UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo (*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação.

Regina Stanquevis

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof^ª. Dra. Neuza M. A. Hassimotto

São Paulo
2013

Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo (*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação.

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Regina Stanquevis

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do grau de
MESTRE

Área de concentração: Bromatologia

Orientador:
Prof^a. Dra. Neuza M.A. Hassimotto

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Stanquevis, Regina
S789o Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo
(*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação /
Regina Stanquevis. -- São Paulo, 2013.
118p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.
Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto

1. Bioquímica dos alimentos 2. Milho : Ciência dos alimentos
3. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos I. T. II.
Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.

641.1 CDD

FOLHA DE APROVAÇÃO

Regina Stanquevis

Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo (*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª. Dra. Neuza M.A. Hassimotto
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, _____ de _____.

À Deus, pelo dom da vida.
À minha mãe, Maria do Carmo, pelo amor e apoio.
À Carlos, pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Neuza M. A. Hassimotto, pela oportunidade de trabalhar junto ao seu projeto de pesquisa e pela orientação e apoio durante o trabalho.

Aos professores: Prof. Dra. Beatriz Cordenunsi, Prof. Dr. João Roberto do Nascimento, Prof. Dra. Inar Castro, que em algum momento me auxiliaram e contribuíram com minha formação.

Aos professores do Departamento de Alimentos que de alguma forma me auxiliaram durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela ajuda nos ensaios de atividade anti-proliferativa.

Às técnicas Tânia, Márcia, Lúcia e Aline, sempre solícitas quando precisei.

Aos colegas do núcleo de flavonoides: Luciane, Afonso e Sara, por toda a ajuda e amizade.

À Juliana Nunes da Cruz, por me auxiliar com os experimentos enzimáticos.

Aos colegas de laboratório, por todo o auxílio durante essa jornada.

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Alimentos, sempre solícitos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade cedida à realização do mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPESP apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota”.
Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

STANQUEVIS, R. **Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo (*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação.** 2013. 118 p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

O milho roxo (*Zea mays* L.), cultura tradicional da região Andina, é conhecido por apresentar alto conteúdo de antocianinas. As antocianinas apresentam diversas propriedades biológicas demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo*; entre elas, alto poder antioxidante, atividade anti-inflamatória e quimiopreventiva; entretanto são compostos que se degradam facilmente. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter um extrato aquoso rico em antocianinas, a partir do milho roxo, e estudar a estabilidade química das antocianinas presentes frente ao pH e temperatura. Inicialmente o milho roxo comercial, utilizado como matéria prima, foi caracterizado por CLAE-DAD-ESI-MS/MS por apresentar cinco derivados de cianidina, três derivados de peonidina, três derivados de pelargonidina, dois derivados de quercetina e dois derivados de isoramnetina, com presença de acilação nas antocianinas. O teor de antocianinas totais foi de 4,61 mg/g, sendo 3,16 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g, 0,63 mg pelargonidina/g e 0,81 mg peonidina/g, além de 1,19 mg quercetina/g e 1,06 mg ácido protocatecúico/g. Para a otimização da obtenção do extrato aquoso e estudo de degradação térmica das antocianinas, foi realizado o delineamento experimental para análise de superfície de resposta. Um delineamento fatorial 3^3 (15 ensaios com 3 repetições do ponto central) foi aplicado para avaliar o efeito de três fatores, em três níveis, para a obtenção do extrato aquoso. Os fatores incluídos foram temperatura (70°C, 95°C e 120°C), tempo de extração (10, 50 e 90 min) e pH da solução (3,0, 5,0 e 7,0). Foram avaliadas três respostas: teor de antocianinas monoméricas, teor de ácido protocatecúico e capacidade antioxidante, os quais foram encontrados: (a) para antocianinas monoméricas, a melhor condição de extração foi obtida no menor valor de pH (3,0) e tempo (10 min), com temperatura intermediária (95°C); (b) para o ácido protocatecúico, a melhor concentração foi obtida em condições de maior valor de pH (7,0) e tempo (90 min), ou seja, oposto à condição anterior, com temperatura intermediária (95°C); (c) para a capacidade antioxidante, a melhor condição foi obtida quando preparou-se o extrato no ponto central dos níveis (pH 5,0), tempo 50 min e temperatura (95°C). Os modelos referentes às respostas de teor antocianinas monoméricas e teor de ácido protocatecúico foram validados, apresentando valores 40,30 mg cianidina 3-glucosídeo eq./L e 0,57 mg/100 mL, respectivamente. Os flavonoides identificados no extrato aquoso de milho roxo foram semelhantes à composição do milho roxo comercial, entretanto, com considerável degradação de derivados de cianidina e peonidina, principalmente aciladas, a ácido protocatecúico e ácido vanílico, respectivamente. Assim, os resultados sugerem que um extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas é obtido em condições de extração de menor valor de pH, onde as antocianinas estão em sua forma mais estável. Porém, quando esse extrato aquoso é exposto a maiores valores de pH e/ou alta temperatura, pode ocorrer degradação das antocianinas presentes aos seus respectivos ácidos fenólicos.

Palavras-chave: antocianinas, milho roxo, ácidos fenólicos, estabilidade química.

ABSTRACT

STANQUEVIS, R. **Optimization of obtaining an aqueous extract of purple corn (*Zea mays* L.) rich in anthocyanins and degradation profile.** 2013. 118 p. Dissertação de mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

Purple corn (*Zea mays* L.), traditional culture of the Andean region, is known for its high content of anthocyanins. Anthocyanins exhibit several biological properties demonstrated in *in vitro* and *in vivo*, among them, high antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive activities, however they are unstable. The objective of this study was to obtain an aqueous extract rich in anthocyanins from purple corn and study the chemical stability of anthocyanins. Initially commercial purple corn, used as raw material, was characterized by HPLC-DAD-ESI-MS/MS by presenting five cyanidin derivatives, three peonidin derivatives, three pelargonidin derivatives, two quercetin derivatives and two isorhamnetin derivatives, with acylation in some anthocyanins. The anthocyanin content was 4.61 mg/g, which 3.16 mg cyanidin 3-glucoside eq./g, 0.63 mg pelargonidin/g and 0.81 mg peonidin/g, in addition 1.19 mg quercetin/g and 1.06 mg protocatechuic acid/g. To optimize the aqueous extract and study thermal degradation of anthocyanins, an experimental design was performed for response surface analysis. A 3³ factorial design (15 trials with 3 replicates of the center point) was applied to evaluate the effect of three factors at three levels, to obtain the aqueous extract. The factors included were temperature (70°C, 95°C and 120°C), extraction times (10, 50 and 90 min) and pH solution (3.0, 5.0 and 7.0). Three variables were evaluated: monomeric anthocyanin content, protocatechuic acid content and antioxidant capacity, which were found: (a) for monomeric anthocyanins content, the best extraction condition was obtained at lower pH (3.0) and time (10 min), and intermediate temperature (95°C); (b) for protocatechuic acid content, the optimal concentration was obtained under higher pH (7.0) and time (90 min), opposite to the previous condition, with intermediate temperature (95°C); (c) for antioxidant capacity, the best condition was obtained when the extract was prepared at the midpoint of levels pH 5.0, time 50 min and 95°C. The mathematical models concerning monomeric anthocyanins content and protocatechuic acid content has been validated, with values of 40.30 mg cyanidin 3-glucoside eq./L and 0.57 mg/100 mL, respectively. The flavonoids profile in the aqueous extract of purple corn were similar to the composition of commercial purple corn, however, with considerable degradation of cyanidin and peonidin derivatives, mainly acylated form, to protocatechuic acid and vanillic acid, respectively. Therefore, the results suggests that an aqueous extract of purple corn rich in anthocyanins can be obtained at lower pH, where the anthocyanins are in their most stable form. However, when the aqueous extract is exposed to higher pH and/or high temperature, anthocyanins degradation may occur to their respective phenolic acids.

Keywords: anthocyanins, purple corn, phenolic acids, chemical stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura geral dos flavonoides	20
Figura 2. Estrutura geral das antocianidinas	23
Figura 3. Estrutura química da antocianina – antocianidina ligada a uma hexose.....	24
Figura 4. Estruturas da antocianina em equilíbrio no meio aquoso.....	26
Figura 5. Esquema de degradação da cianidina 3-glucosídeo.....	27
Figura 6. Degradação de cianidina 3-glicosídeo em ácido protocatecúico durante tratamento térmico.....	28
Figura 7. Milho roxo.....	35
Figura 8. Concentração de fenólicos totais em amostras de milho roxo e derivados comerciais adquiridos em 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$).....	54
Figura 9. Concentração de antocianinas monoméricas em amostras de milho roxo e derivados comerciais adquiridos em 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$).....	54
Figura 10. Perfil cromatográfico obtido- por CLAE-DAD (λ 270 nm) de amostras de milho roxo, fração eluída com metanol. (A) sabugo comercial; (B) sabugo; (C) grão. Picos: (1 e 3) derivados de cianidina, (2) ácido protocatecúico; (4) derivado de pelargonidina; (5) derivado de peonidina; (6 e 7) derivados de quercetina; (8 e 9) derivados de isoramnetina.....	55
Figura 11. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (λ 270 nm) de amostras de milho roxo, fração eluída com metanol:amônia. (A) amostra comercial; (B) sabugo; (C) grão. Picos: (10) desconhecido; (3, 11 e 14) derivados de cianidina; (12 e 15) derivados de pelargonidina; (13 e 16) derivados de peonidina.....	56
Figura 12. Capacidade antioxidante pelo método DPPH em amostras de milho roxo nos anos de 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$).....	62

Figura 13. Capacidade antioxidante pelo método ORAC em amostras de milho roxo nos anos de 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).	63
Figura 14. Controle positivo da inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais avaliadas.	64
Figura 15. Avaliação da inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais avaliadas utilizando o milho roxo.	64
Figura 16. Extratos preparados conforme planejamento experimental.	66
Figura 17. Concentração de antocianinas monoméricas nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.	67
Figura 18. Fator significativo na avaliação da concentração de antocianinas monoméricas.	68
Figura 19. Superfície de resposta do modelo ajustado para antocianinas monoméricas.	69
Figura 20. Valor otimizado previsto pelo modelo para concentração de antocianinas monoméricas.	70
Figura 21. Concentração de ácido protocatecúico por CLAE-DAD nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.	71
Figura 22. Fatores em ordem de significância na avaliação da concentração de ácido protocatecúico.	72
Figura 23. Superfície de resposta do modelo ajustado para ácido protocatecúico.	74
Figura 24. Valor otimizado previsto pelo modelo para concentração de ácido protocatecúico.	75
Figura 25. Capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.	76
Figura 26. Fatores em ordem de significância na avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.	77
Figura 27. Superfície de resposta do modelo ajustado para avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.	79
Figura 28. Valor otimizado previsto pelo modelo para capacidade antioxidante pelo método DPPH.	80
Figura 29. Capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC nos quinze extratos aquosos de milho roxo.	81
Figura 30. Fator significativo na avaliação da concentração da capacidade antioxidante pelo	

método ORAC.	82
Figura 31. Superfície de resposta do modelo ajustado para avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC.....	83
Figura 32. Valor otimizado previsto pelo modelo para capacidade antioxidante pelo método ORAC.....	83
Figura 33. Perfil de inibição da ECA (%) da fração metanol e metanol:amônia da extração do milho roxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=2).	87
Figura 34. Perfil de inibição da ECA (em %) em diferentes concentrações do extrato aquoso otimizado.	88
Figura 35. Relação entre a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações do extrato aquoso.	89
Figura 36. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (525 nm) de (A) milho roxo (B) extrato aquoso otimizado; fração eluída com metanol. Picos: (1 e 3) derivados de cianidina; (4) derivado de pelargonidina; (5) derivado de peonidina; (3' e 3'' não identificados). Picos com números iguais representam o mesmo composto.	90
Figura 37. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (525 nm) de (A) milho roxo (B) extrato aquoso otimizado; fração eluída com metanol:amônia. Picos: (11 e 14) derivado de cianidina acilada; (12) derivado de pelargonidina acilada; (13) derivado de peonidina acilada. Picos com números iguais representam o mesmo composto.	91
Figura 38. Esquema de degradação da cianidina	95
Figura 39. Esquema de degradação da peonidina.....	96
Figura 40. Concentração de ácido vanílico nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios e no extrato aquoso otimizado.	96
Figura 41. Esquema de degradação da pelargonidina.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de solventes para eluição dos compostos fenólicos por CLAE-DAD.	41
Tabela 2. Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade anti-proliferativa do milho roxo.....	44
Tabela 3. Gradiente de solventes para eluição de ácido hipúrico por CLAE-DAD.	47
Tabela 4. Concentração de amido e açúcares solúveis em amostras de milho roxo adquiridos em maio/2011 e fevereiro/2013.	52
Tabela 5. Flavonoides e ácido fenólico presentes em diferentes amostras e partes do milho roxo identificados por CLAE-DAD 2011 e 2013.....	58
Tabela 6. Identificação por LC-ESI-MS/MS de antocianinas (modo positivo) detectadas na fração eluída com metanol e metanol:amônia na amostras de milho roxo (sabugo comercial, sabugo e grão).....	59
Tabela 7. Identificação por LC-ESI-MS/MS de flavonols e ácido fenólico (modo negativo) detectadas na fração eluída com metanol das amostras de milho roxo (sabugo comercial e espiga – sabugo e grão).	61
Tabela 8. Atividade média antiproliferativa do extrato nas linhagens tumorais (GI ₅₀) em µg/mL.....	65
Tabela 9. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para antocianinas monoméricas. ..	68
Tabela 10. ANOVA da regressão utilizando resultados de antocianinas monoméricas.	69
Tabela 11. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para antocianinas monoméricas. .	71
Tabela 12. ANOVA da regressão utilizando resultados de antocianinas monoméricas.	73
Tabela 13. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	76
Tabela 14. ANOVA da regressão utilizando resultados de capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	78
Tabela 15. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para capacidade antioxidante pelo método ORAC.	81
Tabela 16. ANOVA da regressão utilizando resultados de capacidade antioxidante pelo método ORAC.	82
Tabela 17. Respostas avaliadas, melhores condições de obtenção e valores previstos.	84
Tabela 18. Validação do modelo para maximização de antocianinas monoméricas ¹ e de ácido protocatecúico ²	85

Tabela 19. Concentração de antocianinas totais, derivados de cianidina, pelargonidina e peonidina quantificadas por CLAE-DAD no milho roxo e no extrato aquoso.	91
Tabela 20. Concentração (mg/g) dos derivados de antocianinas no milho roxo e no extrato aquoso.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura geral das principais classes de flavonoides.	21
Quadro 2. Principais antocianinas encontradas em alimentos vegetais e derivados.	30
Quadro 3. Fatores selecionados para o método da superfície de resposta e seus respectivos níveis para a obtenção do extrato aquoso de milho roxo.	48
Quadro 4. Matriz do planejamento experimental 3^3 , com três repetições do ponto central. Valores codificados.	48
Quadro 5. Matriz do planejamento experimental 3^3 , com três repetições do ponto central. Valores reais.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Flavonoides	20
2.2 Antocianinas.....	23
2.3 Estabilidade de cor das antocianinas	24
2.3.1 Efeitos estruturais	25
2.3.2 pH	25
2.3.3 Temperatura.....	27
2.3.4 Copigmentação	28
2.3.5 Oxigênio e luz.....	29
2.4 Fontes alimentares de antocianinas	29
2.5 Atividade biológica de antocianinas.....	30
2.5.1 Capacidade antioxidante	31
2.5.2 Efeito anti-hipertensivo.....	33
2.5.3 Efeito anti-proliferativo.....	33
2.6 O milho roxo	34
3 OBJETIVO	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material.....	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Caracterização química	37
4.2.1.1 Quantificação de amido.....	37
4.2.1.2 Quantificação de açúcares solúveis	38
4.2.1.3 Quantificação de compostos fenólicos totais	38

4.2.1.4 Determinação de antocianinas monoméricas	39
4.2.1.5 Quantificação de flavonoides	40
4.2.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	41
4.2.1.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)	42
4.2.1.8 Extração de ácido protocatecúico	42
4.2.2 Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i>	42
4.2.2.1 Capacidade antioxidante	43
4.2.2.2 Avaliação da atividade anti-proliferativa	44
4.2.2.3 Atividade inibitória da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)	46
4.2.3 Obtenção do extrato aquoso de milho roxo.....	47
4.2.3.1 Delineamento experimental: análise da superfície de resposta	47
4.2.4 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Caracterização do milho roxo	51
5.1.1 Amido e açúcares solúveis	51
5.1.2 Concentração de fenólicos totais e antocianinas monoméricas.....	52
5.1.3 Quantificação de flavonoides e perfil de compostos fenólicos	55
5.1.4 Avaliação da atividade biológica do milho roxo	62
5.1.4.1 Capacidade antioxidante	62
5.1.4.2 Atividade anti-proliferativa	63
5.2 Otimização da obtenção do extrato aquoso de milho roxo.....	66
5.2.1 Concentração de antocianinas monoméricas – Resposta 1	67
5.2.2 Quantificação de ácido protocatecúico por CLAE – Resposta 2	70
5.2.3 Capacidade antioxidante	75
5.2.3.1 Capacidade antioxidante – método DPPH – Resposta 3.....	75

5.2.3.2 Capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC – Resposta 4	80
5.2.4 Validação do modelo – obtenção do extrato aquoso rico em antocianinas (extrato aquoso otimizado) e extrato aquoso rico em APC.....	85
5.2.5 Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)	86
5.3 Perfil das antocianinas – milho roxo VS extrato aquoso otimizado	89
6 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados do mundo. É um alimento básico para grandes grupos de pessoas e é também utilizado para alimentação animal. Há diferentes colorações do milho, entre eles o amarelo, azul, vermelho, roxo e marrom (ZILÍC et al., 2012). O milho roxo é culturalmente popular na região Andina, particularmente no Peru e Chile. É consumido nessa região como uma bebida preparada por imersão do milho em água fervente.

O milho roxo possui alta concentração de antocianinas, um grupo pertencente à classe dos flavonoides. O interesse no estudo das antocianinas se deve ao seu potencial biológico, entre eles atividade antioxidante (PRIOR; WU, 2006) e anti-inflamatória (FLESCHHUT et al., 2006). Apesar disso, as antocianinas são estruturas que, dependendo das condições do meio onde se encontram, podem se degradar gerando outros compostos fenólicos que também demonstram potencial biológico (GUAN et al., 2006; TSENG et al., 2000).

Considerando que as antocianinas são compostos quimicamente instáveis, o objetivo geral deste trabalho foi otimizar a obtenção de um extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas e estudar o perfil de degradação frente a temperatura e pH.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Flavonoides

O interesse sobre o estudo dos flavonoides tem crescido nos últimos anos devido à grande abundância desse composto na dieta e também devido às evidências de seu papel na redução do risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; YAO et al., 2004;).

Os flavonoides são compostos fenólicos que fazem parte da classe dos polifenóis. São metabólitos secundários de plantas e possuem funções como proteção contra radiação ultravioleta, proteção contra insetos nocivos, sinalização para insetos polinizadores e participam da fotossíntese (PIETTA, 2000). Os flavonoides fazem parte de nossa dieta uma vez que são encontrados em diversos alimentos vegetais; entre eles: frutas, hortaliças, legumes, grãos e especiarias, além de produtos alimentícios processados tais como vinho e chá (IZZI et al., 2012; PIETTA, 2000).

Estruturalmente, os flavonoides são constituídos de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, denominados de anéis A, C e B (figura 1), os quais apresentam diferentes graus de hidroxilação e metoxilação (BRAVO, 1998). Nas plantas geralmente são encontrados na forma glicosilada, o que aumenta a sua solubilidade em água. Os açúcares mais comumente encontrados são a glicose e ramnose (MANACH et al., 2004).

Figura 1. Estrutura geral dos flavonoides (Fonte: BRAVO, 1998).

As principais subclasses dos flavonoides podem ser diferenciadas pela oxidação do anel central e pela ligação do anel C com o anel B (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Sendo assim, os flavonoides podem ser subdivididos em: flavonol, flavona, flavanona, Flavan-3-ol, isoflavona e antocianidina (quadro 1).

Quadro 1. Estrutura geral das principais classes de flavonoides.

Flavonoide e estrutura geral
<p>Flavonol</p>	<p>Flavona</p>
<p>Flavanona</p>	<p>Flavan-3-ol</p>
<p>Isoflavona</p>	<p>Antocianidina</p>

Fonte: CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009.

O flavonol é o flavonoide mais frequentemente encontrado em alimentos, como caempferol, quercetina e isoramnetina. Tem coloração amarelo claro e no tecido das plantas fica acumulado nas partes mais externas já que sua biossíntese é estimulada pela luz (MANACH et al., 2004). Cebola, alho-poro, brócolis, tomate, maçã, vinho tinto e chá são exemplos de alimentos onde podem ser encontrados (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Flavonas, como a luteonina e apigenina, não são muito comuns; porém, quantidades

significativas foram encontradas no aipo e salsa (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Tem coloração amarelo claro e sabor amargo (YAO et al., 2004).

A flavanona é uma estrutura não-planar presente principalmente em frutas cítricas como toranja, laranja e limão. As mais comumente encontradas são a hesperitina e a naringenina (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; MANACH et al., 2004).

O Flavan-3-ol existe tanto na forma monomérica – catequinas – quanto na forma polimérica – proantocianidinas. As catequinas e as epicatequinas são as mais comuns e podem ser encontradas em vários tipos de frutas, vinho tinto, chá verde, chá preto e chocolate (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são polímeros de catequinas e epicatequinas e são responsáveis pelo caráter adstringente de frutas como uva, maçã, pera e caqui, bebidas como vinho, chá e cerveja e pelo amargor do chocolate (MANACH et al., 2004).

Isoflavonas, como a genisteína e dadzeína, são encontradas quase exclusivamente em leguminosas como soja, feijão preto e grão de bico (PIETTA, 2000). São classificados como fitoestrógenos: sua estrutura apresenta similaridade ao do estrogênio e, apesar de não serem esteroides, a posição análoga ao estradiol confere propriedade pseudohormonal e capacidade de ligação ao receptor de estrogênio (MANACH et al., 2004).

As antocianidinas são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de flores e frutos. Tem em sua estrutura a presença do cátion flavílio e, quando estão na forma glicosilada, são denominadas de antocianinas (MANACH et al., 2004). Algumas das principais antocianidinas são a cianidina, peonidina, pelargonidina e, na dieta, são encontradas no vinho tinto, vegetais como rabanete, berinjela, cebola, milho roxo e em frutas como morango, uva, amora e framboesa (PRIOR; WU, 2006).

A quantidade e perfil de flavonoides nos alimentos dependem de muitos fatores, como genética da planta, processamento e armazenamento, condições ambientais e variações entre as espécies (ROSS; KASUM, 2002). Ainda que os flavonoides sejam tratados pelo corpo humano como xenobióticos, eles desenvolvem um importante papel no combate a certos tipos de doenças. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o consumo de flavonoides melhora a disfunção cardiovascular (ALAM; KAUTER; BROWN, 2013; CHULAROJMONTRI; GERDPRASERT; WATTANAPITAYAKUL, 2013), apresenta ação anti-hipertensiva (KONTA et al., 2013), efeito neuroprotetor (YU et al., 2013) e ação antimutagênica e quimiopreventiva (KIM et al., 2007). As frutas e os legumes são as principais fontes de flavonoides na dieta, seguido de chás e vinhos.

2.2 Antocianinas

As antocianinas são um importante grupo dentro dos flavonoides; sua importância se dá tanto pelo uso como corante alimentício como pelos efeitos benéficos para a saúde (MERCADANTE; BOBBIO, 2008).

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis localizadas nos vacúolos das células epidérmicas dos tecidos das plantas (PAPPAS; SCHAICH, 2009). Amplamente distribuídas no reino vegetal, são comumente encontradas em flores, frutas, grãos e legumes onde são responsáveis pela coloração azul, vermelha e roxa (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; MANACH et al., 2004). Nas plantas, essa pigmentação é responsável pela proteção contra radiação solar (SILVA et al., 2012).

Em sua estrutura química, a antocianidina é caracterizada pelo cátion 2-fenilbenzopirílio (ou cátion flavílio) – dois anéis aromáticos unidos por uma ponte com três carbonos e um oxigênio (MALACRIDA; MOTTA, 2006). Das antocianidinas encontradas naturalmente na natureza, mais de 90% são baseadas nas antocianidinas cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (MERCADANTE; BOBBIO, 2008). A variação na estrutura da molécula de antocianidina se deve ao número de grupos hidroxila e o grau de metilação desses grupos (McGUIE; WALTON, 2007) (figura 2).

Figura 2. Estrutura geral das antocianidinas (Fonte: LOPES et al., 2007).

No tecido das plantas, a antocianina é formada pela antocianidina, uma (ou mais) molécula de açúcar (figura 3) e, frequentemente, um ácido orgânico. A glicosilação é mais comum na posição 3 do anel central e os açúcares mais frequentes são a glicose, galactose, xilose e ramnose; os ácidos frequentemente estão ligados aos açúcares e os mais comuns são os ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico, malônico e oxálico (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005; REIN, 2005,).

Figura 3. Estrutura química da antocianina – antocianidina ligada a uma hexose (Fonte: MALACRIDA; MOTTA, 2006).

2.3 Estabilidade de cor das antocianinas

As antocianinas são compostos altamente reativos e rapidamente se degradam dependendo das condições. A estabilidade é uma característica importante das antocianinas quando se pensa na viabilidade dos pigmentos no uso como corantes; entretanto, a utilização das antocianinas como corantes naturais ainda é restrita pela baixa estabilidade no meio aquoso e pH neutro (PATRAS; BRUNTON; TIWARI, 2009; ZHAO et al., 2008). Além disso, a estrutura química também pode influenciar na atividade biológica.

A intensidade e estabilidade do pigmento antocianínico é influenciada por fatores físicos e químicos, como fatores estruturais, pH, temperatura, luz, oxigênio e interação com outros componentes alimentares, tais como ácido ascórbico e copigmentos (MALACRIDA; MOTTA, 2006; MERCADANTE; BOBBIO, 2008).

2.3.1 Efeitos estruturais

De uma forma geral, as antocianidinas não são encontradas na forma livre na natureza e são menos solúveis do que suas formas glicosiladas, as antocianinas (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005). Modificações estruturais na molécula da antocianina influenciam em sua estabilidade. A melhor estabilidade dos grupos antociânicos com estruturas mais complexas se dá pelo fato de que substituintes na aglicona podem ocultar o cátion flavílio e assim o proteger da hidratação (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2004).

Antocianinas ligadas a um ácido orgânico (antocianinas aciladas) são mais estáveis em comparação às não aciladas uma vez que eles conferem estabilidade através da proteção contra a hidratação da estrutura do cátion flavílio (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2004). Além disso, o tipo de ácido ligado afeta a estabilidade – grupo acila aromática forma ligação hidrofóbica com o anel flavílio e assim o protege da hidratação e consequente perda da estrutura do cátion (MERCADANTE; BOBBIO, 2008; REIN, 2005); o aumento do grau de metoxilação do grupo acila melhora a integridade da molécula frente ao aquecimento: quanto maior o grau de metoxilação, maior o tempo de meia vida das antocianinas (SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006).

2.3.2 pH

A estabilidade da estrutura da antocianina é fortemente influenciada pelo pH do meio. Quando em solução ácida, mais estável é a estrutura da antocianina e a solução apresenta coloração vermelha; em solução básica, menos estável é a estrutura da antocianina e a solução apresenta coloração azul escura (LOPES et al., 2007; REIN, 2005).

Em solução aquosa e temperatura ambiente, quatro diferentes estruturas das antocianinas podem ser encontradas (figura 4): base quinoideal (A) e cátion flavílio (AH^+), que são formas coloridas; hemiacetal (B) e chalcona (C), que são formas incolores (MERCADANTE; BOBBIO, 2008). Em meio aquoso muito ácido (pH 0,5), a forma predominante encontrada é o cátion flavílio (REIN, 2005).

Assim, a alteração do pH do meio ocasiona alteração da cor. O aumento do pH leva a

diminuição da concentração do cátion flavílio e perda de intensidade da cor, devido à desprotonação e posterior formação da base quinoidal e/ou devido à hidratação levando a formação de hemiacetal e posterior formação da chalcona (REIN, 2005). Conforme há aumento do pH, a forma hemiacetal dá lugar a forma chalcona através da abertura do anel central; a chalcona é altamente instável e pode levar a uma degradação irreversível a seus respectivos ácidos fenólicos e aldeídos pela quebra do anel central (HASSIMOTTO, 2005; LOPES et al., 2007; McGUIE; WALTON, 2007).

Figura 4. Estruturas da antocianina em equilíbrio no meio aquoso (Adaptado de MERCADANTE; BOBBIO, 2008).

Se houver perda da cor pelo aumento do pH do meio, pode-se reverter o processo acidificando novamente a solução – o cátion flavílio volta a ser a forma colorida predominante desde que não haja formação de chalcona; caso haja formação de chalcona, não é possível a recuperação da cor (REIN, 2005).

2.3.3 Temperatura

A temperatura é um importante fator se tratando da estabilidade de antocianinas. Alta temperatura pode ocasionar a hidrólise da molécula de açúcar levando a perda da cor (REIN, 2005). A degradação térmica de antocianinas segue a cinética de primeira ordem; a estabilidade dos pigmentos antociânicos decai com o aumento da temperatura (LOPES et al., 2007; MERCADANTE; BOBBIO, 2008; REIN, 2005). A degradação térmica pode acarretar em formação de pigmentos marrons, especialmente na presença de oxigênio.

A alta temperatura pode levar a degradação da antocianina pela quebra do anel central de sua estrutura, com formação de aldeídos e ácidos fenólicos (figura 5). Assim, a degradação da cianidina 3-glucosídeo leva a formação de ácido protocatecúico (APC) (HIEMORI; KOH; MITCHELL, 2009; SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006; VITAGLIONE et al., 2007). Outros ácidos fenólicos, tais como ácido vanílico, caféico e ferúlico também já foram descritos como produto de degradação de antocianinas, o que depende dos grupos substituintes do anel B da antocianidina. Sadilova, Stintzing e Carle (2006) demonstraram a concentração de APC, em tratamento térmico de cenoura roxa a 95°C, aumentou de 2,8 µg APC/mL após uma hora para 18,4 µg APC/mL após 7 horas.

Figura 5. Esquema de degradação da cianidina 3-glucosídeo (Fonte: KAY; KROON; CASSIDY, 2009).

Brownmiller, Howard e Prior (2008) conduziram estudo com produtos processados do mirtilo (suco e geleia) e constataram que a alta temperatura resulta em extensa degradação de antocianinas monoméricas (de 29 a 59% do valor inicial). Já no processamento de geleia de framboesa observou-se a perda de até 80% de antocianinas durante ebulição por 10 a 15 minutos (GARCÍA-VIGUERA et al., 1998). Ainda, a alta temperatura juntamente com pH elevado causou a degradação de antocianinas de cereja produzindo diferentes ácidos fenólicos (REIN, 2005).

Em estudo conduzido por Hiemori, Koh e Mitchell (2009), demonstrou-se que a cianidina 3-glicosídeo encontrada no arroz preto foi predominantemente degradada a APC quando o arroz foi cozido a uma temperatura de 100°C (figura 6). O mesmo foi observado por Ranilla et al. (2009); após a autoclavagem do milho roxo, as antocianinas presentes foram degradadas principalmente a APC.

Figura 6. Degradação de cianidina 3-glicosídeo em ácido protocatecúico durante tratamento térmico (Fonte: HIEMORI; KOH; MITCHELL, 2009).

2.3.4 Copigmentação

A cor das antocianinas pode ser realçada por reações de copigmentação intermoleculares – a associação da estrutura da antocianina com outros compostos (MERCADANTE; BOBBIO, 2008). Essa associação ocorre através de ligações de hidrogênio

ou por empilhamento das moléculas por meio de ligações hidrofóbicas, que oferece proteção ao cátion contra ataque nucleofílico e hidratação, aumentando assim a estabilidade do pigmento (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2013). A copigmentação produz um deslocamento no comprimento máximo de absorção – conhecido como efeito batocrômico (LOPES et al., 2007) ou efeito hiperacrômico, onde a intensidade da cor é elevada pela copigmentação (REIN, 2005).

Vários compostos podem atuar como copigmento de antocianinas, como ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos fenólicos. Eiro et al. (2002) demonstrou efeito intermolecular imediato entre antocianinas e ácidos fenólicos, como o ácido gálico e ácido clorogênico. ZHANG et al. (2009) demonstrou que a copigmentação de antocianinas de batata roxa com ácido cítrico aumentou a sua estabilidade.

2.3.5 Oxigênio e luz

O oxigênio pode causar oxidação das antocianinas de forma direta ou indireta. Precipitado, turbidez e cor marrom podem ser resultados de oxidação (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

A luz é essencial durante o desenvolvimento da planta e consequentemente na biossíntese de antocianinas; porém a antocianina é facilmente degradada quando exposta a luz (LOPES et al., 2007). Palamidis e Markakis (1975) observaram a diminuição do tempo de meia vida de antocianinas em bebidas a base de suco de uva – no escuro, foi de 416 dias; expostas à luz, foi de 197 dias. O efeito de fotodegradação em suco de uva também foi observado por Song et al. (2013).

2.4 Fontes alimentares de antocianinas

As antocianinas podem ser encontradas em várias famílias de plantas, como frutas, legumes, raízes, verduras, cereais, além de bebidas como o vinho. No quadro 2 estão relacionadas algumas fontes de antocianinas e as mais comumente encontradas.

Quadro 2. Principais antocianinas encontradas em alimentos vegetais e derivados.

Alimentos	Antocianinas	Fonte
Uva	Petunidina 3,5- <i>O</i> -diglucosídeo, malvidina 3- <i>O</i> -glucosídeo, cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo, peonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo	De la Cruz et al. (2012).
Vinho	Delfinidina 3- <i>O</i> -diglucosídeo, malvidina 3- <i>O</i> -glucosídeo, cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo, peonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo	Revilla et al. (1999).
Mirtilo	Delfinidina 3-glucosídeo, malvidina-3-hexose, petunidina-3-arabinosídeo	Liu et al. (2011).
Amora silvestre	Cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo, cianidina 3- <i>O</i> -rutinosídeo	Hassimotto, Genovese e Lajolo (2008).
Morango	Pelargonidina 3-glucosídeo, pelargonidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-glucosídeo	Silva et al. (2002).
Milho roxo	Cianidina 3-glucosídeo, peonidina 3-glucosídeo, pelargonidina 3-glucosídeo	Pedreschi e Cisnero-Zevallos (2007).
Cebola roxa	Cianidina 3-glucosídeo, peonidina 3-glucosídeo, delfinidina 3-glucosídeo	Slimestad, Fossen e Vagen (2007).

Dentre as antocianinas encontradas em alimentos, a cianidina é a mais comum e abundante, a delfinidina é majoritária em diferentes tipos de feijões, a pelargonidina é a principal antocianina do morango, a petunidina é facilmente encontrada em algumas espécies de uva, a peonidina é encontrada no milho roxo, batata doce e algumas espécies de uva e a malvidina é a antocianina majoritária de uvas (MERCADANTE; BOBBIO, 2008).

2.5 Atividade biológica de antocianinas

Estudos já demonstraram uma correlação positiva entre o consumo regular de frutas e legumes com um estilo de vida saudável, o qual pode reduzir o risco de desenvolvimento de

doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (ZAFRA-STONE et al., 2007). No Brasil, o consumo de flavonoides foi estimado entre 60 a 106 mg/dia e as principais fontes são a laranja, alface e cebola. Além dessas fontes alimentares, as frutas com coloração avermelhada como o morango, uva e cereja e bebidas como o vinho também fazem parte da dieta dos brasileiros – esses alimentos são ricos em antocianinas (ARABBI; GENOVESE; LAJOLO, 2004). No Reino Unido, esse número sobe para uma média de 182 mg/dia, sendo que 65% do total consumido é de antocianinas e flavonols (BEKING; VIEIRA, 2011). Já na Espanha, a média de consumo de flavonoides é de 313 mg/dia e as proantocianidinas perfazem 60% desse total (ZAMORA-ROS et al., 2010). O interesse no estudo com antocianinas também se deve a suas propriedades biológicas, tais como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e anti-proliferativa (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

2.5.1 Capacidade antioxidante

Reações de oxidação e redução é um fenômeno bioquímico natural para o funcionamento do organismo e nesse processo de respiração há a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O organismo apresenta um complexo sistema de defesa (catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase) (SEIFRIED et al., 2007); se há um desequilíbrio desse sistema, mostra-se um quadro de estresse oxidativo que pode causar dano celular. Já é bem documentado que as EROs são mediadores de diversos processos patológicos, como doenças inflamatórias, cardiovasculares e diabetes (FERNANDEZ-PACHON et al., 2008).

Antioxidantes são substâncias que podem retardar ou evitar a oxidação do substrato oxidável (MIGUEL, 2011); se o mecanismo de ação for através da reação do antioxidante com o radical livre, o radical formado precisa ser estável. Antioxidantes exógenos podem ter importância contra doenças crônicas (RODRIGUES, 2009); considerando os antioxidantes presentes na dieta, entre eles frutas e outros vegetais, os flavonoides tem a capacidade de sequestrar radicais livres ou doar elétrons ou hidrogênio, dependendo de sua estrutura (SCALBERT et al., 2005).

Assim como na estabilidade da sua estrutura química, a quantidade de grupos

hidroxila influencia sobre a capacidade antioxidante da antocianina; quanto maior o número de grupos hidroxila, maior será a capacidade antioxidante (MIGUEL, 2010); nesse contexto, a delphinidina apresenta maior número de hidroxilas e, conseqüentemente, a maior capacidade antioxidante. Apesar disso, Lima et al. (2011) reportou que a cianidina encontrada na casca da jabuticaba apresentou melhor capacidade antioxidante em comparação com a delphinidina. A glicosilação da molécula e a quantidade de grupos hidroxila do açúcar podem ter influência na capacidade antioxidante; diferentes açúcares formam diferentes estruturas quando ligadas ao radical livre e isso pode aumentar ou diminuir essa capacidade (WANG; CAO; PRIOR, 1997).

Uma das principais atividades biológicas atribuídas às antocianinas é a sua capacidade antioxidante. Testes *in vitro* com extrato de arroz preto e extrato de mirtilo mostraram que as antocianinas presentes nesses extratos possuem alta capacidade de sequestro de radical superóxido (10 a 25 vezes a mesma concentração que o antioxidante Trolox) e que a cianidina 3-glucosídeo presente no extrato de arroz preto contribui com aproximadamente 74% dessa capacidade (ICHIKAWA et al., 2001); Yao et al. (2010) também observou elevada capacidade antioxidante do extrato de arroz preto. Outras fontes de antocianinas, tais como suco de mirtilo (LOPERA et al., 2012), cogumelos da espécie *Boletus edulis* (VAMANU; NITA, 2013), mirtilo selvagem (FRACASSETTI et al., 2013) e o milho roxo (LEE; GARCIA; PARKIN, 2010; RAMOS-ESCUADERO et al., 2012;) também demonstraram alta capacidade antioxidante em diversos ensaios *in vitro*. Apesar dos vários testes *in vitro* mostrarem a alta capacidade antioxidante das antocianinas, deve-se considerar que resultados *in vivo* dependem da biodisponibilidade desses compostos.

Em intervenção em humanos, após administração de suco de amora preta, houve aumento da capacidade antioxidante no plasma; não associado às antocianinas, mas à elevação de ascorbato; porém observou-se aumento da enzima catalase associado às antocianinas. Ainda no mesmo ensaio, observou-se aumento do nível da capacidade antioxidante da urina associado às antocianinas (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO, 2008). Ainda, Hassimoto e Lajolo (2011), em estudo com ratos, verificaram que a ingestão a longo prazo de antocianinas aumentou a capacidade antioxidante do plasma e aumentou os níveis de glutathione em alguns tecidos, como fígado e rins. Em ensaio com ratos saudáveis, foi visto que doses agudas de suco de maçã acarretou o aumento da capacidade antioxidante do plasma em 20%; a ingestão aguda de sabugueiro a aumentou em 30%. Os mesmos frutos, em longo prazo, não aumentaram a capacidade antioxidante do plasma (FERNANDEZ-PACHON et al., 2008).

Em estudos agudos, pode-se monitorar o papel de antioxidantes endógenos que, junto com os antioxidantes presentes nos alimentos, agem em sinergismo aumentando a capacidade antioxidante; já em estudos crônicos, esses antioxidantes endógenos podem variar dependendo de outros componentes da dieta (FERNANDEZ-PACHON et al., 2008).

2.5.2 Efeito anti-hipertensivo

A hipertensão é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Uma das maneiras do organismo controlar a pressão arterial é através de uma enzima chave envolvida na tensão vascular, a enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é uma enzima glicoproteica ligada à membrana na superfície de células endoteliais encontrada em abundância principalmente no pulmão e é responsável por converter a angiotensina I em angiotensina II, que é um potente vasoconstritor (RANG; DALE, 2011).

Um dos mecanismos para o controle da pressão arterial é através da inibição da ECA com consequente efeito hipotensivo. As antocianinas, assim como outras classes de flavonoides, foram observadas quanto ao seu potencial anti-hipertensivo através da inibição da ECA. Ojeda et al. (2010) demonstraram que as antocianinas cianidina e delfinidina presentes na vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*) tiveram efeito inibitório da ECA em ensaio enzimático *in vitro*. O mesmo efeito inibitório da ECA foi demonstrado por Pozo-Bayón et al. (2007) em estudo com vinho tinto e atribuiu esse efeito ao alto conteúdo de compostos fenólicos.

2.5.3 Efeito anti-proliferativo

O câncer é responsável por mais de 12% das causas de morte no mundo. Segundo a União Internacional Contra o Câncer, a projeção é de que quase 20 milhões de casos incidirá em 2020, se tornando problema de saúde pública; a explicação está na maior exposição das pessoas aos fatores de risco cancerígenos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A ingestão de vegetais está, também, associada com a redução dos riscos de desenvolvimento do câncer. Dados epidemiológicos, como o Exame de Saúde Móvel

Finlandês, demonstraram que o consumo de flavonoides como a hesperitina reduziu em 42% o risco de câncer de pulmão em relação ao grupo controle; da mesma forma, o consumo de miricetina reduziu em 57% o risco de câncer de próstata (NEUHOUSER, 2004).

As antocianinas têm demonstrado efeito protetor contra alguns tipos de câncer como visto em estudos *in vitro*. A cianidina 3-glucosídeo proveniente da amora, em células de câncer de esôfago, promoveu inibição da proliferação e indução da apoptose (ZIKRI et al., 2009). Fukamachi et al. (2008) reportaram que a cianidina 3-glucosídeo presente no milho roxo inibiu a carcinogênese em células mamárias de ratas e promoveu indução da apoptose; Jing et al. (2008) mostraram que as antocianinas presentes no milho roxo suprimiram a proliferação celular em câncer colorretal.

Segundo Shih, Yeh e Yen (2007), a redução do estresse oxidativo é uma estratégia para a quimioprevenção: antocianinas ativaram e aumentaram o sistema de defesa antioxidante endógeno (glutathione) a nível molecular em células tumorais de fígado de rato. O mesmo foi visto por Singletary, Jung e Giusti (2007), em estudo com suco de uva e a delphinidina, que foram capazes de aumentar a atividade do sistema antioxidante endógeno e diminuíram a formação de EROs em células mamárias imortais.

Apesar dos diversos mecanismos citados, a atividade biológica depende da biodisponibilidade do composto. A absorção de antocianinas é considerada baixa; Hassimotto, Genovese e Lajolo (2008) reportaram que 0,11% da dose administrada (25 mg/200 g peso animal) foi absorvida e encontrada no plasma e rins. Além disso, o que acontece com a antocianina ingerida e não absorvida ainda não está esclarecido: estudos mostram que essas antocianinas alcançam o cólon (VITAGLIONE et al., 2007) e que em contato com a microbiota intestinal são degradadas aos seus respectivos ácidos fenólicos e aldeídos (McGUIRE; WALTON, 2007). Como a degradação de antocianinas em ácidos fenólicos e aldeídos podem ocorrer em condições *in vitro* e biológicas, é provável que a absorção de antocianinas tenha sido subestimada e os produtos de degradação das antocianinas contribuam significativamente para os benefícios alegados (KAY; KROON; CASSIDY, 2009).

2.6 O milho roxo

Há vários tipos de milho com colorações diferentes; entre eles o amarelo, branco, roxo, vermelho, marrom, verde e azul. O milho roxo (figura 7) é cultivado principalmente no Peru e Chile (JING et al., 2008); no Brasil, agricultores da região sul e central do país mantêm a tradição de plantar o milho roxo em pequena escala. É um alimento que tem sido cultivado e

consumido para colorir alimentos por sua forte pigmentação e, por muitos séculos, na região dos Andes no Peru, Chile e outros países hispânicos, tradicionalmente é consumido como bebida, denominada *chicha morada*, preparada com a imersão da espiga inteira em água fervente (PEDRESCHI; CISNERO-ZEVALLOS, 2007).

Figura 7. Milho roxo.

A coloração do milho roxo é proveniente da alta concentração de antocianinas. Entre as atividades biológicas associadas às antocianinas presentes no milho roxo estão o elevado poder antioxidante (PRIOR; WU, 2006), anti-proliferativo (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007) e anti-inflamatório (FLESCHHUT et al., 2006).

Ainda que produzido em baixa escala no Brasil, o milho roxo tem um alto potencial como alimento, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de outros alimentos ou corantes alimentícios. Como é uma rica fonte de antocianinas, inclusive aciladas (o que confere maior estabilidade a estrutura), o sabugo do milho roxo, que é a porção do milho com maior concentração de antocianinas, foi escolhido para a obtenção do extrato aquoso rico em antocianinas, com a menor degradação possível dessas antocianinas, e que esse extrato possa ser utilizado posteriormente, por exemplo, como fonte alimentar ou como fonte de antocianinas em meio aquoso (já que as antocianinas em meio aquoso estão sujeitas a hidratação com consequente perda de cor).

As antocianinas são componentes com potencial atividade biológica; entretanto, dependendo das condições de extração ou mesmo dependendo das condições fisiológicas, podem estar presentes em diferentes formas ou mesmo serem degradadas, podendo haver prejuízo de sua atividade biológica. Dentre as diversas fontes alimentares, o milho roxo mostra-se como excelente fonte para a obtenção de um extrato aquoso rico em antocianinas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo é otimizar a obtenção de um extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas, estudar sua estabilidade química e sua atividade biológica.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterização química do milho roxo;
- Selecionar a melhor condição para a obtenção do extrato aquoso rico em antocianinas e outro rico em APC;
- Estudar a estabilidade química do extrato aquoso através da identificação de produtos de degradação das antocianinas presentes;
- Avaliar a atividade biológica das antocianinas do extrato aquoso de milho roxo em sistema *in vitro*: capacidade antioxidante, atividade anti-proliferativa e inibição da enzima conversora da angiotensina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As amostras de milho roxo (*Zea mays* L.) foram obtidas: 2 kg de sabugo triturado na cidade de Valparaíso (Chile) no ano de 2011, denominado nesse trabalho como sabugo comercial; cinco espigas de milho roxo inteiras e secas, 1 litro de suco pronto para beber sabor *chicha morada* e dois sucos em pó sabor *chicha morada* da marca Negrita no bairro do Pari, em São Paulo no ano de 2011; três espigas de milho roxo inteiras e secas, no bairro do Pari, em São Paulo no ano de 2013.

O sabugo comercial foi armazenado em sacos individuais contendo aproximadamente 200 g e o milho inteiro foi debulhado em sabugo e grãos; as amostras foram então armazenadas sob refrigeração (4°C) até análise. O suco pronto e o suco em pó foram mantidos em temperatura ambiente até análise. Para a análise, os grãos, o sabugo e o sabugo comercial foram moídos em moinho de facas com resfriamento por circulação de água (Analysenmuhle, Janke&Kunkel, Wilmington, NC) e posteriormente passados pelo tamis 80. O suco pronto foi utilizado *in natura* e o suco em pó foi reconstituído conforme instruções do fabricante.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização química

4.2.1.1 Quantificação de amido

O teor de amido foi determinado enzimaticamente pelo método descrito por Arêas e Lajolo (1980). Aproximadamente 0,25 g de amostra foi triturado em tubo Potter com

hidróxido de sódio 0,5 N (4 mL para o sabugo e 10 mL para o grão) durante aproximadamente dois minutos e em seguida neutralizados com ácido acético 0,5 N. O conteúdo do tubo foi então transferido para um balão volumétrico (50 mL para o grão e 25 mL para o sabugo) e completado com água mili-Q. Em um tubo Corex, 1 mL do conteúdo do balão foi adicionado de 4 mL de etanol absoluto e centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e após secagem total do precipitado, adicionou-se 1 mL de solução de amiloglicosidase; os tubos foram então levados ao banho maria a 37°C por 2 horas. Após esse período, retirado do banho maria, adicionou-se 100 µL de ácido perclórico 0,6 N. Em adequada diluição dessa solução, transferiu-se 100 µL para tubo de ensaio e adicionou-se 1, 5 mL de solução God-Pod; levou-se ao banho maria a 37°C por 15 minutos e a absorbância foi monitorada a 450 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England). A quantificação foi realizada através de curva de calibração de glicose e expresso em g/100g de amostra.

4.2.1.2 Quantificação de açúcares solúveis

Aproximadamente 1,0 g do sabugo comercial, sabugo e grão foram extraídas três vezes com etanol 80% a 80°C por agitação (Eppendorf Termomixer Compact) a 450 rpm por 20 minutos. Após, centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos. O volume foi então ajustado em balão de 2 mL e uma alíquota do sobrenadante foi seca a vácuo para evaporação do etanol em speed vac. O precipitado foi ressuspendido com 1 mL de água mili-Q. Os açúcares solúveis foram identificados por CLAE com detecção por amperometria de pulso em um sistema de cromatografia (Dionex DX-500, EUA), equipado com coluna Carbowax PA1 4 mm x 250 mm em corrida isocrática com fluxo de 1 mL/min de hidróxido de sódio 18mM durante 25 min (MAINARDI et al., 2006).

4.2.1.3 Quantificação de compostos fenólicos totais

Aproximadamente 1,0 g de amostra foi homogeneizada em 25 mL de solução metanol/água/ácido acético na proporção de 70:25:5 (v/v) e mantida sob agitação em agitador magnético na velocidade de 400 rpm por duas horas, sob refrigeração (4°C). O extrato foi então filtrado e mantido no freezer (-20°C) por até cinco dias para análise. Posteriormente, o extrato foi analisado quanto ao seu conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas, ácido protocatecúico e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Swain e Hills (1959), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Aliquotas de 250 µL de extrato, em adequada diluição, foram adicionadas de 2 mL de água destilada, 250 µL de reagente Folin e 250 µL de carbonato de sódio saturado e mantidas em banho maria a 37°C/30 min. A absorbância foi monitorada a 765 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England). A quantificação foi realizada através de curva de calibração de ácido gálico (Sigma Aldrich) e os resultados expressos em mg ácido gálico equivalente/g amostra ou mL de amostra.

4.2.1.4 Determinação de antocianinas monoméricas

A concentração de antocianinas monoméricas foi realizada utilizando a metodologia descrita por Lee, Durst e Wrolstad (2005) através do método do pH diferencial. Para a análise, foram feitas duas soluções tampão: (1) tampão cloreto de potássio 0,025M pH 1,0 e (2) tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. Os extratos, em adequada diluição, foram adicionadas nos dois tampões, mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente a absorbância foi monitorada a 520 e 700 nm em espectrofotômetro UV-Visível (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Cambridge, England). O conteúdo de antocianinas monoméricas foi expresso como mg cianidina 3-glucosídeo equivalente/g amostra ou L de amostra e determinado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Cianidina 3-glucosídeo equivalente (mg/L)} = A \times PM \times FD \times 1000 / (\epsilon \times l)$$

onde:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

PM = peso molecular da cianidina 3-glucosídeo (449,2g)

FD = fator de diluição (10)

ϵ = coeficiente de extinção molar da cianidina 3-glucosídeo (26.900)

l = caminho óptico da cubeta

4.2.1.5 Quantificação de flavonoides

Para a extração dos compostos fenólicos, aproximadamente 1,0 g de amostra foi homogeneizada com 100 mL de metanol/água/ácido acético 70:25:5 (v/v) em ultra-turrax (Brinkmann Homogenizer, Suíça) durante dois minutos e posteriormente o extrato foi filtrado em papel filtro (Nalgon, porosidade 3 micras, Brasil) à vácuo. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes com 50 mL do mesmo solvente, nas mesmas condições. Os extratos assim obtidos foram agrupados e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor, RE 120, Buchi, Flawil, Suíça) a 40°C até completa remoção do metanol. Posteriormente o volume foi ajustado com água destilada para 100 mL para posterior aplicação em coluna de separação em fase sólida (SPE). Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Para a SPE, volume apropriado de amostra foi passado em coluna com 1,0 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel) preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada com 20 mL de metanol e 50 mL de água miliQ. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 20 mL de água miliQ e a eluição dos flavonoides foi realizada com 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5 v/v). O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep24 DLSupelco, Bellefonte, PA). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação à 40°C, sob vácuo, e ressuspensos com 1 mL de metanol/ácido acético 95:5 v/v. As amostras foram filtradas utilizando-se filtros de polietileno (Milipore Ltda., Bedford, EUA) de 0,43 μ m de poro e mantidas em freezer (-20°C) até análise por CLAE-DAD.

4.2.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

A quantificação e identificação dos compostos fenólicos foram realizadas através de CLAE-DAD. O cromatógrafo usado foi o Hewlett-Packard Infinity 1120 Series (Palo Alto, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos, coluna Prodigy 5 μm ODS₃ 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltda, Reino Unido) em fluxo 1 mL/min e temperatura de 25°C, tempo de corrida de 45 minutos. A fase móvel para eluição foi constituída por gradiente de solventes (A): ácido fórmico 0,5% em água e (B): acetonitrila (tabela 1). O monitoramento foi feito em comprimento de onda 525 nm, 270 nm e 370 nm. O sistema foi controlado pelo programa ChemStation.

As amostras foram injetadas em duplicata, em volumes entre 5 a 20 μL . Os flavonoides foram identificados através de seu tempo de retenção e comparação com o espectro de absorção de padrões. Para a quantificação, utilizou-se curva de calibração dos padrões cianidina 3-glucosídeo, peonidina, pelargonidina (Extrasynthese, Genay, France), quercetina e ácido protocatecúico (Sigma Aldrich, EUA) injetados em triplicata, em cinco concentrações distintas. Os derivados de isoramnetina foram quantificados como equivalente de quercetina. Os compostos fenólicos foram expressos em mg equivalente/g de amostra ou 100 mL de amostra.

Tabela 1. Gradiente de solventes para eluição dos compostos fenólicos por CLAE-DAD.

Tempo (min)	Ácido fórmico 0,5% (%)	Acetonitrila (%)
0	90	10
5	90	10
15	80	20
25	75	25
33	65	35
38	50	50
43	10	90
44	10	90
45	10	90

4.2.1.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)

A identificação de flavonoides e outros compostos fenólicos foram conduzidos em aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (BrukerDaltonics, Alemanha) (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) e interface de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE/DAD. Após a passagem pelo DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 mL/min para a passagem no espectrômetro de massas. O ESI foi mantido em modo positivo para antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides e ácidos fenólicos. O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre m/z 100-1000. A energia de ionização para o modo negativo foi de 3000 V e para o modo positivo 3500 V.

4.2.1.8 Extração de ácido protocatecúico

A extração de ácido protocatecúico foi adaptada da metodologia descrita por Xu *et al.* (2007). Quantidades de 2 mL de extrato (conforme item 4.2.1.3 e 4.2.3.1) foram adicionadas de 320 µL de HCl 10% (v/v) em tubo corex e agitadas vigorosamente em vortex (Thermolyne, EUA) durante dois minutos. Adicionou-se, então, acetato de etila (Synth, Brasil) na proporção de 1:3 (v/v), agitou-se em vortex vigorosamente durante cinco minutos e, após centrifugação em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha) a 9000 rpm por 5 minutos a 4°C, 2 mL do sobrenadante foram retirados, secos através de fluxo contínuo de nitrogênio gasoso e ressuspensos com 500 µL de metanol/ácido acético 95:5 (v/v). A quantificação foi efetuada através de CLAE-DAD, conforme foi descrita no item 4.2.1.6.

4.2.2 Avaliação da atividade biológica *in vitro*

4.2.2.1 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi analisada utilizando-se dois métodos: método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) (PRIOR et al., 2003).

Método DPPH – o método DPPH é baseado na redução do radical DPPH• (Sigma Aldrich, EUA) pelos antioxidantes com alteração de coloração proporcional à concentração da substância redutora da amostra. Alíquotas de 40 µL de amostra, em adequada diluição, foram adicionadas de 200 µL de solução DPPH• (0,4925 mg DPPH/25 mL metanol) em microplaca de 96 cavidades, mantidas em temperatura ambiente por vinte minutos no escuro. A absorbância foi monitorada a 517 nm em leitor de microplaca (Benchmark Plus, Microplate Spectrophotometer, Japan). A porcentagem de inibição dos radicais livres foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = - ((\text{Abs amostra} / \text{Abs branco} * 100) - 100)$$

Para a quantificação, utilizou-se curva de calibração com trolox (Sigma Aldrich, EUA) e os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox/g de amostra ou 100 mL de amostra.

Método ORAC – O método ORAC mede um sinal de fluorescência (fluoresceína) que diminui na presença de um gerador de espécies reativas de oxigênio. O método utiliza um iniciador de radicais livres, o AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanamide,dihydrochloride), que gera um radical peróxido. O radical peróxido formado abstrai um átomo de hidrogênio na presença de um antioxidante para formar um hidroperóxido e um radical antioxidante estável; como resultado, o dano à fluoresceína induzido pelo radical peróxido é inibido. Alíquotas de 25 µL de extrato em adequada diluição foram colocadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas em aparelho de microplaca (BioTek, EUA) com 40 nM de fluoresceína (Sigma Aldrich) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, após adição de AAPH 153 nM, o decaimento da fluorescência foi monitorado durante 1 hora, em intervalos de 1 minuto. O cálculo foi realizado a partir da área sob a curva do padrão trolox, através de curva de calibração. Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de trolox/g de amostra ou 100 mL de amostra.

4.2.2.2 Avaliação da atividade anti-proliferativa

A avaliação da atividade anti-proliferativa do milho roxo foi feita em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e todas as análises foram feitas no laboratório de Farmacologia do departamento CPQBA da Universidade Estadual de Campinas.

O milho roxo foi avaliado quanto a sua atividade anti-proliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (MONKS et al., 1991). Para o ensaio, foi feita uma nova extração e utilizou-se a fração metanol (método descrito no item 4.2.1.5, com modificação do solvente utilizado, metanol acidificado com ácido clorídrico 5% v/v). Foram empregadas 6 linhagens de células tumorais humanas (tabela 2) que foram cedidas gentilmente pelo *Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute* (NCI, EUA). As células tumorais foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm³ (Nunc[®]), com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Foi também empregada uma linhagem de célula normal, denominada de HaCat (queratinócito normal humano), doada pelo professor doutor Ricardo Della Coletta, do Departamento de Diagnóstico Oral, área de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp.

Tabela 2. Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade anti-proliferativa do milho roxo.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária	Densidade de Inoculação (10 ⁴ cel/mL)
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/Normal	Ectoderme	5,0

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 cavidades (Nunc[®]), de

cada suspensão celular, na densidade de inoculação descrita na tabela 2, em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1mL/L RPMI). Após 24h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação, com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, da placa controle chamada T₀, o que permitirá determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 min a temp. ambiente; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, o crescimento celular, expresso em porcentagem, foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T - T_0) / (T_1 - T_0)]$

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T - T_0) / T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T₁ = absorbância do branco de células.

T₀ = absorbância do controle de células na placa T₀.

A atividade anti-proliferativa média (mean log GI₅₀) das amostras foi calculada através de média aritmética dos valores experimentais, em log, de GI₅₀ empregando-se software MS Excel. As amostras foram classificadas, de acordo com critérios sugeridos pelo NCI/EUA (FOUCHE et al., 2008) quanto à atividade anti-proliferativa em: inativa (I, mean log GI₅₀ > 1.5), ativa com atividade fraca (F, 1.1 < mean log GI₅₀ < 1.5), moderada (M, 0 < mean log GI₅₀ < 1.1) ou potente (P, mean log GI₅₀ < 0).

4.2.2.3 Atividade inibitória da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

O ensaio para a atividade inibitória da ECA foi realizado de acordo com Lahogue et al. (2010). A enzima conversora da angiotensina (EC 3.4.15.1) (Sigma Aldrich, EUA) proveniente de pulmão de coelho foi diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,3M. Preparou-se a solução a uma concentração de 100 mU de enzima/ml tampão e alíquotas de 250 µl foram armazenadas a -20°C até a análise. Para a determinação da inibição da ECA utilizou-se o substrato HHL (Hipuril-His-Leu, Sigma Aldrich, EUA), o qual foi dissolvido em tampão borato de sódio 0,1 M, pH 8,3 contendo NaCl 0,3M, atingindo a concentração final de 5 mM. O substrato foi preparado a cada dia de ensaio.

Volumes de 25 µl de amostra (ou tampão borato substituindo-a para ser utilizado como controle negativo) e 40 µL da ECA foram misturados e incubados por 10 minutos a 37°C a uma agitação de 450 rpm (Eppendorf Termomixer Compact). Após esse período, foram adicionados 100 µL do substrato HHL em cada tubo e novamente incubados por mais 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 70 µL de HCl 1M; as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e filtradas em filtro de nylon 0,45.

A análise do produto formado (ácido hipúrico – HA) pela reação enzimática foi realizada através de CLAE-DAD. O cromatógrafo utilizado foi o Hewlett-Packard Infinity 1110 Series (Palo Alto, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos, coluna Agilent 5 µm C18 (4.6 x 150 mm, Agilent) em fluxo de 0,7 ml/min. A fase móvel para eluição foi constituída por gradiente de solventes (A): TFA 0,05% em água e (B): TFA 0,05% em acetonitrila (tabela 3). O sistema foi controlado pelo programa ChemStation. A curva de calibração foi utilizada com ácido hipúrico (Sigma Aldrich) como padrão. O monitoramento foi feito em comprimento de onda 228 nm.

Tabela 3. Gradiente de solventes para eluição de ácido hipúrico por CLAE-DAD.

Tempo (min)	TFA 0,05% em água (%)	TFA 0,05% em acetonitrila (%)
0	95	5
15	20	80
15.10	20	80
20	20	80
20.10	95	5
30	95	5

A inibição da ECA pela presença dos compostos fenólicos foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{inibição da ECA (\%)} = (\text{HA}_{\text{controle}} - \text{HA}_{\text{inibidor}} / \text{HA}_{\text{controle}}) \times 100$$

onde:

HA_{controle} e HA_{inibidor} correspondem ao valor de ácido hipúrico formado (expresso em µg) durante a reação da amostra controle (sem a presença da solução inibidora) e da amostra contendo a solução inibidora, respectivamente. Todas as amostras com a solução inibidora foram corrigidas pelo valor de HA formado da amostra do branco.

Para a amostra controle foi colocado tampão borato como substituto da solução inibidora. Para a amostra do branco foi colocado 40 µl de tampão borato ao invés da adição da enzima juntamente com o substrato e a solução inibidora para descontar o HA formado durante a reação sem a presença da enzima.

4.2.3 Obtenção do extrato aquoso de milho roxo

4.2.3.1 Delineamento experimental: análise da superfície de resposta

Com o objetivo otimizar a obtenção de um extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas e também estudar a sua estabilidade térmica a partir do sabugo comercial, foi

elaborado um planejamento experimental utilizando a técnica estatística de fatorial fracionário 3^3 (três variáveis com três níveis) (quadro 3), na opção de quinze ensaios com três repetições do ponto central (método Box-Behnken) (quadro 4), em dois ensaios divididos em blocos (1) e (2). As variáveis independentes selecionadas foram temperatura, tempo de extração e pH da solução (quadro 5). Para obter o pH necessário foram utilizados três soluções tampão citrato-fosfato nos pHs 3,0, 5,0 e 7,0.

Quadro 3. Fatores selecionados para o método da superfície de resposta e seus respectivos níveis para a obtenção do extrato aquoso de milho roxo.

	Níveis		
Fatores	-1	0	+1
Temperatura (x1)	70°C	95°C	120°C
Tempo (x2)	10 min	50 min	90 min
pH (x3)	3,0	5,0	7,0

Quadro 4. Matriz do planejamento experimental 3^3 , com três repetições do ponto central. Valores codificados.

Ensaio	Temperatura	Tempo	pH
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Quadro 5. Matriz do planejamento experimental 3³, com três repetições do ponto central. Valores reais.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	pH
1	70	10	5
2	120	10	5
3	70	90	5
4	120	90	5
5	70	50	3
6	120	50	3
7	70	50	7
8	120	50	7
9	95	10	3
10	95	90	3
11	95	10	7
12	95	90	7
13	95	50	5
14	95	50	5
15	95	50	5

De acordo com o planejamento estabelecido no quadro 3, aproximadamente 1,0 g de sabugo comercial foi colocado em erlenmeyer juntamente com 100 mL do tampão específico, aquecido em banho de vaselina líquida (Synth, Brasil) até a temperatura especificada no planejamento durante o tempo determinado para cada ensaio. Após o término, o extrato foi imediatamente resfriado em banho de gelo até temperatura ambiente (25°C), completado para o volume final de 100 mL, filtrado em papel filtro e mantido em freezer (-20°C) até análise. Os ensaios foram realizados de forma aleatória.

As respostas analisadas foram: determinação de antocianinas monoméricas descrito no item 4.2.1.4, quantificação de ácido protocatecúico por CLAE-DAD descrito no item 4.2.1.6. 4.2.1.8 e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC descrito no item 4.2.2.1.

4.2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para as análises descritivas, foi aplicado ANOVA seguido de Tukey ou teste t não pareado. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. A análise da superfície de resposta foi realizada através da ferramenta Design e Análise de Experimentos (DOE, do inglês *Design of Experiment*). Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica v. 11.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do milho roxo

O sabugo comercial e a espiga (divididas em sabugo e grão), para fins de caracterização química, foram analisados quanto à concentração de amido e açúcares solúveis, concentração de fenólicos totais, concentração de antocianinas monoméricas, avaliação da capacidade antioxidante e identificação e quantificação de flavonoides através de CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS. Os produtos derivados do milho roxo, o suco pronto para beber e o suco em pó foram analisados quanto a concentração de fenólicos totais, concentração de antocianinas monoméricas, quantificação de flavonoides por CLAE-DAD e avaliação da capacidade antioxidante e CLAE-DAD.

5.1.1 Amido e açúcares solúveis

Carboidratos são os compostos mais abundantes no milho, chegando a representar 70% do peso total. Conforme o milho amadurece, a umidade cai, o teor de açúcares diminui e o teor de amido aumenta (Caniato et al., 2004).

A quantificação do teor de amido foi feita no sabugo comercial, no sabugo e grãos. Dentre as amostras analisadas, o grão apresentou o maior teor de amido: cerca de 68% na amostra de 2011 e 60% na amostra de 2013. Em grãos de milho, a porcentagem de amido varia de 65 a 80% (Zeoula et al., 1999). No sabugo comercial e no sabugo a concentração de amido foi bastante baixa, cerca de 1% (tabela 4).

O teor de açúcares solúveis também foi quantificado no sabugo comercial, sabugo e grãos. Foi encontrado glicose, frutose, sacarose e maltose, sendo mais abundante sacarose e menores concentrações dos outros açúcares; a maltose só foi encontrada na amostra de 2011. Através dos resultados, a amostra de milho colhida em 2011 apresenta maior teor de amido comparado aos teores de açúcares solúveis e a amostra de milho colhida em 2013 apresenta menor teor de amido comparado aos açúcares solúveis; isso sugere que a amostra de 2011

estava em estágio de maturação mais avançado do que a amostra colhida em 2013.

Tabela 4. Concentração de amido e açúcares solúveis em amostras de milho roxo adquiridos em maio/2011 e fevereiro/2013 (g/100g).

	Amido	Glicose	Frutose	Sacarose	Maltose
Amostras 2011					
Sabugo comercial	$2,4 \pm 0,18^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^a$
Sabugo	$1,6 \pm 0,05^b$	$0,03 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^a$
Grão	$67,5 \pm 4,17^c$	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,09 \pm 0,00^b$	$0,04 \pm 0,00^b$
Amostras 2013					
Sabugo comercial	--	--	--	--	--
Sabugo	$1,04 \pm 0,08^A$	$0,22 \pm 0,01^A$	$0,13 \pm 0,02^A$	$0,10 \pm 0,01^A$	n. d.
Grão	$60 \pm 1,14^B$	$0,11 \pm 0,01^B$	$0,05 \pm 0,00^B$	$0,34 \pm 0,02^B$	n. d.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d.: não detectado.). Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras. Letras maiúsculas ou minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.1.2 Concentração de fenólicos totais e antocianinas monoméricas

Importantes diferenças foram observadas nos teores de fenólicos totais entre as amostras, como pode ser visto na figura 8. O conteúdo de fenólicos totais, na amostra de 2011 (sabugo comercial, sabugo e grãos) variou entre 0,03 a 45 mg ácido gálico eq./g amostra, sendo a maior concentração encontrada para o sabugo e o menor para o suco em pó. Já no milho colhido em 2013 (sabugo e grãos), o conteúdo de fenólicos totais foi de 5,01 mg ácido gálico eq./g para o grão e 40,4 mg ácido gálico eq./g para o sabugo. Para as todas as amostras analisadas, o conteúdo de fenólicos totais segue a ordem decrescente: sabugo > sabugo comercial > grão > suco pronto > suco em pó.

Já era esperado que o grão apresentasse menor conteúdo de fenólicos totais em relação ao sabugo já que sua maior composição é de amido e açúcares, ficando os compostos fenólicos presentes, principalmente, no pericarpo do grão. Apesar do sabugo comercial não ter outro tipo de material em sua composição (segundo o fabricante), o sabugo apresentou duas vezes mais teor de fenólicos totais do que seu respectivo produto comercial; essa variação no conteúdo de fenólicos totais pode ser estar relacionado à condições climáticas ou biológicas

(já que a formação de flavonoides no vegetal depende da luz); ainda deve-se considerar que o sabugo comercial é comercializado já na forma triturada: dessa forma, as antocianinas podem ser degradadas pela exposição a luz e oxigênio. Além disso, os valores aqui encontrados são superiores aos relatados por ZILÍC et al. (2012) que encontraram, no sabugo de diferentes espécies de milho roxo, teores de fenólicos totais entre de 4,94 mg/g no milho multicolorido à 10,52 mg/g no milho azul. Ainda, independente da parte do milho, o teor de fenólicos totais é superior quando comparados a outros vegetais, tais como amora silvestre, jambolão, repolho roxo e alface roxa, com concentrações de 3,73, 5,83, 1,78 e 1,7 mg ácido gálico eq./g , respectivamente (HASSIMOTTO, 2005).

Observa-se que o sabugo contém a maior concentração de antocianinas monoméricas (16,2 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g na amostra de 2011 e 22,5 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g na amostra de 2013) (figura 9). Isso se explica porque o sabugo, apesar de representar aproximadamente 15% do peso total do milho inteiro, possui o pigmento em todo seu interior enquanto os grãos só apresentam esse pigmento no pericarpo. Os valores encontrados foram superiores ao já relatado em outros vegetais como mirtilo fresco (1,67 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g) (BROWNMILLER; HOWARD; PRIOR, 2008), guajiru fresco (1,04 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g) e jussara fresca (2,9 mg cianidina 3-glucosídeo eq./g) (BRITO et al., 2007). No suco pronto e no suco em pó não foram detectadas antocianinas monoméricas.

Analisando os dados de fenólicos totais e antocianinas monoméricas nas amostras do milho inteiro, nos anos de 2011 e 2013, observou-se que, apesar de bem próximos, os valores de fenólicos totais das duas amostras apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) e o mesmo foi observado para o teor de antocianinas monoméricas.

Figura 8. Concentração de fenólicos totais em amostras de milho roxo e derivados comerciais adquiridos em 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 9. Concentração de antocianinas monoméricas em amostras de milho roxo e derivados comerciais adquiridos em 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d.: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.1.3 Quantificação de flavonoides e perfil de compostos fenólicos

De acordo com a análise por CLAE-DAD das diferentes amostras eluídas com metanol (figura 10) e metanol:amônia (figura 11), foi detectado a presença de ácido protocatecúico e derivados de cianidina, peonidina, pelargonidina, quercetina e isoramnetina no sabugo comercial, sabugo e grãos. Considerando as duas eluições, no total, foram identificados cinco derivados de cianidina, três derivados de peonidina, três derivados de pelargonidina, dois derivados de quercetina e dois derivados de isoramnetina. Nenhum flavonoide foi detectado nas amostras de suco pronto e suco em pó. A distribuição desses compostos, identificados por CLAE e posteriormente confirmados por LC-ESI-MS/MS, nos eluatos metanólicos foi a mesma em todas as amostras.

Figura 10. Perfil cromatografico obtido- por CLAE-DAD (λ 270 nm) de amostras de milho roxo, fração eluída com metanol. (A) sabugo comercial; (B) sabugo; (C) grão. Picos: (1 e 3) derivados de cianidina, (2) ácido protocatecúico; (4) derivado de pelargonidina; (5) derivado de peonidina; (6 e 7) derivados de quercetina; (8 e 9) derivados de isoramnetina.

Figura 11. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (λ 270 nm) de amostras de milho roxo, fração eluída com metanol:amônia. (A) amostra comercial; (B) sabugo; (C) grão. Picos: (10) desconhecido; (3, 11 e 14) derivados de cianidina; (12 e 15) derivados de pelargonidina; (13 e 16) derivados de peonidina.

A literatura indica que os flavonoides comumente encontrados nas plantas estejam glicosilados (MALACRIDA; MOTTA, 2006), o que foi confirmado já que não foi encontrado nenhum flavonoide na forma aglicona. De acordo com a tabela 5, pode-se observar que a cianidina é a antocianina majoritária em todas as amostras. Derivados de quercetina e isoramnetina foram os únicos flavonoides não antociânicos em concentrações detectáveis pela CLAE. Em outros trabalhos com milho roxo (RAMOS-ESCUADERO et al., 2012) também foram detectadas pequenas concentrações de caempferol e naringenina em frações metanólicas. Para ácidos fenólicos, o ácido protocatecúico foi o único detectado; traços de ácido vanílico e *p*-cumárico também foram encontrados em amostras de milho roxo em outros trabalhos (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

Quantitativamente, as duas representando a mesma porção do milho roxo amostras (sabugo e sabugo comercial) apresentaram elevada variabilidade nos teores de compostos

fenólicos, especialmente antocianinas. Comparando o sabugo comercial com o milho colhido em 2011, as antocianinas totais variaram de 4,61 mg/g no sabugo comercial e 33,76 mg/g no sabugo proveniente do milho inteiro. Adicionalmente, houve também variabilidade nos conteúdos de outros flavonoides: 1,19 mg/g de quercetina no sabugo comercial e 10,46 mg/g de quercetina no sabugo. Comparando o sabugo comercial com o milho colhido em 2013, também foi possível observar alta variabilidade entre as amostras: as antocianinas totais no sabugo foi de 28,09 mg/g e a concentração de quercetina foi de 7,11 mg/g.

Zilic et al. (2012) reportaram concentrações de antocianinas totais (em cianidina equivalente) que variavam de 0,0025 a 0,696 mg/kg em amostras de milho azul, vermelho e multicolorido (em análise por cromatografia líquida); já Lopez-Martinez et al. (2009), em análise por espectrofotometria, encontraram concentrações de 4,65 mg/g de antocianinas (expressa em cianidina 3-glucosídeo equivalente) em amostras de sabugo de milho roxo mexicano; com os resultados obtidos nesse experimento, pode-se dizer que o sabugo comercial e as duas porções do milho roxo (sabugo e grão) contém maiores concentrações de antocianinas.

Posteriormente, a identificação estrutural dos compostos fenólicos presente nas amostras foi realizada através de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-ESI-MS/MS). Os espectros de massas dos picos das antocianinas e demais flavonoides (tabelas 5 e 6) estão em anexo neste documento (anexo A).

Tabela 5. Flavonoides e ácido fenólico presentes em diferentes amostras e partes do milho roxo identificados por CLAE-DAD 2011 e 2013.

Amostra	APC	Quercetina^{a,c}	Cianidina^b	Pelargonidina^a	Peonidina^a	Antocianinas
	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	totais (mg/g)
Amostras 2011						
Sabugo comercial	1,06 ± 0,28	1,19 ± 0,24	3,16 ± 0,12	0,63 ± 0,05	0,81 ± 0,04	4,61
Sabugo	2,09 ± 0,11	10,46 ± 0,32	18,75 ± 0,99	7,29 ± 0,38	7,72 ± 0,46	33,76
Grão	n.d.	0,75 ± 0,18	2,82 ± 0,26	0,67 ± 0,10	0,53 ± 0,02	4,02
Suco pronto	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Suco em pó	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Amostras 2013						
Sabugo	1,58 ± 0,17	7,11 ± 0,22	17,21 ± 0,34	4,89 ± 0,10	5,99 ± 0,18	28,09
Grão	n.d.	0,44 ± 0,06	1,41 ± 0,26	0,34 ± 0,02	0,28 ± 0,01	2,03

Os resultados foram expressos como média ± DP (n=2). APC: ácido protocatecúico. n.d.: não detectado. a: expresso como aglicona eq.; b: expresso como cianidina 3-glucosídeo eq.; c: soma de derivados de quercetina e isoramnetina.

Tabela 6. Identificação por LC-ESI-MS/MS de antocianinas (modo positivo) detectadas na fração eluída com metanol e metanol:amônia na amostras de milho roxo (sabugo comercial, sabugo e grão).

Pico	TR (min)	[M] ⁺ m/z	MS ² m/z	Composto proposto ou isômero
Fração metanol (Figura 12)				
1	3,2	899	737/575/423/329/287	Desconhecido (derivado de cianidina)
3	11,7	449	287	Cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*
4	13,4	433	271	Pelargonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*
5	14,1	463	301	Peonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*
Fração metanol:amônia (Figura 13)				
10	9,2	221	205	Desconhecido
3	11,8	449	287	Cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*
11'	13,9	535	287	Isômero do composto 11
11''	14,5	535	287	Isômero do composto 11
11	15,7	535	449/287	Cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo)
12	17,1	519	433/271	Pelargonidina 3-(6''-malonilglucosídeo)
13	17,7	549	463/301	Peonidina 3-(6''-malonilglucosídeo)
14	18,1	621	535/287	Cianidina-3 <i>O</i> -glucosídeo-2-malonilglucosídeo
15	19,8	605	561/271	Desconhecido (derivado de pelargonidina)
16	20,2	635	591/549/301	Peonidina 3-(dimalonilglucosídeo)

TR = tempo de retenção . * Identidade confirmada também por comparação com o TR de padrões.

Os picos 3, 4 e 5 foram identificados como cianidina 3-glucosídeo, pelargonidina-3-glucosídeo e peonidina-3-glucosídeo apresentando íon molecular a m/z 449, 433 e 463, respectivamente. O fragmento MS^2 gerado correspondem às antocianidinas cianidina (m/z 287), pelargonidina (m/z 271) e peonidina (m/z 301), respectivamente, correspondente à perda de uma hexose. A identidade destes compostos foi confirmada por comparação com tempo de retenção dos respectivos padrões (anexo B).

O pico 11 apresentou íon molecular a m/z 535 com fragmento MS^2 a m/z 449 $[M-86]^+$ (possivelmente correspondente a uma cianidina 3-glucosídeo) e fragmento a m/z 287 $[M-86-162]^+$ (correspondente a uma cianidina). De acordo com Pascual-Teresa, Santos-Buelga e Rivas-Gonzalo (2002), a diferença de 86 que formou o fragmento a m/z 449 é decorrente da perda de um grupamento malonil; portanto, pode-se concluir que o pico 11 possivelmente é correspondente a uma cianidina-3-(6''-malonilglucosídeo). Os picos 11' e 11'' da fração metanol:amônia tiveram o mesmo íon molecular a m/z 535 e fragmentação MS^2 com diferentes tempos de retenção, o que indica que são possíveis isômeros do composto 11 (cianidina 3-glucosídeo aciladas com grupamento malonil).

Os picos 12 e 13 seguiram o mesmo padrão do pico 11. O pico 12 apresentou íon molecular a m/z 519, com fragmento MS^2 a m/z 433 $[M-86]^+$ (possivelmente correspondente a uma pelargonidina 3-glucosídeo) e a m/z 217 $[M-86-162]^+$ (correspondente a uma pelargonidina). O pico 13 apresentou íon molecular a m/z 549 com fragmento MS^2 a m/z 463 $[M-86]^+$ (possivelmente correspondente a uma peonidina-3-glucosídeo) e a m/z 301 $[M-86-162]^+$ (correspondente a uma peonidina). A diferença de 86 que formou o fragmento a m/z 433 (no pico 12) e a m/z 463 (no pico 13) foi provavelmente decorrente da perda de um grupamento malonil; portanto, pode-se dizer que são correspondente a uma pelargonidina-3-(6''-malonilglucosídeo) e peonidina-3-(6''-malonilglucosídeo), respectivamente (ZILÍC et al., 2012).

O pico 14 apresentou íon molecular a m/z 621 com fragmento MS^2 a m/z 535 $[M-86]^+$ (correspondente provável a uma cianidina-3-(6''-malonilglucosídeo)) e fragmento a m/z 287 (correspondente a uma cianidina). O pico 16 apresentou íon molecular a m/z 635 e fragmento MS^2 a m/z 549 (correspondente a uma peonidina-3-(6''-malonilglucosídeo)) e fragmento a m/z 301 (correspondente a uma peonidina). De acordo com Zhao et al. (2008), a diferença de 86 que formou o fragmento m/z 535 e a m/z 549 foi decorrente da perda de um grupamento malonil; portanto, pode-se dizer que o pico 14 é correspondente a uma cianidina-3-glucosídeo-2-malonilglucosídeo e o pico 16 é correspondente a uma peonidina-3-dimalonilglucosídeo.

Tabela 7. Identificação por LC-ESI-MS/MS de flavonols e ácido fenólico (modo negativo) detectadas na fração eluída com metanol das amostras de milho roxo (sabugo comercial e espiga – sabugo e grão).

Pico	TR (min)	[M-H] ⁻ , <i>m/z</i>	MS ² <i>m/z</i>	Composto proposto ou isômero
2	8,4	153	109	Ácido protocatecúico*
6	19,9	609	463/301	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo*
7	21,2	463	301	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo*
8	23,2	623	315	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo
9	25	477	315	Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo

TR = tempo de retenção.* Identidade confirmada também por comparação com o TR de padrões.

O pico 2 apresentou [M-H]⁻ a *m/z* 153 e fragmento MS² a *m/z* 109 e foi identificado como ácido protocatecúico. Os picos 6 e 7 foram identificados como quercetina-3-rutinosídeo e quercetina-3-glucosídeo, respectivamente. O pico 6 apresentou [M-H]⁻ a *m/z* 609 e fragmento MS² a *m/z* 301 correspondente a quercetina, onde a diferença foi resultante da perda de uma hexose e uma desoxi-hexose. O pico 7 apresentou [M-H]⁻ a *m/z* 463 e fragmento MS² a *m/z* 301 correspondente a quercetina, onde a diferença foi resultante da perda de uma hexose.

Os picos 8 e 9 foram identificados como isoramnetina-3-rutinosídeo e isoramnetina-3-glucosídeo, respectivamente. O pico 8 apresentou [M-H]⁻ a *m/z* 623 e formou fragmento MS² a *m/z* 315 correspondente a isoramnetina, onde a diferença foi resultante da perda de uma hexose e uma desoxi-hexose. O pico 9 apresentou [M-H]⁻ a *m/z* 477 e formou fragmento MS² a *m/z* 315 correspondente a isoramnetina, onde a diferença foi resultante da perda de uma hexose.

Os compostos ácido protocatecúico, quercetina 3-glucosídeo e quercetina 3-rutinosídeo tiveram sua identidade confirmada também pelo tempo de retenção com os respectivos padrões (anexo C).

Desta maneira, considerando as informações do espectro absorção na região UV/visível e espectrômetro de massas, o composto majoritário das amostras de milho roxo é a cianidina 3-glucosídeo. Os resultados encontrados estão de acordo com vários trabalhos que reportaram que as principais antocianinas encontradas no milho roxo são a cianidina, peonidina e pelargonidina (PASCUAL-TERESA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002; ZHAO et al., 2008; ZILÍC et al., 2012;).

5.1.4 Avaliação da atividade biológica do milho roxo

5.1.4.1 Capacidade antioxidante

Com relação à capacidade antioxidante, o sabugo apresentou o maior valor nas duas metodologias analisadas, com valores de 138 $\mu\text{mol trolox eq./g}$ e 837 $\mu\text{mol trolox eq./g}$ quando avaliadas por DPPH e ORAC, respectivamente, em amostra colhida em 2011, e valores de 122 $\mu\text{mol trolox eq./g}$ e 742 $\mu\text{mol trolox eq./g}$, quando avaliadas por DPPH e ORAC, respectivamente, em amostra colhida em 2013 (figuras 12 e 13).

A capacidade antioxidante, tanto pelo método DPPH quanto pelo método ORAC, foi correlacionada com o conteúdo de fenólicos totais ($R^2 > 0,98$) e com o conteúdo de antocianinas monoméricas ($R^2 > 0,90$) nas amostras analisadas. Outros trabalhos também correlacionaram a capacidade antioxidante com o conteúdo de fenólicos totais (PASKO et al., 2009; SUN et al., 2002). Einbond et al. (2004) demonstrou que a capacidade antioxidante de frutas pode estar relacionada não só conteúdo a compostos como a vitamina C, mas também a outros compostos como antocianinas e flavonoides.

Figura 12. Capacidade antioxidante pelo método DPPH em amostras de milho roxo nos anos de 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP ($n=3$). n.d: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p<0,05$).

Figura 13. Capacidade antioxidante pelo método ORAC em amostras de milho roxo nos anos de 2011 e 2013. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=3). n.d: não detectado. Foi aplicado ANOVA seguido de Tukey para comparação entre as amostras e Teste t para amostras iguais em anos diferentes. Letras ou números diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.1.4.2 Atividade anti-proliferativa

No presente trabalho, avaliou-se a atividade antiproliferativa dos flavonoides do milho roxo extraído previamente em coluna de poliamida, em seis diferentes linhagens tumorais. Entretanto o milho roxo não apresentou inibição da proliferação celular nas linhagens avaliadas (figuras 14 e 15).

Figura 14. Controle positivo da inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais avaliadas.

Figura 15. Avaliação da inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais avaliadas utilizando o milho roxo.

Como observado nas figuras 14 e 15, o milho roxo não apresentou inibição da proliferação celular quando comparado ao controle positivo, doxorubicina (tabela 8). Segundo o índice de classificação da NCI/EUA, o GI_{50} do milho roxo (que é a concentração necessária para que ocorra 50% da inibição do crescimento), foi de 1,8, que é considerado inativo (I) e o GI_{50} da doxorubicina foi de -0,5, considerado potente (P).

Tabela 8. Atividade média antiproliferativa do extrato nas linhagens tumorais (GI_{50}) em $\mu\text{g/mL}$.

	m	a	p	o	h	k	Mean log GI_{50}	q
Doxorubicina	0,044	6,7	0,092	0,27	0,26	0,31	-0,5 P	0,040
Milhoroxo	104,5	68,5	81,2	31,7	93,2	32,2	1,8 I	129,4

m: MCF-7 (mama); a: NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); p: PC-3 (próstata); o: OVCAR-3 (ovário); h: HT29 (colorretal); k: K562 (leucemia); q: HaCat (queratinócito humano imortalizado, linhagem não tumoral). GI_{50} : *Growth Inhibition 50*– concentração necessária para que ocorra 50% de inibição do crescimento ($\mu\text{g/mL}$). mean log GI_{50} : atividade média dos extratos, considerando-se as linhagens tumorais.

Alguns estudos com extratos de alimentos vegetais ricos em antocianinas demonstraram atividade antiproliferativa. A batata roxa apresentou atividade anti-proliferativa em estudo *in vitro* (MADIWALE et al., 2012) e *in vivo* (LIM et al., 2013); a aronia apresentou atividade anti-proliferativa em linhagens de células cervicais tumorais (RUGINA et al., 2012).

Outros trabalhos apresentaram boa atividade anti-proliferativa do milho roxo. A atividade anti-proliferativa pode depender dos métodos de avaliação e da linhagem de células tumorais empregadas. Long et al. (2013) reportou inibição da proliferação celular em linhagem tumoral de câncer de próstata, através da inibição do estágio G1 do ciclo celular; Fukamachi et al. (2008) citou a inibição da proliferação em células de câncer de mama: a nível celular, foi reduzido os níveis de proteína RAS (proteína importante no controle de multiplicação e diferenciação celular) em células tumorais. O milho roxo pode ter boa atividade anti-proliferativa dependendo das condições de extração e da linhagem tumoral utilizada.

5.2 Otimização da obtenção do extrato aquoso de milho roxo

Para obtenção de um extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta que é uma técnica estatística de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais. As extrações foram feitas em dois ensaios distintos e em cada um dos ensaios foram feitas quinze extrações de acordo com o planejamento experimental conforme apresentada no item 4.2.3. Observou-se que, conforme o pH do meio, o extrato mudou de cor. Isso se deve a estrutura da antocianina – mais estável e de coloração vermelha em pH ácido (extratos 5, 6, 9 e 10) e menos estável e de coloração roxo-azulada em pH neutro-básico (extrato 7, 8, 11 e 12). No pH 5,0, a coloração ainda é vermelha, porém menos intensa do que no pH 3,0 (figura 16).

Figura 16. Extratos preparados conforme planejamento experimental.

Como respostas para a metodologia, foram avaliadas a concentração de antocianinas monoméricas, concentração de ácido protocatecúico por CLAE-DAD e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC.

5.2.1 Concentração de antocianinas monoméricas – Resposta 1

Os quinze extratos, dos dois ensaios, foram submetidos à análise de concentração de antocianinas monoméricas através do método do pH diferencial. Verificou-se que a concentração de antocianinas monoméricas variou conforme o pH do meio e a temperatura no qual o extrato foi preparado (figura 17): nos extratos preparados em temperatura mais baixa (70°C) e pH ácido (pH 3,0), a concentração de antocianinas foi maior do que aqueles extratos preparados em temperatura elevada (120°C) e pH neutro (pH 7,0). Já os extratos com valores intermediários de temperatura e pH, a concentração de antocianinas monoméricas ficou próxima daquelas encontradas nos extratos preparados com valores mais baixos de temperatura e pH. Considerando todos os extratos, a concentração de antocianinas monoméricas variou de 13,03 à 52,27 mg cianidina 3-glucosídeo equivalente/L, sendo a menor concentração encontrada no extrato 8 (temperatura 120°C e pH 7,0) e a maior concentração encontrada no extrato 9 (temperatura 95°C e pH 3,0). Já foi reportado que as antocianinas são mais estáveis em meio ácido (LOPES et al., 2007).

Figura 17. Concentração de antocianinas monoméricas nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.

Para essa resposta, observou-se que apenas o pH foi fator significativo ($p < 0,05$) e causa influência na resposta (tabela 9); além disso, não houve interação significativa entre os

fatores ($p>0,05$). Como foram feitos dois ensaios, utilizou-se o efeito de blocagem para separá-los durante a análise e o bloco não foi significativo ($p>0,05$) (figura 18).

Tabela 9. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para antocianinas monoméricas.

Fatores	CR	p
Média	35,83700	0,000010
Bloco	-0,00033	0,999805
pH (L) (x3)	-8,86063	0,007291

CR = coeficiente de regressão. L = linear. Valores significativos para $p<0,05$.

Figura 18. Fator significativo na avaliação da concentração de antocianinas monoméricas.

O modelo é igual à equação abaixo, indicando que se ajusta a um modelo linear:

$$\hat{y} = 35,84 - 8,86x_3$$

onde $\hat{y}$ é igual a concentração de antocianinas monoméricas em mg de cianidina 3-glucosídeo eq./L.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função da resposta. Segundo os dados da tabela 10, a falta de ajuste (*lack-of-fit*) do modelo não foi significativa ($p>0,05$) indicando que o modelo está ajustado. Os graus de liberdade do erro puro são referentes aos pontos centrais, sendo 2 graus de liberdade do primeiro ensaio e 2 graus de liberdade do segundo ensaio.

Tabela 10. ANOVA da regressão utilizando resultados de antocianinas monoméricas.

Fatores	SQ	GL	QM	p	Observação
Bloco	0,000	1	0,000	0,999805	Não significativo
pH (L) (x3)	1256,171	1	1256,171	0,007291	Significativo
Falta de ajuste	1791,153	23	77,876	0,357628	Não significativo
Erro puro	197,498	4	49,487		
Total	3245,272	29			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio. Valores significativos para $p < 0,05$.

Através da superfície de resposta, é possível observar as combinações dos fatores e verificar o ponto ótimo da resposta pretendida; conforme há o deslocamento nas direções máxima ou mínima dos fatores, há mudança na resposta.

Para antocianinas monoméricas, como apenas o pH foi fator significativo, observou-se no gráfico de interação entre pH x temperatura ou pH x tempo (figura 19), que a resposta muda apenas quando o valor do pH é alterado. De acordo com o modelo, quanto menor o valor do pH, há maior concentração de antocianinas monoméricas (área vermelha no gráfico) e, quanto maior o valor do pH, há uma menor concentração (área verde no gráfico).

Figura 19. Superfície de resposta do modelo ajustado para antocianinas monoméricas.

Quando o modelo é utilizado para otimizar o extrato, a concentração de antocianinas monoméricas passa de 35,84 mg cianidina 3-glucosídeo eq./L (média dos ensaios) para 44,70 mg cianidina 3-glucosídeo eq./L (figura 20). Constatou-se que apenas o pH é significativo: quando há aumento do pH, ocorre queda na resposta final; os outros fatores, como não são

significativos, não interferem no valor final.

Figura 20. Valor otimizado previsto pelo modelo para concentração de antocianinas monoméricas.

5.2.2 Quantificação de ácido protocatecúico por CLAE – Resposta 2

O ácido protocatecúico é obtido através quebra da estrutura da antocianina pelo rompimento do seu anel central devido a mudança do pH do meio, oxidação, exposição à luz, alta temperatura, entre outros fatores. Nessa resposta foi avaliado o teor de ácido protocatecúico nos extratos obtidos através do planejamento experimental.

Os quinze extratos, dos dois ensaios, foram quantificados por CLAE quanto à concentração de ácido protocatecúico. Verificou-se que a concentração variou conforme o pH do meio e a temperatura no qual os extratos foram preparados (figura 21). Considerando todos os extratos, a concentração de ácido protocatecúico variou de 0,08 a 0,53 mg/100 mL, sendo as menores concentrações encontradas nos extratos 5 e 9 e as maiores concentrações encontradas nos extratos 8 e 12, contrariamente ao encontrado na resposta do teor de antocianinas monoméricas. Em comparação com os dados encontrados em antocianinas monoméricas, pode-se dizer que os níveis de ácido protocatecúico se elevam quando as antocianinas são expostas a elevadas temperaturas e maiores valores de pH (neutros e básicos), onde provavelmente ocorre maior degradação da estrutura através da abertura do anel central, podendo levar a formação de subprodutos. Nesse caso, os extratos com maior

concentração de ácido protocatecúico são aqueles que foram encontrados menor concentração de antocianinas e vice-versa. Já foi demonstrado em outros estudos que o meio básico pode degradar a estrutura das antocianinas pela quebra do anel central com formação de ácido protocatecúico e que a alta temperatura também pode levar a sua degradação.

Figura 21. Concentração de ácido protocatecúico por CLAE-DAD nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.

Para essa resposta, observou-se que todos os fatores foram significativos (temperatura, tempo e pH) e causam influência na resposta (tabela 11); houve interação significativa entre tempo x pH ($p < 0,05$). Na realização de dois ensaios, na análise estatística utilizou-se o efeito de bloco para separá-los e esse efeito não foi significativo ($p > 0,05$) (figura 22).

Tabela 11. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para antocianinas monoméricas.

Fatores	CR	p
Média	0,225162	0,000013
Bloco	-0,014492	0,171973
T°C (L) (x1)	0,060822	0,007021
Tempo (L) (x2)	0,084029	0,002149
pH (L) (x3)	0,087378	0,001858
Tempo x pH (L) (x2x3)	0,055620	0,030139

CR = coeficiente de regressão. L = linear. Valores significativos para $p < 0,05$.

Figura 22. Fatores em ordem de significância na avaliação da concentração de ácido protocatecúico.

O modelo é igual à equação abaixo, indicando que se ajusta a um modelo linear:

$$\hat{y} = 0,23 + 0,06x_1 + 0,08x_2 + 0,08x_3 + 0,05x_2x_3$$

onde $\hat{y}$ é igual a concentração em mg de ácido protocatecúico/g.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função da resposta. Segundo os dados da tabela 12, a falta de ajuste (*lack-of-fit*) do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) indicando que o modelo está ajustado. Os graus de liberdade do erro puro são referentes aos pontos centrais, sendo 2 graus de liberdade do primeiro ensaio e 2 graus de liberdade do segundo ensaio.

Tabela 12. ANOVA da regressão utilizando resultados de antocianinas monoméricas.

Fatores	SQ	GL	QM	p	Observação
Bloco	0,006301	1	0,006301	0,171073	Não significativo
T°C (L) (x1)	0,059190	1	0,059190	0,007021	Significativo
Tempo (L) (x2)	0,113055	1	0,113055	0,002149	Significativo
pH (L) (x3)	0,122158	1	0,122158	0,001858	Significativo
Tempo x pH (L) (x2x3)	0,024748	1	0,024748	0,030139	Significativo
Falta de ajuste	0,045133	20	0,002257	0,574951	Não significativo
Erro puro	0,009131	4	0,002283		
Total	0,379715	29			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio. Valores significativos para $p < 0,05$.

Na superfície de resposta para a concentração de ácido protocatecúico, observou-se no gráfico de interação entre tempo x pH que, quanto maior a temperatura, maior a concentração de ácido protocatecúico (área vermelha), sendo a maior concentração encontrada em temperatura igual a 120°C (figura 23). Nota-se, também, que além da temperatura estar no nível mais elevado, os outros fatores também estão com os valores nos níveis máximos para alcançar a maior concentração de ácido protocatecúico (tempo = 90 minutos e pH = 7,0).

Figura 23. Superfície de resposta do modelo ajustado para ácido protocatecúico.

Quando o modelo é utilizado para otimizar o extrato, a concentração de ácido protocatecúico passa de 0,23 mg/100 mL (média dos ensaios) para 0,50 mg/100 mL (figura 24). Como todos os fatores são significativos, todos influenciam na resposta final, com maior influencia do pH e tempo do que da temperatura na preparação do extrato.

Figura 24. Valor otimizado previsto pelo modelo para concentração de ácido protocatecúico.

5.2.3 Capacidade antioxidante

As antocianinas e outros compostos fenólicos tem se mostrado potentes agentes antioxidantes *in vitro* (HASSIMOTTO, 2005; RODRIGUES, 2009). A capacidade antioxidante desses compostos se deve a habilidade de doar um átomo de hidrogênio ou elétron (FERNANDEZ-PACHON et al., 2008). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser avaliada por vários métodos; nesse trabalho, os quinze extratos, dos dois ensaios, foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH e pelo método ORAC.

5.2.3.1 Capacidade antioxidante – método DPPH – Resposta 3

Observou-se que o maior valor de capacidade antioxidante analisada pelo método DPPH foi obtida aos extratos preparados nos pontos centrais dos níveis, ou seja, temperatura 95°C, tempo 50 minutos e pH 5,0 (figura 25). Considerando todos os extratos, a capacidade antioxidante variou de $36,74 \pm 4,5$ à $134,83 \pm 2,9$ $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$ de extrato, sendo o menor valor encontrada no extrato 11 (temperatura 95°C e pH 7,0) e o maior valor encontrada no extrato 14 (representa um dos extratos preparados no ponto central dos níveis).

Figura 25. Capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios.

Para essa resposta, observou-se que todos os fatores foram significativos (temperatura, tempo e pH) ($p < 0,05$) e causam influência na resposta (tabela 13), sendo o pH o fator mais significativo; não houve interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$). Como foram feitos dois ensaios, utilizou-se o efeito de blocagem para separá-los durante a análise e o bloco não foi significativo (figura 26).

Tabela 13. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para capacidade antioxidante pelo método DPPH.

Fatores	CR	p
Média	117,4287	0,000003
Bloco	-3,7880	0,053797
T°C (L) (x1)	9,4729	0,007813
T°C (Q) (x1)	-13,5842	0,008565
Tempo (L) (x2)	6,9863	0,021892
Tempo (Q) (x2)	-15,0257	0,005989
pH (L) (x3)	-10,2506	0,005900
pH (Q) (x3)	-34,9320	0,000245

CR = coeficiente de regressão. L = linear; Q = quadrático. Valores significativos para $p < 0,05$.

Figura 26. Fatores em ordem de significância na avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

O modelo é igual à equação abaixo, indicando que se ajusta a um modelo quadrático:

$$\hat{y} = 117,43 + 9,47x_1 - 13,5842x_1^2 + 6,99x_2 - 15,03x_2^2 - 10,25x_3 - 34,93x_3^2$$

onde $\hat{y}$ é igual a capacidade antioxidante em $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função da resposta. Segundo os dados da tabela 14, a falta de ajuste (*lack-of-fit*) do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) indicando que o modelo está ajustado. Os graus de liberdade do erro puro são referentes aos pontos centrais, sendo 2 graus de liberdade do primeiro ensaio e 2 graus de liberdade do segundo ensaio.

Tabela 14. ANOVA da regressão utilizando resultados de capacidade antioxidante pelo método DPPH.

Fatores	SQ	GL	QM	p	Observação
Bloco	430,48	1	430,475	0,053797	Não significativo
T°C (L)	1435,76	1	1435,760	0,007813	Significativo
T°C (Q)	1362,68	1	1362,678	0,008565	Significativo
Tempo (L)	780,93	1	780,929	0,021892	Significativo
Tempo (Q)	1667,23	1	1667,226	0,005989	Significativo
pH (L)	1681,21	1	1681,211	0,005900	Significativo
pH (Q)	9011,05	1	9011,051	0,000245	Significativo
Falta de ajuste	2305,21	18	128,067	0,235415	Não significativo
Erro puro	235,27	4	58,818		
Total	17759,86	29			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio. Valores significativos para $p < 0,05$.

Para a capacidade antioxidante dos extratos avaliada pelo método DPPH, como não há interação entre os fatores, observou-se na superfície de resposta a variação da capacidade antioxidante quando há alteração no valor do pH do extrato: de acordo com o modelo, conforme há aumento ou diminuição do pH, a capacidade antioxidante é alterada. Nessa resposta, a capacidade antioxidante é maior quando o pH do extrato é igual a 5,0 (figura 27).

Figura 27. Superfície de resposta do modelo ajustado para avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

A capacidade antioxidante média dos extratos é de 117,43 $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$; porém, para essa resposta, a otimização do modelo propõe capacidade antioxidante de 114,98 $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$ quando utiliza-se temperatura de 107,5°C, tempo 50 minutos e pH 5,0 (figura 28). Sugere-se então que a média dos valores dos extratos já esteja no seu valor máximo.

Figura 28. Valor otimizado previsto pelo modelo para capacidade antioxidante pelo método DPPH.

5.2.3.2 Capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC – Resposta 4

Observou-se que a maior capacidade antioxidante analisada pelo método ORAC foi atribuída ao extrato 8 (temperatura 120°C, pH 7,0, tempo 90 minutos), seguido dos extratos preparados nos pontos centrais dos níveis (temperatura 95°C, pH 5,0, tempo 50 minutos) (figura 29). Levando em consideração todos os extratos, a capacidade antioxidante variou de 225 ± 11 a 622 ± 7 $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$ de extrato.

Figura 29. Capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC nos quinze extratos aquosos de milho roxo.

Para essa resposta, observou-se que apenas o pH foi fator significativo ($p < 0,05$) e causa influência na resposta (tabela 15); não houve interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$). Como foram feitos dois ensaios, utilizou-se o efeito de blocagem para separá-los durante a análise e o bloco não foi significativo (figura 30).

Tabela 15. Coeficiente de regressão dos fatores analisados para capacidade antioxidante pelo método ORAC.

Fatores	CR	p
Média	385,5176	0,000004
Bloco	0,3508	0,975843
pH (L) (x3)	49,6934	0,029024

CR = coeficiente de regressão. L = linear. Valores significativos para $p < 0,05$.

Figura 30. Fator significativo na avaliação da concentração da capacidade antioxidante pelo método ORAC.

O modelo é igual à equação abaixo, indicando que se ajusta a um modelo linear:

$$\hat{y} = 385,52 + 49,69x_3$$

onde $\hat{y}$ é igual a capacidade antioxidante em $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função da resposta e, segundo os resultados obtidos (tabela 16), a falta de ajuste (*lack-of-fit*) do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) e os graus de liberdade do erro puro são referentes aos pontos centrais, sendo 2 graus de liberdade do primeiro ensaio e 2 graus de liberdade do segundo ensaio.

Tabela 16. ANOVA da regressão utilizando resultados de capacidade antioxidante pelo método ORAC.

Fatores	SQ	GL	QM	p	Observação
Bloco	3,7	1	3,69	0,975843	Não significativo
pH (L)	39511,0	1	39511,00	0,029024	Significativo
Falta de ajuste	135147,8	23	5875,99	0,337225	Não significativo
Erro puro	14226,7	4	3556,68		
Total	188889,2	29			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio. Valores significativos para $p < 0,05$.

Para a capacidade antioxidante dos extratos avaliada pelo método ORAC, apenas o pH foi fator significativo. Pode-se observar no gráfico de superfície de resposta a interação entre

pH x temperatura e pH x tempo, onde há variação da capacidade antioxidante quando há alteração no valor do pH do extrato. Nessa resposta, a capacidade antioxidante é maior quando o pH do extrato é igual a 7,0 (área vermelha do gráfico) (figura 31).

Figura 31. Superfície de resposta do modelo ajustado para avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC.

Quando o modelo é utilizado para otimizar o extrato, a capacidade antioxidante passa de 385,52 $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$ (média dos ensaios) para 435,56 $\mu\text{mol trolox eq./100 mL}$ (figura 32). Como apenas o pH é significativo, quando há aumento do pH, ocorre queda na resposta final; os outros fatores, como não são significativos, não interferem no valor final.

Figura 32. Valor otimizado previsto pelo modelo para capacidade antioxidante pelo método ORAC.

A tabela 17 mostra todas as respostas analisadas, com todos os valores previstos.

Tabela 17. Respostas avaliadas, melhores condições de obtenção e valores previstos.

Resposta	Melhores condições de obtenção	Modelo	Valor previsto
Antocianinas monoméricas	pH: 3,0	$\hat{y} = 35,84 - 8,86x_3$	44,69 ¹
Ácido protocatecúico	T°C: 120, tempo: 90 min, pH: 7,0	$\hat{y} = 0,23 + 0,06x_1 + 0,08x_2 + 0,08x_3 + 0,05x_2x_3$	0,50 ²
C.A. – DPPH	T°C: 107,5, tempo: 50 min, pH: 5,0	$\hat{y} = 117,43 + 9,47x_1 - 13,5842x_1^2 + 6,99x_2 - 15,03x_2^2 - 10,25x_3 - 34,93x_3^2$	115 ³
C.A. – ORAC	pH: 7,0	$\hat{y} = 385,52 + 49,69x_3$	435,56 ⁴

C.A.: capacidade antioxidante; $\hat{y}$: representa a concentração esperada para cada resposta. ¹ mg cianidina 3-glucosídeo eq./L. ² mg/100 mL. ^{3,4} μ mol trolox eq./100 mL.

5.2.4 Validação do modelo – obtenção do extrato aquoso rico em antocianinas (extrato aquoso otimizado) e extrato aquoso rico em APC

Sabe-se que a cianidina é a antocianina majoritária no milho roxo, e que se há degradação pela abertura do anel de sua estrutura, há formação de ácido protocatecúico. Através do planejamento experimental, foi possível observar que dependendo das condições do meio, pode haver maior ou menor concentração de antocianinas e maior ou menor concentração de ácido protocatecúico. Assim, foram validados dois extratos: um com maior concentração de antocianinas monoméricas e outro com maior concentração de ácido protocatecúico; os modelos para obtenção de tais extratos apresentaram condições opostas. A melhor condição de obtenção do extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas (extrato aquoso otimizado) se dá quando são utilizados o menor nível de pH, segundo o modelo proposto pela resposta onde é avaliada a concentração de antocianinas monoméricas e, para validação de tal modelo, a extração foi feita utilizando-se temperatura 70°C, tempo 10 minutos e pH 3,0. Já a melhor condição de obtenção do extrato aquoso de milho roxo rico em APC se dá quando são utilizados os maiores níveis das variáveis avaliadas, segundo o modelo proposto pela resposta onde é avaliada a concentração de APC e, para validação de tal modelo, a extração foi feita utilizando-se temperatura 120°C, tempo 90 minutos e pH 7,0 (tabela 18). Esses extratos também foram testados quanto a sua capacidade antioxidante.

Tabela 18. Validação do modelo para maximização de antocianinas monoméricas¹ e de ácido protocatecúico².

Resposta	Valor obtido	DPPH³	ORAC³
Antocianinas monoméricas	40,30 ¹	79,80	362,84
Ácido protocatecúico	0,57 ²	95,19	494,33

¹mg cianidina 3-glucosídeo eq./L; ² mg/100 mL; ³ μmol trolox eq./100 mL.

Essa validação indicou que os valores teóricos apresentados no modelo como valores previstos se mostraram verdadeiros através do ensaio.

Para a capacidade antioxidante do extrato aquoso otimizado, avaliado pelo método DPPH, o valor encontrado está dentro do esperado para estes níveis sendo que os demais extratos preparados em meio ácido estão na mesma faixa de valor; na avaliação pelo método ORAC, o valor encontrado para capacidade antioxidante também está dentro do esperado já

ficou na mesma faixa que os demais extratos. O mesmo foi observado para capacidade antioxidante do extrato aquoso rico em APC, avaliada também pelos métodos DPPH e ORAC: esse extrato obteve o mesmo desempenho dos demais extratos preparados nos níveis máximos, seguindo o mesmo padrão.

Segundo o exposto, o extrato aquoso com maior concentração de ácido protocatecúico apresentou maior capacidade antioxidante comparado ao extrato aquoso otimizado. O processo de extração do extrato rico em APC (aumento de temperatura e pH) pode ter formado compostos fenólicos que estavam em menores quantidades no extrato aquoso otimizado e esses compostos podem exercer capacidade antioxidante. Vedana et al. (2008) encontraram valores de capacidade antioxidante superior em extrato aquoso extraído a quente do que a frio; o que sugere que o aumento da temperatura e/ou do pH durante o processo de extração leva a destruição de antocianinas mas pode ocasionar a liberação de outros compostos com capacidade antioxidante.

5.2.5 Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)

O primeiro ensaio da atividade inibitória da ECA foi realizado com as o extrato metanólico do milho roxo: fração eluída com metanol, na concentração de 0,02 mg/mL de antocianinas totais, e fração eluída com metanol:amônia, na concentração de 0,026 mg/mL de antocianinas totais. As reações foram submetidas à análise por CLAE-DAD para verificar o valor da área do pico de ácido hipúrico formado, que é o produto da reação entre a ECA com o substrato HHL. Esses valores foram descontados dos brancos e comparados com o valor de ácido hipúrico formado do controle. O cálculo para encontrar a atividade inibitória da enzima foi realizado em porcentagem de inibição da enzima (figura 33).

Figura 33. Perfil de inibição da ECA (%) da fração metanol e metanol:amônia da extração do milho roxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (n=2). O controle indica 100% de inibição da enzima.

Foi observado que as frações metanol e metanol:amônia tiveram a capacidade de inibir a ação da enzima em valores próximos a 20%. Na fração metanol, há a presença de derivados de antocianinas (cianidina, pelargonidina e peonidina) além de outros flavonoides como a quercetina e isoramnetina, além do ácido protocatecúico; já na fração metanol:amônia, só foram eluídos derivados antociânicos. Apesar de compostos diferentes, a inibição da ECA das duas frações se mostrou semelhante. Valores semelhantes foram encontrados por Lacaille-Dubois, Franck e Wagner (2001), onde a fração metanólica de extrato de *Crataegus monogyna* (pilreiteiro, em português, uma espécie de espinheiro) contendo 0,33 mg/mL de flavonoides (Flavan-3-ol) e ácidos fenólicos mostrou inibição de 33% da ação ECA.

O ensaio da atividade inibitória da ECA utilizando o extrato aquoso otimizado foi realizado na concentração de 0,04 a 0,08 mg cianidina 3-glucosídeo eq./mL (figura 34).

Figura 34. Perfil de inibição da ECA (em %) em diferentes concentrações do extrato aquoso otimizado.

De acordo com os resultados, foi observado que, conforme o aumento da concentração de antocianinas monoméricas, houve aumento na porcentagem de inibição da ECA: na menor concentração houve 14% de inibição e na maior concentração houve 82% de inibição.

A determinação do valor de IC_{50} é obtido a partir da concentração mínima do extrato aquoso para inibir 50% da atividade da ECA. Para a construção da curva, o perfil de inibição foi avaliado nas cinco concentrações diferentes empregadas e, ao avaliar a regressão linear da curva das concentrações, conseguiu-se um coeficiente de regressão $R^2 = 0,99$ (figura 35); observou-se que a atividade da inibição da enzima aumentou conforme aumentou a concentração da amostra.

Figura 35. Relação entre a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações do extrato aquoso.

Dessa maneira, o perfil de inibição ficou mais evidente quando se concentrou o extrato para determinar o IC_{50} . Determinou-se que 50% de inibição da enzima, nessa faixa para esse extrato, pode ser alcançado com uma concentração de 0,06 mg/mL, ou 60 μ g cianidina 3-glucosídeo eq./mL. Os extratos obtidos através de extração em coluna de poliamida, fração metanol e metanol:amônia, deram perfil de inibição da ECA em torno de 20%, na concentração de cerca de 0,02 mg de antocianinas totais. Já o extrato aquoso otimizado, na menor concentração avaliada de 0,04 mg cianidina 3-glucosídeo eq/mL apresentou inibição na faixa de 14%.

Em outro trabalho de inibição da ECA, foi determinado que a concentração de extrato aquoso de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*) contendo antocianinas (delfinidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo) foi de 40 μ g/mL, e o lisinopril (medicamento anti-hipertensivo) apresentou IC_{50} na faixa de $1,2 \times 10^{-4}$ μ g/mL (Ojeda et al., 2010). Comparado ao extrato aquoso de vinagreira, o extrato aquoso otimizado obteve maior perfil de inibição; porém, é baixa atividade se comparado ao lisinopril.

5.3 Perfil das antocianinas – milho roxo VS extrato aquoso otimizado

A análise por CLAE-DAD mostra que o perfil cromatográfico do milho roxo e do extrato aquoso otimizado é semelhante, o que indica que a extração em fase aquosa se mostra eficiente para a maioria da antocianinas (figuras 36 e 37), com recuperação de 76% de antocianinas totais (tabela 19). No extrato aquoso, porém, foi encontrado dois picos (pico 3' e

pico 3''), não identificados, quantificados como equivalentes de cianidina 3-glucosídeo.

Figura 36. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (525 nm) de (A) milho roxo (B) extrato aquoso otimizado; fração eluída com metanol. Picos: (1 e 3) derivados de cianidina; (4) derivado de pelargonidina; (5) derivado de peonidina; (3' e 3'') não identificados. Picos com números iguais representam o mesmo composto.

Figura 37. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (525 nm) de (A) milho roxo (B) extrato aquoso otimizado; fração eluída com metanol:amônia. Picos: (11 e 14) derivado de cianidina acilada; (12) derivado de pelargonidina acilada; (13) derivado de peonidina acilada. Picos com números iguais representam o mesmo composto.

Tabela 19. Concentração de antocianinas totais, derivados de cianidina, pelargonidina e peonidina quantificadas por CLAE-DAD no milho roxo e no extrato aquoso.

	Milho roxo	Extrato aquoso	% Recuperação
Antocianinas totais (mg/g)	4,61	3,52	76
Derivados de cianidina (mg/g)	3,16 ± 0,12	2,75 ± 0,13	87
Derivados de pelargonidina (mg/g)	0,63 ± 0,05	0,33 ± 0,02	52
Derivados de peonidina (mg/g)	0,81 ± 0,04	0,43 ± 0,01	53

Na tabela 20, pode-se observar a diferença na composição do extrato aquoso em comparação ao perfil de antocianinas do milho roxo. Na comparação pico a pico dos compostos antociânicos quantificados no milho roxo e no extrato aquoso, observa-se os mesmos compostos em concentrações diferentes. A cianidina 3-glucosídeo e a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) são as antocianinas majoritárias encontradas no milho roxo e, consequentemente, no extrato aquoso.

Tabela 20. Concentração (mg/g) dos derivados de antocianinas no milho roxo e no extrato aquoso.

Pico	Composto proposto	Milho roxo	Extrato aquoso	%
1	Desconhecido (derivado de cianidina)	0,34 ± 0,01	0,41 ± 0,04	+ 21
2	Ácido protocatecúico	1,06 ± 0,28	0,31 ± 0,02	- 71
3	Cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*	1,42 ± 0,08	1,18 ± 0,10	- 17
3'	Desconhecido	n.d.	0,26 ± 0,02	---
3''	Desconhecido	n.d.	0,14 ± 0,02	---
4	Pelargonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*	0,24 ± 0,02	0,38 ± 0,07	+ 58
5	Peonidina 3- <i>O</i> -glucosídeo*	0,58 ± 0,05	0,30 ± 0,02	- 48
11''	Isômero do composto 11	0,35 ± 0,07	0,27 ± 0,03	- 23
11	Cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo)	0,90 ± 0,15	0,47 ± 0,08	- 48
12	Pelargonidina 3-(6''-malonilglucosídeo)	0,35 ± 0,07	0,20 ± 0,01	- 43
13	Peonidina 3-(6''-malonilglucosídeo)	0,22 ± 0,03	0,06 ± 0,01	- 73
14	Cianidina 3- <i>O</i> -glucosídeo-2-malonilglucosídeo	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,05	+ 38

n.d.: não detectado. % = sinal de “+” indica maior recuperação no extrato aquoso em relação ao milho roxo, sinal de “-” indica menor recuperação no extrato aquoso em relação ao milho roxo. *Identidade confirmada por comparação com o tempo de retenção de padrões.

Em geral, observa-se que as antocianinas aciladas apresentaram menor concentração em comparação à concentração da matéria prima. A menor recuperação dos picos de antocianina acilada podem estar associadas primeiramente a desacilação, com posterior quebra da estrutura química devido a fatores como calor ou mudança do pH do meio. Além disso, essa menor concentração pode ser pelo solvente utilizado para realizar a extração das antocianinas; Ju e Howard (2005) demonstraram que houve menor extração de antocianinas totais e outros compostos fenólicos quando foi utilizado meio aquoso comparado a extração metanólica, cerca de -43%.

A quebra da estrutura química da antocianina leva a formação de um aldeído e um ácido fenólico; esse ácido fenólico é diferente para cada antocianina. Em estudo com três antocianidinas (cianidina, malvidina e peonidina), Keppler e Humpf (2005) reportaram que o aldeído recorrente da quebra da estrutura dessas antocianidinas é o aldeído floroglucinol. Ainda no mesmo estudo, os autores reportaram que a quebra da cianidina, malvidina e peonidina leva a formação de ácido protocatecúico, ácido sirínico e ácido vanílico, respectivamente. A pelargonidina, quando sofre quebra na estrutura, leva a formação do ácido *p*-hidroxibenzóico (MOHSEN et al., 2006). Já a delphinidina, quando sofre quebra na estrutura, forma ácido gálico e a quebra da estrutura química da petunidina forma o ácido 3-*O*-metil gálico (FORESTER; WATERHOUSE, 2008).

Ou seja, poderia se esperar que nas condições experimentais possa ocorrer degradação química da estrutura de uma antocianina (acilada ou não), o que poderia acarretar em aumento na concentração da antocianina na sua forma glicosilada, na sua forma aglicona ou até mesmo aparição ou aumento dos respectivos ácidos fenólicos, decorrentes da quebra do anel central da antocianina.

A cianidina 3-glucosídeo e a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) apresentaram menores concentrações no extrato aquoso quando comparadas ao milho roxo, cerca de 17% e 48%, respectivamente. Em geral, espera-se o padrão de degradação esquematizado na figura 38: em determinadas condições, como as avaliadas nesse trabalho, a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) pode sofrer desacilação do grupamento malonil e formar a cianidina 3-glucosídeo, que por sua vez pode perder o grupamento açúcar e levar a formação da cianidina; esta pode sofrer abertura e consequente quebra do anel central de sua estrutura levando a formação de um ácido fenólico, neste caso, o ácido protocatecúico. Contudo, não foi observado elevação da concentração de cianidina 3-glucosídeo, tampouco foi encontrado a cianidina aglicona; o que levaria a formação de ácido protocatecúico.

No extrato aquoso, porém, foi observado que não houve elevação dos teores de ácido

protocatecúico; isso pode ser devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso ou ao método de extração. Entretanto, nos extratos obtidos durante planejamento experimental, pode-se observar que, conforme as condições do meio foram alteradas (temperatura, tempo e pH), a concentração de cianidina baixou e a concentração de ácido protocatecúico aumentou, indicando degradação.

Apesar da acilação aumentar a estabilidade da antocianina através de reações de copigmentação intramolecular (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2004; MERCADANTE; BOBBIO, 2008; REIN, 2005), a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) é menos estável quando comparada a antocianinas aciladas com ácidos fenólicos (CAO et al., 2009). Além disso, apesar da cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) e da cianidina 3-glucosídeo apresentarem menores concentrações, a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) apresentou maior porcentagem na queda desses compostos no extrato aquoso, o que pode sugerir que a cianidina 3-glucosídeo é mais estável do que a cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo); Cao et al. (2009) demonstraram que isso ocorre porque produtos de degradação provenientes da cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo) podem proteger a estrutura da cianidina 3-glucosídeo contra degradações. Considerando a acilação com ácidos não aromáticos, um grupo malonil pode ter ação de prevenção da estabilidade da cor acidificando o meio (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005).

Figura 38. Esquema de degradação da cianidina (Adaptado de SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006).

A peonidina 3-glucosídeo e a peonidina 3-(6''-malonilglucosídeo) foram encontradas em menores concentrações no extrato aquoso em relação ao milho roxo (-48% e -73%, respectivamente); na laranja vermelha essas antocianinas também foram relatadas como antocianinas minoritárias (PATRAS et al., 2010).

Assim como acontece com a cianidina, era esperado o padrão de degradação esquematizado na figura 39: a peonidina 3-(6''-malonilglucosídeo) pode sofrer desacilação do grupo malonil e formar a peonidina 3-glucosídeo; esta pode sofrer deglicosilação e levar a formação da peonidina, a qual pode perder sua integridade com a abertura do anel central levando a formação de ácido vanílico. Porém, não se observou aumento na concentração de peonidina 3-glucosídeo, também não foi encontrado peonidina aglicona.

Foi observado, contudo, a presença de ácido vanílico em todos os extratos obtidos a partir do delineamento experimental (figura 40) que não foi detectado no milho roxo. Sugere-se, então, que houve degradação da peonidina acilada e/ou da peonidina glicosilada.

Figura 39. Esquema de degradação da peonidina (Adaptado de SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006).

Figura 40. Concentração de ácido vanílico nos quinze extratos aquosos de milho roxo nos dois ensaios e no extrato aquoso otimizado.

A pelargonidina 3-glucosídeo e a pelargonidina 3-(6''-malonilglucosídeo) não

seguiram o mesmo padrão da cianidina e da peonidina. A pelargonidina 3-(6''-malonilglucosídeo) apresentou menor porcentagem de recuperação (-43%) em relação ao milho roxo, mas a pelargonidina 3-glucosídeo apresentou maior porcentagem (+58%).

O padrão de degradação da pelargonidina segue o mesmo padrão das demais antocianinas: a pelargonidina 3-(6''-malonilglucosídeo) sofre desacilação, dando forma a pelargonidina 3-glucosídeo, que pode sofrer deglicosilação e formar a pelargonidina; a pelargonidina pode sofrer abertura e consequente quebra do anel central de sua estrutura levando a formação de um ácido fenólico que, neste caso, é conhecido como ácido *p*-hidroxibenzóico (figura 41). Todavia, nesse caso em particular, não foi encontrado o ácido *p*-hidroxibenzóico em nenhum dos extratos obtidos através do delinamento experimental e nem no extrato aquoso otimizado; houve, porém, aumento da concentração de pelargonidina 3-glucosídeo. Isso pode ser explicado pela estrutura química da pelargonidina: a estabilidade da antocianidina é influenciada pelos substituintes no anel B – quanto menos substituintes (grupos hidroxila ou metoxila), maior é a sua estabilidade; como a pelargonidina tem apenas um substituinte, uma hidroxila, isso a torna menos reativa e consequentemente mais estável que as demais (MIGUEL, 2010).

Figura 41. Esquema de degradação da pelargonidina (Adaptado de SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006).

A estabilidade das antocianinas é dependente do meio onde se encontram. Sadilova, Stintzing e Carle (2006) observaram que após tratamento térmico a 95°C durante 3 horas, as antocianinas presentes no sabugueiro sofreram perda de 50%. Buckow et al. (2010) demonstraram que o tratamento térmico pode ocasionar perda de antocianinas em diferentes níveis, dependendo da temperatura e do tempo de exposição. Além da questão da temperatura e pH, considera-se também o efeito da copigmentação intramolecular quando trata-se de antocianinas aciladas, já que estas podem promover (ou seus produtos de degradação podem promover) maior estabilidade frente a mudança de temperatura e/ou pH. Giusti e Wrolstad (2003) reportaram que antocianinas aciladas com ácido cinâmico mostraram um deslocamento batocrômico na região UV-visível e um efeito hipercrômico foi demonstrado quando comparou-se uma pelargonidina acilada com seu derivado não acilado. Antocianinas aciladas são mais resistentes a hidratação da molécula (o que forma o carbinol) e assim mantêm maior estabilidade na cor quando há mudança do pH do meio. Além disso, são mais resistentes frente a exposição da luz (Inami et al., 1996). Antocianinas com derivados de ácido

cinâmico são capazes de formar isômeros da forma *trans* para *cis*, o que aparentemente aumenta a resistência a hidratação do íon flavílio (GEORGE et al., 2001).

Os dados apresentados mostraram que o milho roxo e seu extrato aquoso é fonte de antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas com grupamento malonil em menor quantidade. Através dos extratos obtidos pelo delinamento experimental e também através do extrato aquoso otimizado, pode-se observar o perfil de degradação das antocianinas presentes no milho roxo e determinar a melhor condição para se extrair a maior concentração possível de antocianinas em meio aquoso. As antocianinas seriam bons candidatos a substituição dos corantes artificiais pela sua pigmentação que varia em tons de vermelho, roxo e azul, devido a sua solubilidade em água (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005; MERCADANTE; BOBBIO, 2008). Além disso, pode-se observar que a atividade biológica de antocianinas também é dependente de sua estrutura, como visto na capacidade antioxidante, e que extratos com elevadas concentrações de ácidos fenólicos decorrentes da quebra de antocianinas apresentaram atividade biológica considerável. O presente modelo pode auxiliar na obtenção de soluções aquosas com altas concentrações de antocianinas sem comprometer a sua estrutura química, e assim garantir a estabilidade do pigmento antociânico.

6 CONCLUSÕES

Através do presente trabalho, é possível concluir que o milho roxo é uma excelente fonte de antocianinas, sendo os derivados de cianidina (cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-(6''-malonilglucosídeo)) os compostos majoritários.

As antocianinas presentes no milho roxo apresentaram boa capacidade antioxidante, assim como os compostos fenólicos oriundos de sua degradação; já para a atividade anti-proliferativa, não foram encontrados resultados positivos significativos na concentração analisada.

Durante o planejamento experimental, determinou-se que, dentre os fatores avaliados, o pH é o fator que mais influencia nas respostas analisadas. Para a preparação do extrato aquoso de milho roxo rico em antocianinas, foi validado o modelo da resposta de antocianinas monoméricas, onde o extrato foi obtido utilizando-se os menores níveis dos fatores avaliados. O extrato aquoso obtido mostrou-se um extrato rico em antocianinas; não foi detectado os ácidos fenólicos decorrentes da quebra da estrutura da peonidina e pelargonidina e não houve aumento do ácido protocatecúico.

O perfil de degradação das antocianinas reforça que são compostos instáveis e que se degradam facilmente na presença de calor ou mudança de pH, e que a pelargonidina é mais estável do que a cianidina e a peonidina devido a sua estrutura química.

REFERÊNCIAS

ALAM, M.A.; KAUTER, K.; BROWN, L. Naringin Improves Diet-Induced Cardiovascular Dysfunction and Obesity in High Carbohydrate, High Fat Diet-Fed Rats. *Nutrients*, v.5, p.637-650, 2013.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetables foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n.5, p.1124-1131, 2004.

ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. *Anais de Farmácia e Química de São Paulo*, v.20, p. 307-318, 1980.

BAKOWSKA-BARCZAK, A. Acylated anthocyanins are stable, natural food colorants – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v.14/55, n.2, p.107-116, 2005.

BALASURIYA, N.; RUPASINGHE, H.P.V. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2320-2325, 2012.

BEKING, K.; VIEIRA, A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.62, n.1, p.17-19, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v.28, p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n.11, p.317-333, 1998.

BRITO, E.S.; ARAÚJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.9389–9394, 2007.

BROWNMILLER, C.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L. Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Food Science*, v.73, n.5, p.H72-H79, 2008.

BUKCOW, R.; KASTELL, A.; TEREFE, N.S.; VERSTEEG, C. Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.10076-10084, 2010.

CANIATO, F.F.; GALVÃO, J.C.C.; FINGER, F.L.; RIBEIRO, R.A.; MIRANDA, G.V.; PUIATTI, M. Composição de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido nos grãos verdes de cultivares de milho na colheita. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.3, n.1, p.38-44, 2004.

CAO, S.; LIU, L.; PAN, S.; LU, Q.; XU, X. A Comparison of Two Determination Methods for Studying Degradation Kinetics of the Major Anthocyanins from Blood Orange. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.9389-9394, 2007.

CEVALLOS-CASALS, B.A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, v.57, p.245-249, 2009.

CHULAROJMONTRI, L.; GERDPRASERT, O.; WATTANAPITAYAKUL, K. Pummelo Protects Doxorubicin-Induced Cardiac Cell Death by Reducing Oxidative Stress, Modifying Glutathione Transferase Expression, and Preventing Cellular Senescence. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, v. 26, n.8, p.965-1096, 2009.

DE LA CRUZ, A.A.; HILBERT, G.; RIVIÈRE, C.; MENGIN, V.; OLLAT, N.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S.; DELAUNAY, J.C.; DELROT, S.; MÉRILLON, J.M.; MONTI, J.P.; GOMÈS, E.; RICHARD, T. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. Accessions by using LC-MS and LC-NMR. *Analytica Chimica Acta*, v.732, p.145-152, 2012.

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

FERNANDEZ-PACHON, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, p. 649-671, 2008.

FISCHER, A.U.; CARLE, R.; KAMMERER, D.R. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry*, v.138, p.1800-1809, 2013.

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G.; KULLING, S.E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, v.45, p.7-18, 2006.

FOUCHE, G.; CRAGG, GM.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p.455-461, 2008.

FORESTER, S.C.; WATERHOUSE, A.L. Identification of Cabernet Sauvignon Anthocyanin Gut Microflora Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 9299-9304, 2008.

FRACASSETTI, D.; DEL BO, C.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; KLIMIS-ZACAS, D.; CIAPPELLANO, S. Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, p.2999-3005, 2013.

FUKAMAKI, K.; IMADA, T.; OHSHIMA, Y.; XU, J.; TSUDA, H. Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Science*, v.99, n. 9, p.1841-1846, 2008.

GARCÍA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ARTÉS, F.; ROMERO, F.; ABELLÁN, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Colour and Anthocyanin Stability of Red Raspberry Jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.78, p.565-573, 1998.

GEORGE, F.; FIGUEIREDO, P.; TOKI, K.; TATSUZAWA, F.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. Influence of trans-cis isomerisation of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins. *Phytochemistry*, v.57, p.791-795, 2001.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p.217-225, 2003.

GUAN, S.; BAO, Y.M.; JIANG, B.; AN, L.J. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *European Journal of Pharmacology*, v.538, p.73-79, 2006.

HASSIMOTTO, N.M.A. *Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora silvestre (Morus sp.)*. São Paulo, 2005. 176p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research*, v.28, p. 198-207, 2008.

HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.91, p. 523-531, 2011.

HIEMORI, M.; KOH, E.; MITCHELL, A.E. Influence of Cooking on Anthocyanins in Black Rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.1908-1914, 2009.

ICHIKAWA, H.; ICHIYANAGI, T.; XU, B.; YOSHII, Y.; NAKAJIMA, M.; KONISHI, T. Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from Purple Black Rice. *Journal of Medicine Food*, v.4, n.4, p. 211-218, 2001.

INAMI, O.; TAMURA, I.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Stability of Anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.3090-3096, 1996.

IZZI, V.; MASUELLI, L.; TRESOLDI, I.; SACCHETTI, P.; MODESTI, A. GALVANO, F.; BEI, R. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Frontiers in Bioscience*, v.17, p.2396-2418, 2012.

JING, P.; BOMSER, J.A.; SCHWARTZ, S.J.; HE, J.; MAGNUSON, B.A.; GIUSTI, M.M. Structure-Function Relationships of Anthocyanins from Various Anthocyanin-Rich Extracts on the Inhibition of Colon Cancer Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.9391-9398, 2008.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Food Science*, v.70, n.4, p.S270-S276, 2005.

KAY, C.D.; KROON, P.A.; CASSIDY, A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.53, p.S92-S101, 2009.

KEPPLER, K.; HUMPF, H.U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p.5195-5205, 2005.

KIM, E.K.; KWON, K.B.; SONG, M.Y.; HAN, M.J.; LEE, J.H.; LEE, Y.R.; LEE, J.H.; RYU, D.G.; PARK, B.H.; PARK, J.W. Flavonoids Protect Against Cytokine-Induced Pancreatic A-Cell Damage Through Suppression of Nuclear Factor JB Activation. *Pancreas*, v. 35, n.4, 2007.

KONTA, E.M.; ALMEIDA, M.R.; AMARAL, C.L.; DARIN, J.D.C.; ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the Antihypertensive Properties of Yellow Passion Fruit Pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in Spontaneously Hypertensive Rats. *Phytotherapy Research*, 2013.

LACAILLE-DUBOIS, M.A; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, v.8, n.1., p.47-52, 2001.

LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, v. 118, p. 870-875, 2010.

LEE, J. DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the Ph Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, v.88, n.5, p.1269-1278, 2005.

LEE, C.H.; GARCIA, H.S.; PARKIN, K.L. Bioactivities of Kernel Extracts of 18 Strains of Maize (*Zea mays*). *Journal of Food Science*, v.75, n.8, p.C667-C672, 2010.

LIM, S.; XU, J.; KIM, J.; CHEN, T.Y.; SU, X.; STANDARD, J.; CAREY, E.; GRIFFIN, J.; HERNDON, B.; KATZ, B.; TOMICH, J.; WANG, W. Role of anthocyanin-enriched purple-fleshed sweet potato p40 in colorectal cancer prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.00, p.1-10, 2013.

LIMA, A.J.B.; CORRÊA, A.D.; SACZK, A.A.; MARTIINS, M.P.; CASTILHO, R.O. Anthocyanin, pigment stability and antioxidante activity in jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n. 3, p. 877-887, 2011.

LIU, Y.; SONG, X.; HAN, Y.; ZHOU, F.; ZHANG, D.; JI, B.; HU, J.; LV, Y.; CAI, S.; WEI, Y.; GAO, F.; JIA, X. Identification of Anthocyanin Components of Wild Chinese Blueberries and Amelioration of Light-Induced Retinal Damage in Pigmented Rabbit Using Whole Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p.356-363, 2011.

LONG, N.; SUZUKI, S.; SATO, S.; NAIKI-ITO, A.; SAKATANI, K.; SHIRAI, T.; TAKAHASHI, S. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell

growth pathways. *Cancer Science*, v.104, n.3, p.298-303, 2013.

LOPERA, Y.E.; FANTINELLI, J.; ARBELAÉZ, L.F.G; ROJANO, B.; RÍOS, J.L.; SCHINELLA, G.; MOSCA, S. Antioxidant Activity and Cardioprotective Effect of a Nonalcoholic Extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during Ischemia-Reperfusion in Rats. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013.

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADRI, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 13, n.3, p.291-297, 2007.

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

MADIWALE, G.P.; REDDIVARI, L.; STONE, M.; HOLM, D.G.; VANAMALA, J. Combined Effects of Storage and Processing on the Bioactive Compounds and Pro-Apoptotic Properties of Color-Fleshed Potatoes in Human Colon Cancer Cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 60, p. 11088-11096, 2012.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do CEPPA*, v.24, n.1, p.59-82, 2006.

MAINARD, J.A.; PURGATTO, E.; VIEIRA, A.; BASTOS, W.A.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.O.R.; LAJOLO, F.M. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of -1,4-glucanphosphorylase during banana ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.19, p. 7294-7299, 2006.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, p.727-747, 2004.

McGUIE, T.K.; WALTON, M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.702-713, 2007.

MERCADANTE, A.Z.; BOBBIO, F.O. Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicochemical Properties. In: SOCACIU, C. *Food Colorants: Chemical and Funcional Properties*, CRC Press, 2008, cap. 4.3, p.241-276.

MIGUEL, M.G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.6, p.07-15, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2007.

MOHSEN, M.A.E.; MARKS, J.; KUHNLE, G.; MOORE, K.; DEBNAM, E.; SRAI, S.K.; RICE-EVANS, C.; SPENCER, J.P.E. Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *British Journal of Nutrition*, v.95, p.51–58, 2006.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v.83, p.757-766, 1991.

NEUHOUSER, M.L. Review: Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence From Human Population Studies. *Nutrition and Cancer*, v.50, n.1, p. 1-7, 2004.

OJEDA, D.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; HERRERA-ARELLANO, A.; TORTORIELLO, J.; ALVAREZ, L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p.7-10, 2010.

PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. *Journal of Food Science*, v. 40, p.1047-1049, 1975 *apud* MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do CEPPA*, v.24, n.1, p.59-82, 2006.

PAPPAS, E.; SCHAICH, K.M. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 49, p.741-781, 2009.

PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. LC–MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.82, p. 1003-1006, 2002.

PASKO, P.; BARTON, H.; ZAGRODZKI, P.; GORINSTEIN, S.; FOLTA, M.; ZACHWIEJA, Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, v. 115, p. 994,998, 2009.

PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B.K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p.3-11, 2010.

PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; TIWARI, B.K. Stability and Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Colour in Strawberry Jam during Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 2009.

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

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.

POZO-BAYÓN, M.A.; ALCAÍDE, J.M.; POLO, M.C.; PUEYO, E. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines. *Food Chemistry*, v.100, p. 43-47, 2007.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D. OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 21, n. 51, p.3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, v.40, n.10, p. 1014-1028, 2006.

RAMOS-ESCUADERO, F.; MUÑOZ, A.M.; ALVARADO-ORTÍZ, C.; ALVARADO, A.; YÁÑES, J.A. Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *Journal of Medicinal Food*, v.15, n.2, p.206-215, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M. *Rang & Dale farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; BELTRÁN, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, v.847, p.83–90, 1999.

RANILLA, L.G.; APOSTOLIDIS, E.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.; SHETTY, K.

Evaluation of Indigenous Grains from the Peruvian Andean Region for Antidiabetes and Antihypertension Potential Using In Vitro Methods. *Journal of Medicinal Food*, v.12, n.4, p.704-713, 2009.

REIN, M. *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki, 2005. 87p. Academic Dissertation – Department of Applied Chemistry and Microbiology – University of Helsinki.

RODRIGUES, E. *Atividade antioxidante in vitro e perfil fenólico de cultivares de mirtilo (Vaccinium sp.) produzidas no Brasil*. Florianópolis, 2009. 86p. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p.19-34, 2002.

RUGINA, D.; SCONTA, Z.; LEOPOLD, L.; PINTEA, A.; BUNEA, A.; SOCACIU, C. Antioxidant Activities of Chokeberry Extracts and the Cytotoxic Action of Their Anthocyanin Fraction on HeLa Human Cervical Tumor Cells. *Journal of Medicinal Food*, v.15, n.8, p.700-706, 2012.

SADILOVA, E.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *Journal of Food Science*, v.71, n.8, p.504-512, 2006.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p. 287-306, 2005.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.18, p.567-579, 2007.

SHIH, P.H.; YEH, C.T.; YEN, G.C. Anthocyanins Induce the Activation of Phase II Enzymes through the Antioxidant Response Element Pathway against Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9427–9435, 2007

SILVA, F.L.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J.; SANTOS-BUELGA, C. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, v.214, p.248-253, 2002.

SILVA, P.F.; PAULO, L.; BARBAFINA, A.; ELISEI, F.; QUINA, F.H.; MAÇANITA, A.L.

Photoprotection and the Photophysics of Acylated Anthocyanins. *Chemistry European Journal*, v.18, p.3736-3744, 2012.

SINGLETERY, K.W.; JUNG, K.J.; GIUSTI, M. Anthocyanin-Rich Grape Extract Blocks Breast Cell DNA Damage. *Journal of Medicinal Food*, v.10, n.2, p. 244-251, 2007.

SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VAGEN, I.M. Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p.10067-10080, 2007.

SONG, B.J.; SAPPER, T.N.; BURTCH, C.E.; BRIMMER, K.; GOLDSCHMIDT, M.; FERRUZZI, M.G. Photo- and Thermodegradation of Anthocyanins from Grape and Purple Sweet Potato in Model Beverage Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, p.1364-1372, 2013.

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.7449-7454, 2002.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. – The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.10, p.63-68, 1959.

VAMANU, E.; NITA, S. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013.

VITAGLIONE, P.; DONNARUMMA, G.; NAPOLITANO, A.; GALVANO, F.; GALLO, A.; SCALFI, L.; FOGLIANO, V. Protocatechuic Acid Is the Major Human Metabolite of Cyanidin-Glucosides. *The Journal of Nutrition*, p.2043-2048, 2007.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.45, p.304-309, 1997.

YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.59, p.113-122, 2004.

YAO, Y.; SANG, W.; ZHOU, M.; REN, G. Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activity of Colored Grains in China. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.58, p.700-774, 2010.

YU, L.; CHEN, C.; WANG, L.F.; KUANG, X.; LIU, K.; ZHANG, H.; DU, J.R. Neuroprotective Effect of Kaempferol Glycosides against Brain Injury and Neuroinflammation by Inhibiting the Activation of NF- κ B and STAT3 in Transient Focal Stroke. *Plos One*, v.8, 2013.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M. CHATTERJEE, A.; VINSON, J.A.; BAGCHI, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.675-683, 2007.

ZAMORA-ROS, R.; ANDRES-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; BERENGUER, T.; JAKSZYN, P.; BARRICARTE, A.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; DORRONSORO, M.; LARRANAGA, N.; MARTÍNEZ, C.; SÁNCHEZ, M.J.; NAVARRO, C.; CHIRLAQUE, M.D.; TORMO, M.J.; QUIRÓS, R.; GONZÁLES, C.A. Estimation of Dietary Sources and Flavonoid Intake in a Spanish Adult Population (EPIC-Spain). *Journal of the American Dietetic Association*, v.110, n.3, p. 390-398, 2010.

ZEOULA, L.M.; MARTINS, A.S.; PRADO, I.N.; ALCADE, C.R.; BRANCO, A.F.; SANTOS, G.T. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, n.5, p.898-905, 1999.

ZHAO, X.; CORRALES, M.; ZHANG, C.; HU, X.; MA, Y.; TAUSCHER, B. Composition and Thermal Stability of Anthocyanins from Chinese Purple Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.10761-10766, 2008.

ZHANG, C.; MA, Y.; ZHAO, X.; MU, J. Influence of Copigmentation on Stability of Anthocyanins from Purple Potato Peel in Both Liquid State and Solid State. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.9503-9508, 2009.

ZIKRI, N.N.; RIEDL, K.M.; WANG, L.S.; LECHNER, J.; SCHWARTZ, S.J.; STONER, D.G. Black Raspberry Components Inhibit Proliferation, Induce Apoptosis, and Modulate Gene Expression in Rat Esophageal Epithelial Cells. *Nutrition and Cancer*, v.61, n.6, p. 816-826, 2009.

ZILÍC, S.; SERPEN, A.; AKILLIOGLU, G.; GOKMEN, V.; VANCETOVIC, J. Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.1224-1231, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Espectros de massas (MS) dos flavonoides eluídos na fração metanol e metanol:amônia;

MS – fração metanol

MS – fração metanol:amônia

Espectros de massas das antocianinas (MS²)

Espectros de massas dos demais flavonoides (MS²)

ANEXO B - Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 525 nm) dos padrões cianidina-3-glucosídeo, pelargonidina-3-glucosídeo e peonidina-3-glucosídeo.

ANEXO C - Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 270 nm) dos padrões ácido protocatecúico, quercetina 3-glucosídeo e quercetina 3-rutinosídeo.