https://eventos.utfpr.edu.br//sicite/

Antioxidantes, antocianinas, flavonoides amarelos e fenóis totais de variedades de milho pipoca

Antioxidants, anthocyanins, yellow flavonoids and total phenols of popcorn varieties

Amanda Fernanda de Oliveira
amandao@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Lilian Tatiani Dusman Tonin
liliandusman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

RESUMO

O milho é um cereal importante para a saúde humana devido as suas propriedades antioxidantes e biológicas associadas aos compostos bioativos presentes em sua composição. O presente trabalho teve como objetivo realizar análises quantitativas referentes a atividade antioxidante e compostos bioativos (flavonoides amarelos, antocianinas e fenóis totais) em oito variedades de milho pipoca, codificadas de T1 a T8. As análises de atividade antioxidante foram realizadas pelo método do sequestro do radical DPPH e habilidade quelante de Fe^{2+}, os resultados revelaram que a amostra T1 apresentou o maior percentual de atividade (30%), e as variedades T1, T5 e T6 apresentaram o maior percentual da atividade (superior a 91%), para os dois métodos, respectivamente. Para os flavonoides amarelos e antocianinas, os maiores valores foram encontrados para as amostras T5, T6, T7 e T8, não havendo diferença significativa entre os valores. A análise dos fenóis totais realizada com o reagente Folin ciocalteau revelou que o maior valor foi encontrado para a variedade T8 (184,78 mg $100g^{-1}$). Os resultados obtidos demonstram a presença de compostos bioativos e o potencial antioxidante destas variedades de milho, sendo importante disseminar seu consumo como alimento funcional.

PALAVRAS-CHAVE: Extração. Compostos bioativos. Radicais livres.

ABSTRACT

Corn is an important cereal for human health due to its antioxidant and biological properties associated with the bioactive compounds present in its composition. The present work aimed to perform quantitative analyzes concerning antioxidant activity and bioactive compounds (yellow flavonoids, anthocyanins and total phenols) in eight popcorn varieties, coded from T1 to T8. Antioxidant activity analyzes were performed by the DPPH radical sequestration method and Fe^{2+} chelating ability. The results revealed that the T1 sample presented the highest percentage of activity (30%), and the T1, T5 and T6 varieties presented the highest percentage. (greater than 91%) for both methods, respectively. For yellow flavonoids and anthocyanins, the highest values were found for samples T5, T6, T7 and T8, with no significant difference between the values. Analysis of total phenols with folin ciocalteau reagent revealed that the highest value was found for the T8 variety (184.78 mg $100g^{-1}$). The results show the presence of bioactive compounds and the antioxidant potential of these maize varieties, being important to disseminate their consumption as a functional food.

KEYWORDS: Extraction. Bioactive compounds. Free radicals.

INTRODUÇÃO

O milho pipoca é um alimento muito apreciado por várias pessoas ao redor do mundo (Souza, 2016). Muita atenção tem sido dada aos compostos bioativos, especialmente para aqueles com alto teor de antioxidantes capazes de prevenir e/ou aliviar as dores de muitas doenças crônicas não transmissíveis resultantes da ação de radicais livres, como cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, inflamações e o envelhecimento (You et al., 2011).

Os antioxidantes são substâncias que ajudam o organismo a inibir ou retardar as ações dos radicais livres, dessa forma, desempenha o papel de proteger as células sadias do nosso organismo, prevenindo doenças e combatendo o envelhecimento precoce (Halliwell et al., 1995).

Os compostos bioativos são substâncias presentes nos alimentos que contribuem para o bom funcionamento dos órgãos e até mesmo para a prevenção de doenças. Dentro desse grupo podemos citar os compostos fenólicos, que possuem ação antioxidante que combatem os radicais livres; as antocianinas, que após a clorofila, pertencem ao mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal, além de proporcionar coloração aos alimentos possuem funções como ação antioxidante, mecanismo de defesa, proteção à ação da luz e função biológica; os flavonoides amarelos pertencem ao grupo dos polifenóis sendo considerado um pigmento natural, são responsáveis pela coloração amarela dos alimentos e possui ampla ação biológica mas sua ação mais importante é a antioxidante (Harborne et al., 1988).

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise quantitativa em diferentes variedades de milho pipoca (T1 a T8), referente ao teor de antocianinas, flavonoides amarelos, fenóis totais e atividade antioxidante, pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e habilidade quelante.

MATERIAL E MÉTODOS

PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados em duplicata com 100 mL de etanol:água 70:30 e 1,0 g do milho pipoca triturado (variedades T1 a T8), permanecendo em agitação magnética, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por quatro horas. Os extratos foram filtrados com papel filtro para um balão volumétrico de 100 mL tendo seus volumes ajustados com o solvente apropriado.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

O método de sequestro do radical DPPH baseia-se na transferência de elétrons pela ação de um antioxidante ao radical DPPH, que possui coloração púrpura e quando reduzido a difenil-picril-hidrazina, passa para a coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos utilizou-se uma solução 137 µM de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) em metanol. Em uma cubeta adicionou-se 2,0 mL da solução do radical DPPH e 1,0 mL de extrato. Um controle foi conduzido substituindo o extrato por 1,0 mL de metanol. Um branco para cada

extrato foi preparado substituindo o radical DPPH por 2,0 mL de metanol. A seguir foram realizadas as leituras a cada um minuto em espectrofotômetro Agilent Tecnologies, modelo Cary 60 UV-VIS à 517 nm, durante meia hora (Brand-Williams et al., 1995, Miliauskas et al., 2004). A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle (AA%), de acordo com a eq. (1), na qual (Ac) representa a absorbância do controle, (Ab) a absorbância do branco de cada extrato e (Aa) representa a absorbância da amostra.

$$AA = \frac{Ac-(Aa-Ab)}{Ac} \quad (1)$$

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA HABILIDADE QUELANTE

A habilidade quelante das amostras está relacionada com a porcentagem de inibição de formação do íon complexo $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$, pois quanto maior for esta inibição, maior será a competição em formar complexos estáveis com Fe^{2+}, imobilizando-o e resultando em um decréscimo na intensidade da cor rosa do íon complexo $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$.

Inicialmente foram preparadas as soluções aquosas de $FeCl_2.4H_2O$ 2 mmol L^{-1}, aquosa de ferrozina 5 mmol L^{-1} e aquosa de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 50 µmol L^{-1}. Todas as soluções foram preparadas e mantidas ao abrigo da luz. Iniciou-se a análise pela adição de 3,7 mL da amostra em um tubo de ensaio e 0,1 mL de $FeCl_2$ e fez-se a leitura da absorbância em 562 nm, que representa a absorbância da solução da amostra (A_0). Após a primeira leitura da absorbância, a reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de ferrozina seguida de agitação vigorosa por 1 minuto e nova leitura da absorbância em 562 nm (A_1) após 10 minutos de repouso. Para controle positivo, utilizou-se uma solução de EDTA que foi utilizada no lugar da amostra. Foi medida a absorbância (A_{branco}) de uma solução contendo 3,7 mL do solvente utilizado para preparar a solução com a amostra e os demais reagentes, inclusive a ferrrozina, que representou a absorbância inicial do íon complexo $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$, seguindo a metodologia de Boroski *et al.* (2015). A habilidade quelante da amostra foi determinada pela eq. (2), na qual A_{branco} é a absorbância inicial do complexo $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$, A_0 é a absorbância da solução da amostra e A_1 é a absorbância do íon complexo $[Fe^{2+}(ferrozina)_3]^{2+}$ na presença da amostra.

$$\% \text{ habilidade quelante} = \{ [A_{branco} - (A_1-A_0)] / A_{branco} \}x100 \quad (2)$$

ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES AMARELOS

A determinação das antocianinas totais e flavonoides amarelos foi realizada segundo a metodologia de Francis *et al.* (1982). Para a extração, pesou-se 1,0 g de cada amostra de milho (T1 a T8) em duplicata, sendo a eles adicionados 50 mL da solução extratora: etanol 95% e HCl 1,5M (85:15), seguido de agitação magnética por dois minutos. As amostras foram armazenadas em refrigeração por 16 horas ao abrigo da luz e filtradas para um balão volumétrico de 100 mL, tendo seus volumes ajustados com a solução extratora. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Agile Tecnologies, modelo Cary 60 UV-VIS, à 535 nm para

antocianinas e 374 nm para flavonoides amarelos e os resultados foram expressos em mg 100 g^{-1} de amostra. Os cálculos foram realizados segundo as eq. (3) e (4), na qual o valor de fator de diluição utilizado foi de 10.000:

$$Antocianinas\ totais = \frac{Fatordediluição * Absorbância}{98{,}2} \quad (3)$$

$$Flavonoides = \frac{Fatordediluição * Absorbância}{76{,}6} \quad (4)$$

FENÓIS TOTAIS

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteau, que consiste em uma solução de íons complexos formados a partir de heteropoliácidos, fosfomolbdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul. Isso acontece porque o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^{+}, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras.

Os fenóis totais dos extratos preparados com etanol 70%, foram determinados usando o reagente Folin-Ciocalteau de acordo com a metodologia descrita por Xu e Chang (2009). Foram adicionados 2,0 mL do extrato, 5,0 mL de água e 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteau a um tubo de ensaio envolto em papel alumínio. Agitou-se, utilizando o agitador de tubos tipo vortex e, após 3 minutos, foram adicionados 1,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 4%, agitando o tubo no vortex. Um controle foi conduzido substituindo a amostra por 2,0 mL de etanol e um branco para cada extrato foi preparado, substituindo o reagente Folin-Ciocalteau por 2,0 mL de etanol. Após uma hora mantendo os tubos no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Agile Tecnologies, modelo Cary 60 UV-VIS, à 760 nm, em triplicata. Para a quantificação dos fenóis totais, foi construída uma curva de calibração com uma solução aquosa de ácido gálico. As concentrações escolhidas foram de 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 5,0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μg mL^{-1}. O mesmo procedimento realizado com os extratos foi aplicado aos pontos da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg EAG 100 g^{-1} de amostra, onde EAG representa o equivalente em ácido gálico.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 é apresentado o percentual de atividade antioxidante obtido para cada amostra através dos métodos do sequestro do radical livre DPPH e habilidade quelante. A variedade T1 apresentou maior atividade antioxidante, sequestrando 30% do radical DPPH na concentração testada, seguida das amostras T2 (26%) e T5 (23%). A variedade T4 foi a que apresentou menor poder antioxidante frente o radical (11%).

Tabela 1 – Percentual de inibição do radical DPPH e habilidade quelante para as variedades de milho pipoca T1 a T8

Variedade	%AA (DPPH)	% Habilidade quelante
T1	30,05 ± 0,75^{a}	94,80 ± 0,13^{a}
T2	26,56 ± 0,36^{b}	81,12 ± 0,28^{b}
T3	20,21 ± 0,08^{d}	57,21 ± 0,86^{c}
T4	11,57 ± 0,38^{f}	79,23 ± 0,70^{b}
T5	23,72 ± 0,61^{c}	94,82± 1,96^{a}
T6	19,59 ± 0,27^{d,e}	91,95± 0,19^{a}
T7	17,38 ± 0,31^{e}	24,50 ± 0,93^{d}
T8	20,10 ± 0,55^{d}	21,38 ± 0,14^{d}

Fonte: Autoria própria (2019)
Resultados expressos como média ± desvio padrão
Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

De acordo com os resultados obtidos as variedades T1, T5 e T6 foram as que apresentaram a maior percentual da atividade antioxidante por este método (superior a 91%) , não apresentando diferenças significativas entre seus valores.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para os compostos bioativos antocianinas, flavonoides amarelos e fenólicos totais para as variedades de milho T1 a T8. As amostras T5, T6, T7 e T8 apresentaram as maiores quantidades de antocianinas e flavonoides amarelos, não havendo diferença significativa entre seus valores.

Tabela 2 – Antocianinas, Flavonoides amarelos e Fenóis Totais para as variedades T1 a T8

Variedade	Antocianinas mg 100 g^{-1}	Flv amarelos mg 100 g^{-1}	Fenóis Totais mg EAG 100 g^{-1}
T1	15,78 ± 0,40 ^{b}	53,08 ± 1,83 $^{b, c}$	173,57 ± 2,66 ^{b}
T2	17,10 ± 0,65 ^{b}	49,49 ± 1,82 $^{b, c}$	98,12 ± 3,59 ^{e}
T3	11,77 ± 0,19 ^{c}	38,73 ± 0,76 ^{c}	95,06 ± 2,57 ^{e}
T4	17,05 ± 1,07 ^{b}	48, 85 ± 2,52 $^{b, c}$	94,76 ± 2,27 ^{e}
T5	25,78 ± 0,55 ^{a}	72,26 ± 1,50 ^{a}	114,28 ± 1,02 ^{d}
T6	24,07 ± 0,38 ^{a}	72,24 ± 2,11 ^{a}	143,47 ± 1,54 ^{c}
T7	26,31 ± 0,98 ^{a}	75,32 ± 3,52 ^{a}	152,23 ± 0,42 ^{c}
T8	26,82 ± 0,71 ^{a}	74,04 ± 2,70 ^{a}	184,78 ± 1,14 ^{a}

Fonte: Autoria própria (2019)
Resultados expressos como média ± desvio padrão
Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

O conteúdo de fenóis totais dos extratos foi calculado utilizando a equação da reta obtida para o ácido gálico obtida através da curva de calibração ($y = 0,0112x – 0,0324$; $R^2 = 0,992$). De acordo com os resultados obtidos o maior valor de fenóis totais foi encontrado para a amostra T8 (184,78 mg EAG 100 g^{-1}).

A partir dos resultados é possível observar uma correlação positiva, para as amostras T5 e T6, entre a atividade antioxidante (encontrada pelo método da

habilidade quelante) e o teor de antocianinas e flavonoides amarelos, o que significa que estes compostos bioativos contribuíram significativamente na capacidade antioxidante do grão para estas amostras. A amostra T1 apresentou correlação positiva entre o teor de fenóis totais e potencial antioxidante frente os dois métodos testados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as oito variedades de milho demonstram a presença de compostos bioativos e o potencial antioxidante destas amostras, sendo importante disseminar seu consumo como alimento funcional.

REFERÊNCIAS

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT-Food science and Technology, p. 25-30.

FRANCIS, F. J. **Analysis of anthocyanins**. In: MARKAKIS, P. (ed.) Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, p. 181-207, 1982.

HALLIWEL, B; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. **Food and Chemical Toxicology**, 33, 1995, 601.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J**.,** The anthocyanins**. In: The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapmam & Hall, London, p. 1-20, 1988.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

SOUZA, R. **A origem do milho pipoca**. Disponível em: http://historiadomundo.uol.com.br/curiosidades/aorigem-da-pipoca.htm. Acesso em: 11 de setembro de 2019.

XU, B.; CHANG, S. K. **Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (Phaseolus vulgaris L.) as affected by thermal processing**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009.

YOU, Q.; WANG, B.; CHEN, F.; HUANG, Z.; WANG, X.; LUO, P. G. **Comparasion of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars.** Food Chemistry, Barking, v. 125, n.1, p. 201-208, 2011.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - câmpus Apucarana pelo apoio e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa.