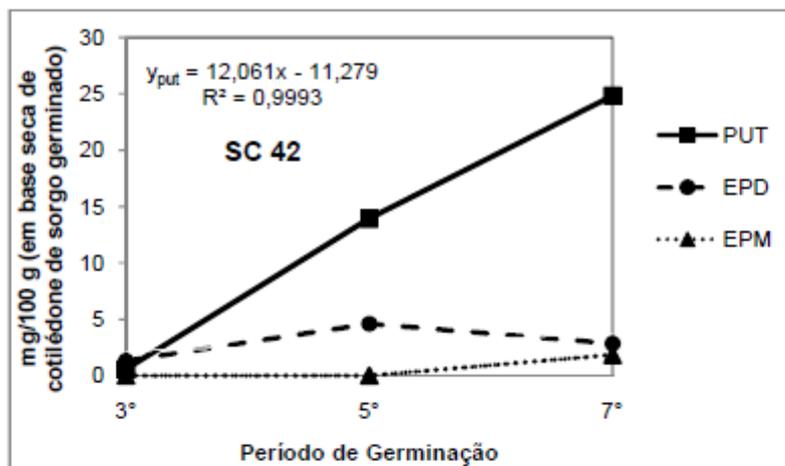


Figura II.4. Teores de aminos bioativas no cotilédone (mg/100 g bs sorgo germinado) durante o período de germinação de linhagens sem tanino.

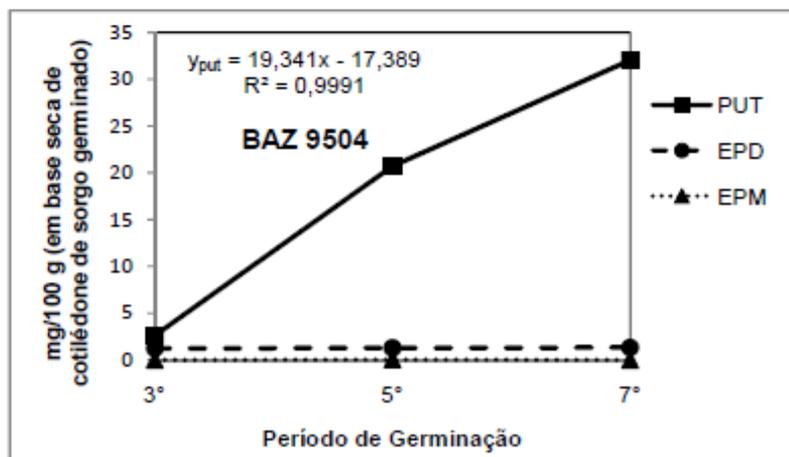
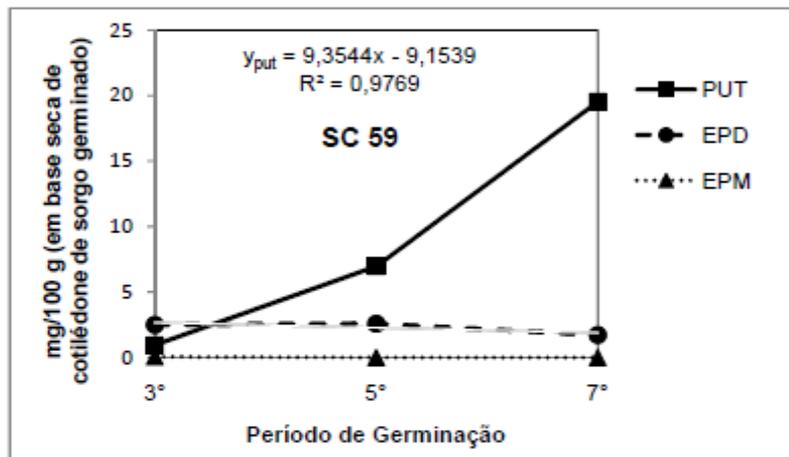
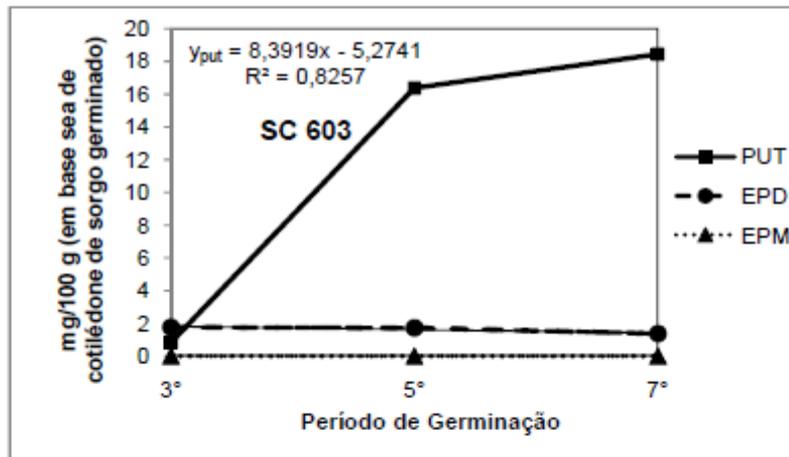


Figura II.5. Teores de aminas bioativas no cotilédone (mg/100 g bs sorgo germinado) durante o período de germinação de linhagens com tanino.

4 CONCLUSÕES

Dentre as aminas pesquisadas, apenas espermina, espermidina e putrescina foram detectadas em sorgo germinado por 7 dias. No primeiro dia de germinação, houve um decréscimo de espermina em quatro dos oito genótipos estudados. Nas demais, não houve alteração significativa nos teores dessa amina, neste período. Espermina foi detectada no 7º dia de germinação no cotilédone e na radícula de alguns genótipos. Do terceiro ao sétimo dia de germinação, houve um aumento significativo dos níveis de putrescina. Altos teores foram detectados na radícula, seguida do cotilédone e folha do genótipo com tanino e no cotilédone do genótipo sem tanino. Os teores de espermidina decresceram na radícula dos dois genótipos e também na folha da plântula do sorgo sem tanino. As mudanças nos teores de aminas durante a germinação de sorgo não foram afetadas pela presença de tanino no grão. Diferentemente do milho e da soja, na germinação do sorgo ocorreram incrementos apenas dos teores de putrescina. Como as poliaminas são comprovadamente compostos antioxidantes, a elaboração de produtos à base de sorgo germinado não agrega os benefícios atribuídos a esses compostos, nas condições de germinação empregadas neste estudo. Vale destacar que mudanças nas condições de germinação normalmente resultam em mudanças na composição do cereal germinado. Assim, sugere-se testar outras condições de germinação.

CAPÍTULO 3 – PERFIL E TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM SORGO

1. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi determinar o perfil e os teores de ácidos hidroxicinâmicos solúveis e insolúveis em sorgo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Fenólicos totais e ácidos hidroxicinâmicos foram determinados em cinco amostras de sorgo, originadas do cultivo com e sem estresse hídrico. Esse material foi cultivado nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. As amostras incluíram as linhagens com tanino SC328 e SC103, com pericarpo de coloração marrom clara e marrom, respectivamente e as linhagens sem tanino, SC42, RTx2783 e SC192 com pericarpo marrom, bronze e amarelo, respectivamente. O cultivo de sorgo foi realizado com duas repetições nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo em Nova Porteirinha, MG, a partir de Junho até Outubro de 2010. As plantas foram irrigadas por aspersão durante 2 h, uma vez por semana. A partir do 50º dia em diante, após o desenvolvimento foliar, a irrigação continuou apenas nas amostras controle até o estágio de enchimento de grão, enquanto que, após o 50º dia de cultivo, as amostras submetidas ao estresse hídrico não foram mais irrigadas.

Após colheita, os grãos foram submetidos ao expurgo com fosfina e armazenados sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ \text{C}$ e 40% de umidade relativa) até a realização dos experimentos.

2.1.2 Reagentes, solventes e padrões

Os reagentes usados foram de grau analítico, com exceção dos solventes utilizados no CLAE (metanol), os quais foram de grau cromatográfico. Também foi utilizado água ultra pura proveniente sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

As soluções padrão de ácidos fenólicos foram preparadas com metanol 50%. O reagente de Folin–Ciocalteu foi adquirido da Cinética (Jand Química, Jandira, SP, Brasil) e os padrões de ácido cumárico (C9008), ácido ferúlico (128708), ácido sinápico (D7927), ácido caféico (Fluka, 60020), ácido gálico (G7384) e o reagente ácido trifluoracético (TFA) (T6508) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os solventes e reagentes utilizados na extração, como o acetato de etila foram adquiridos da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, EUA), o hexano, ácido acético, carbonato de sódio e hidróxido de sódio da Synth (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), o metanol da J.T. Baker (Xalostoc, México) e o ácido clorídrico da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil).

2.2 MÉTODOS

As amostras de sorgo foram trituradas em moinho de facas (IKA A11 Basic, Alemanha) por 10 s, obtendo-se uma granulometria de 420 μm . A partir das amostras trituradas, foram realizadas as análises descritas a seguir.

2.2.1 Determinação de fenólicos totais

Os fenólicos totais foram extraídos do sorgo segundo metodologia proposta por Chiremba et al. (2012) com modificações. Foi pesado 1 g do sorgo triturado, seguindo-se a extração com 15 mL de metanol acidificado (1% de HCl concentrado, v/v). As amostras foram homogeneizadas em mesa agitadora (Tecnal TE – 140, Piracicaba, SP, Brasil) a 250 rpm por 15 min e em seguida, centrifugadas (Jouan CR3i, Saint-Herblain, França) a 4.500 g a 18 °C por 15 min e filtradas em papel de filtro qualitativo. Em tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL do sobrenadante e 1 mL da solução de Folin-Ciocalteu. Após 8 min acrescentou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio (20%, p/v) e 7 mL de água deionizada. Agitou-se a solução em vortex por 20 seg e após repouso por 2 h no escuro, procedeu-se a leitura da absorbância a 725 nm em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu, Kioto, Japão). As análises foram realizadas em triplicata.

A curva padrão utilizada para quantificar os fenólicos totais foi elaborada com soluções aquosas do padrão ácido gálico, nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 125 mg/L. Uma equação de regressão ($y = 0,01114x + 0,0450$; $R^2 = 0,9696$) foi utilizada para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por g de sorgo.

2.2.2 Extração de ácidos fenólicos solúveis

Os ácidos fenólicos livres e conjugados solúveis foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por Shao et al. (2014) com modificações. Pesou-se 1 g de farinha de sorgo (granulometria de 420 µm) e procedeu-se a extração com 15 mL de metanol 80%. A mistura foi agitada em mesa agitadora (Ovan, Badalona, Espanha) a 800 rpm por 1 h seguida de centrifugação (Jouan CR3i, Saint-Herblain, França) a 4500 g a 18 °C por 15 min. A extração foi realizada duas vezes e os sobrenadantes combinados.

Os sobrenadantes foram concentrados sob um fluxo de ar em banho a 40 °C. O sobrenadante concentrado foi hidrolisado com 2 mL de solução de NaOH 2 M por 2 h sob agitação em mesa agitadora (Ovan, Badalona,

Espanha) a 800 rpm. Após digestão, o pH foi ajustado para cerca de 1,5-2,0 com HCl concentrado. A solução foi então extraída com acetato de etila para eliminação de possíveis flavonoides e o sobrenadante recolhido e concentrado sob ar comprimido a 50 °C (\pm 5 °C). O extrato obtido foi armazenado a -20 °C até a análise por cromatografia líquida. Antes da injeção no cromatógrafo, os extratos foram ressuspensos em 2 mL de metanol a 50% e filtrados em filtros HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 μ m de tamanho de poro (Millipore Corp Milford, MA, EUA). A extração foi realizada em triplicata.

2.2.3 Extração de ácidos fenólicos insolúveis

Os ácidos fenólicos conjugados presentes no resíduo proveniente da extração do sorgo com metanol a 80%, descrita no item 2.2.2, foram extraídos segundo metodologia proposta por Chiremba et al. (2014) com algumas modificações. Inicialmente o resíduo foi lavado com água pura, para remover o solvente orgânico, e em seguida, filtrado em papel qualitativo. Uma porção de 200 mg foi adicionada de solução de NaOH 2 M ficando a solução sob agitação a 800 rpm por 2 h em mesa agitadora (Ovan, Badalona, Espanha), a fim de se proceder a hidrólise dos ácidos hidroxicinâmicos conjugados. Após digestão, o pH foi ajustado para cerca de 1,5-2,0 com HCl concentrado. A fim de remover os lipídeos, foram adicionados 15 mL de hexano. A fase orgânica foi removida com o auxílio de pipeta e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. A fase aquosa foi então extraída por duas vezes, com 15 mL de acetato de etila, a fim de ser retirar possíveis flavonoides. O sobrenadante foi recolhido e concentrado sob ar comprimido, a temperatura de 50 °C (\pm 5 °C) e armazenado a -20 °C até a análise por CLAE. Antes da injeção no cromatógrafo, os extratos foram ressuspensos em 2 mL de metanol a 50% e filtrados em membranas HAWP de 13 mm de diâmetro e 0,45 μ m de tamanho de poro (Millipore Corp Milford, MA, EUA). A extração foi realizada em triplicata.

2.2.4 Determinação dos ácidos fenólicos

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo (Modelo 10 ADVP, Shimadzu, Kioto, Japão) ligado a um detector de arranjo de diodos M10 AVP. A coluna foi de fase reversa Nova pak® C18 de 3,9 x 300 mm, 4 µm (Waters, Milford, MA, EUA). Duas fases móveis foram utilizadas: (A) água adicionada de 1 mmol de TFA (pH 2,91) e (B) metanol também adicionado de 1 mmol de TFA (pH 1,60). O fluxo foi de 0,5 mL/min no seguinte gradiente: 0 min 4% B, 18 min 18% B, 35 min 58% B, 60 min 50% B, 62 min 4% B, 70 min 4% B.

A identificação dos ácidos fenólicos foi feita na região de 320 nm, por comparação dos tempos de retenção dos ácidos fenólicos existentes nas amostras e da solução do padrão dos ácidos fenólicos. Os teores de ácidos fenólicos nas amostras foram determinados por interpolação a partir de curvas de calibração externa com soluções padrão de quatro ácidos fenólicos ($R^2 \geq 0,9967$).

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o programa SISVAR, versão 5.3 (UFLA, Lavras, MG, Brasil). Os coeficientes de correlação de Pearson e de regressão foram determinados pelo programa EXCEL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS EM SORGO

Os fenólicos totais nas amostras de sorgo cultivadas com irrigação variaram de 27 a 168 mg/100 g de sorgo e de 27 a 242 mg/100 g naquelas

cultivadas sob estresse hídrico (Tabela III.1). O ambiente não impactou nos teores de fenólicos nos grãos, visto que não houve diferença significativa entre as amostras cultivadas com e sem estresse hídrico. Em relação ao genótipo, o teor de fenólicos totais foi significativamente menor no SC192 de pericarpo mais claro, o que reforça o fato de genótipos mais escuros possuírem teores maiores de compostos fenólicos (DYKES et al., 2005; ZHAO et al., 2014).

Tabela III. 1. Teor médio de fenólicos totais (mg equivalente de ácido gálico/100 g) em grãos de sorgo cultivados ou não sob estresse hídrico

Genótipos	Cor do pericarpo	Teor médio (\pm desvio padrão) de fenólicos totais (mg equivalente ácido gálico/100 g)	
		Irrigada	Estresse hídrico
SC328	Marrom claro	156 \pm 18	168 \pm 25 ^{ab}
RTx2783	Bronze	53 \pm 5	81 \pm 14 ^{ab}
SC103	Marrom	168 \pm 9	242 \pm 18 ^a
SC42	Marrom	135 \pm 4	232 \pm 98 ^a
SC192	Amarelo	27 \pm 5	27 \pm 7 ^b

Médias seguidas de diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferença significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Moraes et al. (2012a) avaliaram os teores de fenólicos totais em alguns genótipos de sorgos desenvolvidos no Brasil e encontraram teores próximos e até maiores que os descritos nesse estudo: 26 a 450 mg/100 g de sorgo, também expressos em equivalentes de ácido gálico. Sorgos cultivados no Egito apresentam teores de fenólicos totais dentro da variação encontrada no presente estudo, ou seja, de 109 a 116 mg/100 g de sorgo (AFIFY et al., 2012a). Em arroz, Zhao et al. (2014) encontraram teores mais baixos em relação ao sorgo: 7 mg/100 g em arroz de pericarpo branco, 75 mg/100 g em cultivares de pericarpo vermelho e 57 mg/100 g nos de pericarpo preto. Em trigo, os teores de fenólicos totais relatados por Li et al. (2008) eram de, no máximo, 42 mg/100 g. Já em milho, o estudo de 33 cultivares de diversas cores apresentou valores entre 13 a 26 mg de fenólicos totais por 100 g de milho (GONZALEZ-MUNOZ et al., 2013). Em outro estudo realizado na Bolívia com 10 cultivares de milho pigmentados, os valores de fenólicos totais variaram de 31 a 81 mg/100 g (MONTILLA et al., 2011). Estes resultados sugerem ser o sorgo uma fonte mais significativa de fenólicos totais, comparado a outros cereais.

3.2 PERFIL DE ELUIÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS

O perfil de eluição dos padrões dos ácidos fenólicos pesquisados e destes nos genótipos pesquisados está representado na Figura III.1. Observa-se que para a fração insolúvel, o cromatograma é mais limpo, ou seja, detectaram-se apenas os ácidos fenólicos, enquanto que na fração solúvel, vários outros compostos não identificados estão presentes juntamente com os ácidos hidroxicinâmicos.

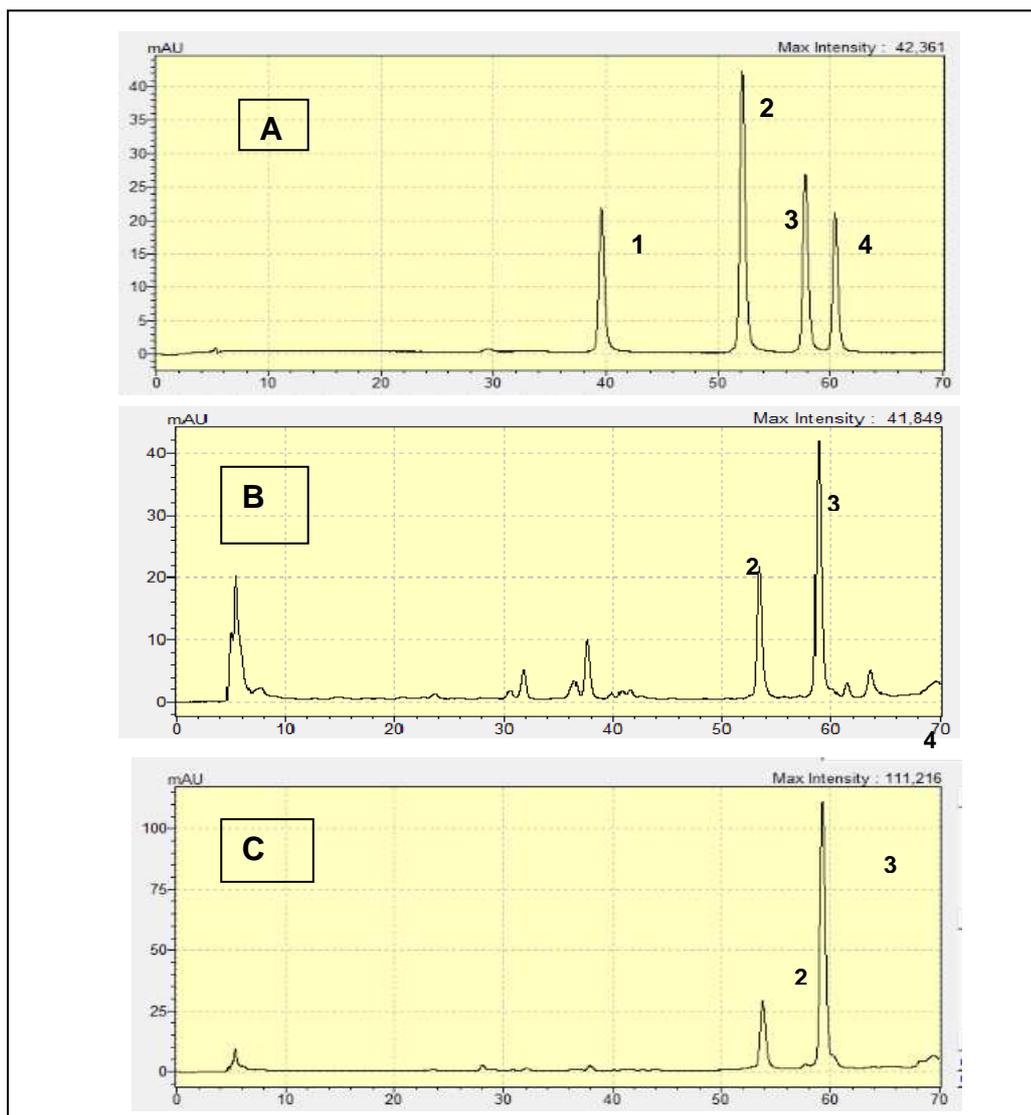


Figura III.1 - Perfil cromatográfico de solução padrão contendo quatro ácidos fenólicos (A), de extrato solúvel da linhagem SC328 (B) e de extrato insolúvel da linhagem SC42 (C) de sorgo. Condições cromatográficas: coluna Nova Pak C18 de 3,9 x 300 mm; 4 µm (Waters, Milford, MA, EUA). Gradiente de eluição metanol e água ambas adicionadas de 1mmol de TFA, fluxo de 0,5 mL/min. Detecção a 320 nm. 1: ácido caféico; 2: ácido cumárico; 3: ácido ferúlico; 4: ácido sinápico.

3.3 PERFIL E TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM GRÃOS DE SORGO

Foi avaliada a presença dos ácidos cafeíco, cumárico, ferúlico e sinápico em amostras de sorgo provenientes de cinco linhagens, todas cultivadas em ambientes, com e sem estresse hídrico.

O perfil e os teores de ácidos fenólicos variaram entre os genótipos, sendo que os ácidos cumárico e ferúlico estiveram presentes em todos eles. O ácido ferúlico foi o mais abundante, correspondendo, nas linhagens irrigadas, à proporção de 70 a 93% dos ácidos fenólicos e de 88 a 96%, naquelas cultivadas sob estresse hídrico (Figura III.2). Grãos de sorgos cultivados sob estresse hídrico apresentaram teor de ácido cumárico variando de 0 a 11%, enquanto que a porcentagem desse composto em sorgos irrigados variou de 7 a 29%. Como já dito, os ácidos cumárico e ferúlico foram detectados em todas as linhagens, exceto na SC192 cultivada sob estresse hídrico, sendo que, concentração muito baixa de ácido ferúlico foi detectada na fração solúvel dessa amostra (Tabela III.1). Quanto ao ácido cafeíco, pequenas quantidades foram detectadas em todas as linhagens estudadas. Nas linhagens SC42 e SC192, o ácido cafeíco foi detectado apenas nas amostras irrigadas. Nas demais, esse composto foi detectado tanto nas amostras com quanto sem estresse hídrico. Da mesma forma, pequenas quantidades de ácido sinápico foram encontradas nas amostras de sorgo, mas apenas na fração solúvel. A exceção foi a linhagem SC192, que produziu, quando cultivada sob estresse hídrico, grande quantidade desse ácido na fração insolúvel.

Chiremba et al. (2012) relataram a presença dos ácidos ferúlico, cumárico em sorgo, e dos ácidos ferúlico, cumárico, cafeíco e sinápico no farelo desse cereal. Dos ácidos hidroxicinâmicos, Afify et al. (2012a) determinaram, em sorgo, os ácidos cafeíco, cumárico e ferúlico. Em outros cereais, como o trigo, também foram encontrados todos esses ácidos hidroxicinâmicos (FERNANDEZ-OROZCO et al., 2010). Em arroz, SHAO et al. (2014) detectaram os ácidos ferúlico, cumárico, vanílico e siríngico. Em milho, apenas os ácidos ferúlico e cumárico foram quantificados por Chiremba et al. (2012).

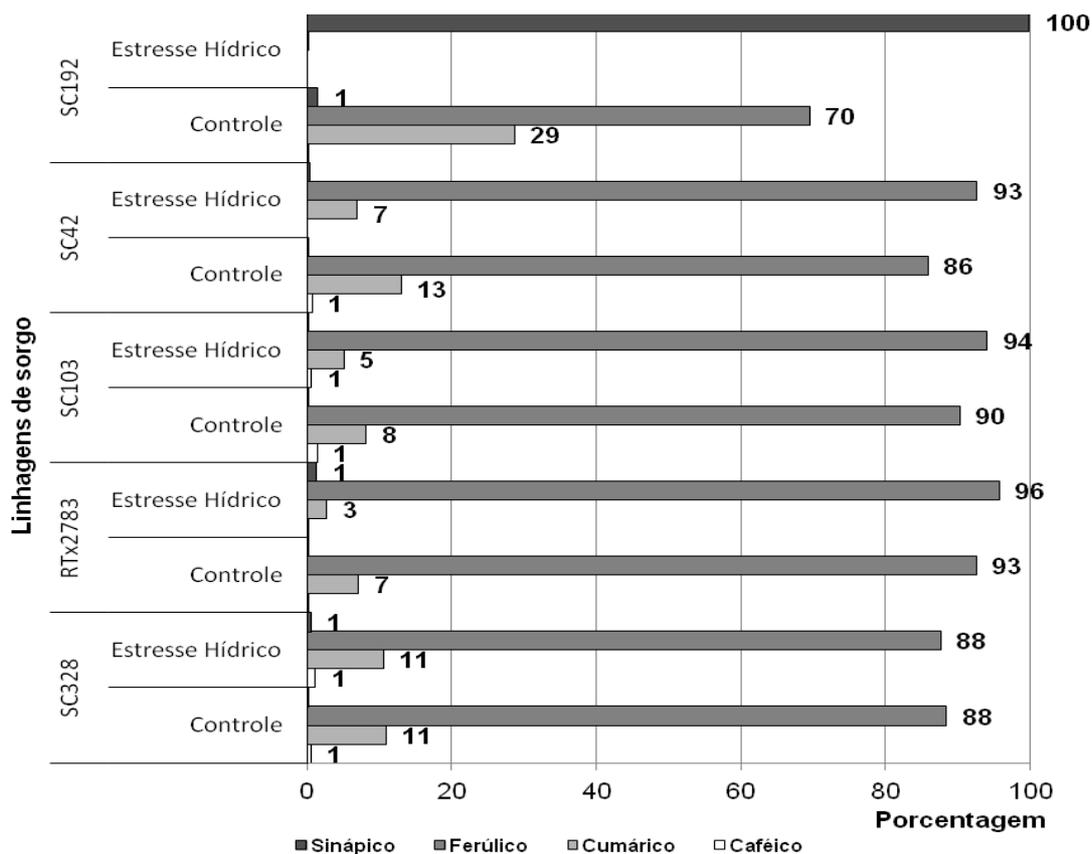


Figura III.2. Percentual de contribuição de ácidos fenólicos ao teor total em linhagens de sorgo irrigadas e cultivadas sob estresse hídrico.

Como já relatado por Adom & Liu (2002), em aveia, milho, trigo e arroz, o ácido ferúlico é sempre o predominante. Em trigo *durum*, o ácido ferúlico correspondeu de 61 a 83,6% do total de ácidos fenólicos (NICOLETTI et al., 2013). Em arroz, o ácido ferúlico correspondeu de 55 a 58% (SHAO et al., 2014). Em milho, a percentagem de ácido ferúlico variou de 62 a 65%, segundo o estudo de Chiremba et al. (2012) ou em média de 71%, segundo Luthria et al. (2014). Em sorgo, Chiremba et al. (2012) encontraram percentagens de ácido ferúlico um pouco mais baixas que nas linhagens brasileiras estudadas, variando de 54 a 61%. Já os teores de ácido ferúlico encontrados por Afify et al. (2012a) são mais próximos aos resultados desse estudo: de 65 a 71%.

Em relação ao conteúdo total de ácidos fenólicos, os teores encontrados nas linhagens pesquisadas variaram de 55,5 a 99,1 mg/100 g nas linhagens cultivadas com irrigação e de 25,6 a 62,3 mg/100 g quando cultivadas sob estresse hídrico (Tabela III. 2). Os teores de ácidos fenólicos totais nas

linhagens SC328 e SC103 cultivadas com irrigação foi significativamente maior em comparação com o cultivo dessas linhagens sob estresse hídrico (Figura III.3). Para as demais linhagens, a diferença entre os teores totais de ácidos fenólicos não foi significativa ao se comparar o cultivo irrigado com o cultivo sob estresse hídrico.

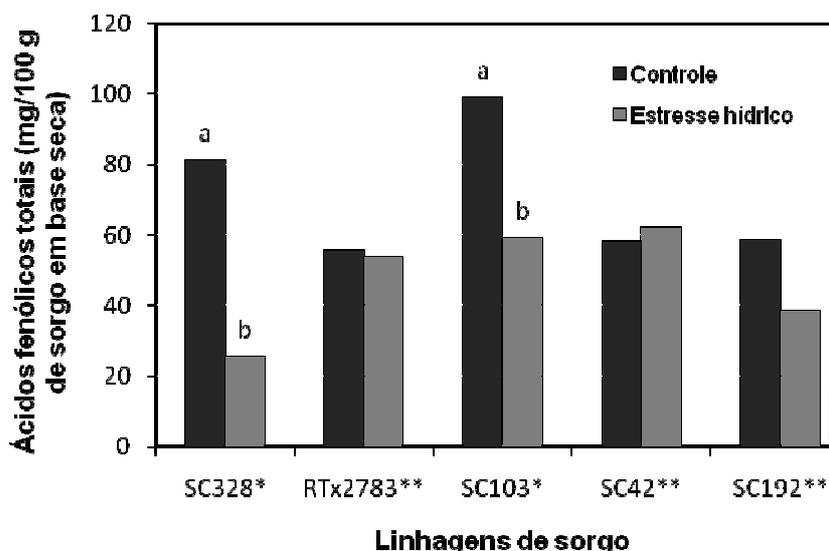


Figura III.3. Ácidos fenólicos totais em linhagens de sorgo irrigadas e cultivadas sob estresse hídrico.

Para cada linhagem, letras diferentes indicam diferença significativa entre o cultivo com irrigação e sob estresse hídrico (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fernandez-Orozco et al. (2010) avaliaram diversos genótipos de trigo e verificaram que os teores de ácidos fenólicos dependeram da safra e da região de plantio, dentre quatro países europeus onde foram cultivados. Os ácidos fenólicos totais variaram de $72,8 \pm 20,6$ a $90,0 \pm 11,7$ mg/100 g de trigo.

Segundo Chiremba et al. (2012), milho e sorgo de pericarpo duro possuem maiores teores de ácidos fenólicos em relação aos de pericarpo mole. Esses autores detectaram em milhos de pericarpos duro e mole, teores de ácidos fenólicos totais variando de 15,4 a 19,5 mg/100 g e de 11,0 a 13,6 mg/g, respectivamente. Em sorgo os teores de ácidos fenólicos totais variaram de 10,7 a 16,3 mg/100 g e de 31,0 a 38,3 mg/100 g nos grãos de pericarpo macio e duro, respectivamente. Já as variedades de sorgo pesquisadas por Afify et al. (2012a) apresentaram teores totais de ácidos fenólicos entre 17,6 e 23,0 mg/100 g.

Tabela III.2. Ácidos fenólicos solúveis e insolúveis de diferentes linhagens de sorgo cultivadas com e sem estresse hídrico

Valores médios de ácidos fenólicos em sorgo (mg/100 g em base seca)										
Ácidos Fenólicos	SC328		RTx2783		SC103		SC42		SC192	
	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico
Caféico										
Solúveis	0,01 ± 0,01	Nd	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,01 ± 0,00 ^b	0,35 ± 0,32	Nd	Nd	0,07 ± 0,03	Nd
Insolúveis	0,40 ± 0,45	0,30 ± 0,52	Nd	Nd	1,41 ± 0,39 ^{aA}	Nd ^B	0,41 ± 0,55	Nd	0,09 ± 0,01 ^A	Nd ^B
Cumárico										
Solúveis	0,60 ± 0,08 ^b	0,08 ± 0,01	0,55 ± 0,12 ^b	0,55 ± 0,03	0,37 ± 0,05 ^b	0,01 ± 0,02	0,61 ± 0,05 ^b	0,78 ± 0,08	1,55 ± 0,76	Nd
Insolúveis	8,28 ± 1,16 ^a	2,64 ± 1,72	3,40 ± 1,44 ^{aA}	0,91 ± 0,35 ^B	7,77 ± 1,20 ^a	3,01 ± 0,68	6,99 ± 0,80 ^a	3,57 ± 0,21	15,25 ± 11,09 ^A	Nd ^B
Ferúlico										
Solúveis	1,78 ± 0,16 ^b	0,18 ± 0,04	1,48 ± 0,34 ^b	2,51 ± 0,16 ^b	1,10 ± 0,10 ^b	0,15 ± 0,13 ^b	2,31 ± 0,26 ^b	2,68 ± 0,73 ^b	3,49 ± 1,47	0,05 ± 0,05
Insolúveis	70,24 ± 26,90 ^a	22,21 ± 4,43	49,84 ± 2,44 ^a	49,07 ± 18,08 ^a	88,34 ± 10,69 ^a	55,48 ± 1,20 ^a	47,67 ± 3,46 ^a	55,01 ± 3,94 ^a	37,26 ± 0,39	Nd
Sinápico										
Solúveis	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,22	0,10 ± 0,01 ^B	0,70 ± 0,16 ^{aA}	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,12	0,18 ± 0,21	0,25 ± 0,01	0,87 ± 0,24	Nd ^b
Insolúveis	Nd	Nd	Nd	Nd ^b	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd ^B	38,70 ± 4,03 ^{aA}
Totais										
Solúveis	2,50 ± 0,24 ^b	0,41 ± 0,24	2,25 ± 0,43 ^b	3,87 ± 0,27 ^b	1,55 ± 0,15 ^b	0,65 ± 0,60 ^b	3,10 ± 0,51 ^b	3,68 ± 0,80 ^b	6,00 ± 2,49 ^{Ab}	0,05 ± 0,05 ^{bB}
Insolúveis	78,93 ± 27,31 ^a	25,15 ± 3,69	53,23 ± 3,87 ^a	49,97 ± 18,41 ^a	97,52 ± 12,25 ^a	58,49 ± 12,70 ^a	55,07 ± 4,44 ^a	58,59 ± 4,15 ^a	52,60 ± 11,36 ^a	38,70 ± 4,03 ^a

n = 3. Nd = não detectado. Limite de quantificação: 0,04 mg/100 g. Para cada ácido fenólico analisado, médias seguidas de letras minúscula na mesma coluna ou de letras maiúsculas na mesma linha são significativamente diferentes (Teste de Tukey, p < 0,05).

Com base na Figura III.4, pode-se afirmar, de um modo geral, que a maior parte dos ácidos fenólicos se encontra na fração insolúvel dos grãos de sorgo, ou seja, no pericarpo, ligados a compostos como celulose e lignina. Esse fato também foi comprovado em outros estudos com sorgo (LUTHRIA & LIU, 2013) e com outros cereais (ADOM & LIU, 2002; ROBBINS, 2003; FERNANDEZ-OROZCO et al., 2010; GONZÁLEZ-MUÑOZ et al., 2013; SHAO et al., 2014).

Nas linhagens estudadas, a quantidade de ácidos fenólicos totais foi significativamente diferente entre as frações solúvel e insolúvel, sendo os teores de ácidos fenólicos insolúveis bem maiores, variando de 90 a 98% dos ácidos fenólicos totais, em linhagens irrigadas, de 93 a 100%, em linhagens cultivadas sem irrigação. Nas linhagens submetidas ao estresse hídrico, os teores totais de ácidos fenólicos solúveis variaram de 0,05 a 3,87 mg/100 g de sorgo em base seca. Já os insolúveis, variaram de 25,15 a 58,59 mg/100 g de sorgo (Tabela III.2). Nas linhagens irrigadas, os teores totais de ácidos fenólicos solúveis variaram de 1,55 a 6,00 mg/100 g. A fração insolúvel apresentou valores de 52,60 a 97,52 mg/100 g (Tabela III.2).

Em trigo, proporções um pouco menores entre ácidos fenólicos solúveis e insolúveis foram determinadas por Fernandez-Orozco et al. (2010): os fenólicos insolúveis corresponderam de 75 a 80% dos ácidos fenólicos totais. Em 33 variedades de milho estudadas por González-Muñoz et al. (2013), a porcentagem média de ácidos fenólicos insolúveis correspondeu a 98%. Em arroz, essa proporção foi um pouco menor: 53 a 57% (SHAO et al., 2014).

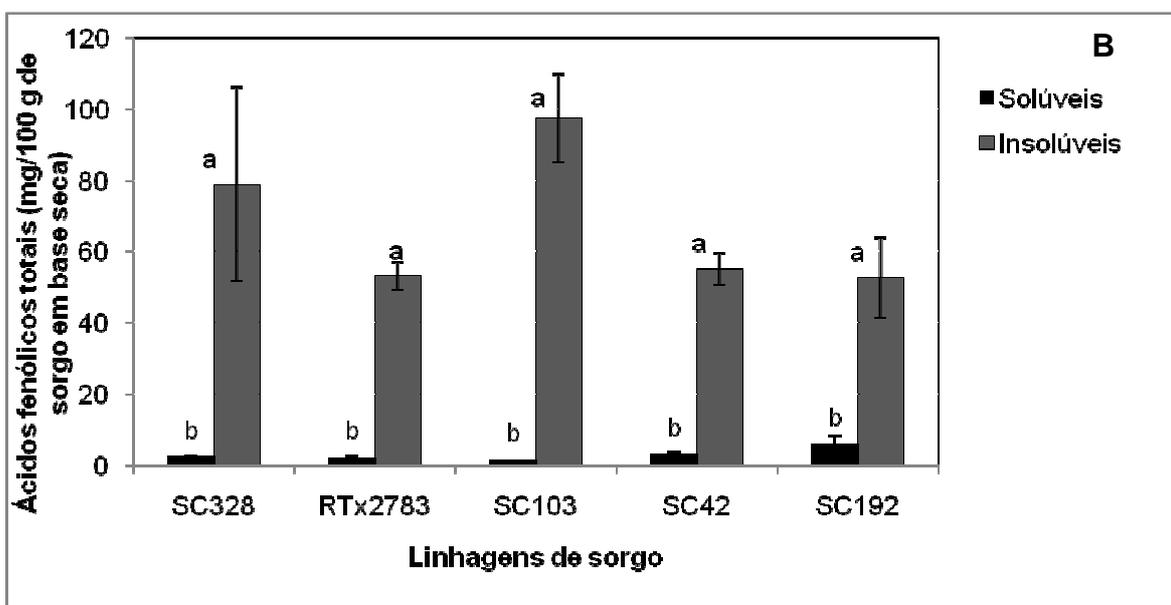
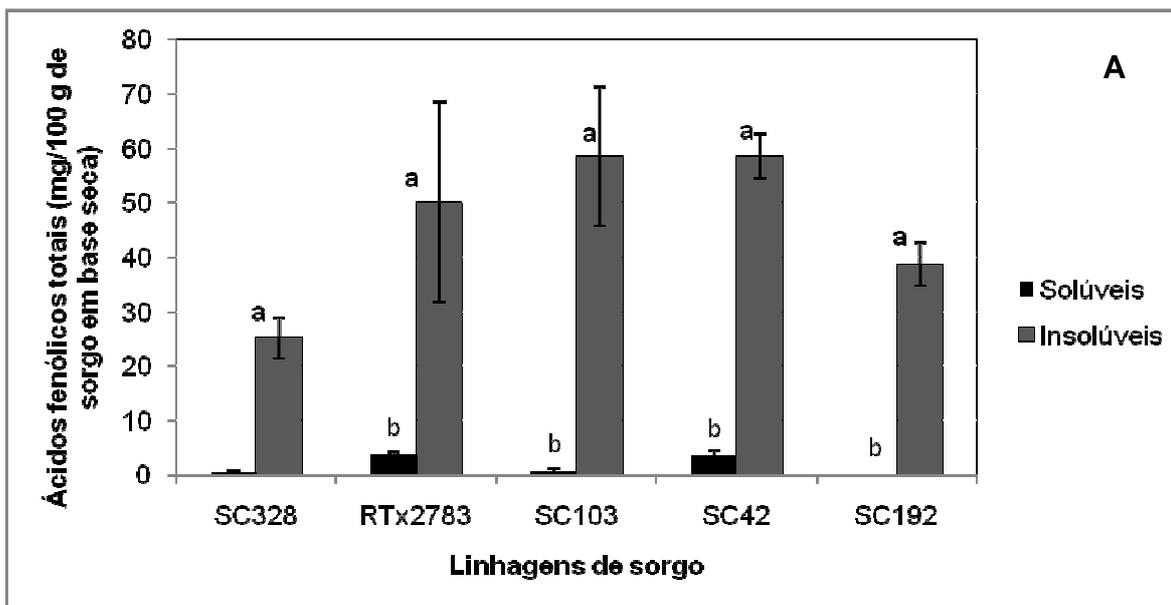


Figura III.4. Teores médios de ácidos fenólicos totais em linhagens de sorgo cultivadas em dois ambientes: com estresse hídrico (A) e irrigadas (B). Para cada linhagem, letras diferentes indicam diferença significativa entre as frações solúvel e insolúvel (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.4 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS E AMINAS BIOATIVAS LIVRES EM SORGO

Esse estudo correlacionou os dados de aminas bioativas determinadas nas linhagens de sorgo SC328, RTx2783, SC103, SC42 e SC192, descritos no

capítulo 1 e os teores de ácidos fenólicos nas frações solúvel e insolúvel destas linhagens. Para as linhagens de sorgo estudadas, cultivadas com irrigação, coeficientes de Pearson significativos ($R \geq 0,9478$) entre as frações solúveis dos ácidos fenólicos e as amins bioativas livres foram obtidos (Tabela III.3). As correlações não foram significativas apenas entre os teores de ácido caféico solúvel e as poliaminas, e entre o ácido sinápico solúvel e a espermina. Portanto, por meio da análise de regressão, pode-se concluir, com 95% de confiança, e em algumas correlações, com confiança até maior, 99%, que mudanças nos teores de ácidos fenólicos na fração solúvel impactam nos teores de amins bioativas livres em sorgo cultivado com irrigação. Mais especificamente, à medida que a planta produz mais amins livres, ocorre também um aumento no teor de ácido fenólico na fração solúvel do grão, segundo as equações mostradas na Tabela III.4. A única exceção ocorre para a espermidina, pois para aumentos do ácido caféico, ocorre diminuição de espermidina no grão.

Tabela III.3. Coeficientes de correlação de Pearson entre ácidos fenólicos e amins bioativas em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico

Ácidos fenólicos	Coeficientes de correlação					
	Amins livres					
	Putrescina		Espermina		Espermidina	
	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico
Cumárico						
Solúvel	0,9478*	0,9939*	0,9946*	0,7701	0,9568**	0,5294
Insolúvel	0,9357**	0,9947**	0,4669	0,7530	0,9355*	0,4438
Ferúlico						
Solúvel	0,9498**	0,4974	0,9943*	0,0971	0,9642*	0,5183
Insolúvel	0,6219	0,8891*	0,7204	0,7217	0,6150	0,7583
Caféico						
Solúvel	0,9977**	Nd	0,6473	0,9630	0,7502	0,5132
Insolúvel	0,7229	Nd	0,8097	ND	0,9085	ND
Sinápico						
Solúvel	0,9678**	0,5507	0,5615	0,5884	0,9660*	0,6472
Insolúvel	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Valores expressos para * $p \leq 0,01$ e ** $p \leq 0,05$. Nd: não determinado, por não haver amina ou ácido fenólico na fração.

Tabela III.4. Equações lineares para as correlações significativas entre ácidos fenólicos na fração solúvel do grão (y) e aminas bioativas livres (x) em sorgos cultivados com irrigação

Ácidos fenólicos na fração solúvel	Putrescina	Espermina	Espermidina
Cumárico	$y = 1,60x + 4,74;$ $R^2 = 0,8983$	$y = 5,33x - 39,35$ $R^2 = 0,9892$	$y = 0,83x - 0,65$ $R^2 = 0,9154$
Ferúlico	$y = 3,33x + 12,81$ $R^2 = 0,9020$	$y = 10,74x + 75,70$ $R^2 = 0,9886$	$y = 1,66x + 4,29$ $R^2 = 0,9296$
Caféico	$y = 8,53x + 0,17$ $R^2 = 0,9954$		
Sinápico	$y = 1,19x + 0,71$ $R^2 = 0,9366$		$y = 0,61x - 3,22$ $R^2 = 0,9331$

No entanto, ainda para o sorgo cultivado com irrigação, o mesmo não pôde ser concluído em relação aos ácidos fenólicos encontrados na fração insolúvel e as aminas bioativas livres, pois a maioria das correlações determinadas foi abaixo de 0,81. As exceções foram as correlações entre o ácido cumárico e a espermidina e putrescina, entre o ácido caféico e a espermidina. Já para as linhagens de sorgo estudadas e cultivadas sob estresse hídrico, a maioria das correlações foi abaixo de 0,88. As exceções foram entre o ácido cumárico na fração solúvel e insolúvel e a putrescina e entre o ácido caféico na fração solúvel e a espermidina, não podendo inferir sobre o impacto dos ácidos fenólicos sobre os teores de aminas livres para essas linhagens quando cultivadas sob estresse hídrico (Tabela III.3).

3.5 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FENÓLICOS TOTAIS

Foi realizado também um estudo da correlação entre os teores de ácidos fenólicos nas frações solúvel e insolúvel e os teores de fenólicos totais nas linhagens SC328, RTx2783, SC103, SC42 E SC192 (Tabela III.5). As correlações não foram significativas entre os ácidos fenólicos e os teores de fenólicos totais tanto na situação de cultivo com irrigação, quanto na de cultivo sob estresse hídrico. As exceções foram a correlação significativa entre o ácido cumárico na fração insolúvel e os fenólicos totais quando o sorgo foi

cultivado sob estresse hídrico e a outra correlação significativa entre os teores de fenólicos totais e ácido caféico na fração solúvel.

Tabela III.5. Coeficientes de correlação de Pearson entre ácidos fenólicos e fenólicos totais em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico

Ácidos fenólicos	Coeficientes de correlação	
	Fenólicos totais	
	Controle	Estresse Hídrico
Cumárico		
Solúvel	0,7432	0,2115
Insolúvel	0,3288	0,9777*
Ferúlico		
Solúvel	0,8179	0,1130
Insolúvel	0,6283	0,7196
Caféico		
Solúvel	0,8936**	0,0190
Insolúvel	0,7589	ND
Sinápico		
Solúvel	0,7084	0,7309
Insolúvel	ND	ND

Valores expressos para *p ≤ 0,01 e **p ≤ 0,05. ND: não determinado por ausência de ácido fenólico na fração.

Adom & Liu (2002) avaliaram a correlação entre o teor de ácido ferúlico solúvel e os fenólicos totais na fração solúvel e conjugada em amostras de milho, trigo, aveia e arroz. Os autores encontraram correlações altas apenas entre os teores de ácido ferúlico solúveis e os fenólicos totais na fração insolúvel. A correlação entre os ácidos ferúlicos solúveis e os fenólicos totais na fração solúvel também foi baixa, como nesse estudo com sorgo.

4 CONCLUSÕES

Os ácidos cumárico e ferúlico estiveram presentes em todas as linhagens estudadas, sendo o ferúlico, o ácido predominante, seguido do cumárico. Já os ácidos caféico e sinápico, quando detectados, estiveram presentes em

pequenas proporções. No sorgo, acima de 90% dos ácidos hidroxicinâmicos presentes estão localizados na fração insolúvel do grão, ou seja, no pericarpo, conjugados a compostos como lignina e celulose

O cultivo de sorgo em ambiente com estresse hídrico não impactou de maneira significativa nos teores de fenólicos totais. Em relação aos ácidos fenólicos, também não houve aumento desses compostos nos sorgos submetidos ao estresse hídrico. Ao contrário, em duas das linhagens estudadas os teores totais de ácidos hidroxicinâmicos nas amostras irrigadas foram significativamente maiores.

Pôde-se concluir ainda, que para sorgos irrigados, mudanças nos teores de ácidos fenólicos na fração solúvel impactam de maneira significativa nos teores de aminas bioativas livres nesses grãos.

CAPÍTULO 4 – AMINAS CONJUGADAS EM SORGO: MÉTODO ANALÍTICO E OCORRÊNCIA

1 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo foram: i) sintetizar aminas conjugadas a ácidos hidroxicinâmicos; ii) desenvolver método analítico para a separação, identificação e quantificação de aminas conjugadas em sorgo por cromatografia líquida de alta eficiência; iii) determinar os tipos e os teores de aminas conjugadas em genótipos de sorgo cultivados no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Foram utilizadas cinco amostras de sorgo, originadas do cultivo com e sem estresse hídrico. Esse material foi cultivado nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. As amostras incluíram as linhagens com tanino SC328 e SC103 de pericarpo marrom claro e marrom, respectivamente e as linhagens sem tanino SC42, RTx2783 e SC192 de pericarpo marrom, bronze e amarelo, respectivamente. O cultivo de sorgo foi realizado com duas repetições nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo em Nova Porteirinha, MG, a partir de Junho até Outubro de 2010. As plantas foram irrigadas por aspersão durante 2 h, uma vez por semana. A partir do 50º dia em diante, após o desenvolvimento foliar, a irrigação continuou apenas nas amostras controle até o estágio de enchimento de grão, enquanto

que, após o 50º dia de cultivo, as amostras submetidas ao estresse hídrico não foram mais irrigadas.

Os grãos assim que colhidos foram submetidos ao expurgo com fosfina e armazenados sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ \text{C}$) e 40% de umidade relativa até a realização dos experimentos.

2.1.2 Reagentes, solventes e padrões

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto o solvente usado no CLAE (acetonitrila), que foi de grau cromatográfico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). A acetonitrila foi filtrada em membrana HVLP com tamanho do poro de 0,45 μm (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), e a fase móvel aquosa foi filtrada em membrana HAWP.

As soluções de aminas conjugadas foram preparadas com dicumaroilputrescina (DCP), diferuloilputrescina (DFP), dicumaroilespermidina (DCEPD), diferuloilespermidina (DFEPD), dicumaroilespermina (DCEPM) e diferuloilespermina (DFEPM).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Síntese das aminas conjugadas

A síntese das diamidas foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob a responsabilidade do professor doutor Ricardo José Alves, visto que não há padrões comerciais de aminas conjugadas aos ácidos hidroxicinâmicos.

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada – CCD, para verificar a pureza das substâncias.

2.2.2 Caracterização das aminas conjugadas sintetizadas

A caracterização dos compostos sintetizados foi feita mediante determinação dos pontos de fusão, obtidos em aparelho Silbron-Thermolyne MP-12516 (Dubuque, IA, EUA), dos espectros no Infravermelho (IV), determinados em espectrômetro Spectrum One Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA) e por meio de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) determinados nos equipamentos Bruker AVANCE DPX200 ou Bruker AVANCE DRX400 (Billerica, MA, EUA), utilizando como padrão interno o sinal do próprio solvente, dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$).

2.2.3 Determinação do comprimento de onda para detecção dos compostos

A região de detecção das aminas conjugadas foi determinada por análise do espectro de absorção de cada um dos padrões sintetizados obtidos no espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu, Kioto, Japão).

2.2.4 Extração e quantificação de aminas conjugadas em sorgo

As aminas conjugadas foram extraídas de amostras de sorgo de acordo com a metodologia proposta por Defernez et al. (2004) com modificações. Pesou-se 1 g de sorgo triturado (granulometria de 420 μm) e procedeu-se a extração com 8 mL de metanol 80% acidificado com 1 mmol de ácido trifluoracético (TFA). A mistura foi agitada em ultrassom por 10 min e, em seguida, foi centrifugada (Jouan CR3i, Saint-Herblain, França) a 4500 g, a 18 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Esse procedimento foi realizado três vezes e os sobrenadantes foram combinados, sendo o volume final completado com metanol para 25 mL em balão volumétrico. Antes da injeção no cromatógrafo líquido, os extratos foram filtrados em membrana de tamanho do poro de 0,45 μm (Millipore Corp., Milford, MA, EUA), tipo HVWP para solventes orgânicos. As extrações foram realizadas em triplicata.

A determinação das aminas conjugadas foi efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão) ligado a um detector de arranjo de diodos, modelo M10 AVP. A coluna foi de fase reversa Nova pak® C18 de 3,9 x 300 mm, 4 µm (Waters, Milford, MA, EUA). Duas fases móveis foram utilizadas: (A) água adicionada de 1 mmol de TFA (pH 2,91) e (B) acetonitrila. O fluxo foi de 0,5 mL/min no seguinte gradiente: 0-9 min, 20% B; 14-22 min, 25% B; 23-26 min, 40%; 30 min, 65% B; 31-40 min, 20% B.

A identificação das aminas conjugadas foi feita no ultra-violeta na região de 320 nm, por comparação dos tempos de retenção das aminas conjugadas existentes nas amostras com os dos padrões de aminas conjugadas. Os teores de aminas conjugadas nas amostras foram determinados por interpolação em curvas de calibração externa com soluções padrão das seis aminas conjugadas ($R^2 \geq 0,9930$).

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o programa SISVAR, versão 5.3 (UFLA, Lavras, MG, Brasil). Os coeficientes de correlação de Pearson e de regressão foram determinados pelo programa EXCEL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMINAS CONJUGADAS

A síntese foi planejada a partir dos ácidos *p*-cumárico (**1A**) e ferúlico (**1B**), conforme mostrado na Figura IV. 1. Inicialmente esses compostos foram convertidos nos ésteres ativados correspondentes (**2A** e **2B**) por reação com *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e cloridrato de *N*-(3-dimetil-aminopropil)-*N'*-

etilcarbodimida (EDAC). Em seguida foi realizado o acoplamento das aminas putrescina, espermina ou espermidina com esses ésteres ativados para obtenção das diamidas **3A**- dicumaroilputrescina; **3B** - diferuloilputrescina; **3C** - dicumaroilespermidina; **3D** - diferuloilespermidina; **3E** - dicumaroilespermina; e **3F** - diferuloilespermina. O esquema da síntese está representado na Figura IV.1.

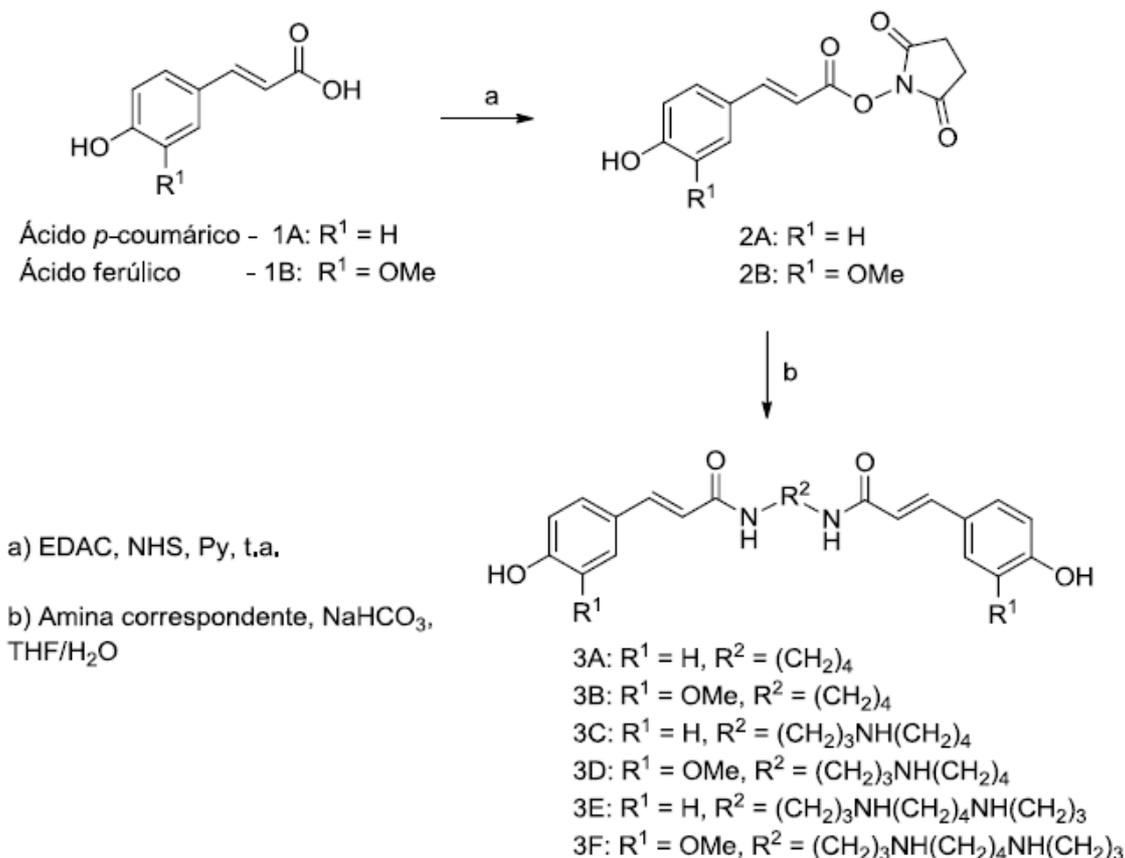


Figura IV.1. Esquema da síntese das aminas conjugadas aos ácidos cumárico e ferúlico. EDAC: cloridrato de N-(3-dimetil-aminopropil)-N'-etilcarbodimida. NHS: N-hidroxisuccinimida. THF: tetrahidrofurano.

Quanto aos rendimentos das amidas obtidas, a DCP foi a única de rendimento satisfatório. As demais, os rendimentos foram baixos (Tabela IV.1).

As diaminas formadas pelos dímeros do ácido ferúlico apresentaram grande dificuldade na sua elaboração. Apresentaram aspecto pegajoso e suas características físico-químicas dificultaram as tentativas de purificação através de recristalização. Essas dificuldades implicaram em uma demanda maior de tempo para obtenção dos compostos. Para a purificação da putrescina

diferúlica obtida, foi necessária a utilização de coluna cromatográfica, o que reduziu drasticamente o seu rendimento em comparação com a putrescina dicumárica.

Tabela IV.1. Rendimentos das reações de síntese das aminas conjugadas

Amina Conjugada	Rendimento em relação aos substratos (%)
Dicumaroilputrescina	86
Diferuloilputrescina	35
Dicumaroilespermidina	48
Diferuloilespermidina	27
Dicumaroilespermina	43
Diferuloilespermina	46

As caracterizações dos produtos obtidos foram feitas através de: ponto de fusão, espectrometria no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C). Os pontos de fusão avaliados estão apresentados na Tabela IV.2, mas não foram encontradas referências para comparação.

Tabela IV.2. Pontos de fusão das aminas conjugadas sintetizadas

Amina Conjugada	Ponto de fusão (°C)
Dicumaroilputrescina	212,1
Diferuloilputrescina	171,7
Dicumaroilespermidina	114,2
Diferuloilespermidina	80,3
Dicumaroilespermina	108,5
Diferuloilespermina	112,1

A Figura IV.2 apresenta o espectro no IV da diferuloilespermidina. Pode-se observar uma banda longa entre 3600 e 2400 cm^{-1} referente aos estiramentos OH e NH e três bandas finas em 2942 e 2872 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos CH alifáticos. Também pode ser observado uma banda em 1651 cm^{-1} referente à carbonila da amida da estrutura da diferuloilespermidina.

A Figura IV.3 apresenta o espectro de RMN ^1H dessa mesma amina conjugada. Pode-se observar em 7,882 ppm um sinal longo correspondente às hidroxilas fenólicas. De 7,354 a 6,395 ppm sinais correspondentes aos hidrogênios dos carbonos, 1-3, 5, 6 e da amida. Em 4,827 ppm, um sinal correspondente ao hidrogênio do NH alifático. Em 3,793 ppm, um sinal longo correspondente ao hidrogênio do carbono 4. Em 3,173 ppm, outro sinal longo correspondente aos hidrogênios dos carbonos 7 e 13. Em 2,503 ppm, um sinal correspondente aos hidrogênios dos carbonos 9 e 10 e por fim, de 1,590 a 1,456 ppm, sinais correspondentes aos hidrogênios dos carbonos 8, 11 e 12.

A Figura IV.4 apresenta o DEPT (intensificação da distorção por transferência de polarização) da diferuloilespermidina. Verificam-se de 139,23 a 111,26 ppm sinais correspondentes aos carbonos 1, 2, 3, 5 e 6 da estrutura química da diferuloilespermidina. De 56,49 a 56,05 ppm sinais correspondentes ao carbono 4, incluindo o sinal para baixo característico de carbono metilênico. De 49,43 a 27,45 ppm, sinais correspondentes aos carbonos metilênicos 7 a 13.

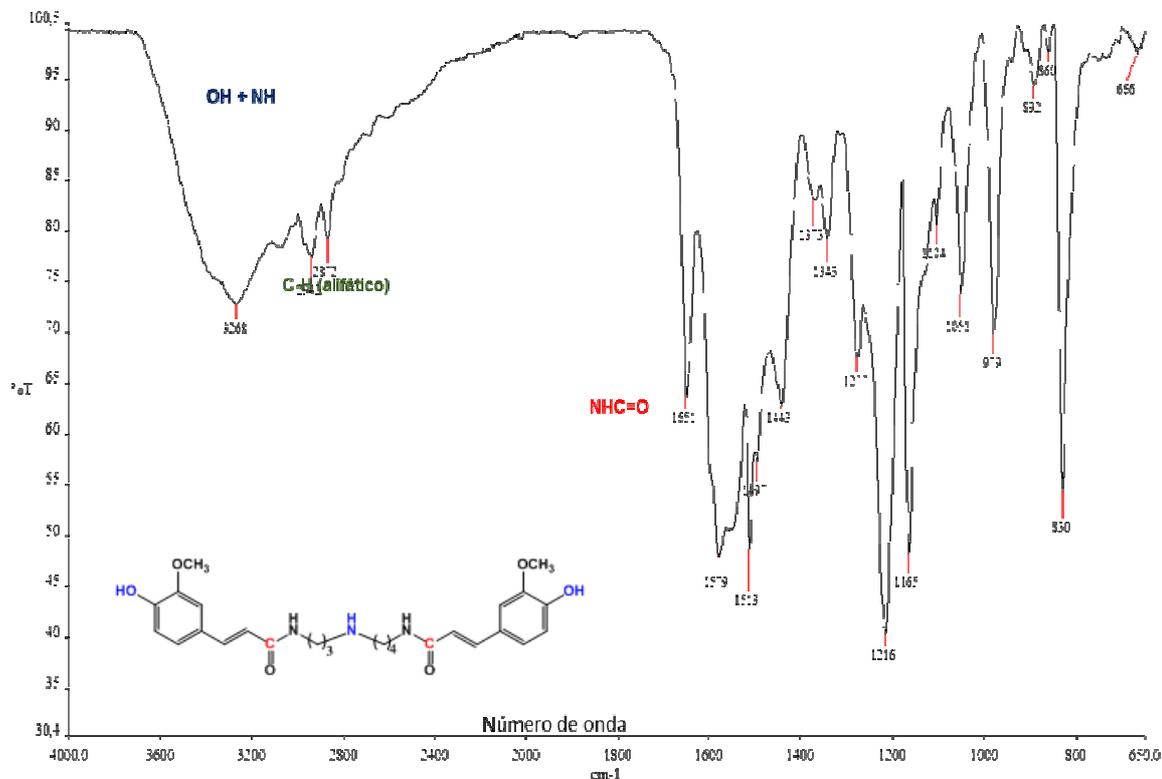


Figura IV.2. Espectro no infravermelho da diferuloilespermidina.

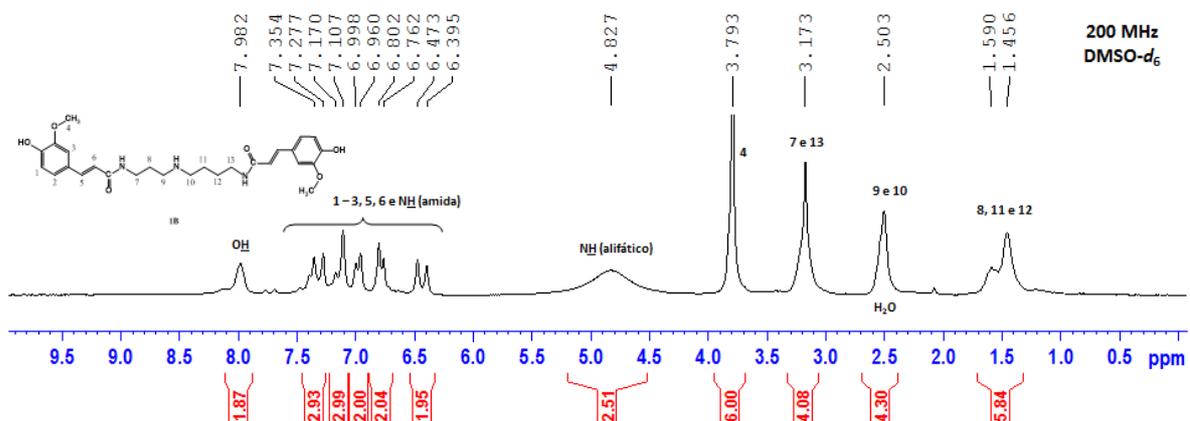


Figura IV.3. Espectro de RMN ^1H da diferuloileespermidina.

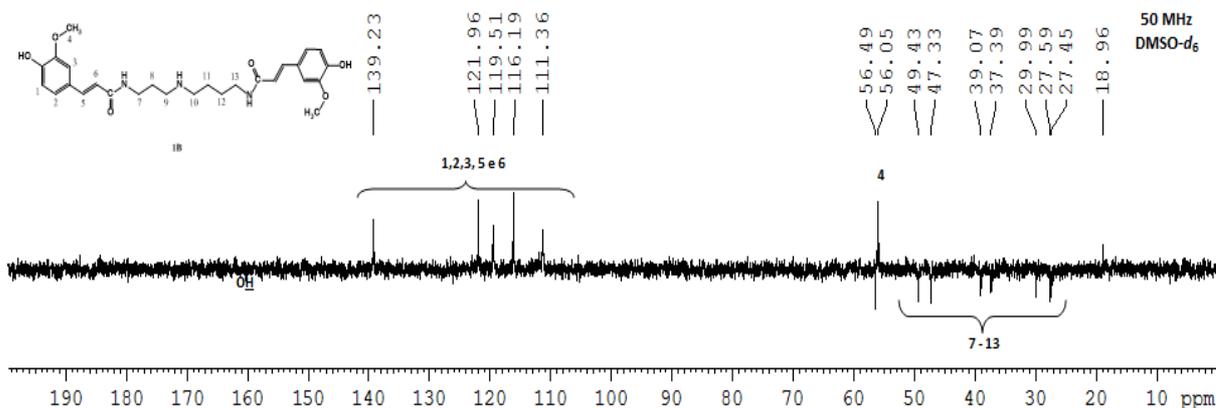


Figura IV.4. Espectro DEPT da diferuloileespermidina.

Os espectros IV e de RMN das demais aminas conjugadas estão apresentados nos APÊNDICE A e APÊNDICE B, respectivamente.

3.2 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DAS AMINAS CONJUGADAS SINTETIZADAS

As aminas conjugadas apresentaram absorção máxima na região próxima a 320 nm (Figura IV.5). Portanto, esse foi o comprimento de onda definido para a detecção dos compostos.

3.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMINAS CONJUGADAS

Para determinação cromatográfica das aminas, foram testadas as fases móveis acetonitrila e TFA 1 mmol com variações de gradiente. Inicialmente foram testados gradientes com fase orgânica muito fraca, abaixo de 20%. Houve separação dos compostos, mas os picos foram detectados depois de 20 min de corrida, o que estendeu demasiadamente a eluição completa dos compostos. Aumentos rápidos da fase orgânica resultaram na sobreposição de picos. A separação completa dos picos foi proporcionada por vários períodos de gradiente constante, além de que para a eluição das amidas derivadas da espermina, foi necessária uma concentração de 60% da fase orgânica, acetonitrila, na mistura. Para eluição posterior dos derivados da espermidina, houve necessidade de diminuição da concentração da fase orgânica na mistura.

O perfil de eluição dos padrões de aminas conjugadas e destas nos extratos de sorgo estão apresentados na Figura IV.6.

Verifica-se na Figura IV. 6 (A) que as aminas conjugadas derivadas da espermina eluíram primeiramente e, em seguida, as derivadas da putrescina. Por fim, eluíram as aminas derivadas da espermidina. Pode-se verificar ainda que as aminas conjugadas dicumáricas eluíram primeiro que as diferúlicas.

Na Figura IV.6 (B), no cromatograma do extrato de sorgo, é possível verificar a presença de vários outros compostos que absorvem a 320 nm além daqueles dos padrões de aminas conjugadas sintetizados. A natureza destes compostos deve ser investigada.

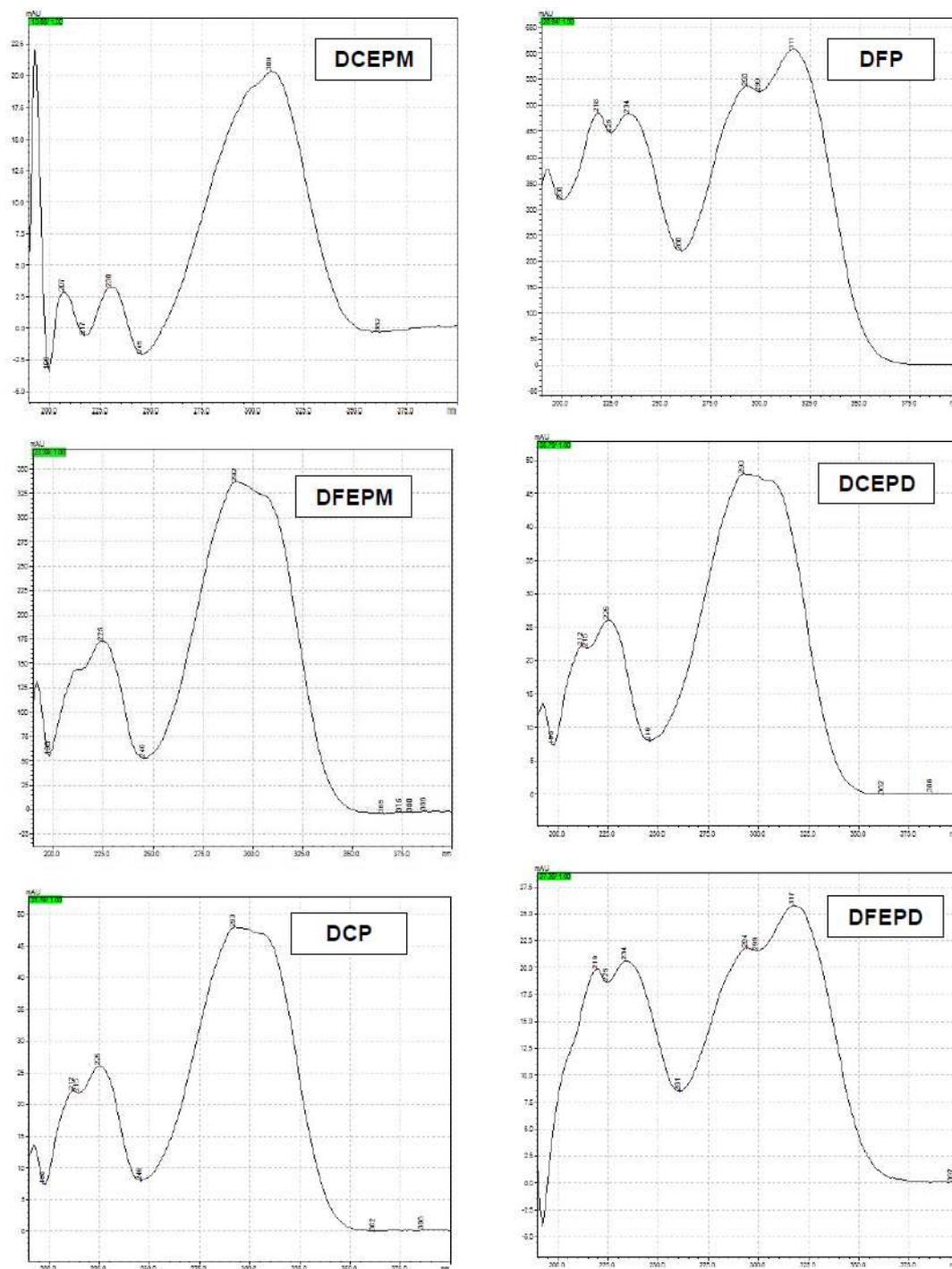


Figura IV.5. Espectro de absorção, na região do ultravioleta, das aminas conjugadas sintetizadas: DCP: dicumaroilputrescina; DFP: diferuloilputrescina; DCEPM: dicumaroileespermina; DFEPM: diferuloileespermina; DCEPD: dicumaroileespermidina; DFEPD: diferuloileespermidina.

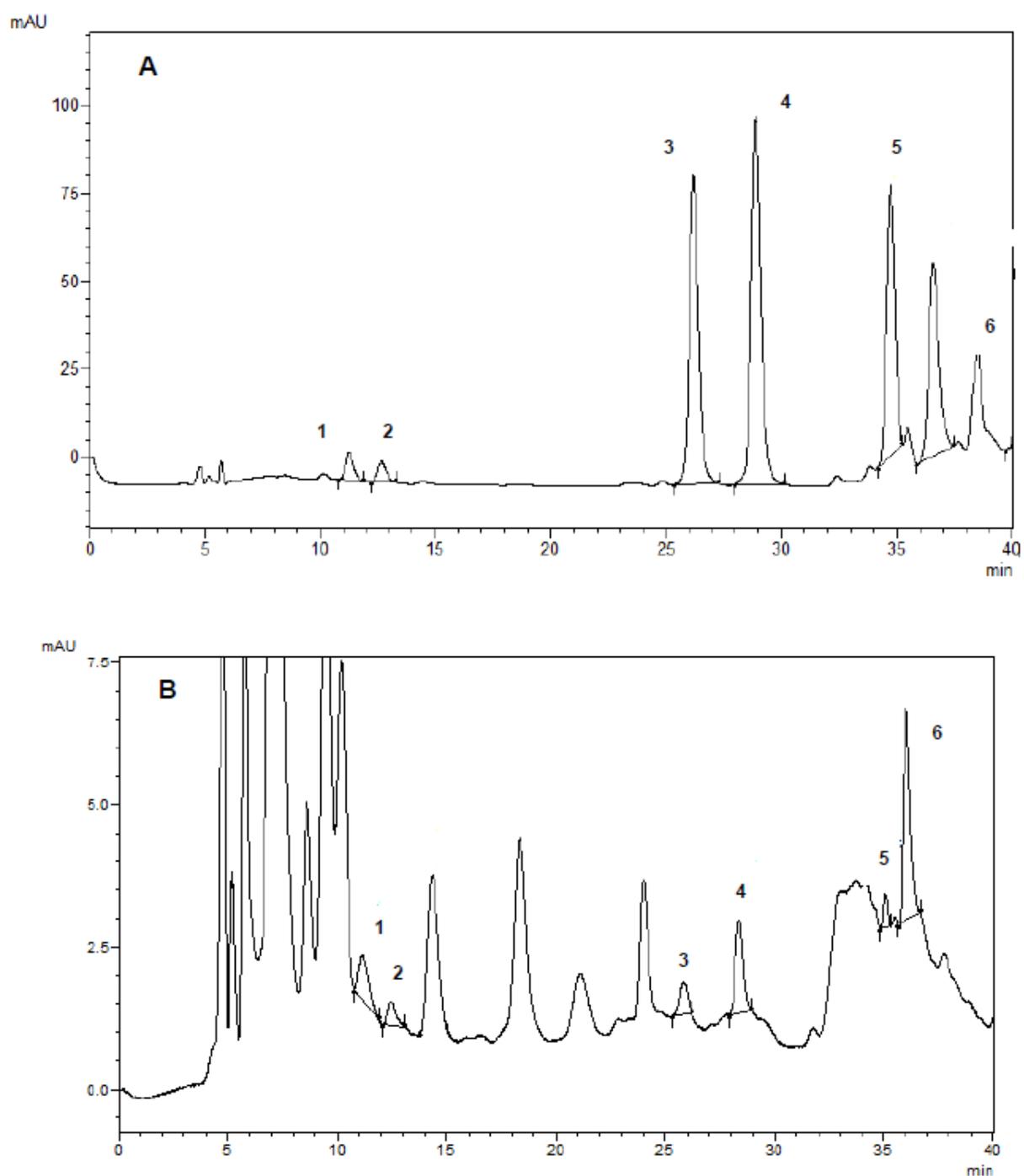


Figura IV.6. Perfil cromatográfico de solução contendo as seis aminas conjugadas sintetizadas (A) e de extrato de sorgo linhagem SC 192 (B). Condições cromatográficas: coluna Nova Pak C18 de 3,9 x 300 mm; 4 μ m (Waters, Milford, MA, EUA). Gradiente de eluição com acetonitrila e água adicionada de 1 mmol de TFA, fluxo de 0,5 mL/min. Quantificação a 320 nm. **1:** dicumaroilespermina (DCEPD); **2:** diferuloilespermina (DFEPM); **3:** dicumaroilputrescina (DCP), **4:** diferuloilputrescina (DFP); **5:** dicumaroilespermidina (DCEPM); **6:** diferuloilespermidina (DFEPD).

3.4 PERFIL E TEORES DE AMINAS CONJUGADAS EM SORGO

Em relação ao perfil de aminas conjugadas, a DCP não foi detectada em nenhuma das linhagens pesquisadas. Pequenas frações de DFP foram encontradas na linhagem RTx2783 cultivada com e sem estresse hídrico, e na linhagem SC192 irrigada (Tabela IV.2). Da mesma forma, as aminas conjugadas diferúlicas e dicumáricas conjugadas à espermidina também foram encontradas em pequenas proporções, abaixo de 7%. A exceção foi a presença de cerca de 20% da DFEPD na linhagem SC192 irrigada (Figura IV.7). As aminas conjugadas DFEPM e DCEPM foram as mais abundantes, correspondendo a 78 a 100% das aminas conjugadas pesquisadas nas linhagens cultivadas com irrigação, e de 92 a 100% nas cultivadas sob estresse hídrico.

Os teores totais das aminas conjugadas pesquisadas nas linhagens estudadas variaram de 5,70 a 32,4 mg/100 g de sorgo cultivado com irrigação, e de 6,94 a 41,4 mg/100 g de sorgo cultivado sob estresse hídrico. No entanto, assim como para os ácidos fenólicos, para a maioria dos genótipos, o cultivo de sorgo em ambiente com estresse hídrico não impactou de maneira significativa nos teores de aminas conjugadas (Tabela IV.3). Ao se avaliar os teores totais de aminas conjugadas nos sorgos cultivados com irrigação, a linhagem SC103 foi a que apresentou teor significativamente mais alto e as linhagens que apresentaram teores significativamente mais baixos foram as SC328 e SC192, quando cultivadas nessas condições (Figura IV.8).

Pesquisas avaliando a presença de aminas conjugadas em cereais ainda são escassas. Choi et al. (2007) avaliaram, em milho, a presença de derivados fenólicos conjugados à putrescina, detectando apenas a presença de DFP, DCP e CFP (cumaroil-feruloilputrescina) em quantidades de 1,44 mg/100 g, 0,68 mg/100 g e 7,81 mg/100 g, respectivamente. Em relação a DFP e DCP, quantidades bem menores foram detectadas na presente pesquisa com sorgo (Tabela IV.3). Já em batata, foram encontrados putrescina, espermina e espermidina conjugadas ao ácido caféico em concentrações que variaram de 1,00 a 1,16 mg/100 g de batata desidratada (NARVÁEZ-CUENCA et al., 2012) ou de 2,20 a 2,89 mg/100 g (SHAKYA & NAVARRE, 2006). Em laranja, foram

detectados apenas o ácido ferúlico conjugado à putrescina em quantidades que variaram de 1,13 a 7,68 mg/100 mL (BALDWIN et al., 2010).

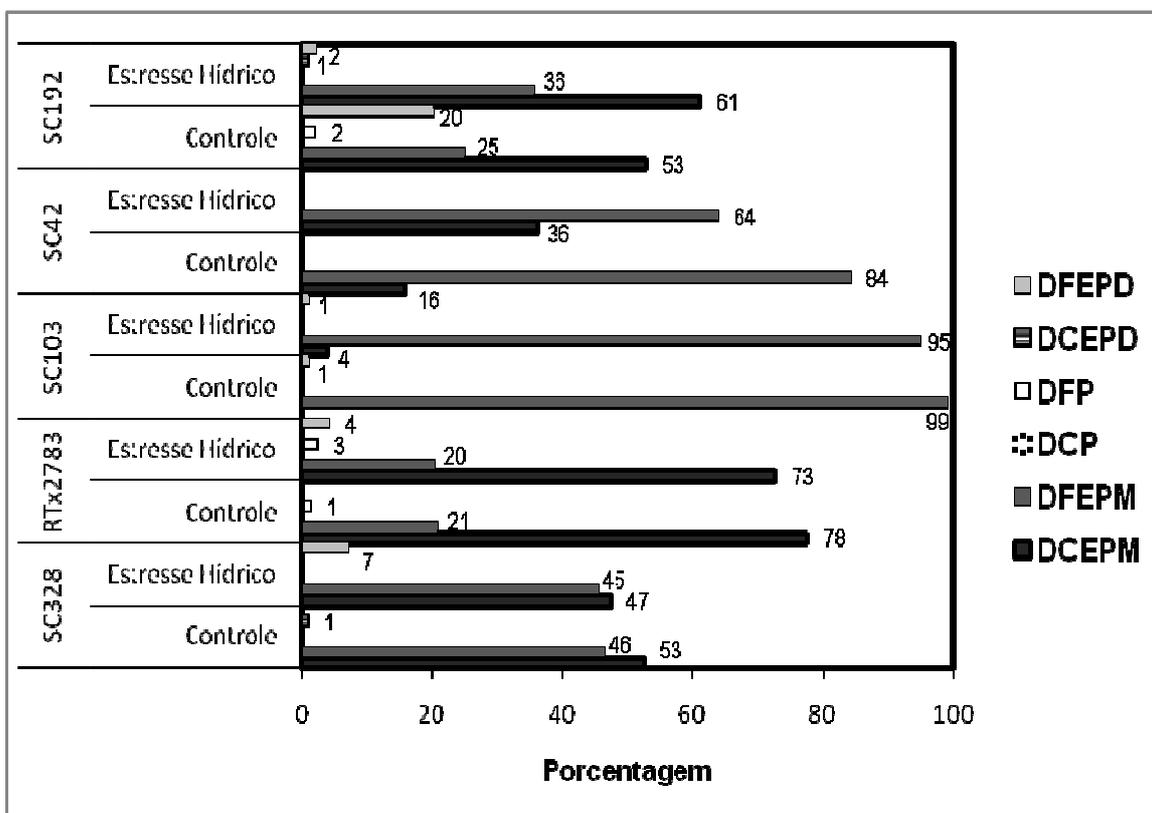


Figura IV.7. Percentuais de contribuição de aminas conjugadas ao teor total em linhagens de sorgo cultivadas em dois ambientes: com estresse hídrico e irrigadas (Controle). DCP: dicumaroilputrescina; DFP: diferuloilputrescina; DCEPM: dicumaroilespermina; DFEPM: diferuloilespermina; DCEPD: dicumaroilespermidina; DFEPD: diferuloilespermidina.

Tabela IV.3. Aminas conjugadas em genótipos de sorgo cultivados com irrigação e sob estresse hídrico

Genótipos	Valores médios de aminas conjugadas (mg/100 g)						Total
	Dicumaroilputrescina	Diferuloilputrescina	Dicumaroilespermina	Diferuloilespermina	Dicumaroilespermidina	Diferuloilespermidina	
Irrigados							
SC328	Nd	Nd	3,00 ± 0,28 ^{ab}	2,65 ± 0,36	0,06 ± 0,03 ^A	Nd ^b	5,70 ± 0,53
RTx2783	Nd	0,14 ± 0,07 ^B	7,40 ± 1,20 ^a	1,99 ± 0,72	Nd	Nd ^b	9,52 ± 1,18
SC103	Nd	Nd	Nd ^b	32,02 ± 1,16	Nd	0,34 ± 0,30 ^b	32,34 ± 1,17
SC42	Nd	Nd	4,61 ± 0,39 ^{ab}	24,50 ± 1,07	Nd	Nd ^b	29,11 ± 1,30
SC192	Nd	0,25 ± 0,02 ^A	6,05 ± 0,21 ^{ab}	2,89 ± 0,51	Nd ^B	2,29 ± 0,03 ^{aA}	11,48 ± 0,70
Estresse hídrico							
SC328	Nd	Nd ^b	3,89 ± 0,22 ^{ab}	3,74 ± 0,02 ^b	Nd ^{bB}	0,59 ± 0,16	8,23 ± 0,06 ^b
RTx2783	Nd	0,34 ± 0,10 ^{aA}	9,66 ± 0,96 ^a	2,71 ± 0,37 ^b	0,03 ± 0,02 ^{ab}	0,57 ± 0,01	13,32 ± 1,52 ^{ab}
SC103	Nd	Nd ^b	1,71 ± 0,60 ^b	39,41 ± 6,76 ^a	Nd ^b	0,42 ± 0,01	41,54 ± 7,34 ^a
SC42	Nd	Nd ^b	5,83 ± 0,71 ^{ab}	10,27 ± 0,24 ^{ab}	Nd ^b	Nd	16,10 ± 0,94 ^{ab}
SC192	Nd	Nd ^{bB}	4,35 ± 1,66 ^{ab}	2,34 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,05 ^{aA}	0,18 ± 0,21 ^B	6,94 ± 1,86 ^b

n = 3. Nd = não detectado. Limite de quantificação: 0,04 mg/100 g. Para cada amina e tipo de cultivo, médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa e entre os genótipos (Teste de Tukey, p < 0,05). Para cada genótipo, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa no cultivo irrigado e sob estresse hídrico (Teste de Tukey, p < 0,05).

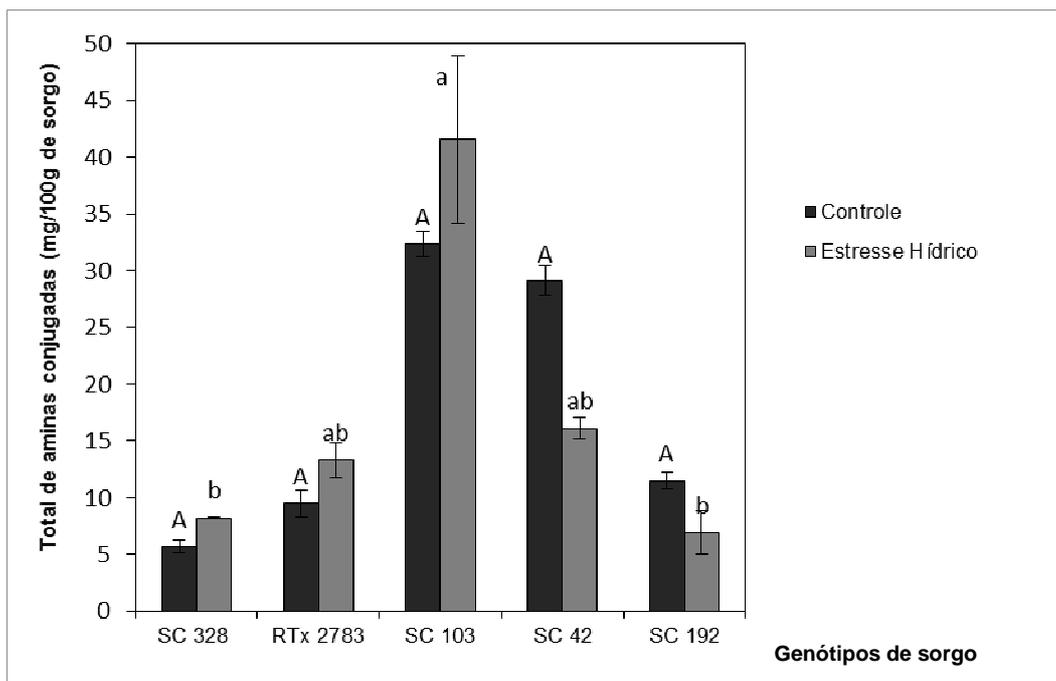


Figura IV.8. Teores totais de aminas conjugadas em genótipos de sorgo cultivados em dois ambientes: com estresse hídrico e irrigados (Controle). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa nos teores totais de aminas conjugadas entre os genótipos cultivados sob estresse hídrico e letras maiúsculas, entre os genótipos cultivados com irrigação (Teste de Tukey, $p < 0.05$).

3.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE AMINAS CONJUGADAS E LIVRES E ÁCIDOS FENÓLICOS EM SORGO

Na Tabela IV.4 estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e livres em linhagens de sorgo cultivadas com e sem estresse hídrico e na Tabela IV.5 os coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e ácidos fenólicos nessas mesmas amostras.

Correlações significativas foram obtidas apenas para as espermidinas conjugadas dicumáricas e diferúlicas no sorgo irrigado e para a espermidina e a amina diferúlica correspondente, no sorgo cultivado sob estresse hídrico (Tabela IV.4). As equações da reta para essas correlações foram $y = 0,21x - 1,08$; $y = 0,50x + 7,10$ e $y = -0,31 + 6,97$, respectivamente. Baseado nestes resultados, à medida que houve aumento nos teores de espermidina no sorgo irrigado, houve também um aumento das aminas dicumáricas e diferúlicas correspondentes.

Tabela IV.4. Coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e livres em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico

Aminas conjugadas	Coeficientes de correlação					
	Aminas livres					
	Putrescina		Espermina		Espermidina	
	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico	Controle	Estresse Hídrico
DCP	Nd	Nd				
DFP	0,7935	Nd				
DCEPM			0,5641	0,4224		
DFEPM			0,3890	0,6013		
DCEPD					0,9952*	0,7015
DFEPD					0,9102*	0,9789*

Valores expressos para *p ≤ 0,05. Nd: não determinado, por não haver amina livre ou conjugada. DCP: dicumaroilputrescina; DFP: diferuloilputrescina; DCEPM: dicumaroilespermina; DFEPM: diferuloilespermina; DCEPD: dicumaroilespermidina; DFEPD: diferuloilespermidina.

Tabela IV.5. Coeficientes de correlação de Pearson entre aminas conjugadas e ácidos fenólicos em sorgos cultivados com e sem estresse hídrico

Aminas conjugadas	Coeficientes de correlação			
	Ácidos fenólicos			
	Cumárico		Ferúlico	
	Solúvel	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel
DCP				
Controle	Nd	Nd		
Estresse hídrico	Nd	Nd		
DFP				
Controle			0,6872	0,7086
Estresse hídrico			Nd	Nd
DCEPM				
Controle	0,4832	0,9936		
Estresse hídrico	0,7186	0,7212		
DFEPM				
Controle			0,3875	0,5382
Estresse hídrico			0,5039	0,5113
DCEPD				
Controle	Nd	0,5158		
Estresse hídrico	Nd	0,9383*		
DFEPD				
Controle			0,8170	0,6385
Estresse hídrico			0,4896	0,5059

Valores expressos para *p ≤ 0,05. Nd: não determinado, por não haver amina conjugada ou ácido fenólico na fração. DCP: dicumaroilputrescina; DFP: diferuloilputrescina; DCEPM: dicumaroilespermina; DFEPM: diferuloilespermina; DCEPD: dicumaroilespermidina; DFEPD: diferuloilespermidina.

Para sorgo cultivado sem irrigação, à medida que a espermidina aumentou no grão, houve um decréscimo no teor da amina diferúlica conjugada

à espermidina, ou seja, houve uma menor formação de diferuloilespermidina (Tabela IV.4).

De acordo com a Tabela IV. 5, não houve correlações significativas em relação às aminas conjugadas e os ácidos fenólicos, tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel dos sorgos cultivados de forma irrigada e sem irrigação. A única exceção foi a correlação significativa entre DCEPD e o ácido cumárico na fração insolúvel do sorgo cultivado sob estresse hídrico.

4. CONCLUSÕES

Foram sintetizadas as aminas diferúlicas e dicumáricas da putrescina, espermina e espermidina, pois pelos resultados iniciais desse trabalho eram passíveis de serem detectadas em sorgo, já que essas aminas e ácidos fenólicos estavam presentes nas linhagens de sorgo testadas. Os compostos sintetizados apresentaram pureza satisfatória, de acordo com as análises em IV, RMN e CLAE.

O método desenvolvido foi útil na separação e quantificação das amidas diferúlicas e dicumáricas da putrescina, espermina e espermidina. As aminas conjugadas derivadas da espermina foram as mais abundantes, sendo os teores da diferuloilespermina mais altos que os da dicumaroilespermina. Quanto às demais aminas conjugadas, a dicumaroilputrescina não foi detectada em nenhuma linhagem, enquanto que a diferuloilputrescina e a dicumaroilespermidina foram encontradas em pequenas quantidades. No entanto, a linhagem SC192 apresentou um teor expressivo de diferuloilespermidina, comparado com as demais linhagens. Assim como para os ácidos fenólicos, para a maioria das linhagens de sorgo estudadas, o cultivo em ambiente com estresse hídrico não impactou de maneira significativa nos teores de aminas conjugadas. O estudo de correlação comprovou que quando o teor de espermidina aumentou no sorgo, houve um aumento da amida correspondente diferúlica e dicumárica no sorgo cultivado com irrigação. Para sorgo cultivado sem irrigação, à medida que a espermidina aumentou no grão, houve uma menor formação de diferuloilespermidina.

CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLIAMINAS, ÁCIDOS FENÓLICOS, AMINAS CONJUGADAS E EXTRATOS METANÓLICOS DE SORGO

1 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo foram: i) avaliar a atividade antioxidante de poliaminas, ácidos hidroxicinâmicos, aminas conjugadas, quimicamente sintetizadas, e extratos metanólicos de sorgo frente aos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] (ABTS) e o poder desses compostos de reduzirem o ferro e o íon do molibdênio; ii) avaliar a capacidade de inibição da oxidação de óleo de soja, determinada em equipamento Rancimat® por aminas bioativas, ácidos hidroxicinâmicos, aminas conjugadas, sintetizadas quimicamente, e por extratos metanólicos de sorgo; iii) comparar a atividade antioxidante dos compostos e extratos de sorgo com antioxidantes tradicionais, como butil hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA); iv) correlacionar os teores de aminas conjugadas, de ácidos fenólicos e de aminas livres nos extratos de sorgo com a atividade antioxidante desses extratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Amostras

Aminas conjugadas a ácidos hidroxicinâmicos foram determinadas em cinco amostras de sorgo, originadas do cultivo com e sem estresse hídrico. Esse material foi cultivado nos campos experimentais da Embrapa Milho e

Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. As amostras incluíram as linhagens com tanino denominadas SC328, de coloração marrom clara e SC103, marrom, e as linhagens sem tanino, SC42, marrom, RTx2783, bronze e SC192 cuja coloração é amarela. O cultivo de sorgo foi realizado com duas repetições nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo em Nova Porteirinha, MG, a partir de Junho até Outubro de 2010.

Quando maduros, os grãos foram colhidos e, após expurgo com fosfina, armazenados sob refrigeração ($4 \pm 2^\circ \text{C}$) e 40% de umidade relativa até a realização dos experimentos.

2.1.2 Reagentes, solventes e padrões

Os reagentes empregados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com metanol (JT Baker, Xalostoc, México). As poliaminas foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA): espermina (S3256) e espermidina (S2626). Os ácidos cumárico (C9008), ferúlico (128708), sinápico (D7927) e caféico (Fluka, 60020) foram também adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As aminas conjugadas dicumaroilputrescina (DCP), diferuloilputrescina (DFP), dicumaroilespermidina (DCEPD), diferuloilespermidina (DFEPD), dicumaroilespermina (DCEPM), diferuloilespermina (DFEPM) foram sintetizadas no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, sob a responsabilidade do Dr. Ricardo José Alves. Todas as substâncias utilizadas nos testes de atividade antioxidante foram diluídas em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os reagentes empregados nos testes de atividade antioxidante foram DPPH (D9132) e ABTS (A1888), adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O fosfato de sódio, molibdato de amônia, hexacianoferrato (III) de potássio, cloreto férrico, persulfato de potássio e ácido tricloracético foram adquiridos da Synth (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), e o ácido sulfúrico da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil).

Os antioxidantes sintéticos utilizados, BHA e BHT, foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

O óleo de soja e de milho refinados e sem antioxidante foram cedidos pela Cargill Agrícola (Mairinque, SP, Brasil) sendo mantidos sob congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparo dos extratos

Os extratos de sorgo foram preparados segundo a metodologia proposta por Shao et al. (2014) com modificações. Foram pesados 2 g de sorgo triturado (granulometria de $420\text{ }\mu\text{m}$) e procedeu-se a extração com 15 mL de metanol 80%. A mistura foi agitada em mesa agitadora (Ovan, Badalona, Espanha) a 800 rpm por 1 hora seguida de centrifugação (Jouan CR3i, Saint-Herblain, França) a 4500 g a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Esse procedimento foi realizado duas vezes e os sobrenadantes combinados. Os sobrenadantes foram concentrados por aquecimento a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ com injeção concomitante de ar comprimido, estocando-os a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos testes antioxidantes. As extrações foram realizadas em triplicata.

Os extratos foram ressuspensos em metanol e utilizados nos testes de atividade antioxidante na concentração de $600\text{ }\mu\text{g/mL}$. Os testes de atividade antioxidante foram realizados em triplicata.

2.2.2 Atividade antioxidante frente ao radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Awika et al. (2003) e Gomes (2014) no Departamento de Química UFLA, sob a responsabilidade da professora doutora Maria das Graças Cardoso.

Uma solução metanólica de DPPH foi preparada na concentração de $40\text{ }\mu\text{g/mL}$. Para a avaliação, $2,7\text{ mL}$ da solução de DPPH foram adicionados em

tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de extrato metanólico ou de cada um dos padrões avaliados. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto a amostra. Para a comparação das atividades antioxidantes, o antioxidante sintético BHT foi empregado. A curva analítica de BHT foi construída nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; e 400 µg/L. Uma equação polinomial ($y = -0,0012x^2 + 0,6892x + 7,1408$; $R^2 = 0,9753$) foi utilizada para expressar os resultados em g equivalente de BHT por g de poliamina, ácido fenólico, amina conjugada, ou extrato de sorgo.

Após descanso por 60 min na ausência de luz, leituras foram realizadas no comprimento de onda de 517 nm utilizando o espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC, Kioto, Japão). A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a equação V.1:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] \times 100 \quad (V.1)$$

em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra, e

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o metanol.

2.2.3 Atividade antioxidante frente ao radical ABTS

O teste frente ao radical ABTS foi realizado no Departamento de Química UFLA, sob a responsabilidade da professora doutora Maria das Graças Cardoso.

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Awika et al. (2003) e Gomes (2014). Para o ensaio, 50 µL de amostra foram adicionados a 1950 µL da solução do radical ABTS•+. Após 6 min de armazenamento em ausência de luz, a absorvância foi monitorada espectrofotometricamente a 734 nm (Shimadzu 160-UV, Kioto, Japão). A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de metanol e uma solução do radical ABTS•+ atuaram como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS•+ pela

amostra, ou seja, pelos extratos de sorgo, poliaminas, ácidos fenólicos, ou amina conjugada, foi calculada de acordo com a equação V.2:

$$\% \text{ Efeito de captação do radical} = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100 \quad (V.2)$$

em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo,

A_{Am} = Absorbância da amostra.

Os valores foram comparados com uma curva padrão de BHT nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; e 1000 µg/mL de BHT em metanol. Uma equação polinomial ($y = -0,0003x^2 + 0,3468x + 8,1096$; $R^2 = 0,9726$) foi utilizada para calcular os resultados que foram expressos em g equivalente de BHT por g de poliamina, ácido fenólico, amina conjugada, ou por g de extrato de sorgo.

2.2.4 Poder de redução do ferro

O teste de poder de redução do ferro realizado no Departamento de Química UFLA, sob a responsabilidade da professora doutora Maria das Graças Cardoso.

Uma alíquota de 50 µL das soluções metanólicas dos extratos de sorgo ou de cada um dos padrões foram adicionados em um tubo de ensaio com 500 µL de tampão fosfato e 500 µL de hexacianoferrato III de potássio. Os tubos foram tampados e após agitação em vortex, foram incubados em um banho-maria a 50 °C durante 20 min. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 500 µL de TCA 10%, 1500 µL de água e 300 µL de cloreto férrico. Foi então feita a leitura em espectrofotômetro a 700 nm (Shimadzu 160-UV, Kioto, Japão) (DOS SANTOS et al. 2007; GOMES, 2014). O poder de redução do íon ferricianeto pelo provável antioxidante foi calculado de acordo com a equação V.3:

$$\text{Poder de redução} = (A_{CN} - A_{Am}) \times 100 \quad (V.3)$$

em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo, e

A_{Am} = Absorbância da amostra.

O poder de redução do ferro pelas amostras foi comparado com uma curva para várias concentrações de BHT (6,25; 12,5; 50; 100; 200; 400; e 1000 $\mu\text{g/mL}$). Uma regressão ($y = 0,0019x - 0,0125$; $R^2 = 0,988$) foi utilizada para expressar os resultados em g equivalente de BHT por g de poliamina, ácido fenólico, amina conjugada ou por g de extrato de sorgo.

2.2.5 Poder de redução do complexo de molibdênio

O teste de poder de redução do complexo de molibdênio foi realizado no Departamento de Química UFLA, sob a responsabilidade da professora doutora Maria das Graças Cardoso.

Uma alíquota de 50 μL das soluções metanólicas dos extratos de sorgo ou de cada um dos padrões foram adicionados em um tubo de ensaio com 500 μL de solução de reagente (ácido sulfúrico 10% 1,8 M, 28 mM de fosfato de sódio e molibdato de amônio a 4 mM). Os tubos foram tampados e incubados em um banho-maria a 95 °C durante 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 695 nm (Shimadzu 160-UV, Kioto, Japão) (PRIETO et al., 1999; GOMES, 2014). O poder de redução do molibdênio pelo provável antioxidante foi calculado de acordo com a equação V.4:

$$\text{Poder de redução} = (A_{CN} - A_{Am}) \times 100 \quad (\text{V.4})$$

em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo,

A_{Am} = Absorbância da amostra.

Os valores da capacidade antioxidante das amostras foram comparados com uma curva para várias concentrações de BHT (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; e 1000 $\mu\text{g/mL}$). Uma regressão linear ($y = 0,0006x + 0,047$; $R^2 = 0,9802$) foi utilizada para expressar os resultados em g equivalente de BHT por g de poliamina, ácido fenólico, amina conjugada, ou por g de extrato de sorgo.

2.2.6 Avaliação da atividade antioxidante em Rancimat®

Os ácidos hidroxicinâmicos foram pesados e diluídos em 1 mL de metanol com auxílio de ultrassom por 15 min. Em seguida foram adicionados 5 g de óleo de soja, obtendo para os ácidos caféico e sinápico, concentrações de 0,06 g/100 g de óleo e para os ácidos ferúlico e cumárico, concentrações de 0,12 g/100 g de óleo. O mesmo procedimento foi realizado para as aminas conjugadas sintetizadas, obtendo concentrações de 0,12 g/100 g de óleo. Antes das análises no Rancimat, os extratos metanólicos de sorgo foram ressuspensos em 1 mL de metanol a 80%, homogeneizados em ultrassom por 15 min e então adicionados em 5 g de óleo de soja, de modo a obter concentrações de extrato em óleo próximas a 0,6 g/100 g de óleo, ou seja, concentrações dez vezes maiores que as concentrações dos padrões em óleo. A capacidade antioxidante dos compostos e dos extratos metanólicos foi comparada à mistura sinérgica de antioxidantes tradicionalmente usada na indústria alimentícia, o BHA e o BHT, estes na concentração final de 0,06 g/100 g de óleo. Todas as soluções em óleo foram homogeneizadas em ultrassom durante 30 min antes da análise no Rancimat.

A análise da atividade antioxidante foi determinada mediante avaliação da estabilidade oxidativa de óleo de soja utilizando o Rancimat® modelo 743 da Metrohm AG (Herisau, Suíça), conforme o método descrito na AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 2009). As análises foram realizadas em duplicata, incluindo o controle em todas as rodadas. Os estudos foram realizados à temperatura de 110 °C, com fluxo de ar de 20 L/h, e 50 mL de água Milli-Q para recepção dos voláteis. Deve-se destacar que a vidraria foi rigorosamente lavada entre as análises, utilizando detergente neutro e ultrassom a 65 °C, a fim de se evitar qualquer interferência nos resultados.

Os resultados foram expressos como fator de proteção (FP) segundo a equação (V.5), conforme boletim de aplicação número 232, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (METROHM, 2008).

$$PF = \frac{PI_a}{PI_c}$$

em que:

PI_a = período de indução do óleo de soja com adição dos extratos metanólicos de sorgo ou dos padrões; e

PI_c = período de indução do controle (óleo de soja sem adição dos extratos metanólicos de sorgo ou dos padrões).

2.2.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, empregando o programa SISVAR, versão 5.3 (UFLA, Lavras, MG, Brasil). Os coeficientes Pearson e de regressão foram determinados pelo programa EXCEL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS DIFERENTES MODELOS QUÍMICOS

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH, ABTS e o poder de redução do ferro e do complexo de molibdênio dos compostos e extratos pesquisados está apresentada na Tabela V.1. Observa-se que todos os compostos e extratos apresentaram atividade antioxidante maior que o BHT frente ao radical DPPH e ABTS. Frente ao radical DPPH, os ácidos caféico, ferúlico e sinápico foram os compostos que apresentaram maior atividade antioxidante. Esse fato é, possivelmente, devido à capacidade desses compostos de doar elétrons ou hidrogênio ao radical DPPH e se estabilizarem por ressonância no anel fenólico. Quando o anel fenólico é substituído nas posições *orto* ou *para* em relação à hidroxila fenólica, essa capacidade antioxidante é aumentada (SON & LEWIS, 2002). Portanto, os ácidos caféico, ferúlico e sinápico possuem maior atividade que o ácido cumárico, já que este

não possui substituição nestas posições. As poliaminas livres também apresentaram atividade antioxidante no modelo utilizado, sendo esta capacidade próxima a do ácido cumárico. Por outro lado, a conjugação aos ácidos fenólicos aumentou a capacidade antioxidante das poliaminas, embora em menor intensidade em relação aos ácidos fenólicos livres. As amidas diferúlicas apresentaram maior atividade que as correspondentes dicumáricas. Um resultado interessante foi o fato de que as amidas da putrescina apresentaram atividade antioxidante, já que, segundo Bellé et al. (2004) e Mendonça (2009), a putrescina livre não possui essa propriedade.

Ainda em relação ao radical DPPH, os extratos metanólicos de sorgo das linhagens SC328, SC103 e SC42 apresentaram atividade antioxidante expressivas, iguais ou próximas aos ácidos caféico, ferúlico e sinápico, o que demonstra a capacidade antioxidante do sorgo, mesmo em linhagens sem tanino. No entanto, vale destacar que os teores de ácidos fenólicos solúveis e de aminas conjugadas nos extratos metanólicos de sorgo são baixos como relatado nos capítulos anteriores, nas Tabelas III.2 e IV.3, respectivamente. Esse fato permite inferir que outros compostos são responsáveis pela atividade antioxidante proporcionada pelos extratos de sorgo avaliados.

Dlamini et al. (2007) observaram que sorgo de pericarpo claro possui menor atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS em comparação com as linhagens cujo pericarpo é vermelho, marrom ou preto. Esse fato também foi observado para o genótipo SC192, de coloração amarela. No entanto o genótipo RTx2783 cujo pericarpo é bronze-avermelhado, mesmo possuindo coloração mais intensa, apresentou baixa atividade antioxidante.

Bellé et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante das poliaminas espermidina e espermina em vários sistemas por meio do teste de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) e verificaram que a espermina possuía maior atividade antioxidante que a espermidina. No entanto, no presente estudo, a capacidade antioxidante da espermina frente ao radical DPPH não foi significativamente diferente em relação à espermidina.

Tabela V.1. Atividade antioxidante em diferentes modelos químicos de poliaminas, ácidos fenólicos, aminas conjugadas e de extratos metanólicos de sorgo expressos em g equivalentes de BHT

Amostra	g equivalente de BHT/g de amostra			
	Radical DPPH	Radical ABTS	Poder redutor do ferro	Poder redutor do complexo de molibdênio
Ácido caféico	181,22 ^a	407,68 ^a	10,57 ^a	21,38 ^a
Ácido cumárico	28,39 ^f	364,47 ^{ab}	1,60 ^e	1,99 ^{cd}
Ácido ferúlico	180,85 ^a	407,18 ^a	5,88 ^b	6,64 ^b
Ácido sinápico	177,34 ^{ab}	407,73 ^a	6,37 ^b	18,92 ^a
Espermidina	4,48 ^g	257,17 ^b	1,54 ^e	0,00 ^d
Espermina	11,43 ^{fg}	359,78 ^b	2,64 ^d	0,00 ^d
Dicumaroilputrescina	15,54 ^{fg}	310,68 ^b	0,08 ^f	0,00 ^d
Diferuloilputrescina	125,75 ^d	211,35 ^{bc}	0,17 ^f	0,85 ^d
Dicumaroilespermidina	26,21 ^f	289,19 ^b	0,00 ^f	0,22 ^d
Diferuloilespermidina	112,02 ^e	234,27 ^b	0,27 ^f	0,37 ^d
Dicumaroilespermina	17,58 ^{fg}	397,93 ^a	1,52 ^e	3,56 ^c
Diferuloilespermina	139,57 ^c	407,73 ^a	3,32 ^c	3,90 ^c
SC328	173,77 ^{ab}	259,59 ^b	0,11 ^f	0,12 ^d
RTx2783	29,74 ^f	42,95 ^d	0,00 ^f	0,00 ^d
SC103	172,36 ^{ab}	291,20 ^b	0,16 ^f	0,10 ^d
SC42	165,72 ^b	163,92 ^c	0,03 ^f	0,00 ^d
SC192	32,04 ^f	38,30 ^d	0,00 ^f	0,00 ^d

Para cada teste, letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Choi et al. (2007) pesquisaram a atividade antioxidante, frente ao radical DPPH, dos compostos dicumaroilputrescina, diferuloilputrescina e cumaroilferuloilputrescina isolados de farelo de milho e comprovaram a atividade antioxidante destes compostos. Dentre estes, a diferuloilputrescina exerceu uma grande capacidade de sequestrar radicais DPPH, seguido pela cumaroilferuloilputrescina e depois pela dicumaroilputrescina. Inclusive a capacidade antioxidante da DFP foi maior que a capacidade antioxidante do ácido ferúlico livre, o que não aconteceu nesse estudo com sorgo. Choi et al. (2007) também verificaram que a atividade antioxidante das aminas conjugadas a derivados do ácido cinâmico, em relação ao sequestro de radicais DPPH, aumenta com a presença de grupos metila adjacentes ao grupo 4-hidroxil *para*-substituído no anel aromático. Esse fato também foi observado nesse estudo, já que as amidas do ácido ferúlico apresentaram maior capacidade antioxidante que as amidas do ácido cumárico. No entanto, a capacidade antioxidante das aminas conjugadas depende de vários outros fatores, como solubilidade e hidrofobicidade dos componentes, capacidade antioxidante na fase aquosa e lipídica. Também, segundo Scherer & Godoy (2009) e Dawidowicz et al. (2012) a capacidade antioxidante de um mesmo composto em modelo DPPH é difícil de ser comparada entre os trabalhos publicados por falta de um padrão na forma de expressar os resultados e pelo fato de diferentes metodologias influenciarem na determinação da capacidade antioxidante dos compostos avaliados.

Em relação ao radical ABTS, os ácidos fenólicos apresentaram alta capacidade antioxidante. As esperminas conjugadas aos ácidos cumárico e ferúlico apresentaram capacidade antioxidante igual às dos ácidos fenólicos livres e as poliaminas espermina e espermidina apresentaram capacidade antioxidante estatisticamente semelhante entre si. Quanto aos extratos de sorgo, os resultados foram semelhantes ao teste com o DPPH, ou seja, as linhagens SC328 e SC103 apresentaram atividade antioxidante expressiva, embora nesse modelo, menores que as dos ácidos caféico, ferúlico e sinápico. Novamente as linhagens SC192 e RTx2783 foram as que apresentaram menor poder antioxidante (Tabela V.1).

Os resultados da atividade antioxidante de extratos de sorgo frente ao radical ABTS foram maiores que os frente ao radical DPPH. Esse fato também

foi observado por Awika et al. (2003), Dykes et al. (2006) e Dlamini et al. (2007). Segundo esses pesquisadores, alguns pigmentos presentes nos extratos de sorgo, tais como as antocianinas, causam interferência levando a subestimação dos resultados dos testes frente ao radical DPPH. O comprimento de onda de 734 nm, utilizado para medir os compostos reduzidos no teste ABTS elimina a interferência das antocianinas, o que não acontece no comprimento de onda empregado no teste DPPH, que é de 517 nm (AWIKA et al., 2003).

O poder dos compostos e extratos de sorgo de reduzirem o íon ferrocianeto a ferrocianato apresentou valores correspondentes a g de BHT inferiores aos apresentados pelo método DPPH e ABTS. Nesse modelo, o ácido caféico demonstrou capacidade antioxidante maior que os ácidos ferúlico e sinápico. Das amidas sintetizadas, apenas as derivadas da espermina apresentaram capacidade antioxidante. Quanto às poliaminas, espermina apresentou poder redutor estatisticamente mais alto que a espermidina. No entanto, segundo Bellé et al. (2004), essas poliaminas têm baixo poder de redução do ferro.

Os extratos metanólicos dos genótipos de sorgo estudados não apresentaram capacidade de reduzir o ferro, e, portanto, não apresentaram capacidade antioxidante, diferentemente dos modelos anteriores (Tabela V.1).

Quanto ao poder de redução do molibdênio pelos compostos e extratos de sorgo estudados, os resultados são próximos ao do teste de redução do ferro, em termos de quantidade equivalente de BHT. No entanto, os ácidos caféico e sinápico foram os que apresentaram maior capacidade de redução do molibdênio, seguida pelo ácido ferúlico. O ácido cumárico apresentou capacidade menor em relação aos demais ácidos fenólicos. As poliaminas, assim como as aminas conjugadas, não apresentaram capacidade antioxidante nesse modelo. As exceções foram as aminas conjugadas da espermina que apresentaram atividade antioxidante estatisticamente igual à do ácido cumárico. Da mesma forma que para o teste de redução do ferro, os extratos de sorgo não apresentaram capacidade de reduzirem o molibdênio (Tabela V.1).

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEO DE SOJA FRENTE AOS DIFERENTES COMPOSTOS

De acordo com a Figura V.1, pode-se observar que o ácido caféico apresentou o maior fator de proteção, ou seja, alta capacidade de estabilizar a oxidação de óleo de soja, capacidade esta inclusive maior que a do antioxidante sintético BHT e da mistura dos antioxidantes sintéticos BHT/BHA, usualmente empregados na indústria de alimentos. Observa-se também que o ácido sinápico, embora tenha apresentado fator de proteção menor que o do ácido caféico e também menor que o dos antioxidantes sintéticos, foi maior que a capacidade antioxidante dos demais ácidos fenólicos estudados. Esse fato já havia sido observado por Robbins (2003), que relatou que a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é variável entre os compostos, pois está relacionada com a quantidade e o tipo do substituinte do grupo hidroxil no anel fenólico.

Em relação às aminas conjugadas sintetizadas, o maior fator de proteção foi para a diferuloilputrescina, 1,04, seguido da diferuloilespermidina, cujo fator de proteção foi de 1,02 (Figura V.1). Observou-se ainda, que embora a atividade antioxidante das aminas conjugadas tenha sido menor que a dos antioxidantes sintéticos, esta foi igual ou maior que a dos ácidos fenólicos correspondentes, o que reforça o fato das aminas, quando conjugadas aos ácidos fenólicos, tem sua capacidade antioxidante potencializada (CHOI et al., 2007).

Como relatado anteriormente, a concentração de aminas conjugadas e de ácidos fenólicos totais solúveis no extrato era menor que 0,12 g/100 g de óleo. Ainda assim, os extratos metanólicos das linhagens SC42 e SC192 apresentaram altos fatores de proteção, 1,07 e 1,06, respectivamente, semelhantes ao fator de proteção do ácido sinápico na concentração de 0,06 g/100 g de óleo (FP - 1,09). Acredita-se que outros compostos estejam contribuindo para a atividade antioxidante desses extratos.

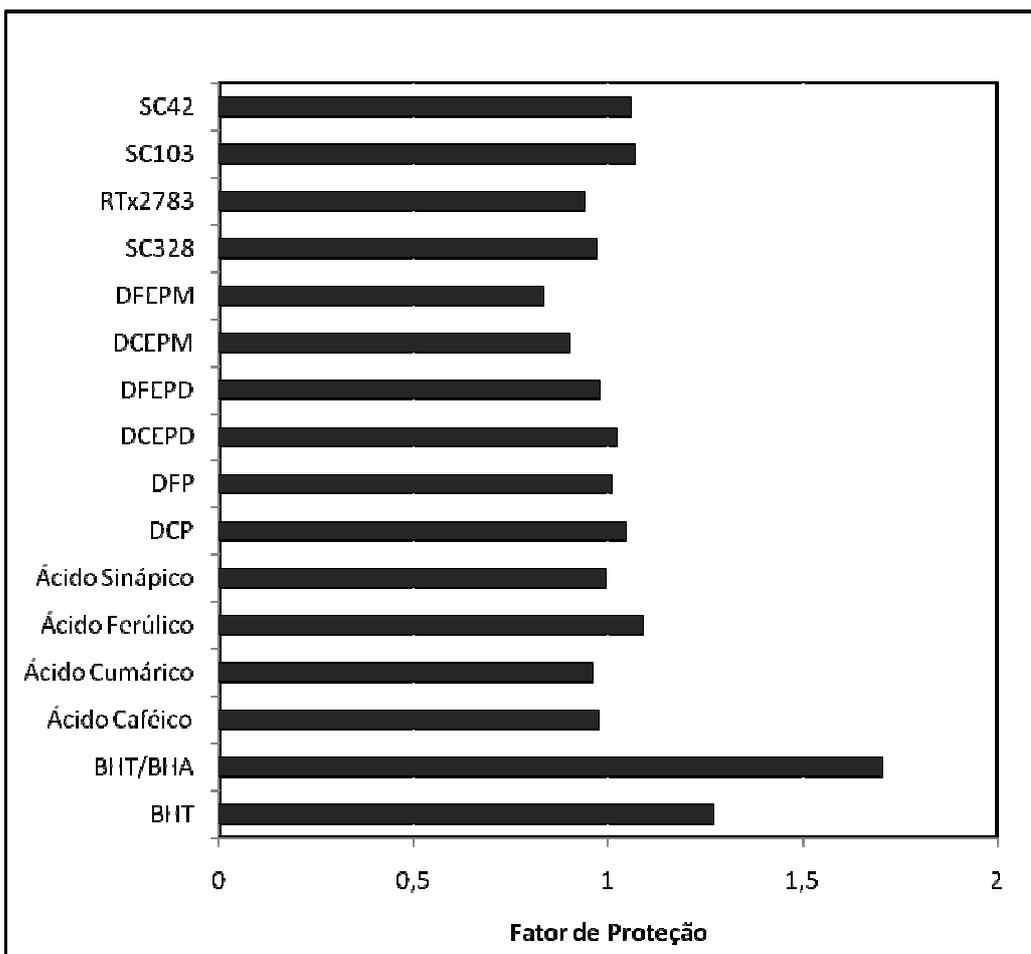


Figura V.1 - Fatores de proteção do BHT, da associação de BHT e BHA, de ácidos hidroxicinâmicos, de aminas conjugadas e de extratos metanólicos de diversas linhagens de sorgo. Concentração das soluções: ácidos caféico, sinápico, BHT e mistura BHT/BHA: 0,06 g/100 g de óleo. Ácidos cumárico, ferúlico e aminas conjugadas: 0,12 g/100 g de óleo. Extratos de sorgo: 0,6 g/100 g de óleo. DCP: dicumaroilputrescina; DFP: diferuloilputrescina; DCEPM: dicumaroilespermina; DFEPM: diferuloilespermina; DCEPD: dicumaroilespermidina; DFEPD: diferuloilespermidina.

3.3 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES TOTAIS DE POLIAMINAS, DE ÁCIDOS FENÓLICOS E DE AMINAS CONJUGADAS EM EXTRATOS DE SORGO E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM DIFERENTES MODELOS

De acordo com a Tabela V.2, não houve correlações expressivas entre os teores de poliaminas, de ácidos fenólicos e de aminas conjugadas e a atividade antioxidante avaliada pelos quatro métodos. No entanto, quando se avaliou os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante, essas correlações foram

significativas a 99% nos testes do radical DPPH e ABTS. Para essas correlações, as equações foram: $[y = 117,40 x - 11,83; R^2 = 0,95$ e $y = 179,13 x - 33,91; R^2 = 0,93$, para a relação entre fenólicos totais e a atividade antioxidante nos testes do radical DPPH e ABTS, respectivamente].

Vários estudos de correlação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante em amostras de sorgo apresentaram valores altos (AWIKA et al.; 2003; DYKES et al., 2006; MORAES, 2011). Awika et al. (2003) encontraram $R^2 = 0,96$ e $R^2 = 0,97$ para a correlação entre os teores de fenólicos totais em amostras de sorgo e atividade antioxidante em DPPH e ABTS, respectivamente, valores próximos a esse estudo. Da mesma forma, Dykes et al. (2006) encontraram correlações de Pearson com $R > 0,97$ entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante tanto em modelo DPPH quanto em ABTS.

Esses resultados permitem inferir que outros compostos fenólicos, além dos ácidos fenólicos e das aminas conjugadas a ácidos fenólicos estão contribuindo para a atividade antioxidante dos extratos de sorgo avaliados. Justamente as linhagens SC328 e SC103, que segundo dados da Embrapa Milho e Sorgo, possuem taninos, apresentaram as maiores capacidades antioxidantes frente aos radicais DPPH e ABTS. Dados fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo também demonstraram correlações expressivas entre os teores de antocianinas nos extratos dos cinco genótipos estudados nesse trabalho e a atividade antioxidante frente ao DPPH ($R^2 = 0,9564$) e ABTS ($R^2 = 0,9104$). Portanto, acredita-se que as antocianinas e/ou os taninos devam ser os maiores responsáveis pela capacidade antioxidante das linhagens de sorgo estudadas.

Tabela V.2. Coeficientes de correlação de Pearson entre a atividade antioxidante em diferentes modelos e os teores totais de poliaminas, de ácidos fenólicos, de aminas conjugadas e fenólicos totais detectados em extratos de sorgo

Compostos detectados em sorgo	Coeficientes de correlação.			
	Atividade antioxidante			
	Redução do molibdênio	Redução do ferro	Radical DPPH	Radical ABTS
Poliaminas ^a	0,3180	0,3874	0,5485	0,4994
Ácidos fenólicos solúveis ^b	0,3628	0,3961	0,3626	0,4206
Aminas conjugadas ^c	0,0008	0,4064	0,5162	0,4325
Fenólicos totais	0,7622	0,8617	0,9760*	0,9670*

Valores expressos para *p ≤ 0,01. **a:** espermina e espermidina; **b:** ácido caféico, cumárico, ferúlico e sinápico; **c:** dicumaroilputrescina, diferuloilputrescina, dicumaroilespermidina, diferuloilespermidina, dicumaroilespermina, diferuloilespermina.

4 CONCLUSÕES

Os extratos de sorgo das linhagens SC328, SC103 e SC42 apresentaram atividade antioxidante expressivas nos modelos DPPH e ABTS. Já as linhagens SC192 e RTx2783 apresentaram menor poder antioxidante nesses modelos. Entretanto, estes extratos não foram capazes de reduzir o ferro e nem o molibdênio, para todas as linhagens estudadas. Quanto aos coeficientes de correlação, estes foram expressivos apenas entre os teores de fenólicos totais no sorgo e a atividade antioxidante em modelo DPPH e ABTS, o que permite inferir que outros compostos fenólicos que não os estudados são os maiores responsáveis para atividade antioxidante das linhagens de sorgo avaliadas.

As aminas conjugadas diferuloilputrescina, diferuloilespermina e diferuloilespermidina apresentaram atividades antioxidantes expressivas em modelo DPPH, embora menores que a do ácido ferúlico, porém maiores que a das poliaminas. Já em relação ao radical ABTS as aminas conjugadas derivadas da espermina apresentaram atividade antioxidante tão alta quanto as dos ácidos fenólicos. Também as únicas aminas conjugadas que

apresentaram capacidade antioxidante capaz de reduzir o ferro e o molibdênio foram as amidas diferúlicas e dicumáricas da espermina.

Os ácidos caféico e sinápico apresentaram alta capacidade de estabilizar a oxidação de óleo de soja, sendo que a capacidade do ácido caféico foi maior que a capacidade antioxidante da mistura de BHT/BHA. As aminas conjugadas aos ácidos cumárico e ferúlico apresentaram capacidade antioxidante maior que a dos ácidos fenólicos correspondentes. Já os extratos metanólicos de sorgo, mesmo possuindo pequenas concentrações de ácidos fenólicos e de aminas conjugadas, apresentaram atividades antioxidantes semelhantes às aminas conjugadas e às dos ácidos ferúlico e cumárico.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

A partir desses estudos, foi possível concluir que o sorgo é um cereal que além de possuir compostos funcionais como, taninos condensados, 3-deoxiantocianinas, ácidos fenólicos, fitostéroides e policosanóis, já relatados em outros estudos, é fonte de poliaminas, especificamente, de espermina e espermidina, compostos com atividade antioxidante já comprovada. Também é um alimento seguro, por não possuir aminas biogênicas.

Durante a germinação por 7 dias, houve apenas aumento nos teores de putrescina, os quais aumentaram três vezes em relação ao grão. O cultivo de sorgo em ambiente com estresse hídrico impactou na diminuição das aminas, sendo os teores significativamente menores nos genótipos com tanino submetidas ao estresse hídrico. Já as mudanças nos teores de aminas durante a germinação de sorgo não foram afetadas pela presença de tanino no grão.

Foram detectados nos genótipos de sorgo estudados, os ácidos hidroxicinâmicos: *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico, sendo o ácido ferúlico predominante. Mais de 90% dos ácidos fenólicos estão localizados na camada externa do grão, ou seja, no pericarpo. Foi possível verificar ainda, que as condições de estresse hídrico não foram suficientes para aumentar os teores de fenólicos totais, incluindo ácidos hidroxicinâmicos nos genótipos estudados, ou seja, não houve efeito do estresse hídrico. Pôde-se concluir ainda, que para sorgos irrigados, mudanças nos teores de ácidos fenólicos na fração solúvel impactaram de maneira significativa nos teores de aminas bioativas livres nesses grãos. Os teores de fenólicos totais encontrados nos genótipos de sorgo estudados sugerem que o sorgo seja fonte maior de fenólicos totais comparado a outros cereais, como trigo, milho e arroz.

Em relação as aminas conjugadas pesquisadas, estas foram encontradas em pequenas quantidades nos extratos metanólicos. As aminas conjugadas derivadas da espermina foram as mais abundantes, sendo os teores da diferuloileespermina mais altos que os da dicumaroleespermina. Quanto às demais aminas conjugadas, a dicumaroilputrescina não foi detectada em

nenhuma linhagem, enquanto que a diferuloilputrescina e a dicumaroilespermidina foram encontradas em pequenas quantidades. Sugere-se, em estudos futuros, avaliar esses compostos nas frações insolúveis do grão, visto que os ácidos fenólicos estão mais concentrados no pericarpo. O estudo de correlação comprovou que quando o teor de espermidina aumentou no cereal, houve um aumento da amida correspondente diferúlica e dicumárica no sorgo cultivado com irrigação.

Foi possível verificar ainda que os extratos metanólicos das linhagens de sorgo possuem atividade antioxidante expressiva frente aos radicais DPPH e ABTS, especialmente as linhagens SC103, SC42 e SC328. Correlações significativas foram observadas somente entre os teores de fenólicos totais no sorgo e a atividade antioxidante em modelo DPPH e ABTS, o que permite inferir que outros compostos fenólicos que não os ácidos hidroxicinâmicos estudados são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante das linhagens de sorgo avaliadas.

Já os extratos metanólicos de sorgo, mesmo possuindo pequenas concentrações de ácidos fenólicos e de aminas conjugadas, apresentaram atividades antioxidantes em Rancimat®, semelhantes às aminas conjugadas e semelhantes às dos ácidos ferúlico e cumárico.

Sugere-se avaliar outros genótipos de sorgo para confirmar o efeito da presença de tanino no grão e do cultivo com estresse hídrico sobre os teores de aminas livres e conjugadas e de ácidos fenólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.
- ADOM, K.K.; LIU, R.H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6182–6187, 2002.
- AFIFY, A.E.M.R.; EL-BELTAGI, H.S.; EL-SALAM, S.M.A.; OMRAN, A.A. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. **Plos one**, v. 6, n. 10, p. 1–6, 2011.
- AFIFY, A.E.M.R.; EL-BELTAGI, H.S.; EL-SALAM, S.M.A.; OMRAN, A.A. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 203–209, 2012a.
- AFIFY, A.E.M.R.; EL-BELTAGI, H.S.; EL-SALAM, S.M.A.; OMRAN, A.A. Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. **Plos one**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012b.
- ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance, **Planta**, v. 231 p. 1237–1249, 2010.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim CEPPA**, v. 19, n. 2, p. 353–380, 2001.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 19 ed., Washington DC, MD: AOAC International, 2012. 3000p.
- AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. Método CD 12b-92. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, 6 ed. Champaign, IL: AOCS, 2009.
- AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W.; WU, X.; PRIOR, R.L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum*

- bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657–6662, 2003.
- AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1199–1221, 2004.
- AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W.; WANISKA, R.D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 90, p. 293–301, 2004.
- AWIKA, J.M.; MCDONOUGH, C.M.; ROONEY, L.W. Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6230–6234, 2005.
- AWIKA, J.M.; YANG, L.; BROWNING, J.D.; FARAJ, A. Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1041–1046, 2009.
- BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J.; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. Effect of Liberibacter infection (Huanglongbing Disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1247–1262, 2010.
- BANDEIRA, C.M.; EVANGELISTA, W.P.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1355–1359, 2012.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341–346, 1995.
- BARROS, F.; DYKES, L.; AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 305–312, 2013.
- BELLÉ, N.A.V.; DALMOLIN, G.D.; FONINI, G.; RUBIN, M.A.; ROCHA, J.B.T. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Research**, v. 1008, p. 245–251, 2004.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, F.; LARHER, J.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v. 140, p. 103–125, 1999.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa, 2009. 399 p.
- CAO, D.D.; HU, J.; ZHU, S.J.; HU, W.M.; KNAPP, A. Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh2 sweet corn (*Zea mays* L.) seed. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 301–307, 2010.
- CARBONNEAU, M.A.; CISSE, M.; MORA-SOUMILLE, N.; DAIRI, S.; ROSA, M.; MICHEL, F.; LAURET, C.; CRISTOL, J.P.; DANGLES, O. Antioxidant properties of 3-deoxyanthocyanidins and polyphenolic extracts from Côte d'Ivoire's red and white sorghums assessed by ORAC and in vitro LDL oxidisability tests. **Food Chemistry**, v. 145, p. 701–709, 2014.
- CARDOSO, L.M.; PINHEIRO, S.S.; DA SILVA, L.H.; MENEZES, C.B.; CARVALHO, C.W.P.; TARDIN, F.D.; QUEIROZ, V.A.V.; MARTINO, H.S.D.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Tocochromanols and carotenoids in sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Diversity and stability to the heat treatment. **Food Chemistry**, v. 172, p. 900–908, 2015.
- CARR, T.P.; WELLER, C.L.; SCHLEGEL, V.L.; CUPPETT, S.L.; GUDERIAN, D. M.; JOHNSON, K.R. Grain sorghum lipid extract reduces cholesterol absorption and plasma non-HDL cholesterol concentration in hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 9, p. 2236–2240, 2005.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 16, p. 2535–2549, 2002.
- CASAL, S.; MENDES, E.; ALVES, R.M.; ALVES, R.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6188–6192, 2004.
- CHIREMBA, C.; TAYLOR, J.R.N.B.; ROONEY, L.W.; BETA, T. Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. **Food Chemistry**, v. 134, p. 81–88, 2012.
- CHOI, S.W.; LEE, S.K.; KIM, E.O.; OH, J.H.; YOON, K.S.; PARRIS, N.; HICKS, K.B.; MOREAU, R.A. Antioxidant and antimelanogenic activities of

- polyamine-conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3920–3925, 2007.
- CHUNG, I.M.; KIM, M.J.; PARK, D.S.; MOON, H.I. Inhibition effects of the classical pathway complement of three *Sorghum bicolor* from South Korea. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 447–449, 2011.
- CHUNG, S.Y.; CHAMPAGNE, E.T. Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2631–2637, 2005.
- CHUNG, S.Y.; CHAMPAGNE, E.T. Ferulic acid enhances IgE binding to peanut allergens in Western blots. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1639–1642, 2011.
- CIPOLLA, B.G.; HAVOUIIS, R.; MOULINOUX, J.P. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. **Amino Acids**, v. 33, p. 203–212, 2007.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 1, n. 12, 2013-2014. Brasília: Conab, 2014. 127p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: outubro de 2014.
- CORREIA, I.; NUNES, A.; BARROS, A.S.; DELGADILLO, I. Protein profile and malt activities during sorghum germination. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2598–2605, 2008.
- CUSTÓDIO, F.B. **Eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado**. 2006. 160f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.
- DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, p. 1037–1043, 2012.
- DEFERNEZ, M.; GUNNING, Y.M.; PARR, A.J.; SHEPHERD, L.V.T.; DAVIES, H.V.; COLQUHOUN, I.J. NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6075–6085, 2004.

- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2002, 507p.
- DICKO, M.H.; GRUPPEN, H.; TRAORÉ, A.S.; VAN BERKEL, W.J.H.; VORAGEN, A.G.J. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2581–2588, 2005.
- DICKO, M.H.; GRUPPEN, H.; TRAORÉ, A.S.; VORAGEN, A.G.J.; VAN BERKEL, W.J.H. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities - review. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 384–395, 2006.
- DLAMINI, N.R.; TAYLOR, J.R.N.; ROONEY, L.W. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1412–1419, 2007.
- DOS SANTOS, M.H.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; GOUVÊA, C.M.C.P. Influência do processamento e torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.
- DU, L.J.; GAO, Q.H.; JI, X.L.; MA, I.J.; XU, F.Y.; WANG, M. Comparison of flavonoids, phenolic acids, and antioxidant activity of explosion-puffed and sun-dried jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11840–11847, 2013.
- DUARTE, J.O. A produção de sorgo granífero no Brasil. **Embrapa Milho e Sorgo**. Sistema de produção, 2, set., 2011. 11p.
- DUODU, K.G.; TAYLOR, J.R.N.; BELTON, P.S.; HAMAKER, B.R. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, p. 117–131, 2003.
- DYKES, L.; ROONEY, L.W. Sorghum and millet phenols and antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 236–251, 2006.
- DYKES, L.; ROONEY, L.W.; WANISKA, R.D.; ROONEY, W.L. Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6813–6818, 2005.
- E.C. EUROPEAN COMMUNITY. Commission Decision of August 12 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of

- analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, L 221/8–L221/36, 2002.
- E.F.S.A. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 1–93, 2011.
- ELKHALIFA, A.E.O.; BERNHARDT, R. Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. **Food Chemistry**, v. 121, p. 387–392, 2010.
- ERDEI, L.; SZEGLETES, Z.; BARABAS, K.; PESTENACZ, A. Responses in polyamine titer under osmotic and salt stress in sorghum and maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 147, p. 599–603, 1996.
- FARHOOSH, R. The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 84, p. 205–209, 2007.
- FERNANDEZ-OROZCO, R.; LI, L.; HARFLETT, C.; SHEWRY, P.R.; WARD, J.L. Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the health grain diversity screen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9341–9352, 2010.
- GLÓRIA, M.B.A. **Bioactive amines**. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. Handbook of Food Science, Technology and Engineering. Marcel Dekker, v. 4, p. 1–38, 2005.
- GLÓRIA, M.B.A.; TAVARES-NETO, J.; LABANCA, R.A.; CARVALHO, M.S. Influence of cultivar and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7480–7485, 2005.
- GOMES, M.S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *citrus* e de seus componentes majoritários**. 2014. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- GONZÁLEZ-MUÑOZ, A.; VILLALOBOS, A.M.Q.; FUENTEALBA, C.; SHETTY K.; RANILLA, L.G. Potential of Chilean native corn (*Zea mays* L.) accessions as natural sources of phenolic antioxidants and in vitro bioactivity for

- hyperglycemia and hypertension management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10995–11007, 2013.
- GRACE, M.H.; YOUSEF, G.G.; GUSTAFSON, S.J.; TRUONG, V.D.; YENCHO, G.C.; LILA, M.A. Phytochemical changes in phenolics, anthocyanins, ascorbic acid, and carotenoids associated with sweet potato storage and impacts on bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 145, p. 717–724, 2014.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.
- HAHN, D.H., FAUBION, J.M., ROONEY, L.W. Sorghum phenolic acids, their performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. **Cereal Chemistry**, v. 60, p. 255–259, 1983.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42–49, 1994.
- HARRMANN, K.M. The shikimate pathway: early steps in biosynthesis of aromatic compounds. **Plant cell**, v. 7, p. 907–919, 1995.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007, 489p.
- HONG, S.S.; JEONG, W.; KWON, J.G.; CHOI, Y.H.; AHN, E.K.; KO, H.J.; SEO, D.W.; OH, J.S. Phenolic amides from the fruits of *Tribulus terrestris* and their inhibitory effects on the production of nitric oxide. **Bulletin of the Korean Chemistry Society**, v. 34, n. 10, p. 3105–3108, 2013.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.
- ISO. International Organization for Standardization. ISO 2591-1:1988: **Test sieving-- Part 1: Methods using test sieves of woven wire cloth and perforated metal plate**. ISO, 13p. 1988.
- JAIN, S.; SHARMA, M.P. Measurement of the oxidation stability of biodiesel using a modified Karl Fischer apparatus. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 899–905, 2011.
- KALAC, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

- KILCI, A.; GOCMEN, D. Changes in antioxidant activity and phenolic acid composition of tarhana with steel-cut oats. **Food Chemistry**, v. 145, p. 777–783, 2014.
- KIM, E.K.; KWON, T.K.; CHOI, S.W. Diferuloylputrescine, a predominant phenolic amide in corn bran, potently induces apoptosis in human leukemia U937 cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n.5, p. 519–526, 2014.
- KING, P.J.; MA G.; MIAO W.; JIA Q.; MCDUGALL, B.R.; REINECKE, M.G.; CORNELL, C.; KUAN, J.; KIM, T.R.; ROBINSON, JR. E. Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 497–509, 1999.
- KUSANO, T.; YAMAGUCHI, K.; BERBERICH, T.; TAKAHASHI, Y. Advances in polyamine research in 2007. **Journal of Plant Research**, v. 120, p. 345–350, 2007.
- LEFÈVRE, I.; GRATIA, E.; LUTTS, S. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). **Plant Science**, v. 161, p. 943–952, 2001.
- LI, L.; SHEWRY, P.R.; WARD, J.R. Phenolic acids in wheat varieties in the health grain diversity screen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9732–9739, 2008.
- LIANG, Q.; CUI, J.; LI, H.; LIU, J.; ZHAO, G. Florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.): potential new sources of dietary fiber and phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3435–3442, 2013.
- LIU, H.P.; DONG, B.H.; ZHANG, W.H.; LIU, Z.P.; LIU, Y.L. Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. **Plant Science**, v. 166, p. 1261–1267, 2004.
- LIU, J.; NADA, K.; PANG, X.; HONDA, C.; KITASHIBA, H.; MORIGUCHI, T. Role of polyamines in peach fruit development and storage. **Tree Physiology**, v. 26, p. 791–798, 2006.
- LIU, R. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 207–219, 2007.
- LUTHRIA, D.L.; LIU, K. Localization of phenolic acids and antioxidant activity in sorghum kernels. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1751–1760, 2013.

- LUTHRIA, D.L.; MEMON, A.A.; LIU, K. Changes in phenolic acid content during dry-grind processing of corn into ethanol and DDGS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1723–1728, 2014.
- LY, D.; KANG, K.; CHOI, J.; ISHIRAHA, A.; BACK, K.; LEE, S. HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hidroxicinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. **Journal of Medical Foods**, v. 11, p. 385–389, 2008.
- MADER, J.C. Polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: free and conjugated polyamines in hormone-induced tuberization. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 1-2, p. 115–120, 1995.
- MARTIN-TANGUY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. **Journal of Plant Physiology**, v. 100, p. 675–688, 1997.
- MENDONÇA, A.C. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- MOHAMED, A.A.; POORTVLIET, E.; STROMBERG, R.; YNGVE, A. Polyamines in foods: development of a food database. **Food & Nutrition Research**, v. 55, p. 5572–5587, 2011.
- MONTILLA, E.C.; HILLEBRAND S.; ANTEZANA, A.; WINTERHALTER, P. Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 7068–7074, 2011.
- MORAES, E.A. **Atividade antioxidante, qualidade proteica e potencial funcional de genótipos de sorgo disponíveis à alimentação humana**. 2011. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- MORAES, E.A.; NATAL, D.I.G.; QUEIROZ, V.A.V.; SHAFFERT, R.E.; CECON, P.R.; PAULA, S.O.; BENJAMIM, L.A.; RIBEIRO, S.M.R.; MARTINO, H.S.D. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejenum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v. 49, p. 553–559, 2012a.

- MORAES, E.A.; QUEIROZ, V.A.V.; SHAFFERT, R.E.; COSTA, N.M.B.; NELSON, J.D.; RIBEIRO, S.M.R.; MARTINO, H.S.D. In vivo protein quality of new sorghum genotypes for human consumption. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1549–1555, 2012b.
- MOREAU, R.A.; NUNEZ, A.; SINGH, V. Diferuloylputrescine and *p*-coumaroyl-feruloylputrescine, abundant polyamine conjugates in lipid extracts of maize kernels. **Lipids**, v. 36, p. 839–844, 2002.
- NARVÁEZ-CUENCA, C.E.; VINCKEN, J.P.; GRUPPEN, H. Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC–DAD–ESI-MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 130, p. 130–138, 2012.
- NICOLETTI, I.; MARTINI, D.; DE ROSSI, A.; TADDEI, F.; D'EGIDIO, M.G.; CORRADINI, D. Identification and quantification of soluble free, soluble conjugated and insoluble bound phenolic acids in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) and derived products by RP-HPLC on a semimicro separation scale. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11800–11807, 2013.
- NISHIBORI, N.; FUJIHARA, S.; AKATUKI, T. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. **Food Chemistry**, v. 100, p. 491–497, 2007.
- NISHIMURA, K.; SHIINA, R.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. **Journal of Biochemistry**, v. 139, p. 81–90, 2006.
- OHE, M.; KOBAYASHI, M.; NIITSU, M.; BAGNI, N.; MATSUZAKI, S. Analysis of polyamine metabolism in soybean seedlings using ¹⁵N-labelled putrescine. **Phytochemistry**, v. 66, p. 523–528, 2005.
- OKOMBI, S.; RIVAL, D.; BONNET, S.; MARIOTTE, A.M.; PERRIER, E.; BOUMENDJEL, A. Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2252–2255, 2006.
- OMARY, M.B.; FONG, C.; ROTHSCILD, J.; FINNEY, P. Effects of germination on the nutritional profile of gluten-free cereals and pseudocereals: a review. **Cereal Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 1–14, 2012.

- ONAL, A.; TEKKELI, S.E.K.; ONAL, C. A review of the liquid chromatography methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 138, p. 509–515, 2013.
- PARR, A.J.; MELLON, F.A.; COLQUHOUN, I.J.; HOWARD V.D. Dihydrocaffeoyl polyamines (Kukoamine and Allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5461–5466, 2005.
- PATENE, C.; SAITA, A.; SORTINO, O. Comparative effects of salt and water stress on seed germination and early embryo growth in two cultivars of sweet sorghum. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.12, p. 1–8, 2012.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Chromatographic and eletrophoretic methods for the analysis of phenetylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 71–88, 2007.
- PIAZZON, A.; VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; MATTIVI, F.; MANDOJ, F.; NARDINI, M. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12312–12323, 2012.
- PRESTES, O.D.; PRESTA, M.A.; KOLBERG; D.I.S.; ZANELLA, R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 18–21, 2007.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.
- PROESTOS, C.; PAUL, L.; KOMAITIS, M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumm dansylation and fluorimetric detection. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1218–1224, 2008.
- QUEIROZ, V.A.V.; MORAES, E.A.; SCHAFFERT, R.E.; MOREIRA, A.V.; RIBEIRO, S.M.R.; MARTINO, H.S.D. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) moench), para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 180–195, 2011.

- QUEIROZ, V.A.V.; MORAES, E.A.; MARTINO, H.S.D.; PAIVA, C.L.; MENEZES, C.B. Potencial do sorgo para uso na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 278, p. 7–12, 2014.
- RABITI, A.L., PISTOCCHI, R., BAGNI, N. Putrescine uptake and translocation in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 77, p. 225–230, 1989.
- ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3022–3029, 2013.
- RODRÍGUEZ, C.W.; ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 531–541, 2000.
- SARKER, S.D.; LATIF, Z.; GRAY, A.I. **Natural products isolation**. 2 ed. Totowa, N.J.: Humana Press. 2006. 515p.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654–658, 2009.
- SHAO, Y.; XU, F.; SUN, X.; BAO, J.; BETA, T. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. **Food Chemistry**, v. 143, p. 90–96, 2014.
- SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, E.C.A.E. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229–233, 2005.
- SILVEIRA, T.M.L. **Aminas bioativas livres e conjugadas no café solúvel: metodologia de análise e influência do processamento**. 2008. 179f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

- SON, S.; LEWIS, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 468–472, 2002.
- SVENSSON, L.; SEKWATI-MONANG, B.; LUTZ, D.L.; SCHIEBER, A.; GANZLE, M.G. Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9214–9220, 2010.
- TALEON, V.; DYKES, L.; ROONEY, W.L.; ROONEY, L.W. Effect of genotype and environment on flavonoid concentration and profile of black sorghum grains. **Journal of Cereal Science**, v. 56, p. 470–475, 2012.
- TARENGHI, E. Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis and of polyamines on strawberry microcutting growth and development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 1, p. 47–55, 1995.
- TAYLOR, J.R.N.; SCHOBER, T.J.; BEAN, S.R. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 252–271, 2006.
- TAYLOR, J.; TAYLOR, J.R.N. Protein biofortified sorghum: effect of processing into traditional African foods on their protein quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2386–2392, 2011.
- TURNER, N.; DIAZ, A.; TADDEO, S.S.; VANAMALA, J.; MCDONOUGH, C.M.; DYKES, L.; MURPHY, M.E.; CARROLL, R.J.; ROONEY, L.W. Bran from black or brown sorghum suppresses colon carcinogenesis. **FASEB Journal**, v. 20, p. A599, pagina, 2006.
- VALERO, D.; MARTINEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 228–234, 2002.
- VIEIRA, S.M.; THEODORO, K.H.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. **Food Chemistry**, v. 100, p. 895–903, 2007.
- WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, v. 64, p. 97–107, 2003.
- WHITAKER, B.D.; STOMMEL, J.R. Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3448–3454, 2003.

- WONG, J.H.; LAU, T.; CAI, N.; SINGH, J.; PERDERSEN, J.F.; VENSEL, W.H.; HURKMAN, W.J.; WILSON, J.D.; LEMAUX, P.G.; BUCHANAN, B.B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 73–82, 2009.
- YANG, L.; ALLRED, K.F.; GEERA, B.; ALLRED, C.D.; AWIKA, J.M. Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. **Nutrition and Cancer**, v. 64, p. 419–427, 2012.
- YIN, L.; WANG, S.; LIU, P.; WANG, W.; CAO, D.; DENG, X.; ZHANG, S. Silicon-mediated changes in polyamine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid are involved in silicon-induced drought resistance in *Sorghum bicolor* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 268–277, 2014.
- ZHANG, Y.; SUN, Y.; XI, W.; SHEN, Y.; QIAO, L.; ZHONG, L.; YE, X.; ZHOU, Z. Phenolic composition and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**, v. 144, p. 674–680, 2014.
- ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M.H. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 133–145, 2010.

APÊNDICE A
Espectros no Infravermelho das Aminas Conjugadas
Sintetizadas

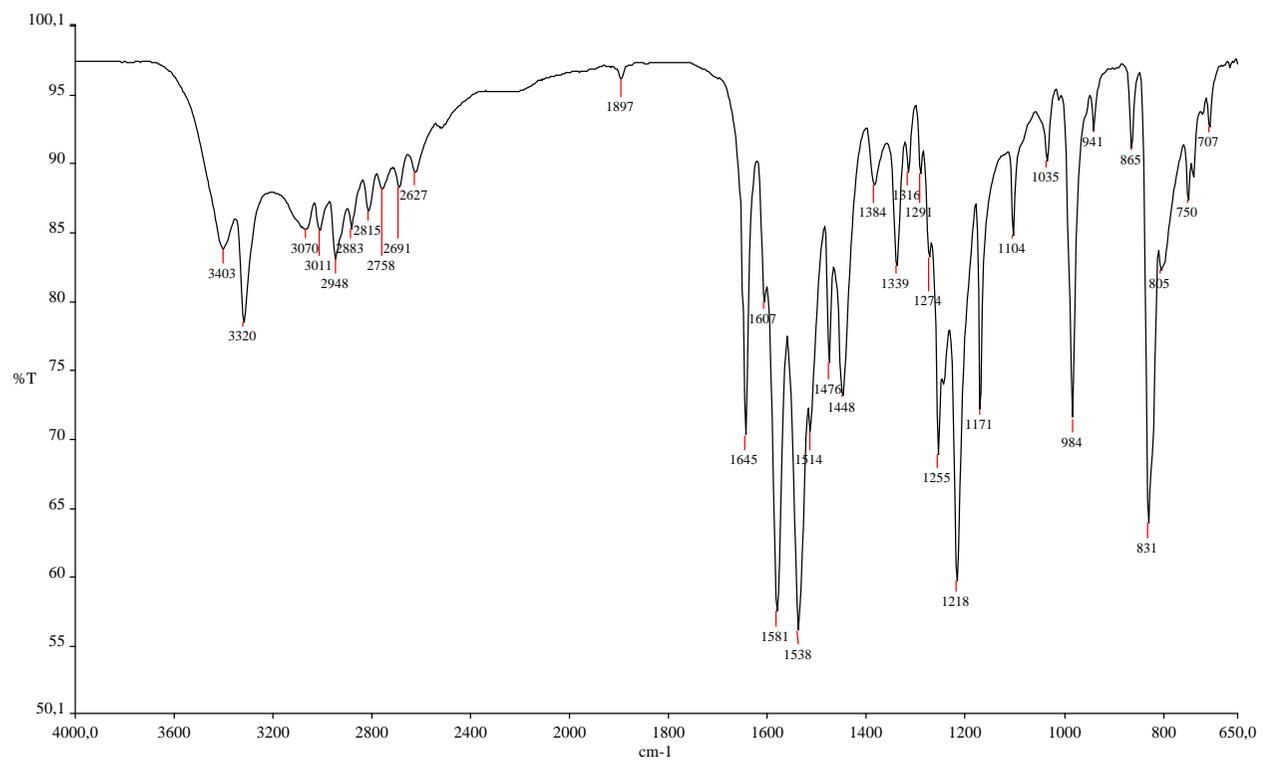


Figura A.1. Espectro IV da dicumaroilputrescina.

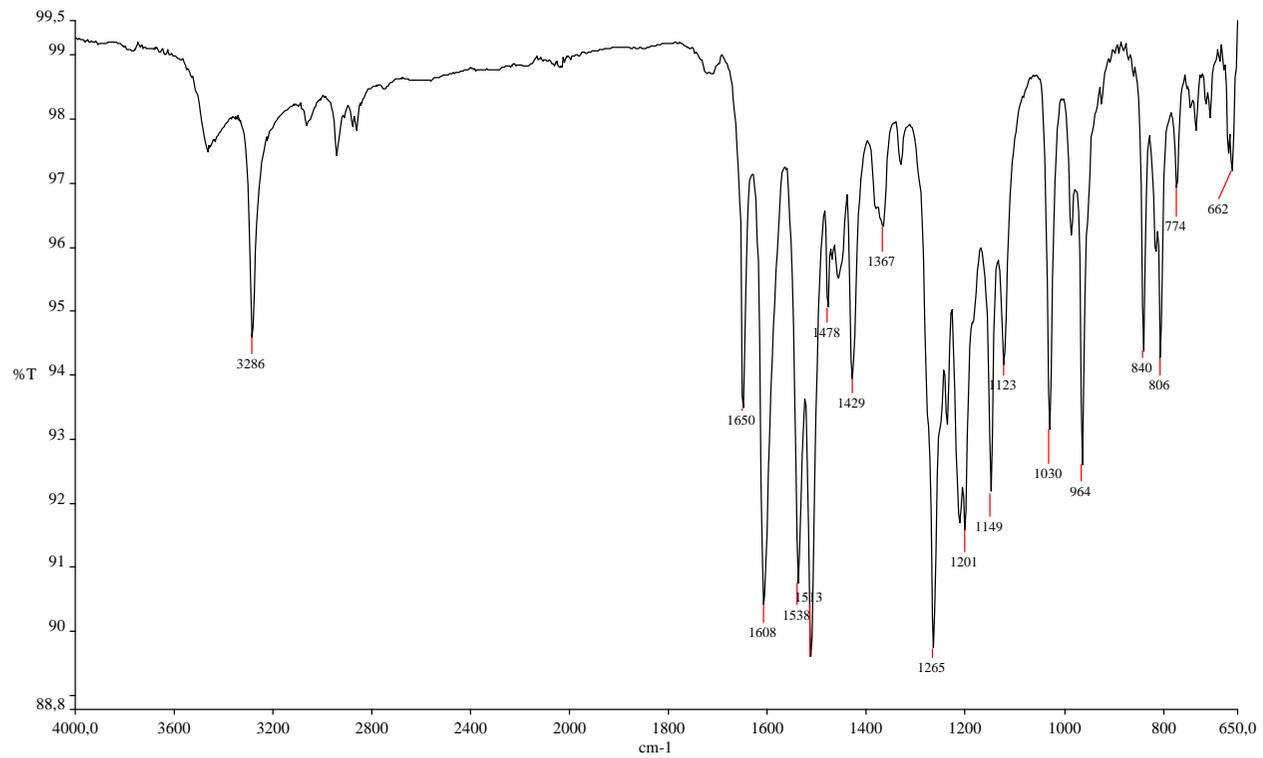


Figura A.2. Espectro IV da diferuloilputrescina.

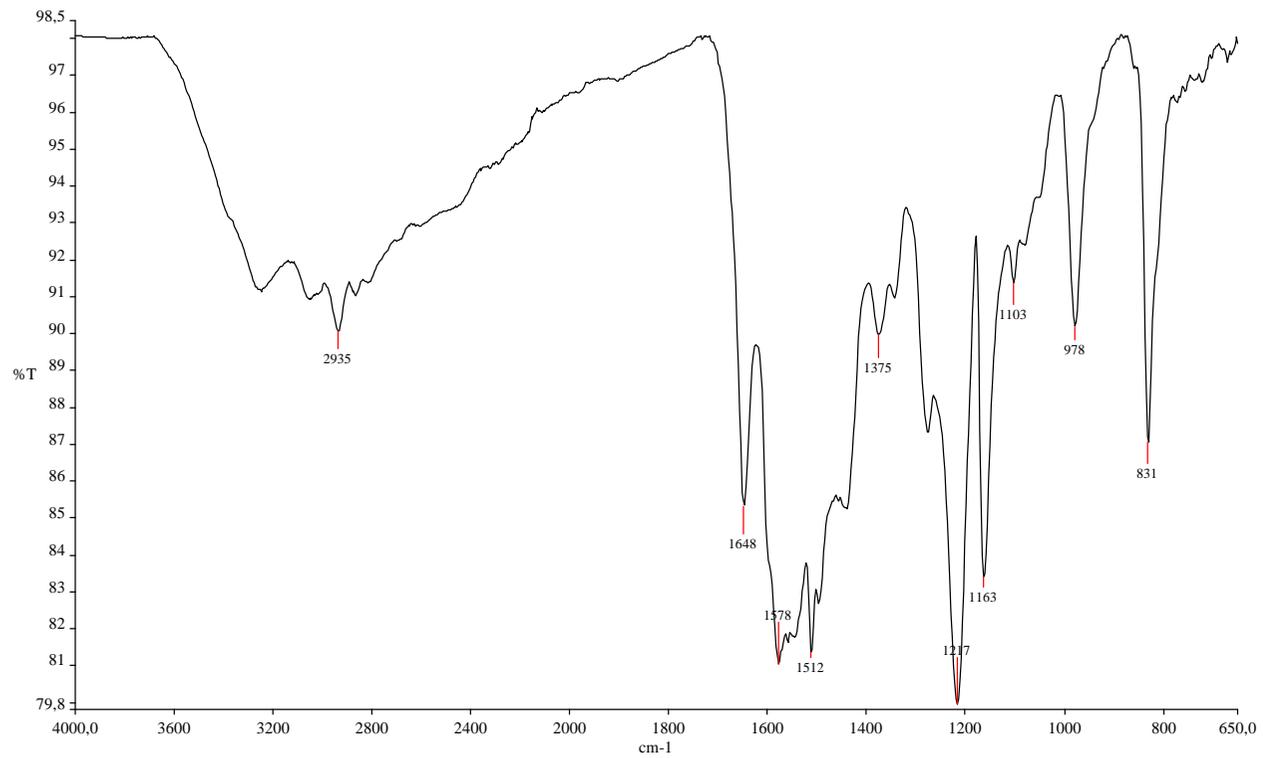


Figura A.3. Espectro IV da dicumarolespermina.

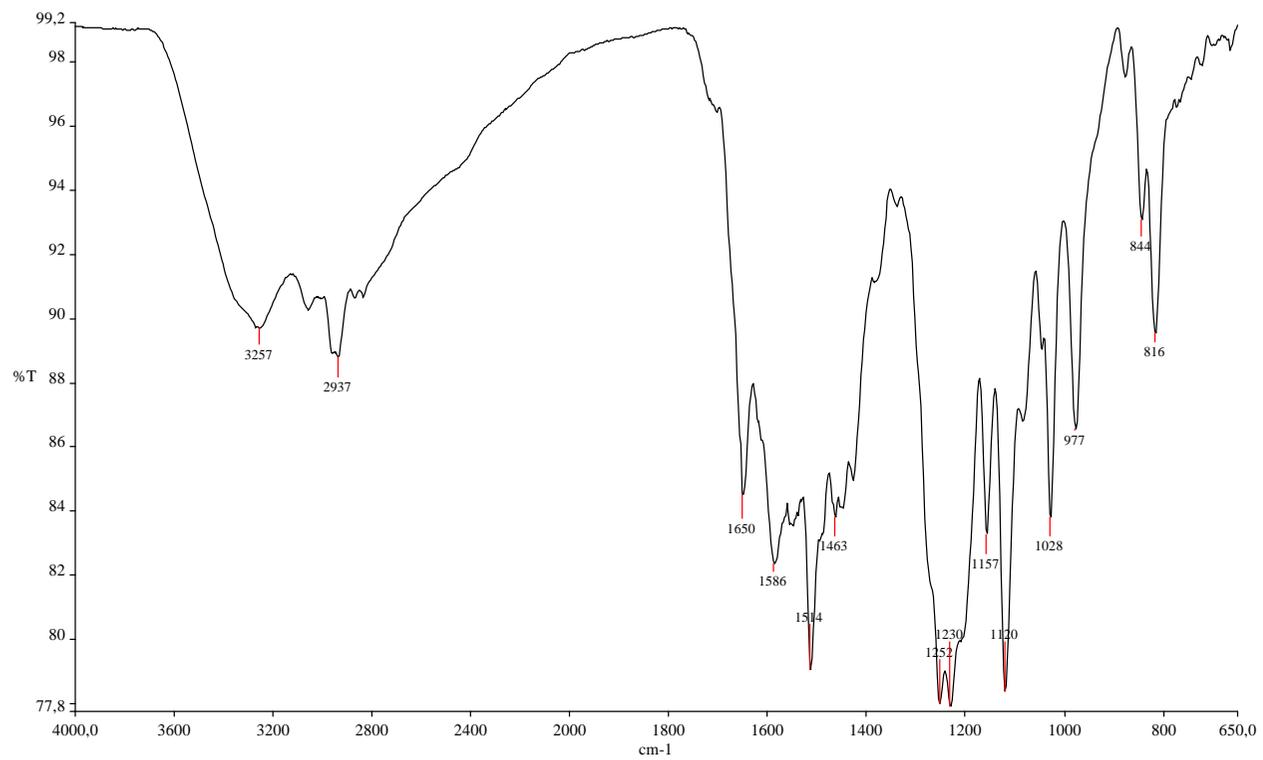


Figura A.4. Espectro IV da diferuloilespermina.

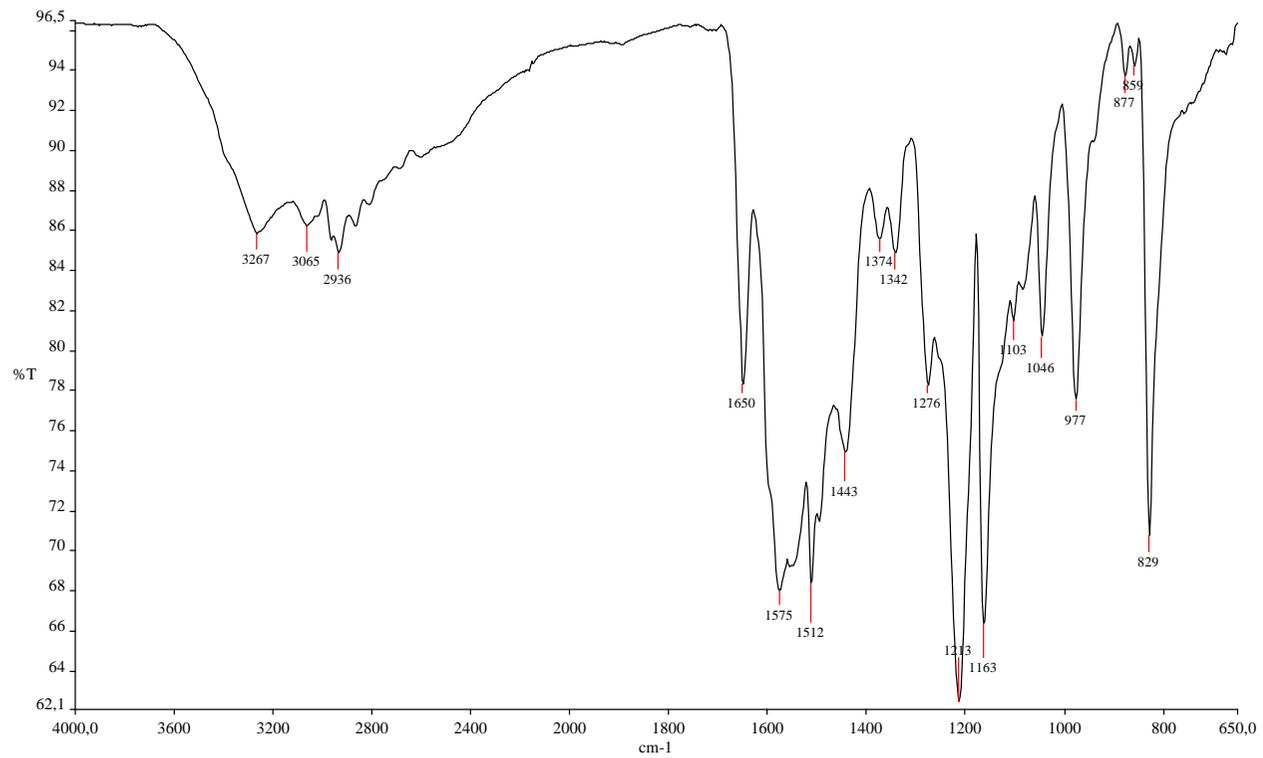


Figura A.5. Espectro IV da dicumaroilespermidina.

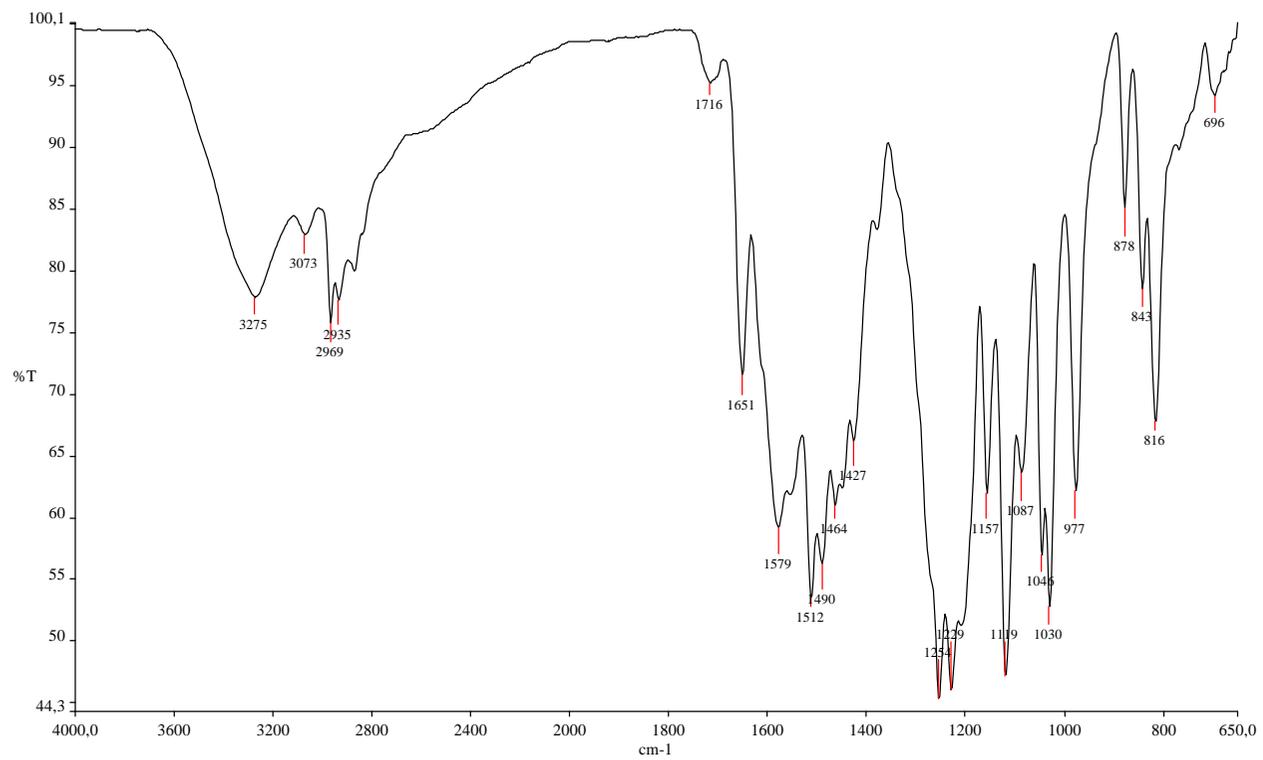


Figura A.6. Espectro IV da diferuloilespermidina.

APÊNDICE B

Espectros no RMN das Aminas Conjugadas Sintetizadas

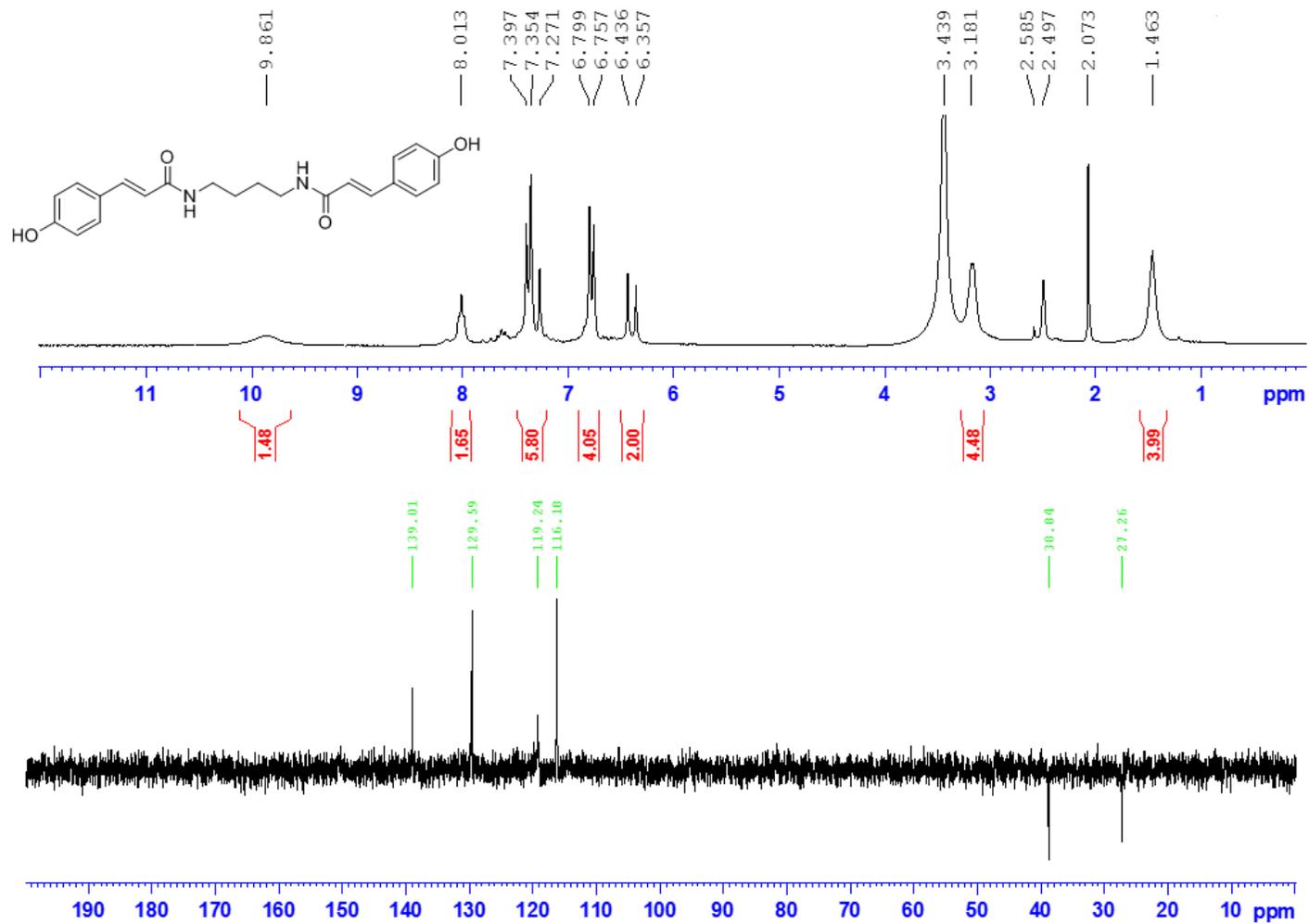


Figura B.1. Espectro de RMN ^1H (A) e DEPT (B) da dicumaroilputrescina. Condições de trabalho: avaliações utilizando $\text{DMSO-}d_6$ e frequência de 200 MHz para ^1H e 50 MHz pra DEPT.

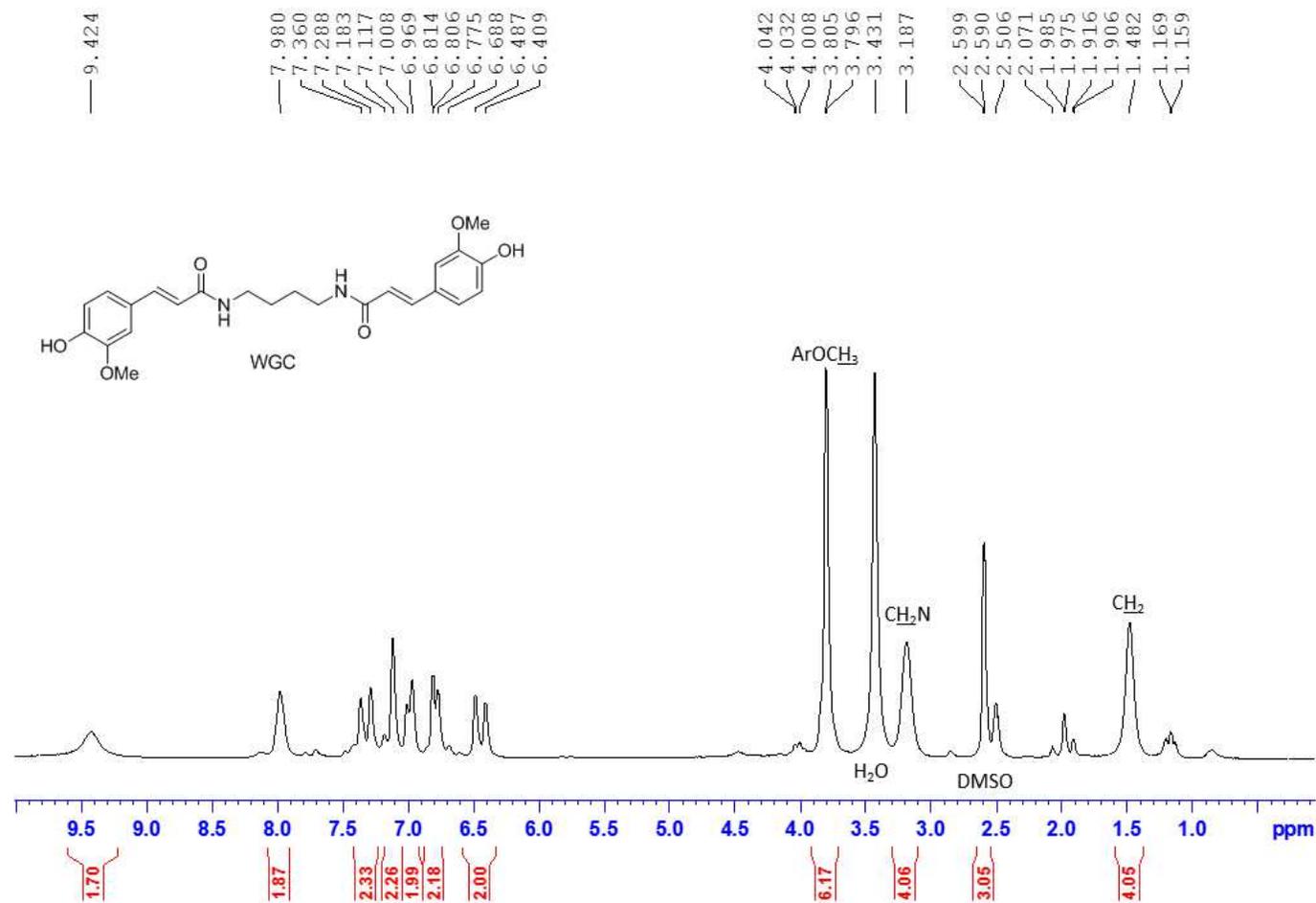


Figura B.2. Espectro de RMN ^1H da diferuloilputrescina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO- d_6 e frequência de 200 MHz.

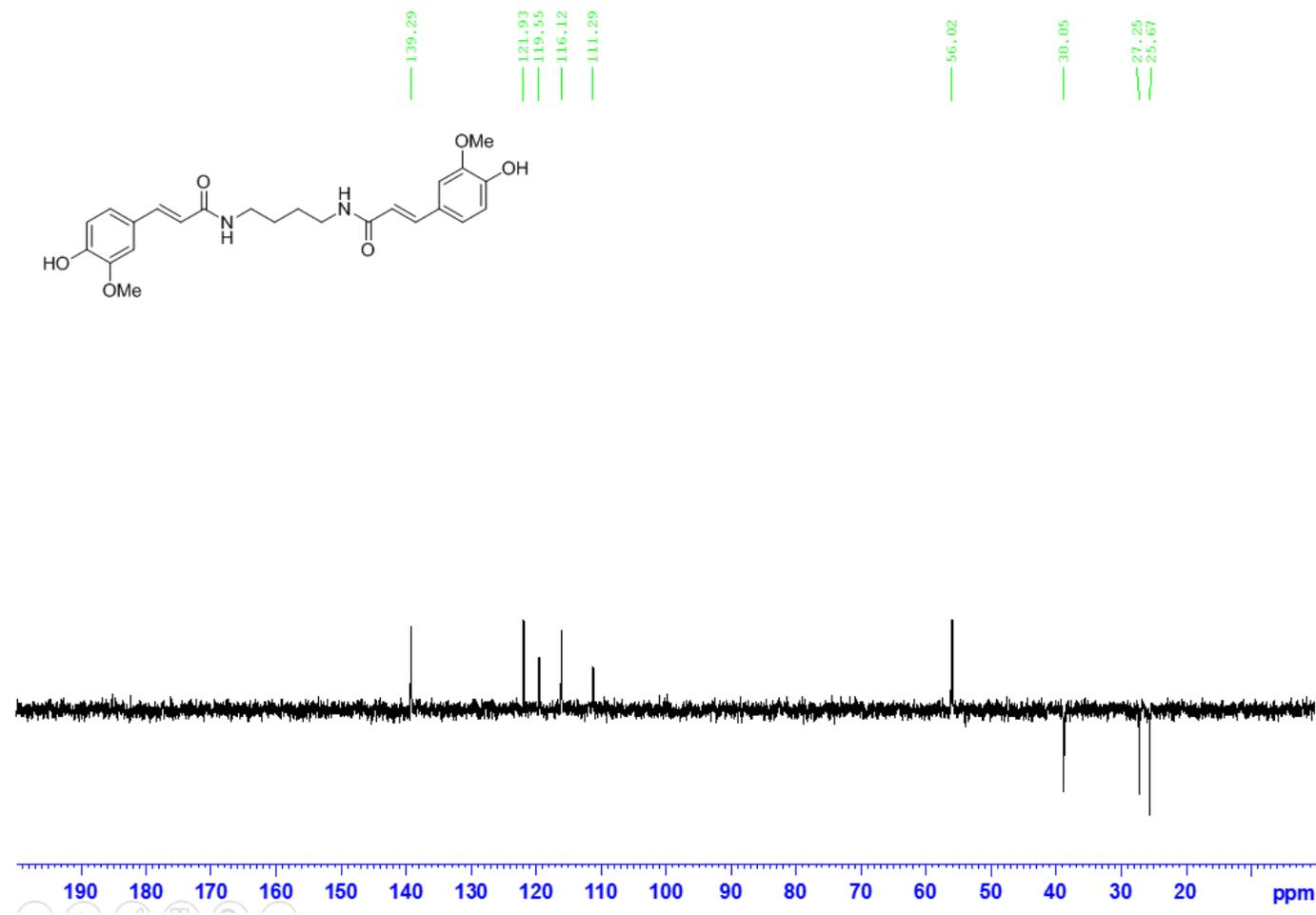


Figura B.3. Espectro DEPT da diferuloilputrescina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO- d_6 e frequência de 50 MHz.

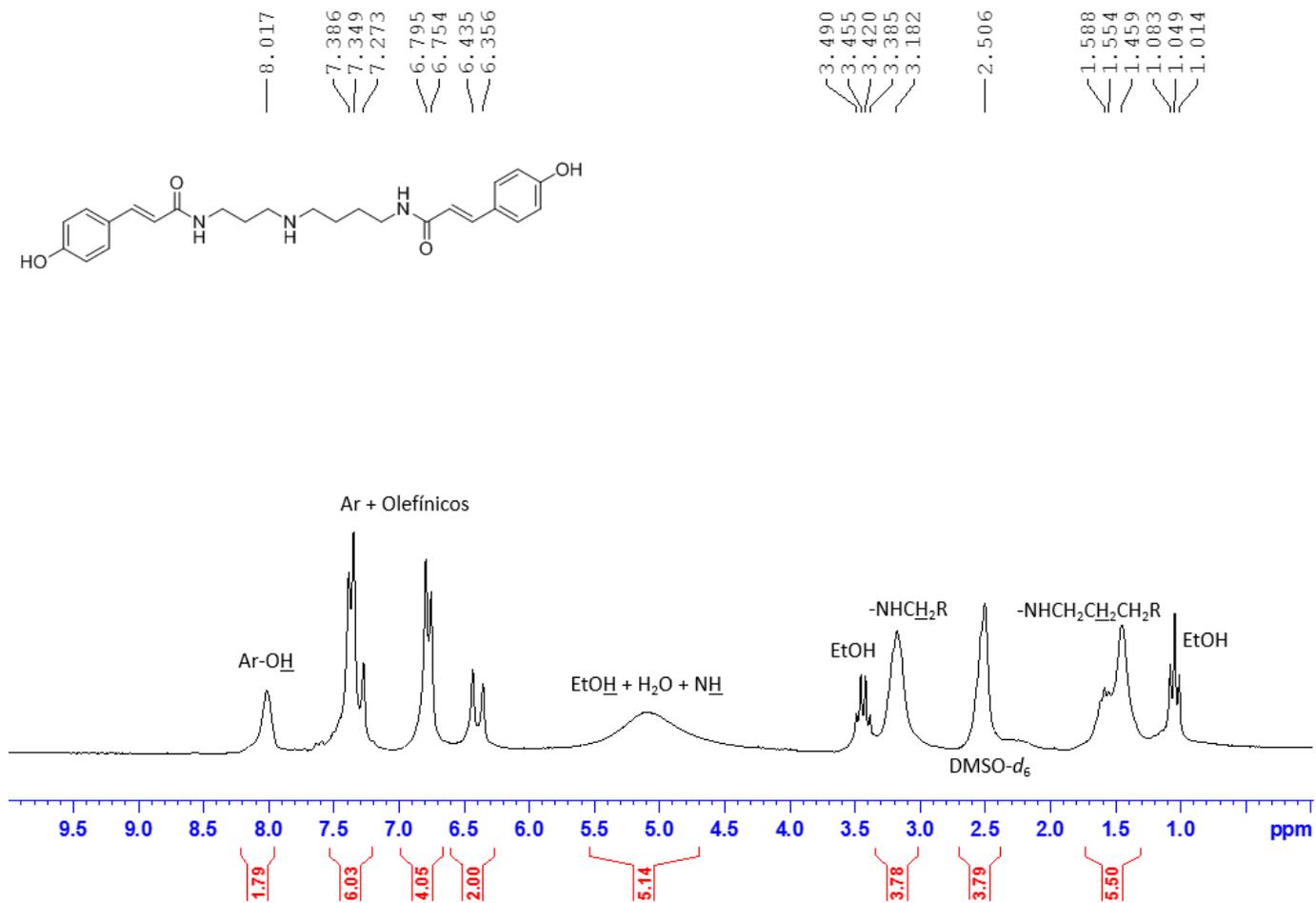


Figura B.4. Espectro de RMN ¹H da dicumaroilpermidina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO-*d*₆ e frequência de 200 MHz.

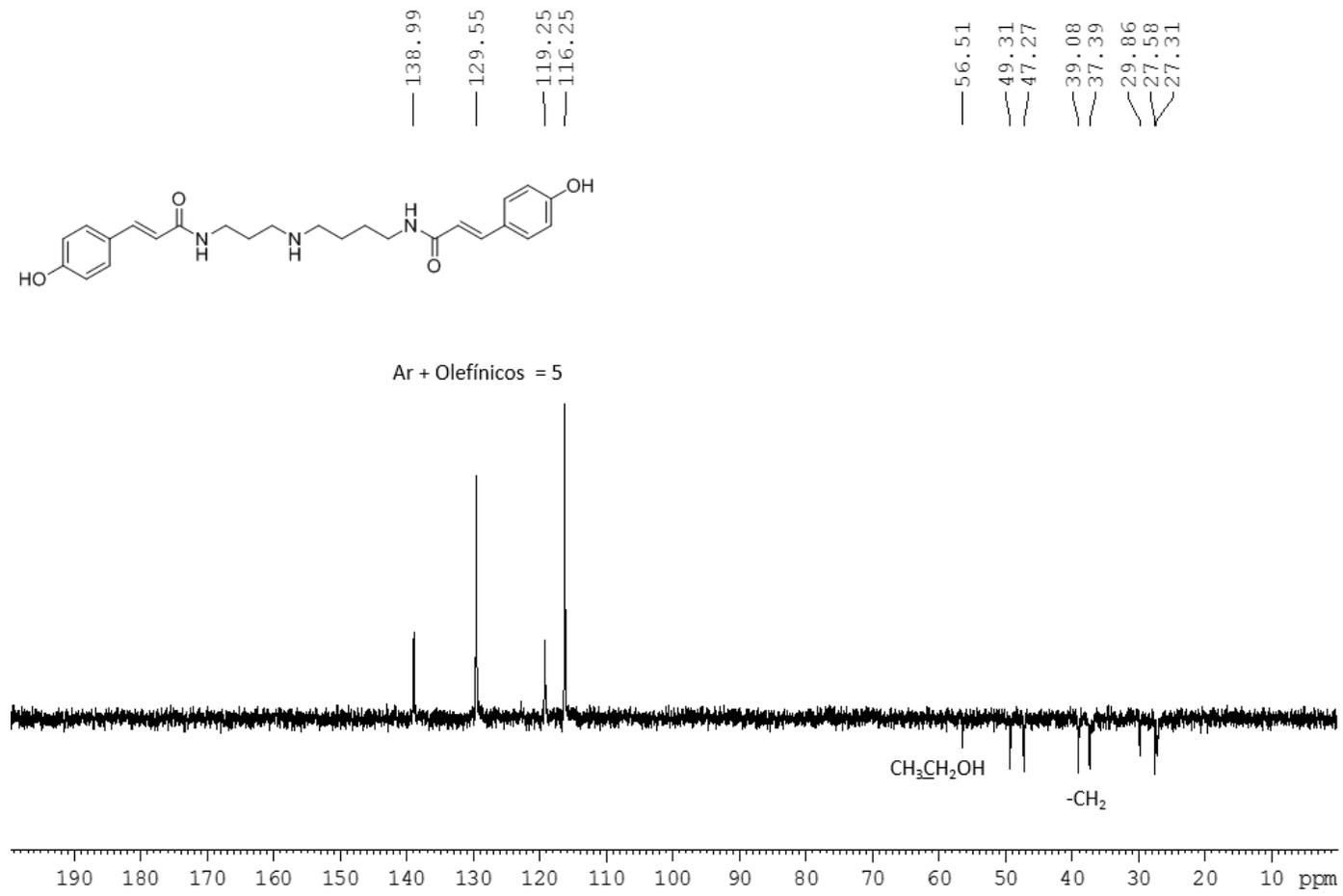


Figura B.5. Espectro DEPT da dicumaroil spermidina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO-*d*₆ e frequência de 50 MHz.

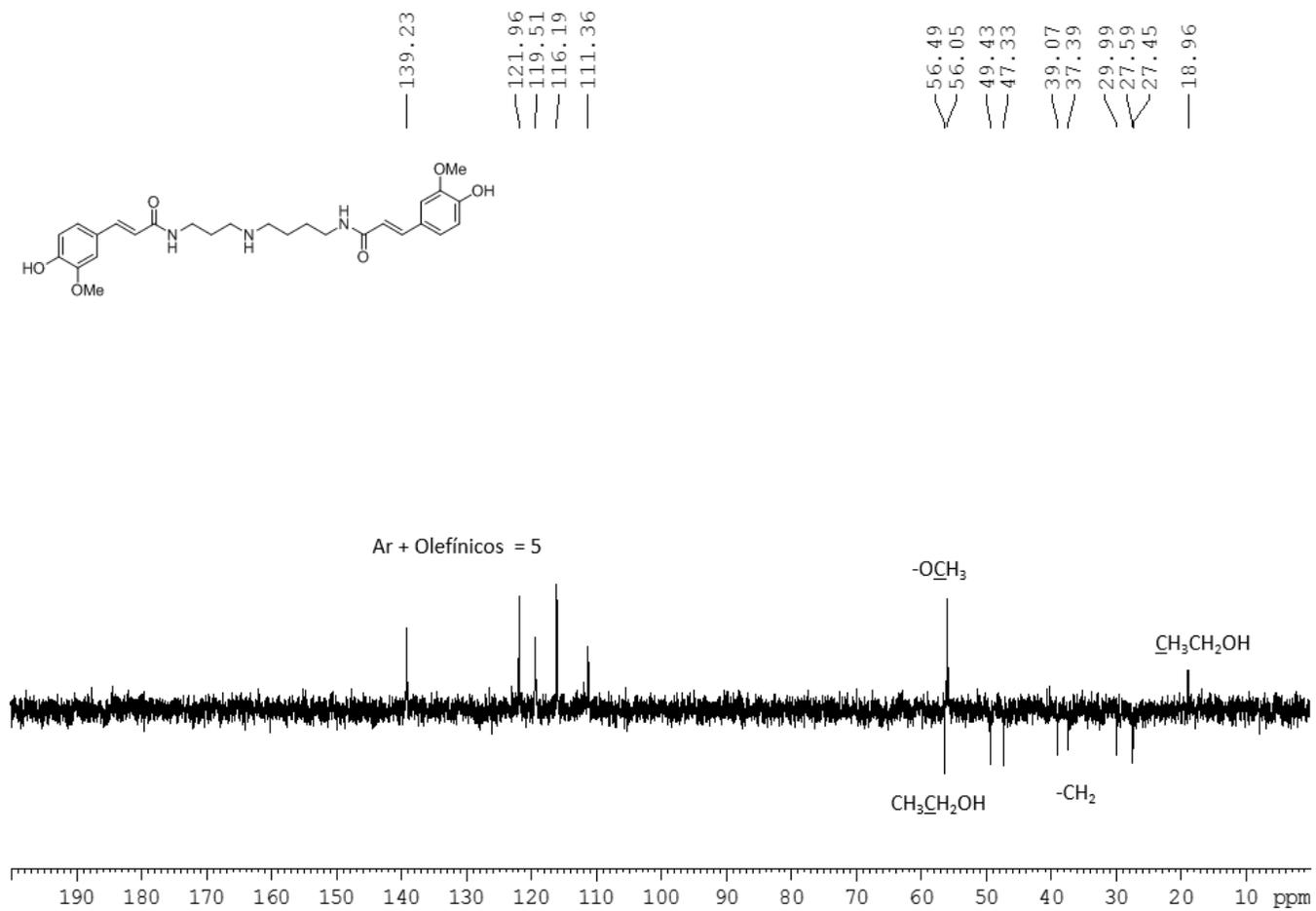


Figura B.7. Espectro DEPT da diferuloileespermidina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO- d_6 e frequência de 50 MHz.

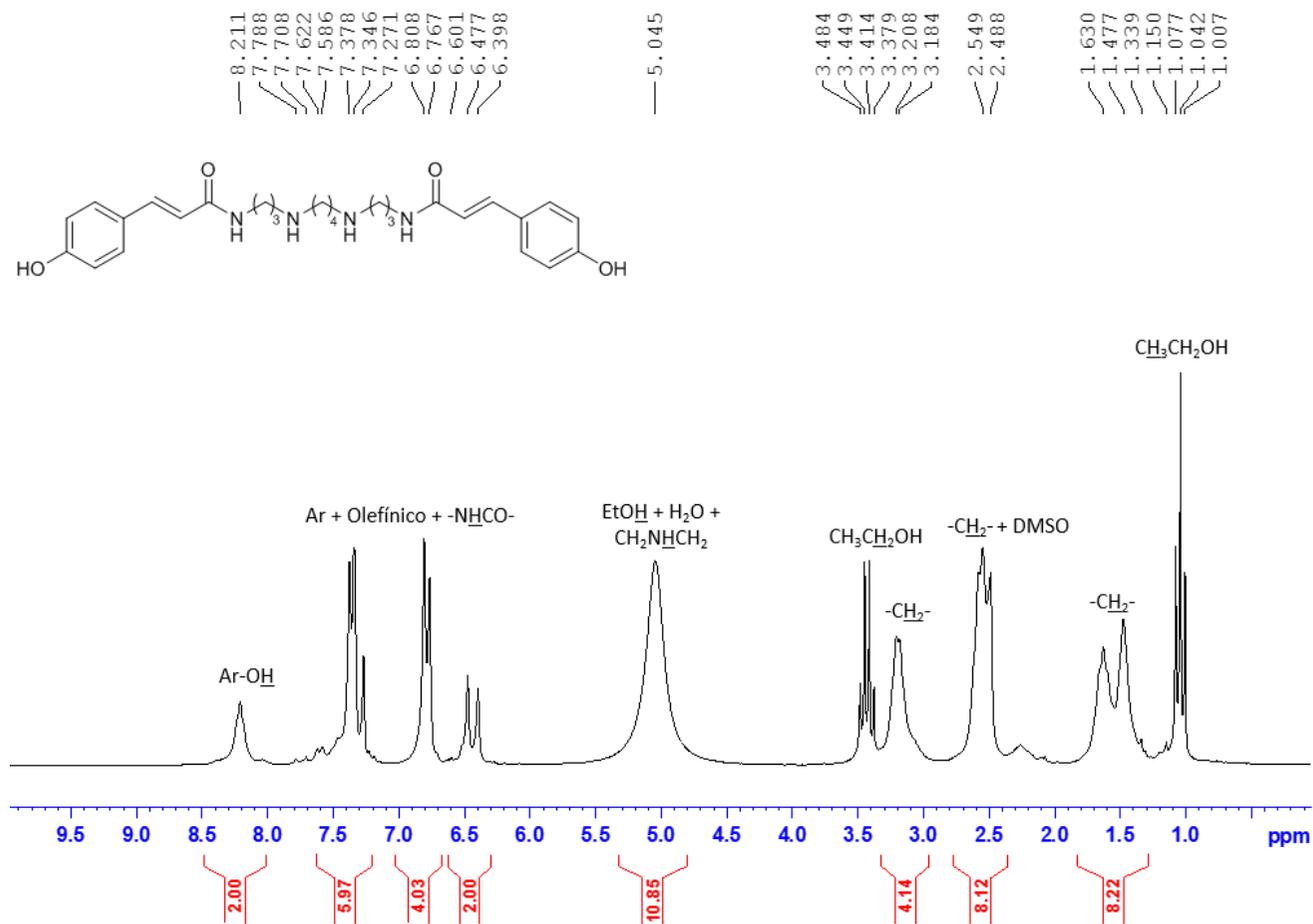


Figura B.8. Espectro de RMN ^1H da dicumaroilpermina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO- d_6 e frequência de 200 MHz.

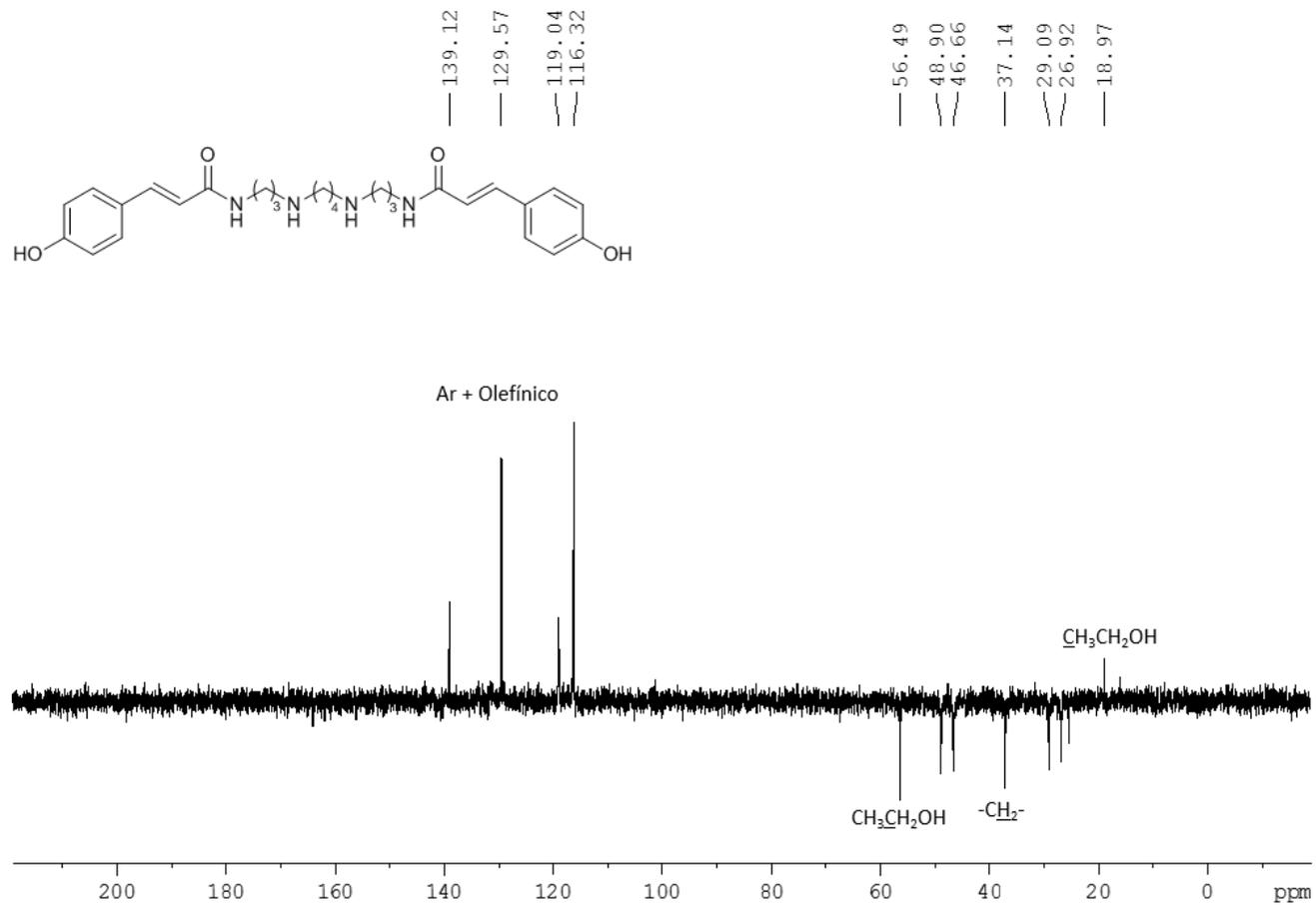


Figura B.9. Espectro DEPT da dicumaroilespermina. Condições de trabalho: avaliações utilizando $\text{DMSO}-d_6$ e frequência de 50 MHz.

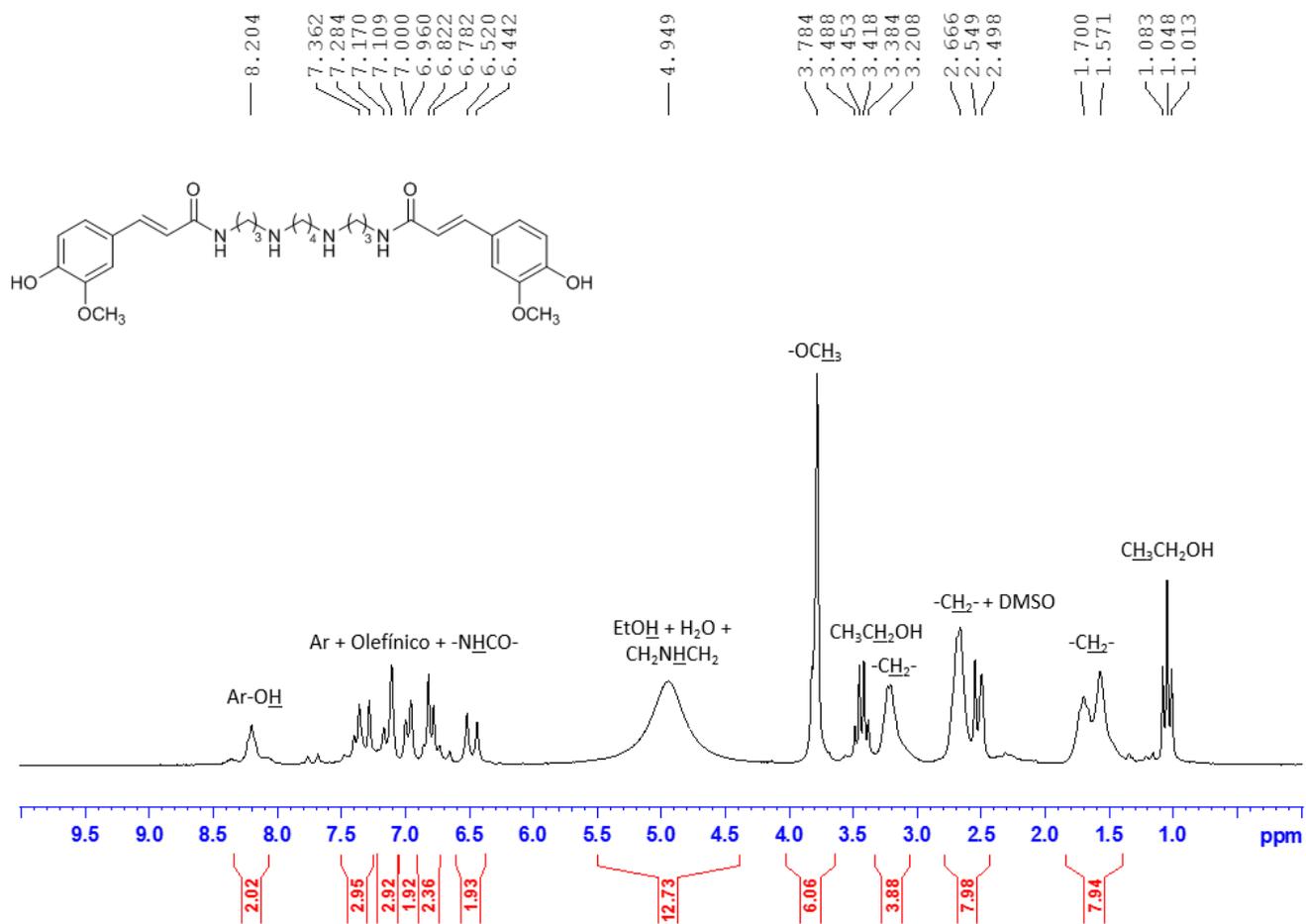


Figura B.10. Espectro de RMN ¹H da diferuloileespermina. Condições de trabalho: avaliações utilizando DMSO-*d*₆ e frequência de 200 MHz.

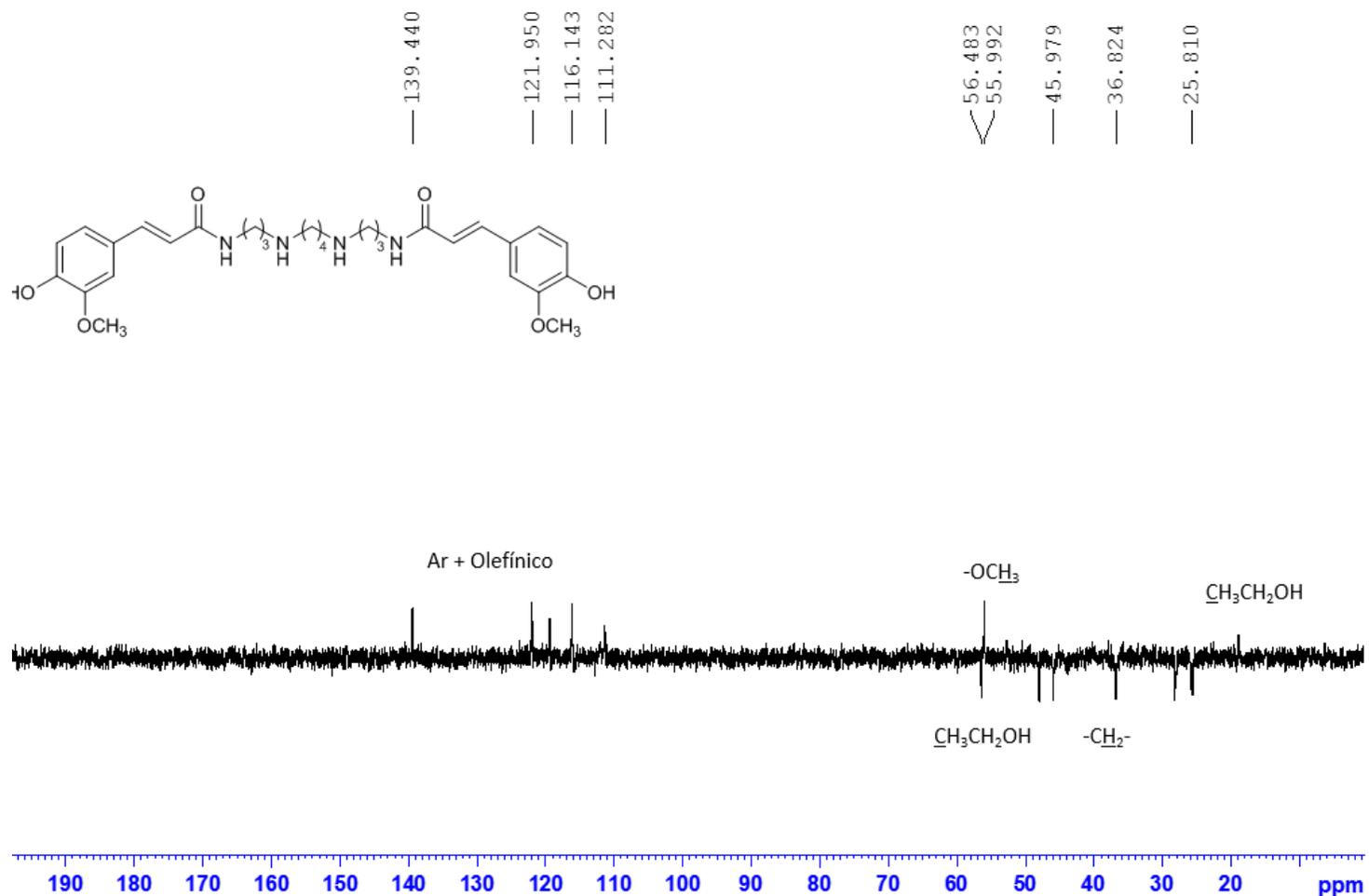


Figura B.11. Espectro DEPT da diferuloilespermina. Condições de trabalho: avaliações utilizando $\text{DMSO}-d_6$ e frequência de 50 MHz.