

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE GRÃO E CASCA DO SORGO GRANÍFERO
[*SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH] HÍBRIDO GUANIPA 71**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Gerson J. Torres Salazar

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nilda Berenice de Vargas Barbosa

Santa Maria, RS

2016

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE GRÃO E CASCA DO SORGO GRANÍFERO
[*SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH] HÍBRIDO GUANIPA 71**

Gerson Javier Torres Salazar

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológica: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nilda Berenice de Vargas Barbosa

Santa Maria, RS

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Torres Salazar, Gerson Javier

Avaliação in vitro do Potencial Antioxidante de extratos de Grão e Casca do Sorgo Granífero [Sorghum Bicolor (L.) Moench] Híbrido Guanipa 71 / Gerson Javier Torres Salazar.-2016.

58 p.; 30cm

Orientador: Nilda Berenice de Vargas Barbosa

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Sorgo granífero 2. Ácidos fenólicos 3. Flavonóides 4. Taninos 5. Atividade antioxidante I. de Vargas Barbosa, Nilda Berenice II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Bioquímica Toxicológica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DE GRÃO E CASCA DO SORGO GRANÍFERO
[*SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH] HÍBRIDO GUANIPA 71**

Elaborada por

Gerson Javier Torres Salazar

Como requisito básico para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Biológica: Bioquímica Toxicológica

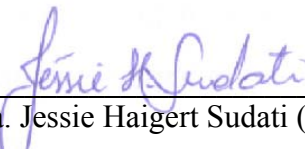
COMISSÃO ORGANIZADORA:



Prof.^a Dr.^a Nilda Berenice de Vargas Barbosa
(Presidente/Orientadora)



Prof. Dr. Felix Soares Antunes (UFSM)



Prof. Dra. Jessie Haigert Sudati (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS, 12 de fevereiro de 2016

Ouvirá o sábio, e aumentará o saber, e o entendido adquirirá conselho.
Prov. de Salomón 1:5

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que desde antes da criação do mundo ele me pensou e deu-me o dom da vida e pelo sustento espiritual e físico constante manifestado de múltiplas formas fazendo com que eu tenha a certeza de nunca estar sozinho.

Agradeço imensamente à minha mãe Gloria Del Carmen Salazar de Torres e a meu pai José Cipriano Torres Urbano por todo amor, carinho, apoio, e orientação que sempre me deram mesmo quando fique perto deles e mais ainda de longe, suas ligações desde a distância na Venezuela foi o combustível ideal para eu continuar no transitar de meus estudos no Brasil; as comunicações constantes com meus irmãos, irmãs, sobrinhos, sobrinhas, e amigos que por mais simples que pareceram também vieram a formar parte deste combustível que me permitiu ter a energia e segurança de que no caminho todo fazia parte de um processo de aprendizado que me faria uma mais forte e melhor pessoa, e como valor agregado uma formação como mestre que saberei usar para o benefício de meus próximos, todos estes fatores foram fundamental para eu chegar até aqui.

Quero agradecer de forma especial à minha orientadora Prof.^a Nilda por todos os ensinamentos, pela compreensão, disponibilidade, confiança e apoio.

Também gostaria de agradecer ao Prof. João Batista pela oportunidade de me permitir trabalhar em seu laboratório, e por todas suas oportunas orientações.

Muito obrigado a minha namorada Sandra Mara Pimentel Duavy pelo seu continuo apoio e mais além em meus ruins momentos que teve que atravessar durante a pesquisa.

Muito obrigado a todos os colegas de laboratório que souberam me acolher como amigo e como mais um do grupo de pesquisa, em especial muito abrigado a Assis Ecker por seu apoio muito além das atividades relacionadas às pesquisas laboratoriais.

Agradeço à Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) pelo seu apoio e bolsa de estudos durante todo o curso.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO.....	VI
LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO.....	VI
LISTA DE IMÁGENES DO MANUSCRITO.....	VII
LISTA DE QUADROS DA DISSERTAÇÃO.....	VII
LISTA DE QUADROS DO MANUSCRITO.....	VII
LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
APRESENTAÇÃO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS GERAL e ESPECÍFICOS.....	8
3. DESENVOLVIMENTO.....	9
MANUSCRITO: Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de los extractos acuosos y cetoacuoso de granos y cascaras de Sorgo granífero [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] híbrido Guanipa 71.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Reactivos.....	15
2.2 Material vegetal e identificación de taninos.....	15
2.3 Preparación de microextractos acuosos y cetoacuosos.....	15
2.4 Imágenes del material vegetal utilizado	16
2.5 Pruebas fitoquímicas de reconocimiento de flavonoides, taninos y polifenoles.....	17
2.5.1 Reacción con H ₂ SO ₄ concentrado.....	17
2.5.2 Reacción con FeCl ₃ 2%.....	17
2.5.3 Reacción con HCl concentrado/Δ.....	17
2.5.4 Reacción con FeCl ₃ 2% para taninos.....	17
2.6 Preparación de los extractos de cascaras y granos de sorgo.....	17

2.7 Detección y cuantificación de compuestos por HPLC-DAD.....	18
3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	19
3.1 Ensayo de la Actividad secuestradora de radical libre DPPH [•]	19
3.2 Ensayo de la Capacidad Antioxidante Relativa (CAR).....	20
3.3 Ensayo de Actividad quelante de ion Fe ⁺² y Poder reductor de ion Fe ⁺³	21
3.4 Ensayo de la degradación oxidativa de la 2-Desoxyribosa (2-DR).....	22
3.4.1 Ensayo del mecanismo antioxidante en la degradación oxidativa de la (2-DR)...	23
3.5 Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Rendimiento de las extracciones e identificación de taninos, polifenoles y flavonoides en los extractos del sorgo Guanipa 71.....	24
4.2 Análisis de HPLC-DAD.....	24
4.3 Actividad secuestradora de radical libre DPPH [•]	25
4.4 Capacidad Antioxidante Relativa (CAR).....	25
4.5 Actividad quelante de ion Fe ⁺² y Poder reductor de ion Fe ⁺³	26
4.6 Degradación oxidativa de la 2-Desoxy-D-ribose (2-DR).....	27
4.6.1 Mecanismo antioxidante en la degradación oxidativa de la (2-DR).....	28
5. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....	29
6. FIGURAS MANUSCRITO.....	35
7. REFERENCIAS MANUSCRITO.....	44
8. CONCLUSÕES.....	51
9. PERSPECTIVAS.....	52
10. REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS.....	Absorbância
Ác. Asc.	Ácido ascórbico
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
TBA.....	Ácido tiobarbitúrico
TCA.....	Ácido tricloroacético
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
HA.....	Antioxidante hipotético
Δ.....	Calor
CAR.....	Capacidade Antioxidante Relativa
CAT.....	Catalasa
HPLC-DAD.....	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Diodos em Series
2-DR.....	2-Desoxi-D-ribose
EECC.....	Energia de Estabilização de Campo Cristalino
ER.....	Espécies reativas
EROs.....	Espécies reativas de oxigênio
EAC.....	Extrato aquoso de casca
EAG.....	Extrato aquoso de grão
ECAC.....	Extrato cetoaquoso de casca
ECAG.....	Extrato cetoaquoso de grão
GSH.....	Glutationa
GPX.....	Glutationa peroxidasa
MDA.....	Malonildialdeído
pKa.....	Negativo do logaritmo da constante de dissociação
ophe.....	Ortofenantrolina
¹ O ²	Oxigênio singlete
(C=O)OOH.....	Peroxiácidos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DPPH [•]	Radical 1,1, difenil-2-picrilhidrazil
•OH.....	Radical hidroxil
SOD.....	Superóxido dismutasa
TRX.....	Tiorredoxina
Tris-HCl.....	Trimetilhidroxi-aminometano cloridrato

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1. Desenho esquemático do grão de sorgo.....	2
Figura 2. Estrutura do grão de sorgo. Seção transversal.....	2
Figura 3. Estrutura dos flavanóis ou catequinas.....	3
Figura 4. Estrutura geral dos flavonóides.....	4
Figura 5. Estrutura das flavonas.....	5
Figura 6. Estrutura dos flavonóis.....	5
Figura 7. Íon flavílio: Estrutura básica das antocianinas.....	5

MANUSCRITO

Figura 1. Perfil representativo de la cromatografía líquida de alta eficiencia del híbrido de <i>Sorgo granífero bicolor</i> guanipa 71, EAG (a), EAC (b), ECAG (c) y ECAC (d)	36
Figura 2. Gráfico de la actividad secuestradora de radical libre de los EAC, ECAC, EAG, y ECAC de sorgo, medida por el ensayo del radical libre 1,1-Diphenyl – 2 picrylhidrazyl (DPPH) 0,15Mm, con el ácido ascórbico como control positivo.....	38
Figura 3. Efecto en la reducción del Mo (VI) a Mo (V) de los EAC, EAG, ECAC, y ECAG de sorgo.....	39
Figura 4. Efecto de los ECAC (A), EAC (B), ECAG (C), y EAG (D) en (mg/mL), sobre la absorbancia en los sistemas de reacción (Fe^{+2} 100 μ M /o-fenantrolina 15 μ M) y (Fe^{+3} 100 μ M /o-fenantrolina 15 μ M).....	40
Figura 5. Porcentaje (%) de protección de la 2-DR de los EAC (A), ECAC (B), EAG (C), y ECAG (D) de sorgo, en tres sistemas de degradación <i>in vitro</i> : H_2O_2 1mM; Fe^{+2} 50 μ M; Fe^{+2} 50 μ M + H_2O_2 1Mm.....	42
Figura 6. Porcentaje (%) de protección de la 2-DR por los ECAC (A), y ECAG (B) de sorgo, en la degradación oxidativa generada por la reacción de Fenton <i>in vitro</i> Fe^{+2} 50 μ M + H_2O_2 1mM, en concentraciones (3.0mM, 3.5mM; 4.0Mm) de 2-DR.....	43

LISTA DE IMÁGENES

MANUSCRITO

Imagen 1 Granos de sorgo Guanipa 71 con cascara	16
Imagen 2. Granos de sorgo Guanipa 71 sin cascara	16
Imagen 3. Cascaras de granos del sorgo Guanipa 71.....	16

LISTA DE QUADROS

DISSERTAÇÃO

Quadro 1. Taxonomia do sorgo.....	1
--	---

MANUSCRITO

Cuadro 1. Identificación de taninos condensados en el sorgo.....	35
Cuadro 2. Reconocimiento de polifenoles, flavonoides, y taninos.....	35
Cuadro 3. Porcentaje (%) de rendimiento de las extracciones.....	35

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabla 1. Composición fenólica de los EAG y EAC del Sorgo granífero Guanipa 71...	37
Tabla 2. Composición fenólica de los ECAG y ECAC del Sorgo granífero Guanipa 71.	37
Tabla 3. Porcentajes (%) de quelación.....	41
Tabla 4. Porcentajes (%) de reducción.....	41
Tabla 5. Resumen de los valores de IC ₅₀ y porcentajes (%) de actividad antioxidante.....	43

RESUMO

Dissertação de Pós-graduação
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Avaliação do potencial antioxidante de extratos aquoso e cetoaquoso de grãos e cascas do Sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] híbrido Guanipa 71

AUTOR: Gerson J. Torres Salazar

ORIENTADORA: Nilda Berenice de Vargas Barbosa

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 07 de dezembro de 2015

O sorgo por apresentar um considerável valor nutritivo é uma importante fonte alimentar animal e humana na Ásia e África. Além disso, compostos fenólicos presentes no pericarpo de seus grãos são reconhecidos como importantes antioxidantes. Considerando tais propriedades, este estudo teve como objetivo obter extratos aquoso e cetoaquoso de grão e casca do sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] híbrido Guanipa 71, do estado Portuguesa-Venezuela, e investigar seus possíveis efeitos antioxidantes *in vitro*. Maiores rendimentos de extração foram obtidos com a acetona/água 7:3. No sorgo integral e nos extratos cetoaquoso foram detectados taninos condensados, mas só nos extratos cetoaquoso acharam-se taninos hidrolisáveis. Ainda, análises por HPLC revelaram nos extratos os ácidos clorogênico, caféico, gálico, elágico, e os flavonóides catequina, quercitrina, quercetina, rutina e luteolina. Os Extratos Cetoaquoso de Casca (ECAC) e de Grão (ECAG) inibiram ao radical DPPH[•] com IC₅₀ (µg/mL) de 31.34 e 36.48, também exibiram a capacidade de reduzir Mo (VI) no ensaio da Capacidade Antioxidante Relativa à rutina (CAR) com IC₅₀ (µg/mL) de 303 e 227.6 respectivamente. No teste da o-fenantrolina os Extratos Aquoso de Grão (EAG) e de Casca (EAC) exibiram as maiores atividades quelante de Fe⁺² de 65.09% e 59.12%. Porém, os extratos ECAG e ECAC exibiram os maiores percentuais redutores de Fe⁺³ de 42.3% e 22.9%, e inibiram a degradação oxidativa da 2-desoxiribose na reação de Fenton, num 17.8% e 29.6%. Em conjunto, os resultados mostram que os extratos exibiram potencial antioxidante via transferência de elétrons, quelação e scavengers de radicais, destacando-se o ECAC com o maior potencial. De forma geral, os dados deste trabalho contribuirão para o avanço de pesquisas que buscam estabelecer o potencial antioxidante *in vitro* de extratos naturais de outros híbridos de sorgo, e neste cenário indicam a relevância dos extratos do sorgo Guanipa 71.

Palavras chaves: Sorgo granífero, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Evaluation of antioxidant potential of aqueous and acetone/water extracts of grain and shells from grains sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] hybrid Guanipa 71

AUTHOR: Gerson J. Torres Salazar

ODVISOR: Nilda Berenice de Vargas Barbosa

PLACE AND DATA OF THE DEFENSE: Santa Maria, december 7th, 2015

Sorghum for presenting a considerable nutritional value is an important animal and human food source in Asia and Africa. Moreover, phenolic compounds present in the pericarp of the grains are recognized as important antioxidants. Considering such properties, this study has been developed to obtain aqueous and acetone/water extracts from the grains and shells of grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] hybrid Guanipa 71, Portuguesa state- Venezuela, in order to investigate its possible antioxidant effects *in vitro*. Higher extraction yields were obtained with acetone/water 7:3. Indeed, HPLC analysis detected all extracts the chlorogenic, caffeic, gallic, ellagic acids and the flavonoids catechin, rutin, quercitrin, quercetin, and luteolin. The shells and grains acetone/water extracts ECAC – ECAG, inhibited the radical DPPH• with IC₅₀ (µg/mL) of 31.34 and 36.48, also showed the ability to reduce Mo (VI) in the Antioxidant Capacity Relative to the rutin assay (CAR) to IC₅₀ (µg/mL) of 303 and 227.6 respectively. The test of the -phenanthroline the grain and shells aqueous extracts EAG – EAC, exhibited the highest chelating activity of Fe⁺² 65.09% and 59.12%. However, the ECAG and ECAC extracts exhibited the highest percentages of reducing Fe⁺³ 42.3% and 22.9%, and inhibited the oxidative degradation of 2-deoxyribose in the Fenton reaction, a 17.8% and 29.6%. Together, the results show that extracts exhibited antioxidant potential through electron transfer, radical scavengers and chelating, highlighting the ECAC with the highest potential. Overall, data from this work will contribute to the advancement of research seeking to establish the antioxidant potential of natural *in vitro* other sorghum hybrids extracts, and in this scenario indicate the relevance of sorghum Guanipa 71 extracts.

Key words: *Grains Sorghum*, phenolic acids, flavonoids, tannins, antioxidant activity.

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrito uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados nesta dissertação.

O **DESENVOLVIMENTO** está apresentado sobre a forma de um manuscrito, o qual se encontra situado no item **MANUSCRITO**.

As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e conclusões encontram-se no próprio manuscrito e representam a parte integral deste estudo.

Os itens **CONCLUSÕES** e **PERSPECTIVAS** são encontrados no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre a investigação desenvolvida.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO**, uma vez que o manuscrito conter suas próprias referências.

1. INTRODUÇÃO

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma gramínea que apresenta uma ampla versatilidade de uso. Os principais tipos de sorgo incluem o granífero, cujo produto principal é o grão, amplamente usado na fabricação de rações animal; o forrageiro, cuja biomassa é utilizada na produção de salvado; o sorgo vassoura usado para confecção de vassoura e artesanatos; e o sorgo para pasto, cruzamento entre *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense* (SAWAZAKI, E., 1998). O sorgo é originário da África sub-sahariana e espécies silvestres encontram-se amplamente distribuídas na África, Ásia e América. Em zonas semiáridas dos trópicos e sub-trópicos, o sorgo parece ser mais resistente à seca e pode crescer bem em diferentes tipos de solo em comparação ao milho (HARRIS K., 1976). O quadro 1 contém a descrição taxonômica do sorgo.

O sorgo é considerado o quinto cereal mais cultivado no mundo depois do trigo, milho, arroz e cevada (FAO¹, 2007). A colheita desta planta como fonte de alimento é comum na Ásia, África, e no Hemisfério Ocidental (DYKES, L., et al. & ROONEY, W. L., 2005). Para o consumo humano são preferidos os grãos compridos com endosperma córneo e amarelo, com maior conteúdo de caroteno e xantofila, o qual aumenta seu valor nutritivo (VALLADARES, C. A., 2010).

Quadro 1: Taxonomia do sorgo

Reino: Plantae	Sub-clase: Commelinidae	Sub-familia: Panicoideae
Sub-reino: Tracheobionta	Grupo: Glumiflora	Tribu: Andropogonea
División: Magnoliophyta	Orden: Poales	Género: <i>Sorghum</i>
Clase: Liliopsida	Familia: Poaceae	Especie: <i>S. bicolor</i>

Fonte: Adaptado de (VALLADARES, C. A., 2010).

O grão de sorgo é esférico, tem aproximadamente 4.0mm de comprimento, 3.5mm de largura, 2.5mm de espessura, peso de 25 a 35mg (ROONEY, L. M., et al. 1980) e é composto por três partes: a parte externa constituída pelo pericarpo, a média pelo tecido de armazenagem (endosperma) e a mais interna constituída pelo germe (embrião) (Figura 1 e 2). Geralmente o pericarpo representa 6%, o endosperma 84%, e o germe 10% do peso do grão (ROONEY, L. M., & MILLER F. R., 1981; SORGHUM & MILLETS, 1995).

¹ Food and Agriculture Organization



Fig. 1. Desenho esquemático de grão de sorgo adaptado de ROONEY, L. M., & MILLER, F. R., (1981).

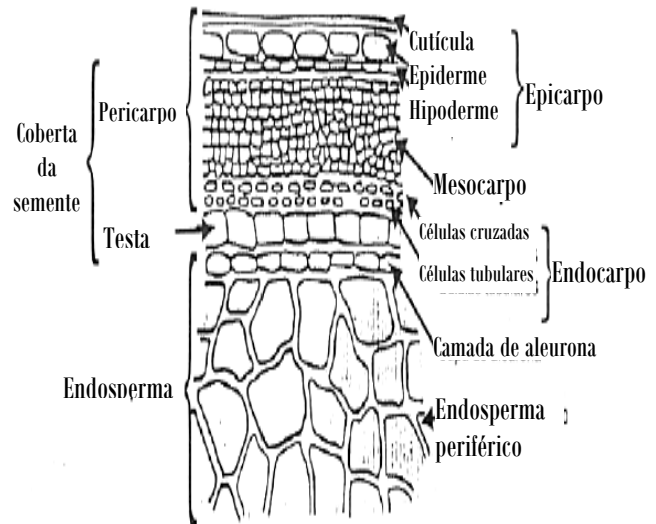


Fig. 2. Estrutura do grão de sorgo. Seção transversal, adaptado de ROONEY, L. M., 1971.

O grão de sorgo é o terceiro cereal mais importante produzido na Venezuela, depois do milho e do arroz (GONZÁLEZ, R. e GRATEROL Y., 2003). Seu uso é exclusivo na indústria de alimentação animal, principalmente na formulação de alimentos para aves e suínos. Seu perfil nutricional é parecido ao de outros cereais tradicionais. No entanto, este apresenta um menor conteúdo de pigmentos carotenóides e metabolitos secundários, como taninos condensados e fitatos (JARAMILLO, M., et al. 1993; GODOY, S., et al. 2005). Estudos feitos com diferentes cultivares do sorgo da Venezuela mostram que os níveis de taninos podem variar de 0,005% a 3,92% (CICCOLA, P., 1989).

De forma geral, as propriedades benéficas do sorgo estão relacionadas com sua composição, principalmente devido aos compostos fenólicos concentrados no pericarpo, os quais incluem ácidos fenólicos (hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), flavonóides e taninos condensados. Esta composição, bem como seus níveis, pode ser afetada pelo genótipo (DYKES, L., & ROONEY, L. W., 2006; DYKES, L., et al., & ROONEY, W. L., 2009).

Os taninos são compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água e peso molecular entre 500 e 3000 Dalton (MELLO, J. e SANTOS, S., 2001). Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados formados a partir do chiquimato (HELDT, H., 1997), onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (VICKERY, M., &

VICKERY, B., 1981). Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros produtos do metabolismo do fenilpropano (HASLAM, E., 1965; De BRUYNE, et al., 1999).

Modelos de estruturas com o esqueleto de flavano com um ou dois grupos OH no anel heterocíclico são conhecidos como flavanóis (Fig. 3). Deste modo, flavan-3,4-dioles, flavan-4-oles e flavan-3-oles, ou catequinas, geralmente não se encontram como estruturas monoméricas senão, formando parte de taninos condensados (MARCANO, D. y HASEGAWA, M., 1991).

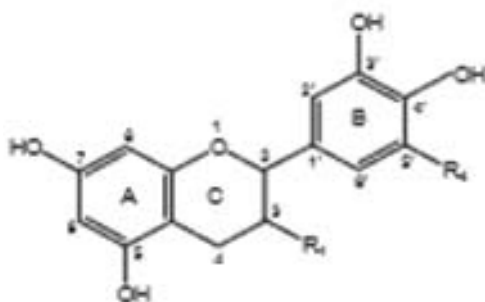


Fig. 3. Estrutura dos flavanóis ou catequinas

Os taninos aparecem na testa com a maturidade do grão de sorgo, e podem ser identificados como uma capa de coloração marrom vermelho à violeta. Além da testa também se encontram presentes no exterior e no interior do pericarpo (HAHN, D., et al., 1984). Os taninos hidrolisáveis e condensados se distinguem tanto por sua importância nutricional como por seus efeitos tóxicos (REED, J., 1995).

O consumo de taninos condensados (polímeros proantocianidina) tem sido associado com efeitos negativos, principalmente devido a sua complexação com proteínas e frações minerais, o que provoca uma menor digestibilidade proteica e absorção de minerais (JANSMAN, A., 1993; JARAMILLO, M., 1991). Hagerman *et al.* (1998), sugeriram que a polaridade destes compostos é o principal indicador do tipo de associação que estabelecem com as proteínas, ou seja, ligação de hidrogênio ou interação hidrofóbica. Desta forma, os polifenóis polares formam ligações de hidrogênio enquanto os polifenóis não polares interações hidrofóbicas.

As propriedades farmacológicas oriundas dos taninos ou flavonóides condensados têm sido, pelo menos em parte, relacionadas com três características que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Estas incluem a capacidade de complexação com íons metálicos (SCALBERT, A., 2000; HURRELL, R., *et al.*, 1998), a capacidade sequestradora de radicais livres (RICE-EVANS,

C., *et al.*, 1996; SAINT-CRICQ de G. N., 1999), e a habilidade de complexar-se com outras macromoléculas tais como proteínas e polissacáridos (SANTOS, S., & MELLO, J., 1999; HASLAM, E., 1998).

Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que o sorgo exibe atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-carcinogênica, e também causa redução nos níveis de colesterol (BRALLEY, E. *et al.*, 2008; DYKES, L., & ROONEY, L. W., 2006). Neste contexto, Franklin e colaboradores (2014) observaram em estudos *in vitro* que misturas de sorgo-feijões são melhores scavengers de radical óxido nítrico que misturas compostas de milho-soja, podendo assim contribuir de forma mais eficaz para a redução do estresse oxidativo (FRANKLIN, B., *et al.*, 2014).

As atividades biológicas exibidas pelos compostos fenólicos podem ser determinadas pelas suas estruturas, tamanhos e também pelas condições das reações nas quais participam nos sistemas biológicos (XIAO, J., *et al.*, 2011; PRIGENT, *et al.*, 2003). Também é conhecido que os efeitos destes compostos podem variar de acordo com as concentrações nas quais estão presentes nas células. Assim é possível que uma mesma molécula possa exibir efeitos anti e/ou pro-oxidante.

A estrutura geral dos flavonóides compreende um anel A derivado da cadeia policétida, que segue um padrão de oxigenação meta; um anel B, derivado do ácido shikímico, com substituição em orto, e três átomos de carbono que ligam os anéis A e B, correspondentes à parte alquílica do fenilpropano. É por isso que se conhece como unidades C-15: C6-C3-C6, figura 4. (MARCANO, D. y HASEGAWA, M., 1991).

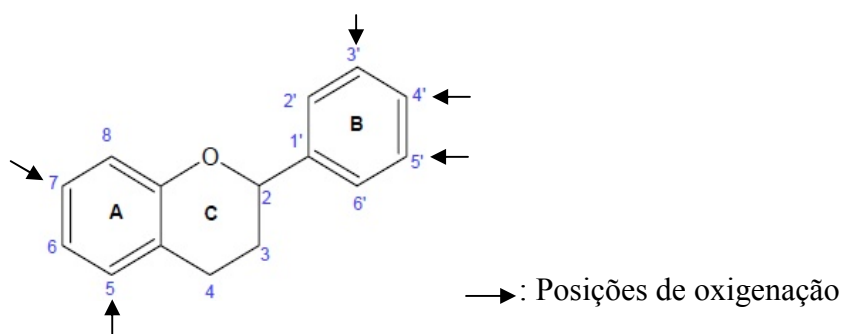


Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides.

Os representantes mais abundantes dos flavonóides são as flavonas (Fig.5) e os flavonóis (Fig. 6). Os mesmos podem estar tanto na forma livre como na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente glicosilados com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C-3 ou C-7. Esses compostos estão

distribuídos em todos os órgãos das plantas de uma grande variedade de gêneros e famílias, incluído o sorgo (ERLUND, I., 2004; HERMANN, K., 1988).

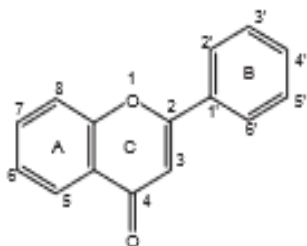


Fig. 5. Estrutura das flavonas.

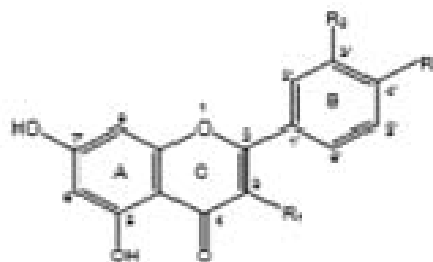


Fig. 6. Estrutura dos flavonóis

Segundo Dykes et al., (2011), os principais flavonóides presentes no sorgo são flavonas, flavanonas e 3-desoxiantocianinas (Figura 7) (DYKES, L., PETERSON, G., ROONEY, W., & ROONEY, W., 2011). Dentre as 3-deoxiantocianinas destacam-se a luteolinidina laranja, e apigeninidina amarela (WU, X., & PRIOR, R., 2005; PALE, E., et al., 1997).

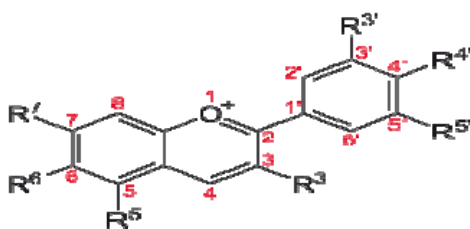


Fig. 7. Íon flavílio: Estrutura básica das antocianinas

Estas antocianinas (luteolinidina e apigeninidina) possuem pequena distribuição na natureza (CLIFFORD, M., 2000), apresentando-se distintas das demais antocianinas, devido à inexistência de um átomo de oxigênio na posição C-3 (MAZZA, G., & BROUILLARD, R., 1987). Esta conformação da molécula de antocianina atribui maior estabilidade em comparação a outras antocianinas encontradas nas frutas e hortaliças (AWIKA, J., 2008; DYKES, L., SEITZ, L., ROONEY, W., & ROONEY, L. W., 2009). Elas são classificadas como fitoalexinas, uma vez que são produzidas em respostas à invasão de fungos ou outros estresses no sorgo (LO, S., et al., 1999; WANISKA, R., & ROONEY, L., 2000). De acordo com tais constatações, WU, X., & PRIOR, R., (2005) identificaram vários compostos 3-deoxiantocianinas em quatro variedades de sorgo, mas seus níveis não foram determinados. Luteolinidina e apigeninidina também se encontram presentes em grandes quantidades no salvado do sorgo negro (AWIKA, J., et al., 2004). Outros flavonóides identificados no sorgo incluem as flavanonas eriodictiol, naringerina, e eriodictiol glucosidados e a flavona apigenina (GUJER, R., et al., 1986; KAMBAL, A., & BATE-SMITH, E., 1976).

Os flavonóides são considerados potentes moléculas scavengers de espécies reativas, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e os radicais hidroxil e peroxil (HARBORNE, J. B., & WILLIAMS, C., A. 2000). De acordo com RATTY, A. K., & DAS, N. P., (1988) a eficiência antioxidante dos flavonóides está diretamente relacionada com seu grau de hidroxilação e diminui com a presença de açúcar invertido. Espécies reativas (ER) de oxigênio e nitrogênio são continuamente formadas no metabolismo normal dos tecidos (KATHIRIA, A., et al. 2012). Seus efeitos benéficos ou maléficos irão depender dos níveis em que se encontram nas células (HAMANAKA, R., & CHANDEL, N., 2010). As ER são muito instáveis devido à alta reatividade química, podendo induzir peroxidação lipídica, oxidação massiva de proteínas e danos no DNA (MATÉS, J., et al. 1999). As principais espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), principalmente formado nas células via cadeia respiratória mitocondrial; o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultante da dismutação do $O_2^{\bullet-}$; e o radical hidroxil ($\bullet OH$), a espécie considerada mais reativa (MATÉS, J., et al. 2010).

Os efeitos oxidantes de ER de oxigênio e nitrogênio são neutralizados pela ação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Tais defesas antioxidantes são cruciais para evitar e/ou diminuir o estresse oxidativo, proporcionando proteção aos sistemas biológicos (VALKO, M., et al, 2006). Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes englobam as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) (MATES, JR, et al, 1999). Como antioxidantes não-enzimáticos destacam-se o ácido úrico, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, coenzima Q, antioxidantes tióis como a Glutaciona (GSH), Tiorredoxina (TRX) e ácido lipoico, ácidos fenólicos, flavonóides, e a melatonina, produto hormonal da glândula pineal (McCALL, M., & FREÍ, B., 1999; VALKO, M., et al, 2007).

Inúmeros estudos voltados para o combate do estresse oxidativo, fenômeno gerado pelo desequilíbrio entre a produção de ER e as defesas antioxidantes nas células, apontam a efetividade dos antioxidantes naturais, em especial os compostos fenólicos (AWIKA, J., et al., 2003; ANDERSON, L., & WOLF, J., 1995). Pode-se destacar neste sentido, que a maioria dos estudos com enfoque em compostos fenólicos e ação antioxidante são com flavonóides isolados, devido à estrutura simples e a ampla distribuição nas plantas.

Embora o sorgo apresente um alto conteúdo de compostos fenólicos, dados sobre o potencial antioxidante de extratos de híbridos de sorgo são escassos na literatura. De ⁶ os poucos estudos existentes com diferentes cultivares de sorgo, são *in vivo* e voltados para

o uso do mesmo na alimentação de animais em pesquisas de cunho metabólico (LATORRE, S. e CALDERÓN, C., 1998). Assim, o desenvolvimento de estudos *in vitro* com ênfase no potencial antioxidante são importantes para identificar e indicar a espécie como uma nova fonte de antioxidantes (HAENEN, G., et al., 2006). Além disso, o estudo *in vitro* das propriedades antioxidantes de extratos de sorgo pode fornecer subsídios para pesquisas *in vivo* e uso da planta para fins farmacológicos. Salienta-se ainda que pesquisas com o grão de sorgo são de extrema relevância, uma vez que é a parte mais amplamente utilizada na alimentação animal na Venezuela, e que apresenta um valor nutritivo similar aos de cereais tradicionais. Da mesma forma, não há dados na literatura sobre o potencial antioxidante da casca do grão. Este tipo de avaliação se faz importante para dar um uso adequado e racional a esta parte do sorgo que geralmente é descartada.

Considerando todos os parâmetros abordados, o presente trabalho foi planejado para identificar os compostos bioativos presentes em extratos de grão e casca do sorgo granífero híbrido Guanipa 71 e investigar o potencial antioxidante dos mesmos através de diferentes ensaios *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo investigar e comparar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos aquoso e cetoaquoso de grão e casca do sorgo granífero híbrido Guanipa 71.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar extrações aquosa e cetoaquosa de compostos no grão e na casca do sorgo.
- Identificar compostos bioativos no sorgo integral, e nos extratos aquoso e cetoaquoso do grão e da casca do sorgo.
- Determinar e comparar o efeito antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso e cetoaquoso do grão e casca do sorgo.

O desenvolvimento referente a esta dissertação está apresentado sobre a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências se encontram no próprio manuscrito.

MANUSCRITO: Evaluación *in vitro* de la actividad Antioxidante de los extractos acuoso y cetoacuoso de granos y cascaras de Sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]

híbrido Guanipa 71

9

Evaluación *in vitro* de la actividad Antioxidante de los extractos acuoso y cetoacuoso de granos y cascaras de Sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] híbrido Guanipa 71

Gerson J. Torres S¹, Assis Ecker¹, Sandra M. P. Duavy¹, Aline A. Boligon², Margareth L, Athayde², Ademir F. Morel³, João B. T. da Rocha¹, Nilda B. V. Barbosa¹.

1 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

2 Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

3 Departamento de Química, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Autor correspondente:

Nilda B. de Vargas Barbosa

Centro de Ciências Naturais e exatas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

97105-900 Santa Maria – RS – Brasil.

Telf: 55-55-3220-8140 Fax: 55-55-3220-8978

E-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br

Resumen

10

El sorgo es una importante fuente de alimento por presentar un considerable valor nutritivo. Además, compuestos fenólicos presentes en el pericarpio de sus granos han

revelados importantes antioxidantes. Considerando tales propiedades, el objetivo de este estudio fue obtener extractos acuoso y cetoacuoso de grano y cascara de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] híbrido Guanipa 71, del estado Portuguesa-Venezuela e investigar sus posibles efectos antioxidantes *in vitro*. La mezcla acetona/agua 7:3 fue más efectiva en las extracciones. En el cereal como en los extractos cetoacuoso de grano ECAG y cascara ECAC se detectaron taninos condensados e hidrolizables, pero en todos los extractos fue detectada la presencia de catequina, rutina, quercitrina, quercetina, luteolina, y los ácidos clorogénico, caféico, gálico, elágico. Los ECAC y ECAG 0.5mg/mL, revelaron importantes características antioxidantes, al reducir en 22.9% y 42.3% iones Fe^{+3} , quelar en 47.3% y 32.4% iones Fe^{+2} en el ensayo de la ortofenantrolina; inhibir respectivamente el radical DPPH• con IC_{50} ($\mu g/mL$) 31.34 y 36.48; reducir Mo (VI) 1,33mM en el ensayo de la Capacidad Antioxidante Relativa a la rutina con IC_{50} ($\mu g/mL$) de 330 y 227.6; e inhibir en 29.60% y 17.77% la degradación oxidativa de la 2-desoxirribosa (2-DR) en la reacción de Fenton. Los extractos acuoso de grano EAG y cascara EAC, fueron relevantes al quelar Fe^{+2} en 65.09% y 59.12%, e inhibir en 17.18% y 10.67% la degradación de la (2-DR) en la reacción de Fenton. En conjunto, los resultados mostraron que los extractos exhibieron actividad antioxidante vía transferencia de electrones, quelante y scavengers de radicales, siendo más efectivo el ECAC. De forma general, este trabajo contribuye para el avance de investigaciones que buscan establecer el potencial antioxidante *in vitro* de extractos naturales de otros híbridos de sorgo, en este escenario se evidenció la relevancia de extractos del híbrido de sorgo Guanipa 71.

Palabras claves: Sorgo granífero, Ácidos fenólicos, Flavonoides, Taninos, Actividad antioxidante.

Sorghum is an important food source for presenting a substantial nutritional value. Moreover, phenolic compounds present in the pericarp of its grains have revealed important antioxidants. Considering such properties, this study has been developed to obtain aqueous and acetone/water extracts from the grains and shells of grain *sorghum* [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] hybrid Guanipa 71, from Portuguesa state- Venezuela, in order to investigate their possible antioxidant effects *in vitro*. The best extracts were obtained after using the mixture acetone/water 7:3. Both in the cereal and the acetone/water extracts of grain ECAG and shell ECAC, condensed and hydrolysable tannins were detected, whereas in all the extracts were detected the presence of catechin, rutin, quercitrin, quercetin, luteolin and chlorogenic, caffeic acid, gallic, ellagic acids. ECAG and ECAC 0.5mg/mL, revealed significant antioxidant properties having reduced 22.9% and 42.3% of the ions of Fe^{+3} and chelated 47.3% and 32.4% of the ions of Fe^{+2} respectively, in the test orthophenanthroline; they inhibited the DPPH• radical with IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of 31.34 and 36.48 respectively; they reduced Mo (VI) 1.33 in the Relative Antioxidant Capacity to the rutin assay with IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of 330 and 227.6 respectively; and they also inhibited the oxidative degradation of 2-deoxyribose (2-DR) in the Fenton reaction by 29.60% and 17.77% respectively. The aqueous extracts of EAG grain and EAC shell were relevant to chelating the ions of Fe^{+2} by 65.09% and 59.12%, and for inhibiting the degradation of (2-DR) in the Fenton reaction by 17.18% and 10.67% respectively. Overall, the results showed that the extracts exhibited antioxidant activity via electron transfer, radical scavenging and metal chelating activity, being more effective the ECAC. In general, this work contributes to the advancement in the research of seeking to establish the antioxidant potential of natural extracts *in vitro* of other sorghum hybrids; and in this scenario the relevance of hybrid sorghum extracts 71 Guanipa was evidenced.

Key words: *Grains Sorghum*, Phenolic acids, Flavonoids, tannins, Antioxidant activity.

El sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es una gramínea que presenta una amplia variedad de uso. El principal tipo de sorgo es el granífero, cuyo producto principal es el grano, ampliamente usado en la fabricación de raciones (Sawazaki, 1998). Es originaria del África sub-sahariana (Awika & Rooney, 2004), y se presenta como cultivo alternativo al consumo de los cereales de mayor producción como el arroz, maíz y cebada (Sanchez, 2003). Aunque largamente utilizado en la alimentación animal (Ítavo, Morais, Ítavo, et al., 2009; Menezes, Segabinazi, Brondani, et al., 2009), el sorgo es considerado alimento básico para millones de personas en el mundo, supliendo cerca del 70% da ingestión calórica diaria (Souza, Dantas, Silva, et al., 2005; Taylor, Schober & Bean, 2006).

Algunos estudios demostraron que otros cereales como la avena, arroz y trigo, poseen menores concentraciones de compuestos fenólicos y baja actividad antioxidante en comparación con el sorgo (Farrar, Hartle, Hargrove, 2008). Por tal motivo Fardet et al., 2008, destacan que una alimentación rica en sorgo puede prevenir enfermedades relacionadas con daños oxidativos, en función del contenido de polifenoles, taninos, antocianinas y la consecuente capacidad antioxidante del cereal (Fardet, Rock & Rémésy, 2008).

Estudios *in vitro* han probado que el sorgo exhibe importantes propiedades farmacológicas. Estas incluyen reducción del colesterol, actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anti-carcinogénica (Bralley et al., 2008; Dykes & Rooney, 2006). Estas propiedades son debida a los compuestos fenólicos, normalmente hallados en cultivares de sorgo, que incluyen derivados de ácidos hidrobencóico e hidroxinámico; y flavonoides que engloban antocianinas y taninos (Awika & Rooney, 2004). Estos compuestos presentan elevada actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y pueden contribuir significativamente con beneficios a la salud asociados al consumo del grano integral (Kamath, Chandrashekar y Rajini, 2004).

A pesar de su abundancia en frutas y vegetales, los ácidos clorogénicos y demás ácidos fenólicos han sido menos estudiados en comparación con los flavonoides (D. M. de Oliveira e D. H. Markowicz Bastos, 2011). Los flavonoides se han revelados para actuar como eliminadores de diversas especies reactivas (ER), como el anión superóxido, radicales hidroxil y peroxil (J. B. Harborne & C. A. Willians, 2000).

Las ER son muy inestables debido a la alta reactividad química, y en niveles elevados pueden inducir peroxidación lipídica, oxidación masiva de proteínas y daños

ADN (Matés et al. 1999). Las principales especies reactivas de oxígeno (EROs) incluyen el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); peróxido de hidrogeno (H_2O_2); y el radical hidroxil ($\cdot OH$), la especie considerada más reactiva (Matés et al. 2010).

Estudios enfocados en el combate del stress oxidativo, fenómeno generado por el desequilibrio entre la producción de ER y las defensas antioxidantes en las células, resaltan la efectividad de los antioxidantes naturales, en especial los compuestos fenólicos (Awika et al., 2003; Anderson & Wolf, 1995). Se puede destacar en este sentido, que la mayoría de los trabajos enfocados en compuestos fenólicos y acción antioxidante son con flavonoides aislados de material vegetal, principalmente debido a sus estructuras simples y amplia distribución en las plantas.

Específicamente con sorgo, existen trabajos sobre diferentes cultivares *in vivo*, en los cuales el sorgo fue usado en forma de harina para alimentación de animales (Latorre S. y Calderón C. 1998). Sin embargo, estos son más enfocados en el estudio de parámetros metabólicos; y hay muy pocos estudios donde se investigue el potencial antioxidante de extractos brutos de granos de sorgos *in vitro* e *in vivo*. De igual forma, no hay datos en la literatura sobre el potencial antioxidante de extractos de cascara de sorgo, lo que torna muy necesario su pesquisa, una vez que el sorgo es ampliamente utilizado en la alimentación animal en Venezuela, y porque se conoce su valor nutritivo similar a los de cereales tradicionales. Además el estudio sobre la actividad antioxidante de la cascara del sorgo podría direccionar un uso adecuado y racional a esta parte del sorgo que generalmente es descartada. Considerando tales aspectos, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar extracciones acuosas e cetoacuosas de granos y cascara del sorgo granífero usualmente usado en Venezuela (híbrido Guanipa 71), identificar los compuestos presentes en los extractos, e investigar el potencial antioxidante a través de ensayos *in vitro*: capacidad secuestradora de radicales libres, capacidad quelante de Fe^{+2} , potencial reductor de Fe^{+3} , y capacidad antioxidante relativa (CAR).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Los productos químicos fueron de grado analítico. Metanol, ácido fórmico, caféico, clorogénico, gálico y elágico fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Catequina, quercetina, quercitrina, rutina, luteolina, 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y 1,10 o-fenantrolina (ophe) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU). 2-Desoxi-D-ribose (2-DR) fue adquirida de Sigma Aldrich Co. (Steinheim, Alemania). El Molibdato de amonio fue adquirido de Labsynth LTDA (São Paulo, Brasil).

2.2 Material vegetal e identificación de taninos

El material vegetal sorgo granífero Guanipa 71 fue colectado en el municipio Turén (09° 20' 03'' latitud norte y 69° 07' 21'' longitud oeste) del estado Portuguesa - Venezuela, localizado a una altura de 275 metros sobre el nivel del mar, con una media anual de 27°C, 1395 mm de lluvia, 1975 mm de evaporación y 4.3 meses secos (García y Soto, 1976; Guerra M., 2008). Una muestra de sorgo con cascara (Imagen 1) fue sometida a una prueba simple de identificación de taninos condensados, denominada “prueba del clareamiento con cloro” (Waniska et al., 1992). Esta prueba consistió en mezclar una muestra de 15g del sorgo con 15g de KOH y 70 ml de NaOCl comercial de 2.0 – 2.5% p/p en cloro activo. La mezcla fue calentada en baño María a 60°C por 10 min, con agitación ocasional. Al final del procedimiento los granos que contenían taninos condensados adquirieron una coloración marrón oscuro, mientras aquellos que no contenían taninos condensados adquirieron una coloración blanquecina.

2.3 Preparación de microextractos acuosos e cetoacuosos

Fue realizada la separación mecánica y molienda de pequeñas muestras de grano (Imagen 2) y cascara (Imagen 3) de sorgo, para realizar dos tipos de microextracciones: **a)** Agua, **b)** Mezcla extractiva de solventes 7:3 acetona/agua (Cork & Krockenberger, 1991; Conde et al., 1997; Lu & Foo, 1997; Hagerman et al., 1977; Hagerman, 1988). La mezcla acetona/agua es considerada más efectiva que los solventes alcohólicos, una vez que inhibe la interacción taninos–proteínas (Latorre S. y Calderón C. 1998) y porque la acetona tiene un mayor poder de penetración del material vegetal (M. Dauchot, 1973). Además, la acetona tiene la ventaja de extraer componentes hidrofílicos, como azúcares y compuestos fenólicos (Tappi, 1997; Sjöström & Alén, 1998; Wallis & Wearne, 1999; Thurbide & Hughes, 2000).

2.4 Imágenes del material vegetal utilizado

En las imágenes 1, 2, y 3, se muestran los materiales vegetales utilizados para la realización del presente trabajo de investigación.



Imagen 1. Granos de sorgo Guanipa 71 con cascara



Imagen 2. Granos de sorgo Guanipa 71 sin cascara



Imagen 3. Cascaras de granos del sorgo Guanipa 71

Fueron hechas cuatro (4) pruebas para determinar presencia/ausencia de flavonoides, taninos y polifenoles en los diferentes microextractos (Marcano, D. y Hasegawa, M., 1991):

2.5.1 Reacción con H₂SO₄ concentrado: una alícuota de cada extracto se colocó en tubos de ensayo y se añadieron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un color rojizo en los extractos indicó la presencia de flavonoides.

2.5.2 Reacción con FeCl₃ 2%: 1mL de cada extracto fue diluido en agua destilada en la proporción de 1:2. Se añadieron por las paredes del tubo dos gotas de cloruro férrico a 2%. El desarrollo de coloración que varía entre verde, amarillo-castaño y violeta. Fue indicativo de prueba positiva a flavonoides.

2.5.3 Reacción con HCl concentrado/Δ: A 50mg de cada extracto en tubo de ensayo fueron añadido 1mL de HCl y se calentaron. La típica reacción de los flavan-3,4-dioles (catequinas) es su conversión a antocianinas por tratamiento con ácido mineral (HCl) y calor, lo que provoca la deshidratación seguida de la oxidación por el oxígeno del aire, originando la sal de flavilio de color rojo.

2.5.4 Reacción con FeCl₃ 2% para taninos: Fue adicionado en 1mL de solución de cada extracto, 5.0mL de agua destilada y dos gotas de cloruro férrico 2%. El desarrollo de coloración azul indicó la presencia de taninos hidrolizables; de coloración verde la presencia de taninos condensados y de coloración que varía de azul para rojo la presencia de polifenoles.

2.6 Preparación de los extractos de cascaras y granos de sorgo

En una muestra de sorgo granífero Guanipa 71, se separaron mecánicamente granos y cascaras, obteniendo los granos libres de cascara y otra fracción de cascaras libres. Seguidamente fueron molidas ambas fracciones con un molino Marconi 630/1. Luego se realizaron las extracciones: **(a)** agua destilada, **(b)** Mezcla acetona-agua 7:3.

(a) Muestras molidas de 185g de grano y 125.5g de cascara fueron extraídas con 1.8L de agua destilada por un tiempo de 96 horas. Al transcurrir este tiempo se separaron las partes líquidas de las partes sólidas. Las partes sólidas se volvieron a extraer con 400mL de agua por 24 horas y las partes líquidas fueron unidas y filtradas con papel filtro 205µm. Los volúmenes resultantes fueron concentrados a un aproximado de 200mL por

baño María a 50°C y posteriormente fueron liofilizados con un liofilizador Enterprise II Terroni, obteniéndose los extractos libres de agua.

(b) Muestras molidas de 250gr de grano y 130gr de cascara fueron extraídas con 2.5 litros de mezcla 7:3 acetona-agua por un tiempo de 96 hs. Transcurrido este tiempo, se separaron las partes líquidas de la sólida. La partes sólidas se volvieron a extraer con 400mL de mezcla extractiva por 24 horas, las partes líquidas fueron unidas y filtradas con papel filtro 205µm. Los volúmenes resultantes de las fracciones líquidas unidas fueron reducidos a cerca de 900mL por evaporación de la acetona a 61°C con un Rotavaporador R-3 BUCHI. Los volúmenes resultantes fueron concentrados próximos a 250mL por baño María a 62°C y posteriormente los extractos concentrados fueron liofilizados con un liofilizador Enterprise II Terroni, obteniéndose los extractos libres de agua.

Los dos tipos de extracciones, generaron cuatro (4) extractos: Extracto Acuoso de Grano (EAG), Extracto Acuoso de Cascara (EAC), Extracto Cetoacuoso de Grano (ECAG), y Extracto Cetoacuoso de Cascara (ECAC).

2.7 Detección y cuantificación de compuestos por HPLC-DAD

La Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) se realizó con un sistema HPLC Shimadzu Prominencia Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con bombas alternativas Shimadzu LC-20AT conectados a un desgasificador DGU 20A5 con integrador CBM 20A, detector de diodos en serie SPD-M20A y software 1.22 SP1. Los análisis cromatográficos de fase inversa se realizaron en condiciones de gradiente con una columna C₁₈ (4.6mm x 150mm) rellena de partículas de diámetro 5µm; la fase móvil fue agua que contenía 1% ácido fórmico (A) y metanol (B), y el gradiente de composición fue: 13% de B hasta 10 min y se cambió para obtener 20%, 30%, 50%, 60%, 70% , 20% y 10% B en 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 min, respectivamente, con ligeras modificaciones del método descrito por (Pereira et al., 2014).

Los EAG, EAC, ECAG y ECAC de sorgo se filtraron con filtro de membrana 0.45µm (Millipore), se desgasificaron por baño ultrasónico, y se analizaron a una concentración de 5mg/mL. El caudal fue de 0.6 mL/min, volumen de inyección de 50µl y la λ eran 270nm para el ácido gálico, 280nm para catequina, 327nm para los ácidos clorogénico, caféico, elágico, y 365nm para la quercetina, quercitrina, luteolina y rutina. La fase móvil se filtró con filtro 0.45µm (Millipore) y se desgasificó por baño ultrasónico. Las soluciones madres de referencias estándares se prepararon en la fase móvil en un rango de

0.030-0.250 mg/mL para catequina, quercetina, quercitrina, luteolina, rutina; y 0.020-0.200 mg/mL para los ácidos elálgico, gálico, caféico y clorogénico. Los picos cromatográficos fueron confirmados mediante la comparación de su tiempo de retención (t_R) con los de patrones de referencia y por los espectros DAD (200 a 500) nm.

Curva de calibración para el ácido gálico: $Y=13574x + 1285.9$ ($r=0.9998$); ácido clorogénico: $Y=11983x + 1239.4$ ($r=0.9996$); ácido caféico: $Y=11792x + 1367.8$ ($r=0.9999$); catequina: $Y=12605x + 1249.6$ ($r=0.9997$); ácido elálgico: $Y=12658x + 1273.1$ ($r=0.9993$); quercitrina: $Y=13509x + 1198.9$ ($r=0.9998$); rutina: $Y=11954x + 1186.5$ ($r=0.9994$); luteolina: $Y=12408x + 1197.2$ ($r=0.9999$) y quercetina: $Y=13752x + 1276.8$ ($r=0.9998$). Los análisis de HPLC se llevaron a cabo a temperatura ambiente y por triplicado.

3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

3.1 Ensayo de la Actividad secuestradora de radical libre DPPH[•]

La actividad secuestradora de radical libre de los EAG, EAC, ECAG y ECAC de sorgo fue determinada por el método fotocolorimétrico de DPPH[•] (1,1, difenil-2-picrilhidrazil), conforme J. Choi et al., (1994) con modificaciones, usando ácido ascórbico como antioxidante estándar. La inhibición del DPPH[•] por los extractos fue acompañada por la desaparición de la absorción del DPPH[•] (Brand – Williams et al., 1995), y el grado de cambio de color es proporcional a la concentración y potencia de los antioxidantes presentes.

En placas ELISA de 96 pozos por separado, volúmenes de 20 μ L de disoluciones de ácido ascórbico y extractos por duplicado fueron resuspendidos en 80 μ L de etanol 95%, y 100 μ L de solución etanólica del radical DPPH[•] 0,3mM; generando las concentraciones finales de ácido ascórbico y extractos de [0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5] mg/mL. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuro, fueron realizadas las medidas de absorbancia en una (λ) de 518nm en un espectrofotómetro de UV-Visible TR Reader Chimadzu. En las mismas condiciones, las lecturas de absorbancia de los respectivos blancos de cada extracto y del ácido ascórbico, fueron realizadas con 20 μ L de disolución de cada extracto o de ácido ascórbico más 180 μ L de etanol al 95%, obteniendo concentraciones finales de [0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5] mg/mL.

Los resultados de los porcentajes (%) de inhibición del radical libre DPPH[•] fueron expresados como un porcentaje (%) comparado con el control, consistiendo de 100 μ L de

solución etanólica de DPPH• 0.3mM y 100µL de etanol 95%. Los porcentajes (%) de inhibición del radical DPPH• fueron calculados usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición de DPPH} = \frac{[(\text{Abs. Control} - (\text{Abs. Extracto} - \text{Abs. Blanco}))]}{\text{Abs. Control}} \times 100\%$$

Abs. Control es la absorbancia de la solución de DPPH• sin extracto; Abs. Extracto es la absorbancia del extracto con DPPH•; Abs. Blanco es la absorbancia del extracto sin DPPH•.

3.2 Ensayo de la Capacidad Antioxidante Relativa (CAR)

La capacidad antioxidante relativa (CAR) de cada extracto fue evaluada por duplicado utilizando el método del reactivo fosfomolibdenio, que se basa en la reducción del Mo(VI) a Mo(V) por el extracto y subsecuente formación del complejo verde de fosfato/Mo(V) en pH ácido y alta temperatura. Fueron colocados en tubos de ensayo 2.7mL del reactivo (1000µL molibdato de amonio 4mM, 1000µL de tampón fosfato de sodio 28mM pH 7.4, 700µL de ácido sulfúrico 0.6M), 200µL de agua miliq y 100µL de los diferentes soluciones de (ECAC, EAC, ECAG y EAG) en las concentraciones de 0.75, 1.5, 3.0 y 7.5mg/mL, para general las concentraciones finales de 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25mg/mL. Los tubos fueron parcialmente cerrados y colocados en baño María a 95°C durante 90 minutos. Después de enfriamiento las lecturas de absorbancia fueron hechas en espectrofotómetro UV/Visible TR Reader Chimadzu a una λ de 695nm. Los blancos de los diferentes extractos en las concentraciones previamente establecidas se realizaron de la misma forma, con la excepción de que el volumen de 1000µL de molibdato de amonio 4mM fue sustituido por agua miliq. Como referencia, se utilizó una solución del compuesto rutina en la concentración de 0.25mg/mL como un 100% de la actividad antioxidante. Para efecto de cálculo de la actividad antioxidante relativa fue utilizada la siguiente fórmula de acuerdo con (Prieto P. & Aguilar M., 1999).

$$\text{Cap. Antiox. Rel. a la rutina (\%)} = \frac{(\text{Abs. Extracto} - \text{Abs. Blanco extracto}) \times 100\%}{(\text{Abs. Control rutina} - \text{Abs. Blanco rutina})}$$

Abs. Extracto es la absorbancia del extracto con el reactivo de molibdato; Abs. Blanco extracto es la absorbancia del extracto sin el reactivo de molibdato; Abs. Control rutina es la absorbancia de la rutina con el reactivo de molibdato; Abs. Blanco rutina es la absorbancia de la rutina sin el reactivo de molibdato.

3.3 Ensayo de Actividad quelante de ion Fe⁺² y Poder reductor de ion Fe⁺³

La capacidad de los extractos en quelar (Fe²⁺) o reducir Fe³⁺ fue determinada a través del ensayo de la 1,10 o-fenantrolina (ophe), según el método de Minnoti y Aust, (1987) con algunas modificaciones. El ensayo se basó en la reacción de Fe²⁺ libre con (o-phe) para formar un complejo naranja-rojizo llamado con frecuencia ferroína (ph)₃Fe⁺², el cual fue medido por lecturas de absorbancia a 510nm (Minnoti & Aust, 1987).

Alícuotas de 1000μL EAG, EAC, ECAG y ECAC fueron mezcladas por separado con ion Fe²⁺ generado *in vitro* usando una solución de FeSO₄ 1000μM, y con ion Fe³⁺ generado *in vitro* usando una solución de FeCl₃ 1000μM, en oscuro y ambiente refrigerado. Después fueron extraídos de las mezclas, volúmenes de 40μL en los tiempos (0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90) minutos para llevar a cabo la reacción en placas ELISA de 96 pozos con agua miliq, Tris-HCl 0.1M pH 7.4, y o-phe 300μM, obteniendo concentraciones finales de los extractos de (0.5 y 0.1) mg/mL, 100μM de ion Fe²⁺ y/o 100μM de ion Fe³⁺. Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro UV/Visible TR Reader Chimadzu a una λ 510nm, y los controles consistieron en sistemas similares en donde las alícuotas de los extractos fueron sustituidas por agua miliq. Para evaluar la estabilidad de los quelatos formados y verificar el potencial reductor de Fe⁺³ de los extractos, a los 90 min a cada sistema de reacción se añadió ácido ascórbico 0.1050M para obtener una concentración final de 0.005M, y fue medida la absorbancia (1) hora después.

Los porcentajes (%) de actividad de quelación de Fe⁺² de los extractos fueron expresados como porcentaje comparado con controles constituidos de agua miliq, Tris-HCl 0.1M pH 7.4, o-phe 300μM, e ion Fe⁺². Los porcentajes de poder reductor de Fe⁺³ fueron expresados como un porcentaje comparado con los controles de Fe⁺². Los porcentajes de actividad de quelación y reducción fueron calculados usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad Quelación Fe}^{+2} (\%)_{t(\text{min})} = \frac{(\text{Abs. Control Fe}^{+2} - \text{Abs. Extracto Fe}^{+2}) \times 100\%}{\text{Abs. Control Fe}^{+2}}$$

$$\text{Poder Reductor Fe}^{+3} (\%)_{t(\text{min})} = \frac{(\text{Abs. Extracto Fe}^{+3} - \text{Abs. Control Fe}^{+3}) \times 100\%}{\text{Abs. Control Fe}^{+2}}$$

Abs. Control Fe⁺² es la absorbancia de la o-phe con Fe⁺² sin extracto, Abs. Extracto Fe⁺² es la absorbancia del extracto con o-phe y Fe⁺², Abs. Control Fe⁺³ es la absorbancia de la o-phe con Fe⁺³ sin extracto, Abs. Extracto Fe⁺³ es la absorbancia del extracto con o-phe y Fe⁺³.

3.4 Ensayo de la degradación oxidativa de la 2-Desoxy –D-ribose (2-DR)

La inhibición de la degradación de la 2-DR *in vitro*, fue determinada de acuerdo a la metodología de J.M. Gutteridge (1981), basada en la cuantificación del principal producto de esta degradación, el malonildialdehído MDA, un compuesto de tres carbonos formado a partir del ataque del radical hidroxil a la 2-DR (Cheeseman et al., 1988).

El MDA formado a partir de la degradación de la 2-DR fue detectado y cuantificado espectrofotométricamente en medio ácido a través de la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA) que, después de calentamiento, forma un cromóforo (MDA-TBA₂) con pico de absorción en 532nm e coeficiente de absorción molar (ϵ) 14.900M⁻¹cm⁻¹ (J.M. Gutteridge 1985; Gutteridge JM 1981). La formación de aductos en medio ácido está probablemente iniciada por el ataque nucleofílico que implica el carbono 5 del TBA y el carbono 1 del MDA seguido de la deshidratación y posterior reacción del intermediario aducto 1:1 con una segunda molécula de TBA (D. R. Janero, 1990).

Acorde a la metodología, en sistemas separados el radical hidroxilo fue generado por las siguientes condiciones pro-oxidantes: **i)** H₂O₂, **ii)** FeSO₄ y **iii)** H₂O₂ más FeSO₄. En breve, por separado y en duplicado la 2-DR (3 mM) se pre-incubó a temperatura ambiente durante 20 min con tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.4) en las tres condiciones pro-oxidantes: **i)** 0.05 mM FeSO₄, **ii)** 1 mM H₂O₂ y **iii)** 1 mM H₂O₂ más 0.05mM FeSO₄. Después se incubaron a 37 °C durante 60 minutos, en ausencia y presencia de los extractos en concentraciones finales de (0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 mg/mL). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) 2.8% y de (TBA) 0.8%. Después, los medios de reacción se calentaron durante 20 min a 100 °C. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro UV/Visible TR Reader Shimadzu a una λ 532 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de protección contra la degradación oxidativa en función de los controles, a raíz de la ecuación de (Mauricio Â. Q. 2006).

$$\text{Protección 2-DR (\%)}_{\text{Pro-oxidante}} = \frac{[(\text{Abs. Control} - (\text{Abs. Extracto} - \text{Abs. Blanco}))]}{\text{Abs. Control}} \times 100\%$$

Abs. Control es la absorbancia de la 2-DR con el pro-oxidante sin extracto, Abs. Extracto es la absorbancia de la 2-DR con pro-oxidante con extracto y Abs. Blanco es la absorbancia del pro-oxidante con extracto sin 2-DR.

3.4.1 Ensayo del mecanismo antioxidante en la degradación oxidativa de la (2-DR)

Utilizando el ensayo de variación de concentración de la 2-DR (3mM, 3.5mM, 4.0mM) según Mauricio Â. (2006), se determinó si el mecanismo de acción antioxidante de los extractos era quelante de metal (Fe^{+2}) o secuestrador de radicales hidroxil. En este ensayo cuando el porcentaje de protección permanece constante en la medida que se aumenta la concentración de molécula alvo (en este caso, 2-DR), el antioxidante es del tipo quelante, esto es, él se acompleja al metal e inhibe la formación del radical hidroxil OH^\bullet . Cuando el porcentaje de protección disminuye a la medida que se aumenta la concentración de la molécula alvo 2-DR, el antioxidante es del tipo secuestrador, ya que está compitiendo con la molécula alvo por el radical hidroxil. Luego, con el aumento de la molécula alvo ocurre una disminución en el porcentaje de protección (Mauricio Â. 2006).

De conformidad, la degradación oxidativa de la 2-DR fue generada por la condición pro-oxidante **iii)**, en la cual el radical hidroxil es formado a partir de la reacción de Fenton. Tres experimentos fueron hechos, el primero con la concentración de 2-DR 3.0mM, un segundo con 2-DR 3.5mM, y el tercero con 2-DR 4.0mM. La protección de la 2-DR fue calculada a raíz de la ecuación de (Mauricio Â. Q. 2006).

$$\text{Protección de la 2-DR (\%)} = \frac{[(\text{Abs. } (\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})_{\text{Control}} - (\text{Abs.}_{\text{Extracto}} - \text{Abs.}_{\text{Blanco}})] \times 100\%}{\text{Abs. } (\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})_{\text{Control}}}$$

$\text{Abs. } (\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})_{\text{Control}}$ es la absorbancia de la 2-DR con $(\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})$ sin extracto; $\text{Abs.}_{\text{Extracto}}$ es la absorbancia de la 2-DR con $(\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})$ con extracto; $\text{Abs.}_{\text{Blanco}}$ es la absorbancia del $(\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2})$ con extracto sin 2-DR.

3.5 Análisis Estadístico

Los resultados son expresados como media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se realizaron usando un análisis de dos-vía de varianza (ANOVA), seguido por prueba de Turkey's de múltiples comparaciones, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Rendimiento de las extracciones e identificación de taninos, polifenoles y flavonoides en los extractos del sorgo Guanipa 71

A través de la “prueba del clareamiento con cloro” se pudo detectar la presencia de taninos condensados en muestras del híbrido de sorgo Guanipa 71 con cascara (Cuadro 1). Según lo observado en el Cuadro 2, fue detectada la presencia de flavonoides en los extractos de grano y cascara del sorgo Guanipa 71. Dentro de estos flavonoides detectados en los extractos, se discriminó la presencia de catequina. Fue detectada la presencia de polifenoles, taninos condensados e hidrolizables en los ECAG y ECAC. Sin embargo, los resultados de las pruebas de polifenoles, taninos condensados e hidrolizables fueron negativos para los EAG y EAC. De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 3, se observó que fue obtenido un mayor porcentaje de rendimiento en las extracciones con la mezcla de acetona/agua 7:3, los resultados también revelaron que tanto en la extracción acuosa como en la cetoacuosa, el material de cascara reportó mayores porcentajes (%) de rendimiento que el material de grano.

4.2 Análisis de HPLC-DAD

La técnica de HPLC reveló la presencia de ácido gálico ($t_R = 12.35$ min; pico 1), catequina ($t_R = 15.07$ min; pico 2), ácido clorogénico ($t_R = 20.11$ min; pico 3), ácido caféico ($t_R = 24.81$ min; pico 4), ácido elágico ($t_R = 33.98$; pico 5), rutina ($t_R = 40.56$ min; pico 6), quercitrina ($t_R = 50.13$ min; pico 7), quercetina ($t_R = 52.17$ min; pico 8) y luteolina ($t_R = 60.12$ min; pico 9) (Fig. 1 y Tabla 1 y 2) en los extractos de (grano y cascara) del híbrido de Sorgo Guanipa 71.

En la tabla 1 referente a las extracciones acuosas, muestra que el (EAG) exhibió mayor concentración en (mg/g) de ácido caféico (29.14 ± 0.01) y rutina (21.58 ± 0.03). En el (EAC) los compuestos mayoritarios en (mg/g) fueron la rutina (31.87 ± 0.02), ácido caféico (23.01 ± 0.03), ácido clorogénico (22.95 ± 0.01) y luteolina (22.67 ± 0.03). Los datos de la tabla 2, referente a las extracciones cetoacuosas, muestran que el (ECAG) exhibió mayor concentración en (mg/g) de ácido gálico (21.79 ± 0.01) y quercetina (16.27 ± 0.02). En el (ECAC) los compuestos mayoritarios en (mg/g) fueron el ácido caféico (23.05 ± 0.01), ácido gálico (15.49 ± 0.03), y quercetina (15.32 ± 0.02). Todos los valores fueron expresados como la (Media \pm SD).

4.3 Actividad secuestradora de radical libre DPPH•

La inhibición del radical libre DPPH• es acompañada por la disminución de su absorbancia por la acción de un antioxidante (AH) o una especie radical (R•). De igual forma el grado de cambio de color es proporcional a la concentración y potencia de los antioxidantes.

Los resultados de la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante de los EAG, EAC, ECAG, ECAC de sorgo, y del control positivo ácido ascórbico, están representados en la figura 2. Tales resultados muestran que todos los extractos presentaron actividad secuestradora del radical DPPH•, por medio de la regresión no lineal de las curvas se reveló que el EAG fue el menos efectivo con un IC₅₀ 430.3µg/mL, seguido por el EAC con un IC₅₀ 481µg/mL. Por otro lado, el ECAC exhibió un mayor potencial de IC₅₀ 31.34µg/mL, seguido del ECAG de IC₅₀ 36.48µg/mL. El ácido ascórbico alcanzó una mayor actividad secuestradora con un IC₅₀ 5.52µg/mL.

El análisis estadístico por ANOVA de dos vías, seguido del test de múltiples comparaciones, reveló que las actividades secuestradoras de los ECAC y ECAG fueron estadísticamente superiores a la de los EAC y EAG. El orden decreciente de la actividad de inhibición de radical libre DPPH• de los extractos de sorgo, fue el siguiente:

$$IC_{50} \mu\text{g/mL} \quad \text{Ác. Asc.} > \text{ECAC} > \text{ECAG} > \text{EAG} > \text{EAC}$$

4.4 Capacidad Antioxidante Relativa (CAR)

El método de complejación por el fosfomolibdeno, es una manera simple y barata de evaluar la CAR de una mezcla compleja de compuestos, como es el caso de extractos obtenidos de plantas. La solución inicial de la prueba es amarilla, tornándose verde a medida que la solución de fosfato de molibdeno se reduce. Este método posee la ventaja de evaluar la capacidad antioxidante tanto de componentes lipofílicos como de hidrofílicos.

La observación de la formación del complejo verde de fosfato/Mo(V) característico de la reducción del Mo (VI), reveló que los extractos exhibían CAR. Observación que se confirmó con los resultados de la evaluación cuantitativa de la CAR de los EAC, EAG, ECAC y ECAG, representados en la figura 3.

La regresión no lineal de las curvas reveló que el ECAG fue más efectivo con un IC₅₀ 227.6 µg/mL, seguido del ECAC con un IC₅₀ 303µg/mL. El EAC fue el tercero con un IC₅₀ 1439 µg/mL, y el EAG exhibió la menor CAR con IC₅₀ 36.48µg/mL.

El análisis estadístico por ANOVA de dos vías, seguido del test de múltiples comparaciones, reveló que los ECAC y ECAG fueron estadísticamente superiores en CAR, que los EAG y EAC. El orden decreciente de CAR de los extractos de sorgo, fue el siguiente: $IC_{50} \mu\text{g/mL} : \text{ECAG} > \text{ECAC} > \text{EAC} > \text{EAG}$

4.5 Actividad quelante de ion Fe^{+2} y Poder reductor de ion Fe^{+3}

La actividad quelante y reductora de los diferentes extractos fue evaluada por la capacidad de los mismos en quelar Fe^{+2} y reducir Fe^{+3} respectivamente, a través del ensayo de la o-phe. Los datos de las figuras 4A, 4B, 4C y 4D son referentes a los efectos de los ECAC, EAC, ECAG y EAG en concentraciones de 0.1 e 0.5 mg/mL. El análisis estadístico por ANOVA de dos vías, seguido del test Tukey's de múltiple comparaciones de los resultados, mostró que los extractos fueron efectivos en quelar Fe^{+2} con mayor poder en la concentración de 0.5mg/mL. También reveló que las actividades quelantes de los EAC y EAG (0.5mg/mL) fueron cinéticamente mayores por observarse un descenso de las absorbancias más rápidos que la de los ECAC y ECAG. Sin embargo, se evidenció que los ECAC y ECAG formaron quelatos termodinámicamente más estables, comportamiento sustentado por el menor aumento de la absorbancia del quelato ferroína $(\text{ph})_3\text{Fe}^{+2}$ al ser añadido el ácido ascórbico, en relación a los controles de Fe^{+2} en 150min.

Con relación al poder reductor (lecturas abajo en las figuras 4A y 4C), el análisis estadístico de los resultados muestra que solamente los ECAC y ECAG exhibieron actividades reductoras. Este efecto aumentó significativamente a partir de 45 minutos en la concentración de 0.1mg/mL en el caso del ECAC (figura 4A), y en el caso del ECAG (Fig. 4C) el efecto del poder reductor aumentó significativamente a partir de 45 minutos en las dos (2) concentraciones testadas. No obstante, el aumento de la absorbancia después de añadir el ácido ascórbico, evidenció que los extractos redujeron parcialmente la totalidad de Fe^{+3} presente, en relación a los controles de Fe^{+2} en 150min.

En términos comparativos se observó que los EAG y EAC presentaron actividad quelante cinéticamente mayor que los ECAG y ECAC. Por otro lado, los ECAG y ECAC exhibieron mayor poder reductor, y formaron quelatos termodinámicamente más estables.

La tabla 3. Presenta los porcentajes de actividad de quelación de los extractos 0.5mg/mL hasta 90 minutos, observándose el siguiente orden de quelación:

$$\text{EAG} > \text{EAC} > \text{ECAC} > \text{ECAG}$$

La tabla 4. Presenta los porcentajes de potencial reductor de los extractos 0.5mg/mL hasta 90 minutos, observándose el siguiente orden de reducción:

$$\text{ECAG} > \text{ECAC} > \text{EAC} > \text{EAG}$$

4.6 Degradación oxidativa de la 2-Desoxy-D-ribose (2-DR)

La protección debida a los extractos contra la degradación oxidativa de la 2-DR, fue determinada por la metodología basada en la detección indirecta de aldehídos, principalmente el MDA. El MDA formado a partir de la degradación de la 2-DR, fue detectado y cuantificado en medio ácido a través de la adición (TBA) que, después de calentamiento, forma un cromóforo (MDA-TBA₂) con pico de absorción en 532nm.

En las figuras (A) EAC, (B) ECAC, (C) EAG, y (D) ECAG, Se observó que los extractos exhibieron una importante protección contra la degradación de la 2-DR generada por H₂O₂ 1mM, pero el análisis estadístico por ANOVA de dos vías, seguido del teste Tukey's de múltiples comparaciones, reveló que en las concentraciones de (0.25, 0.5) mg/mL los ECAC (B) y EAG (C) exhibieron una significativa mayor protección que los EAC (A) y ECAG (D).

En el sistema oxidativo de Fe⁺² 50μM de la 2-DR, los EAC, ECAC, EAG, y ECAG, confirieron una creciente protección contra la degradación oxidativa de la 2-DR conforme se aumentó las concentraciones de los mismos, a su vez los ECAC, EAG, y ECAG, según el análisis estadístico fueron estadísticamente más protectores que el EAC, mas no se observó diferencia significativa entre las protecciones conferidas por los ECAC, EAG, y ECAG.

Respecto a la degradación oxidativa de la 2-DR por la reacción de Fenton (Fe⁺² 50μM + H₂O₂ 1mM), los ECAC y ECAG se mostraron más efectivo en proteger la 2-DR que los EAC y EAG que se caracterizaron por conferir baja protección a la 2-DR. Por otro lado, el análisis estadístico de los resultados reveló que la protección conferida por el ECAC fue significativamente superior a la del ECAG.

La protección conferida a la 2-DR por los extractos, fue estadísticamente inferior en el sistema Fenton que en los sistemas oxidativos de Fe⁺² y H₂O₂ por separados.

Al considerar el análisis estadístico global de los resultados de la figura 5, se observó que el ECAC fue más efectivo en inhibir la degradación de la 2-DR en los tres

sistemas oxidativos. No obstante, considerando el análisis estadístico de los resultados se pudo establecer el siguiente orden de actividad protectora de los extractos.

$$\text{ECAC} > \text{EAG} \approx \text{ECAG} > \text{EAC}$$

4.6.1 Mecanismo antioxidante en la degradación oxidativa de la (2-DR)

Con el fin de determinar si la protección exhibida por los extractos en el sistema Fenton envolvió el poder quelante o la acción scavenger, se realizó el ensayo de variación de la concentración de la 2-DR. Para este ensayo se consideraron los ECAC y ECAG, porque fueron los que exhibieron mayores porcentajes (%) de protección ante el sistema Fenton. En conformidad se evaluó la acción protectora de los extractos en la 2-DR en sistemas de degradación oxidativa con $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ en concentraciones fijas, variando la concentración de la molécula alvo 2-DR (3.0, 3.5, 4.0) mM, y realizando comparaciones entre los niveles de protección de las mismas concentraciones de los extractos por cada sistema de reacción.

El análisis estadístico por ANOVA de dos vías, seguido del test Turkey's de comparaciones múltiples de los resultados de las figuras (6A) ECAC y (6B) ECAG, reflejó que al variar las concentraciones de la molécula alvo 2-DR, los porcentajes (%) de protección de la 2-DR conferida por los ECAC y ECAG por cada concentración, permaneció significativamente constante. Es probable que el conjunto de compuestos presentes en los dos extractos actuaron como un antioxidante del tipo quelante, esto es, se dió la complejación al metal e inhibiendo consecuentemente la formación del radical hidroxil.

En la tabla 5, el resumen de los valores de IC_{50} y porcentajes (%) de actividad antioxidante revelada a través de los ensayos realizados, demostró que los ECAG y ECAC exhibieron mayores potenciales antioxidantes que los EAG y EAC. Entre los extractos cetoacuoso, el ECAC en términos generales fue más eficaz como agente antioxidante que el ECAG. En cuanto a los extractos acuoso, el EAG exhibió globalmente mayor potencial antioxidante que el EAC. En conclusión el orden global de potencial antioxidante de los extractos fue el siguiente:

$$\text{ECAC} > \text{ECAG} > \text{EAG} > \text{EAC}$$

5.- DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Varios estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado la importancia de los fitoquímicos, compuestos fenólicos -como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanos y quinonas, entre otros- en la prevención de diferentes tipos de patologías, especialmente las de carácter oxidativo (Thomasset S. C, et al, 2007; Mikkelsen T. B, et al, 2006). Consecuentemente, la relevancia de pesquisas enfocadas en el uso de alimentos con fitoquímicos que podrían funcionar como componentes nutracéticos aumentó considerablemente en las últimas décadas (Gülçin, Huyut, Elmastas, 2010). En este contexto, el presente trabajo fue realizado para identificar los compuestos bioactivos presentes en extractos de grano y cascara del sorgo granífero híbrido Guanipa 71 e investigar el potencial antioxidante de los mismos a través de diferentes ensayos *in vitro*. En general, el conjunto de ensayos experimentales reveló la presencia de diferentes compuestos fenólicos en la composición de los extractos y propiedades antioxidantes de los mismos, como por ejemplo capacidad scavenger de radical, reductoras y quelantes de iones ferroso.

La detección de taninos condensados en el cereal integral del sorgo, de taninos condensados e hidrolizables en los extractos cetoacuoso de cascara y grano, al igual que en otros trabajos, confirman que sorgos venezolanos poseen taninos condensados entre sus metabolitos secundarios (Jaramillo, M., et al., 1993; Ciccola, P., 1989). La detección de taninos condensados en las muestra integrales de sorgo, a través de la “prueba del clareamiento con cloro” tiene una relevante importancia en el momento de coleccionar el material vegetal, una vez que ésta nos permite discriminar y seleccionar entre sorgos con presencia o ausencia de taninos condensados entre sus metabolitos secundarios, de acuerdo al objetivo de la investigación. La presencia de catequinas en los extractos también reveló la presencia de taninos, una vez que catequinas en extractos naturales no son halladas como estructuras monoméricas sino, asociadas a taninos, (Marcano, D. y Hasegawa, M., 1991). Estas moléculas de catequina pudieron ser escindidas de moléculas de taninos durante el proceso de extracción.

Las pruebas de reconocimiento de polifenoles y flavonoides, permitieron obtener resultados sobre el tipo de compuestos bioactivos presentes en los extractos del sorgo, en especial de flavonoides, y de esta forma se tuvo la noción de que compuestos estándares podrían considerarse en el análisis de HPLC-DAD.

Mayores rendimientos de extracción obtenidos con la mezcla acetona/agua 7:3, confirmaron a esta mezcla como la mejor opción de extracción. Eso puede estar relacionado con el hecho de que la acetona es un solvente dipolar que no forma estructuras asociadas, esto porque la carga positiva en su dipolo no reside en un átomo de hidrógeno, lo que le impide formar puentes de hidrógeno, al contrario del agua que por ser un solvente polar prótico tiene la capacidad de acoplarse mediante la formación de puentes de hidrógeno (Cortez D., 2012). Otro factor que pudo contribuir al rendimiento de la extracción cetoacuosa, es que la acetona tiene mayor capacidad de infiltrar el material vegetal. Se clasifica la capacidad de infiltrar de los solventes, conforme a valores en aumento de la tensión superficial (dinas/cm) y a valores decrecientes de viscosidad (centipoise) (M. Dauchot, 1973). Considerando la baja viscosidad y la tensión superficial media, las acetonas son en general clasificadas como infiltrantes (L. Masschelein–Kleiner, 2004). No obstante, análisis de HPLC en los extractos revelaron compuestos en común, quercetina, quercitrina, luteolina, catequina, rutina, ácidos gálico, elágico, caféico y clorogénico. La realización de los dos tipos de extracciones permitió determinar cuál de ellas reportaba un mayor porcentaje (%) de rendimiento, y así, usar la misma para futuros trabajos con otros cultivares de sorgo.

Las mayores concentraciones de compuestos hábiles en transferir electrones, como quercetina, ácidos gálico y elágico, encontradas en los ECAC y ECAG podrían justificar sus mayores niveles de inhibición del radical DPPH[•], y de reducción de Mo (VI) y Fe⁺³. El ácido elágico hidratado y el ácido gálico, poseen el grupo pirogalol en presencia de estructuras π -conjugadas que confieren mayor oxidabilidad para reducir iones metálicos e inhibir DPPH[•] por transferencia de protones, formando a la vez quinonas que pueden ser estabilizadas por resonancia (Rice-Evans, Miller & paganga, 1996). La estructura π -conjugada que permite la deslocalización de electrones, y el grupo catecol en el anillo B, favorecen el potencial de reducción de la quercetina, esta estructura probablemente activa el mecanismo de donación de un electrón y liberación de un protón, resultando en la formación de una semiquinona, la cual puede donar otro electrón y liberar otro protón para formar una quinona (Lopes, et al., 1999; Ananth Sekher. P., et al., 2001). Los protones liberados inhiben al DPPH[•] y los electrones reducen Mo (VI) y Fe⁺³. Interesantes estudios *in vitro*, postulan la quercetina como el flavonoide con el mayor poder secuestrador de especies reactivas de oxígeno (Heijnen, C. G., 2002). Bajos niveles de rutina y quercitrina, que poseen sus C-3 glicosilado, y del compuesto luteolina que no posee el grupo 3-OH,

parecen ser factores que suman una débil acción secuestradora a la quercetina y a los ácidos gálico y elágico en los ECAC y ECAG (Rice-Evans, Miller & paganga, 1996). Mayores niveles de catequina en los ECAC y ECAG parecen no contribuir a la inhibición de DPPH•, por no presentar el grupo 4C=O, ni el enlace doble C2-C3, para promover la deslocalización de electrones entre los anillos A y B, causando una menor actividad secuestradora (Rice-Evans et al., 1996).

Mayores porcentajes (%) de quelación de Fe⁺² fueron observados por los EAC y EAG. Los resultados del EAC podrían explicarse por sus mayores concentraciones de los compuestos rutina, luteolina, ácidos caféico y clorogénico; mientras que en el caso de los resultados del EAG podrían ser debido a los compuestos mayoritarios rutina, quercitrina, y los ácidos caféico y clorogénico. Estos compuestos presenta en su estructura química el grupo catecol que favorece la completa acomplejación de iones Fe⁺². En el caso de la rutina, su actividad antioxidante es mejorada cuando esta está acomplejada a iones metálicos (Afanas'eva, et al., 2001). La formación del complejo entre catecol y un ion metálico provocaría una disminución en el pKa de hidrógeno del segundo hidroxilo fenólico y, con eso, favorecería la completa acomplejación Fe-catecol (Pardo-Abreu G. L., et al., 2006). Teóricamente la quercetina posee tres posibles sitios de quelación del ion Fe⁺²; el grupo catecol del anillo B, el grupo 3-OH con el 4 C=O, y 4 C=O con el grupo 5-OH (Leopoldini, M, et al., 2004b). Esta capacidad quelante de los EAC y EAG del sorgo granífero híbrido Guanipa 71, podría orientar hacia nuevas estrategias alimenticias para evitar la sobrecarga de iones Fe⁺² y la consecuente generación de radicales libres (Robak J., 1985). La baja actividad reductora de estos extractos, puede explicarse por sus bajos niveles de quercetina, ácidos gálico y elágico. Mientras que las actividades quelantes de Fe⁺² de los ECAC y ECAG podrían justificarse en parte por el efecto sinérgico de los niveles de, catequina, rutina, quercitrina, luteolina, ácidos caféico y clorogénico.

Los quelatos formados entre el ion Fe⁺² y los compuestos presentes en los EAC y EAG fueron cinéticamente favorecidos por disminuir más rápidamente la absorbancia característica del quelato ferroína (ph)₃Fe⁺². Sin embargo, los quelatos formados entre el ion Fe⁺² y los compuestos presentes en los ECAC y ECAG, ocasionaron un menor aumento de la absorbancia del quelato ferroína, al ser añadido el ácido ascórbico a los 90 minutos de iniciado el ensayo, esto evidenció que los quelatos formados tenían mayores estabilidades termodinámicas, y consecuentemente energías de estabilización superiores a

la del quelato ferroína de alta energía de estabilización de campo cristalino (EECC) (Shriver, A., 2003).

El Hierro puede encontrarse en dependencia de las características de los organismos de cada individuo, en concentraciones que varían entre 35 a 50mg/Kg, en forma funcional como hemoglobina, mioglobina, citocromos, enzimas con complejos de sulfuro de hierro y otras Fe-dependientes (Hermes-Lima, M., 2004; Manjunatha H, Srinivasan K., 2006). El Fe tiene la capacidad única de alterar su equilibrio redox en respuesta a ligandos, que hace que sea esencial para diversos procesos celulares (Kruszewski M., 2003). Por tales razones las células mantienen la concentración de hierro libre a un nivel mínimo requerido para evitar los efectos tóxicos de su exceso. Sin embargo, en algunas situaciones se altera su equilibrio y los resultados de su sobrecarga que se asocia con el estrés oxidativo que induce varios problemas de salud (Goodman LS, & Gilman A., 2006). Antes estos desequilibrios el cuerpo carece de medios efectivos para excretar excesos de hierro y por lo tanto el interés en desarrollar agentes quelantes capaces de formar complejos con hierro y promover su excreción (Liu ZD, & Hider RC. 2002; Birch N, et al., 2006). La interesante capacidad de los extractos acuoso y cetoacuoso del sorgo Guanipa 71 para quelar iones Fe^{+2} *in vitro*, reveló la noción de que este cereal podría actuar como un alimento que además de energéticamente suplir al consumidor, sume una acción de control sobre los niveles de Fe^{+2} en el organismo.

La donación sinérgica de electrones de los niveles de quercetina, ácidos gálico y elálgico, presentes en el ECAC, podría explicar la mayor inhibición de degradación oxidativa de la 2-DR frente al H_2O_2 , en comparación al EAC. Este mecanismo genera especies radicalares que son estabilizadas por formación de semiquinonas y quinonas para prevenir las reacciones en cadena de radicales (Wright, J.S., et al., 2001; Leopoldini M. et al., 2004a; Leopoldini M. et al., 2004b). El EAG con mayor nivel de ácido elálgico exhibió una mayor inhibición de degradación oxidativa de la 2-DR, que el ECAG con mayores niveles de ácido gálico y quercetina. Esto podría deberse a los mayores niveles de ácidos clorogénico y caféico, que al disociarse neutralizarían radicales $\bullet OH$ por la vía de formación de enlaces covalentes entre los átomos de oxígeno de carga negativa y átomos de oxígeno del $\bullet OH$, formando peroxiácidos $R(C=O)OOH$. Para la formación del $\bullet OH$, un posible mecanismo pudo ser que del 21% de O_2 atmosférico (Halliwell B, & Gutteridge J; 2007), una pequeña fracción energéticamente excitada e inestable (oxígeno singlete ${}^1O^2$ con dos electrones apareados en los orbitales antienlazantes $\pi^* 2p$) (Halliwell B., 2006),

fue reducida debido al favorable potencial de reducción (-0.33volt) para formar el anión $O_2^{\bullet-}$, y luego la reacción de Haber-Weiss en la que el $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 promueven la formación del radical $\bullet OH$ (F. Haber & J. Weiss, 1932; WH Koppenol, 2001). Por ser pequeña la fracción de oxígeno singlete, es generada una baja concentración de $O_2^{\bullet-}$ que a su vez se comporta como reactivo límite en la reacción con el H_2O_2 , limitando la formación de $\bullet OH$. Esto explicaría la mayor protección de la 2-DR en el sistema de H_2O_2 que en el sistema de Fenton con mayor concentración de $\bullet OH$ formada por la reacción directa del Fe^{+2} y H_2O_2 . De igual forma este mecanismo podría justificar los mayores niveles de protección conferidos por los EAC, ECAC, EAG, y ECAG a la 2-DR en el sistema de degradación por Fe^{+2} .

La inhibición de degradación oxidativa de 2-DR por los EAC, ECAC, EAG y ECAG frente a la acción del Fe^{+2} , guardó una importante correlación de pendiente positiva con el aumento de la concentración de cada extracto. Tales datos indican una acción antioxidante por vía de quelación de iones Fe^{+2} , previniendo que éstos participen en la generación de radicales libres (Leopoldini M. et al., 2004a; Leopoldini M. et al., 2004b; Jovanovic, S., et al., 1998). Un posible mecanismo para la formación del $\bullet OH$ podría partir de la reacción de auto-oxidación del Fe^{+2} para producir radicales $O_2^{\bullet-}$ que al combinarse con protones del medio reaccionar formarían H_2O_2 ; la fracción de Fe^{+2} sin oxidar reaccionaría con el H_2O_2 formado, produciendo el radical $\bullet OH$ (Hermes-Lima M., 2004; Fenton H., 1894; Azzi A. et al., 2004). El radical $\bullet OH$ con constantes de reacción con otras moléculas que varían de 10^7 y $10^9 M^{-1}.S^{-1}$, oxidaría con facilidad a la 2-DR (Halliwell B, 2006; Genestra M, 2007).

Niveles constantes de protección de la 2-DR al variar su concentración frente a concentraciones fijas de Fe^{+2}/H_2O_2 , podrían reconfirmar en términos generales que el conjunto de compuestos presentes en los ECAC y ECAG actuaron como un antioxidante del tipo quelante de Fe^{+2} previniendo de ese modo la formación de H_2O_2 y $\bullet OH$. No obstante, tal mecanismo quelante no excluye una componente secuestradora de radicales libres, hecho evidenciado por otros autores (Andrade RG, et al., 2006; South PK, & Miller DD, 1998). Además, quelatos formados podrían ser capaces de secuestrar $O_2^{\bullet-}$ (Mahal HS, et al., 2005). Se ha demostrado que la actividad antioxidante de la rutina, es mejorada cuando esta está acomplejada a iones metálicos (Afanás'eva, et al., 2001).

En conclusión, el conjunto de resultados obtenido en este trabajo muestran que los extractos de grano y cascara del genotipo de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.)

Moench] híbrido Guanipa 71, exhibieron elevadas actividades antioxidante *in vitro*, las cuales fueron confirmadas a través de la capacidad secuestradora de radical libre DPPH[•], la actividad quelante de ion Fe⁺², poder reductor de ion Fe⁺³, capacidad de inhibir la degradación oxidativa de la (2-DR), y la Capacidad Antioxidante Relativa (CAR). Tales propiedades tornan el sorgo granífero una planta promisoría para ser evaluada en estudios antioxidantes *in vivo*, y perfilan el uso de granos y cascara del cereal integral en alimentación humana con importantes propiedades antioxidantes, a pesar de que taninos condensados fueron confirmados entre sus metabolitos secundarios.

La cascara del sorgo al igual que la cascara de otros cereales tradicionales, es comúnmente desechada en el proceso de producción de alimentos humano y animal. Sin embargo, este trabajo reveló compuestos bioactivos en sus extractos acuosos y cetoacuosos, entre los cuales figuraron los flavonoides y ácidos fenólicos que le confirieron relevante actividad antioxidante *in vitro*, estos resultados tornan a cascara de sorgo como un importante material vegetal a ser considerado en la producción de alimentos humano.

6. FIGURAS

Cuadro 1. Identificación de taninos condensados en el sorgo integral.

“Prueba del clareamiento con cloro” (Waniska et al., 1992).	Sorgo granífero [<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench] híbrido Guanipa 71
	Positiva (+) (color marrón)

Cuadro 2. Reconocimiento de polifenoles, flavonoides y taninos

Reacción	Extracto acetona/agua		Extracto acuoso	
	Grano	Cascara	Grano	Cascara
H ₂ SO ₄ conc. Flavonoides	+	+	+	+
FeCl ₃ 2% Flavonoides	+	+	+	+
HCl conc./Δ (catequinas)	+	+	+	+
FeCl ₃ 2% (Polifenoles)	+	+	-	-
FeCl ₃ 2% (Taninos condensados)	+	+	-	-
FeCl ₃ 2% (Taninos hidrolizables)	+	+	-	-

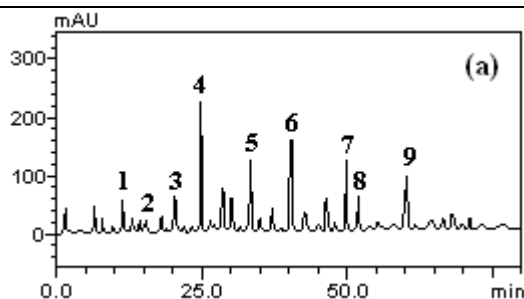
Prueba positiva = + Prueba negativa = -

Cuadro 3. Porcentajes (%) de rendimiento de las extracciones

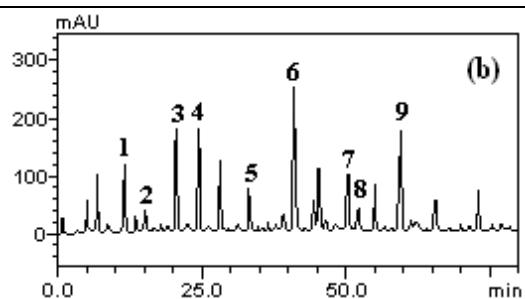
Muestra	Extracción acetona/agua			Extracción acuosa		
	Material total m(g)	m(g) extracto	% (m/m) Rend.	Material total m(g)	m(g) extracto	% (m/m) Rend.
Grano	285	11.05	3.87	185	4.92	2.66
Cascara	130	7.94	6.1	125.5	4.63	3.69

Rend. = Rendimiento.

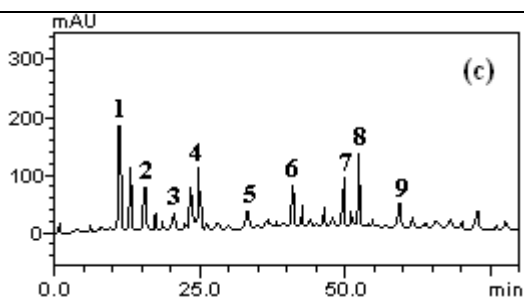
S. granífero bicolor híbrido Guanipa 71
(grano) extracto acuoso



S. granífero bicolor híbrido Guanipa 71
(cascara) extracto acuoso



S. granífero bicolor híbrido Guanipa 71
(grano) extracto acetona/agua



S. granífero bicolor híbrido Guanipa 71
(cascara) extracto acetona/agua

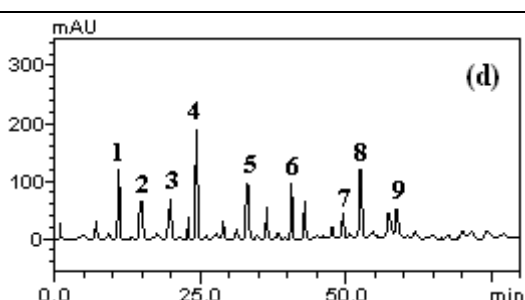


Figura 1 – Perfil representativo de la cromatografía líquida de alta eficiencia del híbrido de Sorgo *granífero bicolor* Guanipa 71. EAG (a), EAC (b), ECAG (c) y ECAC (d). Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogénicos (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), rutina (pico 6), quercitrina (pico 7), quercetina (pico 8) y luteolina (pico 9).

Tabla 1. Composición fenólica de los EAG y EAC del Sorgo granífero Guanipa 71.

Compuestos	Acuoso (grano) mg/g	Acuoso (cascara) mg/g
Ácido gálico	6.23 ± 0.01 a	16.07 ± 0.02 a
Catequina	1.98 ± 0.03 b	3.14 ± 0.01 b
Ácido clorogénico	6.47 ± 0.02 c	22.95 ± 0.01 c
Ácido caféico	29.14 ± 0.01 d	23.01 ± 0.03 c
Ácido elágico	15.67 ± 0.01 e	8.62 ± 0.01 d
Rutina	21.58 ± 0.03 f	31.87 ± 0.02 e
Quercitrina	15.69 ± 0.01 e	9.94 ± 0.03 f
Quercetina	6.42 ± 0.01 a	3.08 ± 0.01 b
Luteolina	9.87 ± 0.02 g	22.67 ± 0.03 c

Resultados son expresados como media ± desviación estándar (SD) de tres determinaciones. Promedios seguidos por letras diferentes difieren por la prueba de Tukey en $p < 0.05$.

Tabla 2. Composición fenólica de los ECAG y ECAC del Sorgo granífero Guanipa 71.

Compuestos	Acetona/agua (grano) mg/g	Acetona/agua (cascara) mg/g
Ácido gálico	21.79 ± 0.01 a	15.49 ± 0.03 a
Catequina	9.36 ± 0.01 b	9.28 ± 0.02 b
Ácido clorogénico	3.07 ± 0.02 c	9.31 ± 0.01 b
Ácido caféico	14.39 ± 0.01 d	23.05 ± 0.01 c
Ácido elágico	3.18 ± 0.03 c	13.27 ± 0.03 d
Rutina	9.12 ± 0.01 b	13.29 ± 0.01 d
Quercitrina	13.95 ± 0.01 d	5.12 ± 0.01 e
Quercetina	16.27 ± 0.02 e	15.32 ± 0.02 a
Luteolina	5.03 ± 0.03 f	5.17 ± 0.01 e

Resultados son expresados como media ± desviación estándar (SD) de tres determinaciones. Promedios seguidos por letras diferentes difieren por la prueba de Tukey en $p < 0.05$.

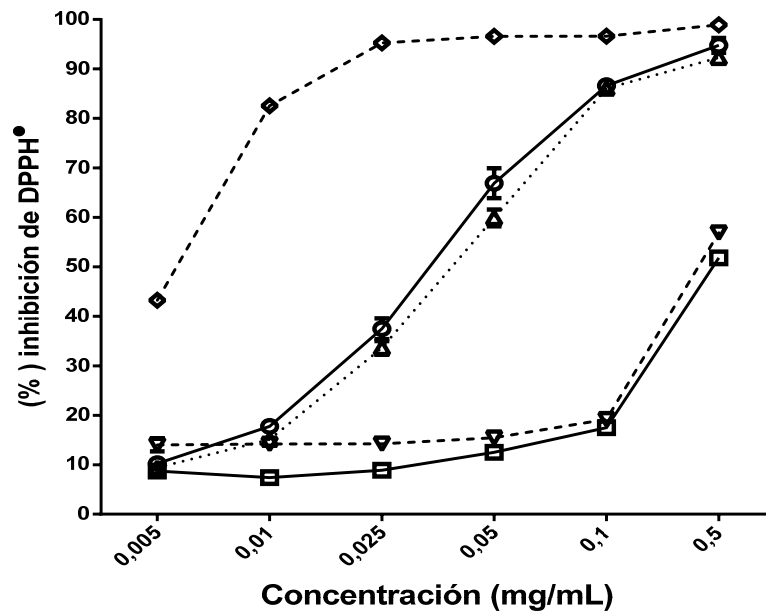


Figura 2. Gráfico de la actividad secuestradora de radical libre de los EAC □ , ECAC φ, EAG ▽, ECAG △ de sorgo, medida por el ensayo del radical libre 1,1- Diphenyl – 2 picryhidrazyl (DPPH[•]). Ácido ascórbico ◇ fue usado como control positivo.

Los valores son expresados como las medias ± S.E.M. (n=11) [Regresión no lineal de las transformadas de las curvas, ANOVA de dos-vía, seguido del test multiple comparisons. Fue usado el programa GraphPad Prism 6.0].

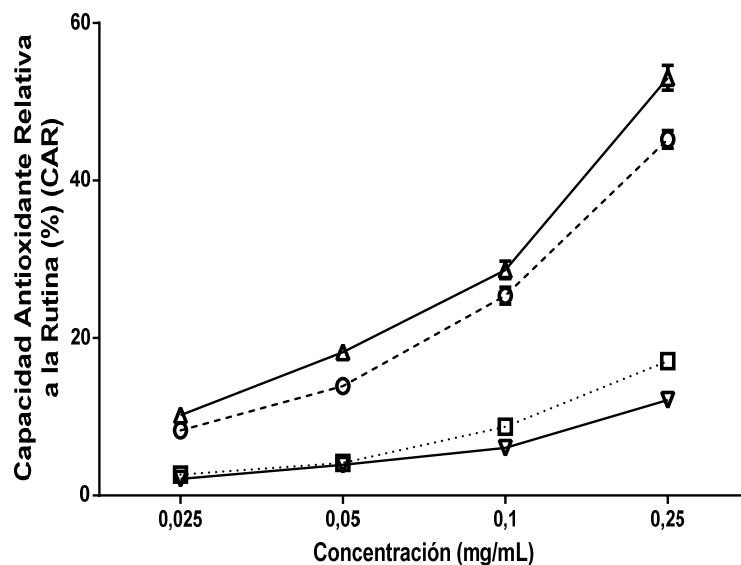


Figura 3. Efecto en la reducción del Mo (VI) a Mo (V) de los EAC □, EAG▽, ECAC ○ y ECAG △ de sorgo.

Los valores son expresados como las medias \pm S.E.M. (n=6) [Regresión no lineal de las transformadas de las curvas, ANOVA de dos-vía, seguido del test multiple comparisons, fue usado el programa GraphPad Prism 6.0].

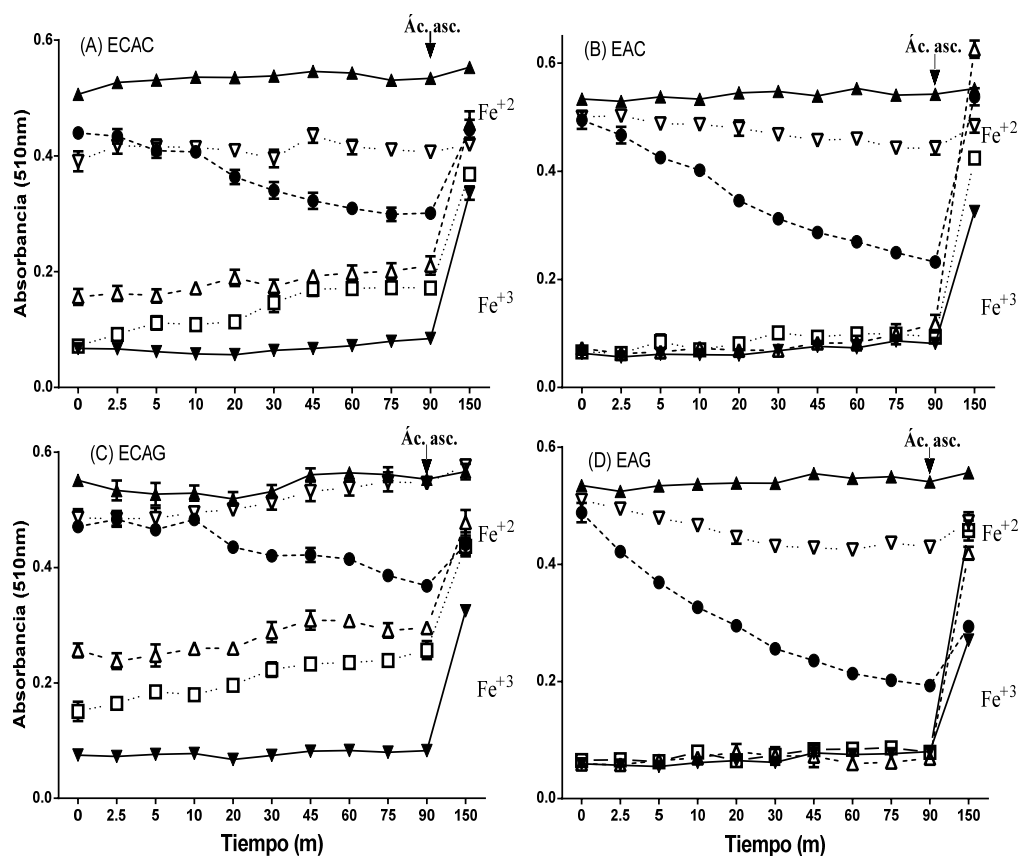


Figura 4. Efecto de los ECAC (A), EAC (B), ECAG (C) y EAG (D), sobre la absorbancia en los sistemas de reacción (Fe^{+2} 100 μM /o-fenantrolina 15 μM) y (Fe^{+3} 100 μM /o-fenantrolina 15 μM).

0.5 mg/mL de extracto + Fe^{+2} ● 0.5 mg/mL de extracto + Fe^{+3} ▲
 0.1 mg/mL de extracto + Fe^{+2} ▼ 0.1 mg/mL de extracto + Fe^{+3} □
 Control Fe^{+2} ▲ Control Fe^{+3} ▼

Los valores son expresados como las medias \pm S.E.M. (n=11) [ANOVA de dos-vía, seguido del test Tukey's de múltiples comparaciones. Fue usado el programa GraphPad Prism 6.0].

Tabla 3. Porcentajes (%) de quelación de los extractos.

Amostra (0.5mg/mL)	(%) quelación Fe ⁺² / Tiempo (min)								Ac. Asc.
	2.5	5	20	30	45	60	75	90	
ECAC	22.267	30.935	37.635	39.839	45.551	46.124	46.918	47.336	28.049
EAC	20.315	25.827	38.246	44.492	48.860	53.438	55.708	59.115	9.686
ECAG	12.989	17.231	22.984	26.794	28.326	29.404	32.416	32.402	26.697
EAG	22.876	33.021	46.409	54.325	58.524	62.267	63.966	65.091	48.998

Ordem de atividade de quelação:

EAG (65.09%) > EAC (59.12%) > ECAC (47.34%) > ECAG (32.40%)

Tabla 4. Porcentajes (%) de reducción de los extractos.

Amostra (0.5mg/mL)	(%) reducción Fe ⁺³ / Tiempo (min)								Ac. Asc
	2.5	5	20	30	45	60	75	90	
ECAC	19.338	19.970	23.359	22.602	23.817	25.131	24.292	22.903	22.579
EAC	3.439	3.973	3.454	3.875	4.910	7.770	7.262	8.803	43.566
ECAG	33.001	31.789	38.918	41.223	42.324	41.310	39.858	42.252	26.092
EAG	-1.680	1.713	1.904	2.495	-0.586	-2.906	-2.519	-1.529	30.128

Ordem do potencial redutor:

ECAG (42.25%) > ECAC (22.91%) > EAC (8.8%) > EAG (-1.53%)

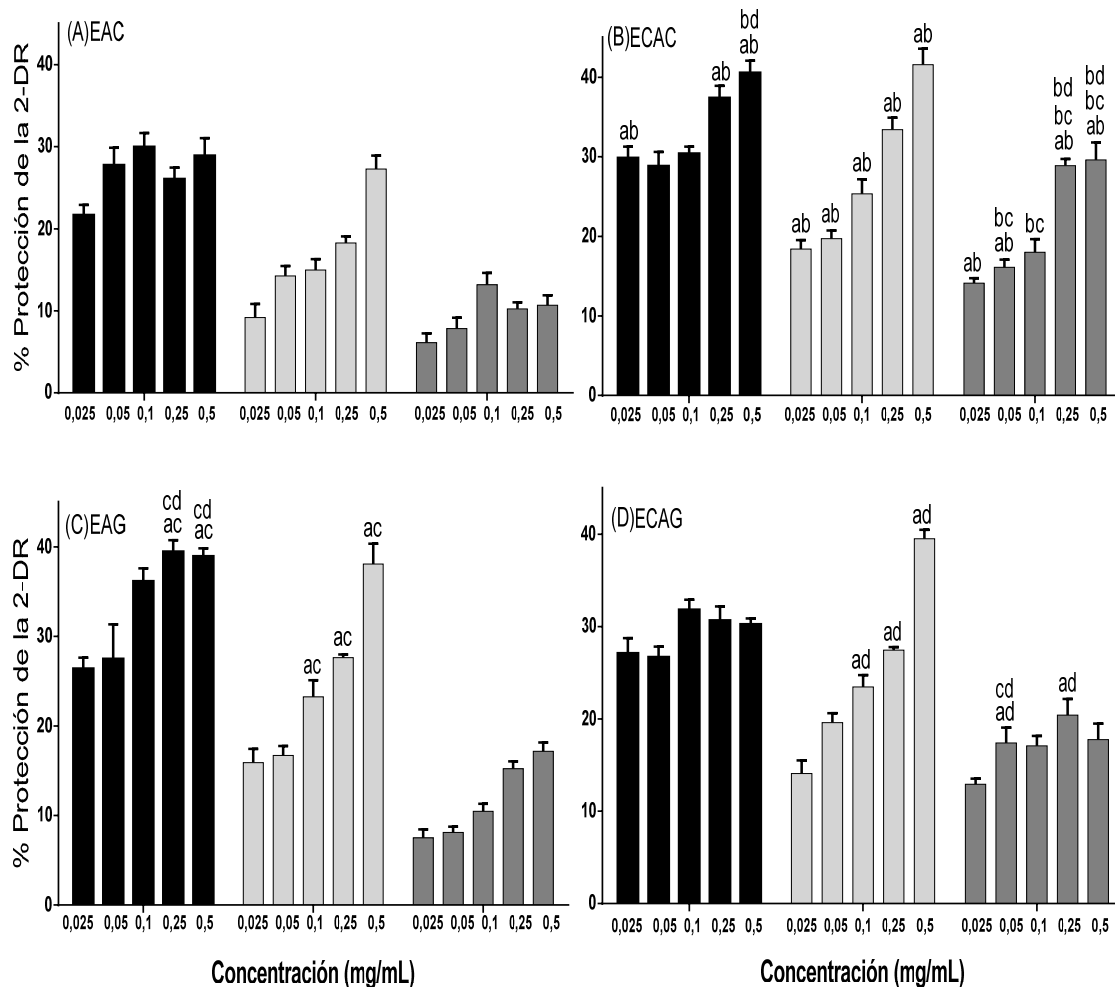


Figura 5. Porcentaje (%) de protección de la 2-DR de los EAC (A), ECAC (B), EAG (C) y ECAG (D) de sorgo, en tres sistemas de degradación *in vitro*: H₂O₂ 1mM-Ext ■ ; Fe⁺² 50µM-Ext □ ; Fe⁺² 50µM + H₂O₂ 1mM-Ext ▒ .

Los valores son expresados como las medias ± S.E.M. (n=8) [ANOVA de dos-vía, seguido del test Tukey's multiple comparisons. Fue usado el programa GraphPad Prism 6.0].

ab: Protección significativamente mayor en la comparación de los extractos A y B, entre sistema oxidativo similar de igual concentración.

Las letras en minúscula definen los extractos que son comparados.

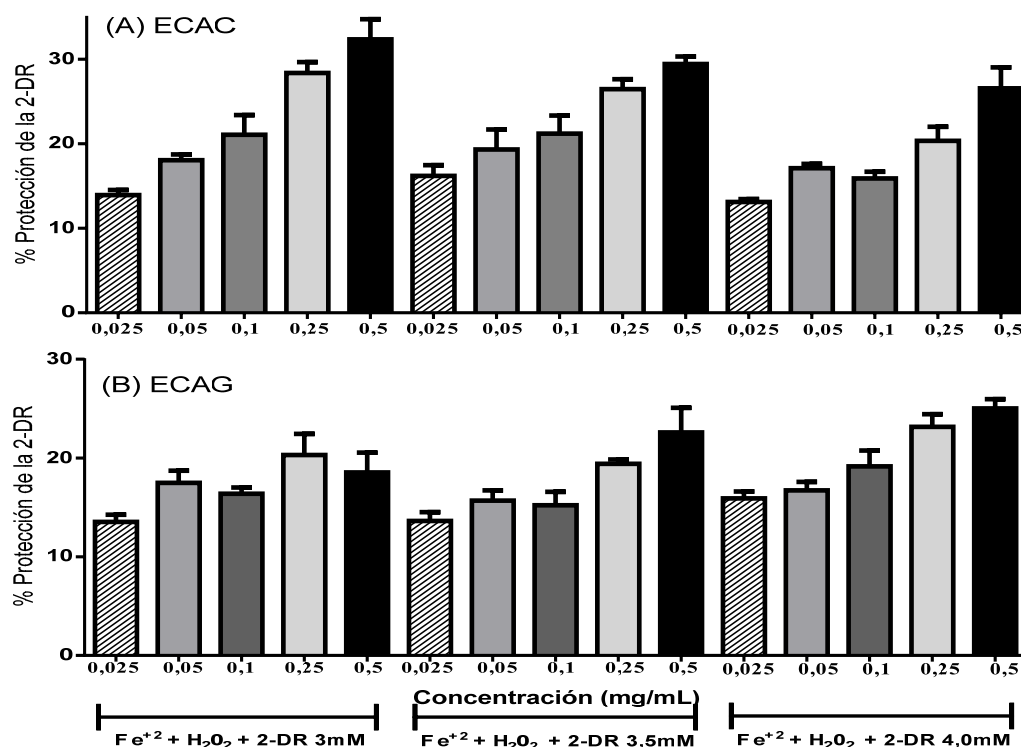


Figura 6. Porcentaje (%) de protección de la 2-DR por los ECAC (A) y ECAG (B) de sorgo, en la degradación oxidativa generada por la reacción de Fenton *in vitro* Fe^{+2} $50\mu M$ + H_2O_2 1mM, en concentraciones (3.0mM, 3.5mM, 4.0mM) de 2-DR.

Los valores son expresados como las medias \pm S.E.M. (n=4) [ANOVA de dos-vía, seguido del test Tukey's multiple comparisons. Fue usado el programa GraphPad Prism 6.0].

Tabla 5. Resumen de los valores de IC_{50} y porcentajes (%) de actividad antioxidante.

Ensayo	EAG	EAC	ECAG	ECAC	
IC_{50} DPPH [•] ($\mu g/mL$)	430.3	481	36.48	31.34	
IC_{50} CAR ($\mu g/mL$)	3010	1439	227.6	303	
Ophe (%) quelación 90min.	65.09	59.12	32.40	47.34	
Ophe (%) reducción 90min.	-1.53	8.8	42.25	22.91	
2-DR (%) protección	H_2O_2	38.96	28.91	30.27	40.57
	Fe^{+2}	38.08	27.27	39.53	41.58
	$H_2O_2 + Fe^{+2}$	17.18	10.67	17.77	29.60

- En los ensayos de la ophe y 2-DR, la concentración de los extractos fue 0.5mg/mL.

Afanas'eva I. B., Ostrakhovitch E. A., Mikhal'chik E. V., Ibragimova G. A., Korkina L. G., Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. **Biochem Pharmacol.** 2001. Mar 15; 61(6): 677-684.

Ananth Sekher Pannala, Tom S. Chan, Peter J. O'Brien, and Catherine A. Rice-Evans. Flavonoid B-Ring, Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 2001; 282:1161-1168.

Anderson, L. R., & Wolf, J. W. Compositional changes in trypsin inhibitor, phytic acid, saponins and isoflavones related to soya bean processing. **Journal of Nutrition.** 1995; 581S, 588S.

Andrade RG, jr., Ginani JS, Lopes GK, Dutra F, Alonso A, Hermes-Lima M. Tannic acid inhibits in iron-dependent free radical formation. **Biochimie.** 2006 sep; 88(9): 1287-96.

Awika, J. M., & Rooney, L. W. Sorghum Phytochemicals and their potencial impact on human health. **Phytochemistry.** 2004; 65(9), 1199-1221.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Ronald, L., & Cisneros-Zevallos, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 2003; 51(23), 6657-6662.

Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Terminology and critical thinking. **Free radical biology.** FEBS Lett. 2004. Jan 30; 558(1-3): 3-6.

Birch N, Wang X, Chong HS. Iron chelators as therapeutic iron depletion agents. **Expert Opin Ther Patents** 2006; 16:1533-56.

Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J. L., & Hartle, D. K. Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. **Journal of Medicinal Food.** 2008; 11:307-312.

Brand-Willians, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm-Wiss. u.-Technol.** 1995; 28:25-30.

Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H. Hydroxyl-Induced-Catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. **Biochem J.** 1988 Jun15; 252(3):649-53.

CICCOLA, P. Microestructura de la testa y contenido de taninos (Proantocianidinas) en algunos cultivares de sorgo granífero producido en el país. Trabajo de grado Facultad de Agronomía U.C.V. Maracay- Venezuela. 1989.

Conde, E.; Cadahía, E.; García-Vallejo, M. C. High-pressure liquid chromatographic analysis of polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *globulus* and *rudis*: Proanthocyanidins, ellagitannins and flavonol glycosides. **Phytochemical Análisis**. 1997; (8)2: 78-83.

Cork, S. J.; Krockenberger, K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants - insights from investigations on eucalyptus leaves. **Journal of Chemical Ecology**. 1991; (17)1:123-134.

Cortez Yáñez Diana Sofía. Obtención de extracto tánico y extracto gálico a partir de la harina de vaina de guarango (*caesalpineia spinosa*) (Mol.) O. kuntz, a escala laboratorio. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Ingeniería Química. Tesis, Riobamba – Ecuador 2012.

Daniela Moura de Oliveira e Deborah Helena Markowicz Bastos. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo – Brasil. **Quim. Nova**. 2011; (34) 6:1051-1056.

MARCANO, Deanna y HASEGAWA Masahisa. (1991). Libro: Fitoquímica Orgánica. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Pp. 81-115.

D. R. Janero. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Review Article. **Free Radical Biology & Medicine**. 1990; 9:515-540.

Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. **Journal of Cereal Science**. 2006; 44:236–251.

Fardet, A., Rock, E. Rémésy, C. Is the *in vitro* antioxidant potencial of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**. 2008; (48)2:258-276.

Farrar, J. L., Hartle, D. K., Hargrove, J. L. A novel nutraceutical property of select sorghum (*sorghum bicolor*) brans: inhibition of protein glycation. **Phytotherapy Research**. 2008; (22)8: 1052-1056.

- Fenton H. The oxidation of Tartaric Acid in the presence of Iron. **J. Chem Soc.**1894; 10:157-158.
- García, J, Soto E. Zonificación ecológica de cultivos IV. Determinación de fechas de siembra. **Rev Fac Agron.** 1976; 9:45-68.
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants, cell signal. 2007 sep; 19(9):1807-19.
- Goodman LS, Gilman A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
- Guerra M. El Portal de Los Llanos. Municipio Turén, Edo. Portuguesa. Portuguesa 2008. Disponible: www.estadoportuguesa.com.ve/municipio_turen.shtml.
- Gülçin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry.** 2010; (3)1:43-53.
- Gutteridge JM. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. **FEBS Lett.** 1981. Jun 15; 128 (2):343-6.
- Haber F, Weiss J. On the catalysis of hydroperoxide. **Naturwissenschaften.**1932; 20:948-950.
- Hagerman, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology.** 1988; (14)2:453-461.
- Hagerman, A. E.; Zhao, Y.; Johnson, S. E.; Shahadi, F. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins. **Acs Sym Ser.** 1977; 662:209-222.
- Halliwell B, Gutteridge J. In: Free Radicals in Biology and medicine. 4th ed. New York; 2007.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidant. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** 2006 Jun; 141(2): 312-322.
- Heijnen, C. G. et al. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Rad. Res.** 2002; 36:575-581.
- Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. 1st ed. New York: John Wiley & Sons; 2004. p.319-366.

Ítavo, C. C. B. F., Morais, M. G., Ítavo, L. C. V. Consumo e digestibilidade de nutrientes de dietas com silagens de grão amidos de milho ou sorgo, em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2009; 61: 452-459.

Jae Sue Choi, Hee Jung Lee, and Sam Sik Kang. Alaternin, Cassiaside and Rubrofusarin gentiobioside, Radical Scavenging Principles from the Seeds of Cassiadora on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical. **Arch. Pharm. Res.** 1994; 17(6):462-466.

Jaramillo, M., Peña, M., Angulo, I., León, A., Obispo, N. Valor nutricional de cultivares de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L) Moench] altos en taninos producidos en Venezuela. Composición química. **Zoot Trop.** 1993; 11:129-135.

Jeffrey B. Harborne, Christine A, Williams. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55 (2000), 481-504. Review. Department of botany, school of plant science, the University of Reading, Reading R66 6AS, UK.

J.M. Gutteridge. Superoxide dismutase inhibits the superoxide driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. **FEBS Lett.** 1985; 185: 19-23.

Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Simic, M. G.; Hara, Y. In *Flavonoids in Health and Disease*; Rice-Evans, C.; Packer, L., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1998; p 137.

Kamath, V, G., Chandrashekar, A. y Rajini, P. S. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. **Journal of Cereal Science**. 2004; (40)3:283-288.

Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. **Redox Rep.** 2001; 53(2):75-100.

Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutat Res** 2003; 531:81-92.

Leopoldini, M.; Prieto Pitarch, I.; Russo, N.; Toscano, M. Structure, conformation and electronic properties of apigenin, luteolin and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. **J. Phys. Chem. B** 2004a; 108:92-94.

Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant properties of phenolic compounds. H-atom versus electron transfer mechanism. **J. Phys. Chem.** 2004b; 108:4916-4922.

Liliane Masschelein–Kleiner. Los solventes. Centro Nacional de Conservación y Restauración DIBAM. Dirección de Biblioteca, Archivos y Museos. Tabaré 654, Recoleta –Santiago de Chile 2004. Pág.86. Fono(562)7382010. fax:(652)7320252.

Liu ZD, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. **Coord Chem Rev.** 2002; 232:151-71.

Lopes G. K., Schulman H. M., Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hidroxil radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochim Biophys Acta.** 1999. Oct 18; 1472 (1-2): 142-152.

Lu, & Foo, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry.** 1997; (59)2: 187-194.

Mahal HS, Kapoor S, Satpati AK, Mukherjee T. Radical scavenging and catalytic activity of metal-phenolic complezes. **J Phys Chem B.** 2005 Dec 22; 109 (50): 24197-24202.

Manjunatha H, Srinivasan K. Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats. **FEBS J.** 2006; 273(19): 4528-4537.

Matés JM, Pérez -Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem.** 1999; 32:595–603.

Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. **Free Radic Biol Med.** 2010; 49:1328–1341.

Mauricio Ângelo Q. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH (piridoxal isonicotinoil hidrazona): um polifenol natural e um quelante sintético. Dissertação de Mestrado, Brasília. Universidade de Brasília; 2006. Pág. 76-77.

M. Dauchot – Dehon, “Les effets de solvants sur les couches picturales. 1. Alcools et acétone“, Bulletin IRPA/KIK, XIV (1973/74) 89 – 104.

Menezes, L. F. G., Segabinazzi, L. R., Brondani, I. L. Silagem de milho e grão de sorgo como suplementos para vaca de descarte terminadas em pastagem cultivada de estação fria. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 2009; (61):182-189.

Mikkelsen TB, Osler M, Orozova-Bekkevold I, Knudsen VK, Olsen SF. Association between fruit and vegetable consumption and birth weight: a prospective study among Danish women. **Scand J Public Health**. 2006; 34: 616-22.

Minnoti G, Aust SD. An investigation into the mechanism of citrate-Fe⁺²-dependent lipid peroxidation. **Free Rad. Biol. Med.** 1987; 3:379-87.

Pardo-Abreu G. L., Sanchez-Baldoquin C., Avila-Gonzalez R., Delgado R., Naal Z., Curti C., Fe(III) improves antioxidant and citoprotecting activities of mangiferin. **Eur J Pharmacol**. 2006. Oct 10; 547(1-3). 31-36.

Pereira, R.P.; Boligon, A.A.; Appel, A.S.; Fachineto, R.; Ceron, C.S.; Tanus-Santos, J.E.; Athayde, M.L.; Rocha, J.B.T. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. **Industrial Crops and Products**. 2014; 53: 34- 45.

Prieto P. Pineda M. and Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex. Specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, 1999; 269(2): 337-41.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. 1996; (20)7):933-956.

Robak J, Maran Kiewicz R. Scavenging of reactive oxygen species as the mechanism of drug action. **Polish J of Pharmacol**. 1985; 47: 89-98.

Sanchez, D.A. White food-type sorghum in direct-expansion extrusion applications. **Food Science and Technology**; Texas A & M university, Texas, 2003. 132p.

Sawazaki, E. Sorgo forrageiro ou misto, sorgo granífero, sorgo vassoura *Sorghum bicolor* L. Moench. In: Falh, J. L. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 6^{ed}. Campinas: IAC, 1998. p. 44-49.

Latorre Sergio José Ramírez y Calderón Cesar Augusto Araque. Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos (*Sorghum bicolor* (L) moench) Cultivados en Colombia. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. Bucaramanga, Julio 1998.

Shriver, Atkins. In: Química Inorgânica 3^a ed. Porto Alegre: Bookman; 2003.

Sjöström, E.; Alén, R. Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p.316.

South PK, Miller DD. Iron binding by tannic acid: effect of selectd ligands. **Food Chemistry**. 1998; 63: 167-72.

Souza, C. C. D., Dantas, J. P., Silva, S. D. M. Produtividade do sorgo granífero cv. Sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados al caldo de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2005; 25:512-517.

Tappi T. Preparation of wood for chemical analysis. Atlanta: Tappi Press, 1997.

Taylor, J. R. N., Schober, T. J. Bean, S. R. Novel food and non-food user for sorghum and millets. **Journal of Cereal Science**. 2006; (44)3: 252-271.

Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals —promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. **Int J Cancer**. 2007; 120: 451-458.

Thurbide, K. B.; Hughes, D. M. A rapid method for determining the extractives content of wood pulp. **Indian Engeenering Chemistry Research**. 2000; 39:3112-3115.

Wallis, A. F. A.; Wearne, R. H. Analysis of resin in eucalypt woods and pulps. **Appita Journal**. 1999; (52)4: 255-299.

Waniska RD, Hugo LF and Rooney LW. Practical methods to determine the presence of tannins in sorghum. **Journal Applied Poultry Research**. 1992; 1:122–128.

Wright, J. S.; Johnson, E. R.; Di Labio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Societ**. 2001; 123:1173-1183.

8. CONCLUSÕES

Com a realização do presente trabalho, conclui-se:

- Os maiores rendimentos de extração foram obtidos com a mistura acetona/água 7:3. Nos dois tipos de extrações, a casca rendeu maiores porcentagens (%) de rendimento que o material de grão.
- Presencia de taninos condensados no cereal integral do sorgo Guanipa 71, de catequina nos extratos aquoso e cetoaquoso da casca y grão, como também taninos hidrolisáveis nos extratos cetoaquoso de casca e grão do sorgo confirmaram estes tipos de compostos entre seus metabolitos secundários. Porém, em todos os extratos do sorgo foram identificados por HPLC os compostos comuns, quercetina, rutina, quercitrina, luteolina, catequina, ácidos gálico, elágico, caféico e clorogênico.
- Segundo a análise estatística dos resultados, os ECAC e ECAG foram mais efetivos em inibir o radical DPPH[•], e reduzir Mo (VI) e Fe⁺³, em comparação aos EAC e EAG. Por outro lado, os EAC e EAG apresentaram maior atividade quelante de Fe⁺². Os ECAC y EAG causaram uma significativa maior inibição da degradação oxidativa da 2-DR frente ao H₂O₂, em comparação ao EAC y ECAG. Tanto para o grão como para a casca, o efeito inibitório dos extratos foi estatisticamente mais proeminente nos sistemas com H₂O₂ e Fe⁺² que no sistema de Fenton. Níveis estatisticamente constantes de proteção da 2-DR ao variar a concentração da mesma (2-DR), contra concentrações fixas de Fe⁺²/H₂O₂ (Fenton), revelaram em termos gerais que o conjunto de compostos presentes nos ECAC y ECAG atuaram como antioxidantes via quelante de Fe⁺², prevenindo deste modo a formação de H₂O₂ e [•]OH.

9.- PERSPECTIVAS

Projeta-se realizar:

- Pesquisas sobre a capacidade antioxidante de extratos do híbrido de sorgo Guanipa 71 y outros híbridos em modelos experimentais *in vivo* tais como a *Drosophila melanogaster* ou ratos.
- Estudos sobre controle de concentração de ferro em organismos *in vivo* por meio de dietas a base de diversos extratos de cultivares de sorgo.
- Compilação de estudos pré-clínicos e clínicos sobre ingestão de alimentos baseado em cultivares de sorgo e níveis de Fe^{+2} livre e sérico em humanos.
- Meta-análises de estudos de ingestão de cultivares de sorgo como fonte alimentar e patologias associadas ao controle de níveis de íons ferroso livre em humanos.

10. REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

- ANDERSON, L. R., & Wolf J. W. (1995). Compositional changes in trypsin inhibitor, phytic acid, saponins and isoflavones related to soya bean processing. **Journal of Nutrition**, 581S, 588S.
- AWIKA, J., M. (2008). Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p.532-538.
- AWIKA, J. M., ROONEY, L. W., WU, X., RONALD, L., & CISNEROS-ZEVALLOS, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(23), 6657–6662.
- BRALLEY, E., GREENSPAN, P., HARGROVE, J. L., & HARTLE, D. K. (2008). Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. **Journal of Medicinal Food**, 11, 307–312.
- CICCOLA, P., (1989). Microestructura de la testa y contenido de taninos (Proantocianidinas) en algunos cultivares de sorgo granífero producido en el país. Trabajo de grado Facultad de Agronomía U.C.V. Maracay- Venezuela.
- CLIFFORD, M., N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p. 1063-1072.
- MARCANO, Deanna y HASEGAWA Masahisa. (1991). Fitoquímica Orgánica. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Pp. 81-115.
- De BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTR, H.; VLIETINCK, A., (1999). **Biochem. Syst. Ecol.** 27, 445.
- DYKES, L., PETERSON, G. C., ROONEY, W. L., & ROONEY, W. L. (2011). Flavonoid composition of lemon – yellow sorghum genotypes. **Food Chemistry**, 128(10), 173 – 179.
- DYKES, L., ROONEY, L. W., WANISKA, R. D., & ROONEY, W. L. (2005). Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 6813–6818.
- DYKES, L., & ROONEY, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. **Journal of Cereal Science**, 44, 236–251.

- DYKES, L., SEITZ, L. M, ROONEY, W. L., & ROONEY, L. W. (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 313–317.
- ERLUND, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**,v.24, p.851-874.
- FAO (2007). FAOSTAT ProdStat database, yearly production. URL: <http://faostat.fao.org>
- FRANKLIN, B., APEA-Bah, AMANDA, Minnaar, MEGAN, J. Bester, KWAKU G. Duodu. (2014). Does a sorghum–cowpea composite porridge hold promise for contributing to alleviating oxidative stress? **Food Chemistry** 157. 157–166.
- GODOY, S., CHICCO, C., MESCHY, F., REQUENA, F. (2005). Phyticphosphorus and phytase activity of animal feed ingredients. **Interciencia**; 30:24-28.
- GONZÁLEZ, R. y GRATEROL, Y. (2003). Comportamiento de 23 híbridos de sorgo granífero bajo condiciones de norte-verano en el estado Portuguesa. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Portuguesa. **Rev. Fac. Agron.** v.20 n.3.
- GUJER, R., MAGNOLATO, D., & SELF, R. (1986). Glucosylated flavonoids and other phenolic compounds from sorghum. **Phytochemistry**, 25, 1431–1436.
- HAENEN, G. R. M. M., ARTS, M. J. T. J., BAST, A., & COLEMAN, M., D. (2006). Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p.191-198.
- HAGERMAN, A. E., RICE, M. E. and RITCHARD, N. T. (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16 (4-8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 2590-2595.
- HAHN, D. H., MCDONOUGH, C., ROSENOW, D.T., MILLER, F. R., ROONEY, L.W. & MECKENSTOCK, D. (1984). Shawaya: A "Black" Sorghum from the Western Sudan. **Sorghum Newsletter** 27:51-52.
- HAMANAKA, R. B., & CHANDEL, N., S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends Biochem Sci** 35:505–513.

- HARBORNE, Jeffrey B., WILLIAMS, Christine A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55, 481-504. Review. Department of botany, school of plant science, the University of Reading, Reading R66 6AS, UK.
- Haslam, E., (1965). **Phytochemistry** 4, 495.
- HARRIS, K. (1976). The sorghum midge. **Annals of Applied Biology**, 84 (1), 114-118.
- HASLAM, E. (1998). Practical Polyphenolics- from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge.
- HASLAM, E. (1996). Natural polyphenol (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.** 59, 205–215.
- Heldt, H., (1997). Plant Biochemistry and Molecular Biology, University Press: Oxford.
- HERMANN K. (1988). On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. F. A*, v.186, p.1-5.
- HURRELL, R. F., REDDY, M., & COOK, J. D. (1998). Inhibition of non-heme iron absorption in man by herb teas, coffee and black tea. **Br. J. Nutr.** 81:289-295.
- JANSMAN, A. (1993). Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. **Nutr Res Rev**; 6:209-236.
- JARAMILLO, M. (1991). Estudio nutricional de cultivares de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L) Moench) altos en taninos condensados producidos en Venezuela. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.
- JARAMILLO, M., PEÑA, M., ANGULO, I., LEÓN, A., & OBISPO, N. (1993). Valor nutricional de cultivares de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L) Moench] altos en taninos producidos en Venezuela. I. Composición química. **Zoot Trop**; 11:129-135.
- KAMBAL, A. E., & BATE-SMITH, E., C. (1976). Genetic and biochemical study on pericarp pigments in a cross between two cultivars of grain sorghum, *Sorghum bicolor*. **Heredity**, 37, 413–416.
- KATHIRIA, A. S., BUTCHER, L. D., FEAGINS, L. A., SOUZA, R. F., BOLAND, C. R., & THEISS, A. L., (2012) Prohibitin 1 modulates mitochondrial stressrelated autophagy in human colonic epithelial cells.

- LATORRE, S. J. R. y CALDERÓN, C. A. A. (1998). Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos [*Sorghum bicolor* (L) Moench] Cultivados en Colombia. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. Bucaramanga.
- LO, S. C. C., DE VERDIER, K., & NICHOLSON, R., L. (1999). Accumulation of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55, 263–273.
- MATÉS, J. M., PERÉZ-GÓMEZ, C., NÚÑEZ DE CASTRO, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.** 32:595–603.
- MATÉS, J. M., SEGURA, J. A., ALONSO, F. J., & MARQUEZ, J. (2010). Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. **Free Radic Biol Med** 49:1328–1341.
- MATES, J. M., PEREZ-GOMEZ, C., De CASTRO, I. N., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, **Clin. Biochem.** 32, 595-603.
- MAZZA, G., & BROUILLARD, R. (1987). Color stability and structural transformations of cyaniding 3, 5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 422-426.
- McCALL, M. R., FREI, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Rad. Biol. Med.** 26, 1034-1053.
- MELLO, J. P. C., SANTOS, S. C., SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., (2001). Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; orgs. Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed.
- PALE, E., KOUUDA-BONAFOS, M., MOUHOSSINE, N., VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRE, R., & OTTINGER, R. (1997). 7-O-Methylapigeninidin, an anthocyanidin from *Sorghum Caudatum*. **Phytochemistry**, 45, 1091–1092.
- PRIGENT, S. V., GRUPPEN, H., VISSER, A. J., VAN KONINGSVELD G. A., DE JONG, G. A., & VORAGEN, A. G. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-Ocaffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(17), 5088–5095.
- RATTY, A. K., DAS, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. **Biochem. Med. Metabol. Biol.**, 39, 69-79.

- REED, J. D., (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **J. Anim. Sci.** 73, 1516–1528.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., & PAGANGA, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** 20: 933-956.
- ROONEY, L., W. (1971). Utilization of sorghum grain: food and industrial. Grain sorghum research in Texas 1970. **Texas Agric.** Expt. Stn. Rept. 1970:71-81.
- ROONEY, L. W., KHAN, M. N., & EARP, C., F. (1980). The technology of Sorghum products chapter in recent progress in cereal chemistry: **Cereals for Food and Beverages**. Inglett, G. (ed). Academic Press Inc. New York, In Press 513-554.
- ROONEY, L.W. & MILLER, F., R. (1981). Variation in the Structure and Kernel characteristics of Sorghum. In: International Symposium on Sorghum Grain Quality. **Anais Patancheru**: P. 143-169.
- SAINT-CRICQ de GAULEJAC, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International** 32:327-333.
- SANTOS, S. C., & MELLO, J., C., P. (1999). Taninos. In: Simões, C. M. O. et al. (ed.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. p.517-544.
- SAWAZAKI, E. (1998). Sorgo forrageiro ou misto, sorgo granífero, sorgo vassoura *Sorghum bicolor* L. Moench. In: Falh, J. L. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 6^{ed}. Campinas: IAC. p. 44-49.
- SCALBERT, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** 30, 3875–3883.
- SCALBERT, A. (2000). Polyphenols, metal ion complexation and biological consequences. In: **Plant polyphenols. 2. Chemistry and Biology**. Ed. by Gross, G. G. *et al.*, New York.
- SORGHUM and MILLETS. FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION...1995. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0818e/T0818E00.htm#Contents>.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., (2006). Free Radicals, Metals and antioxidants stress – induced cancer. Mini-review. **Chemico–Biological Interactions** 160, 1-40.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., TELSER, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44-84.

VALLADARES César Augusto. (2010). Taxonomía, Botánica y Fisiología de los cultivos de grano II. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Centro Universitario Regional del Litoral Atlántico (CURLA). Departamento de Producción Vegetal. Honduras La Ceiba.

VICKERY, M. L. E.; VICKERY, B., (1981). Secondary Plant Metabolism. The Macmillan Press LTD: London.

WANISKA, R. D., & ROONEY, L., W. (2000). Structure and chemistry of the sorghum caryopsis. In C. W. Smith & R. A. Frederiksen (Eds.).Sorghum: Origin, history, technology, and production (pp. 649–688). New York: John Wiley and Sons.

WU, X., & PRIOR, R., L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 3101–3113.

XIAO, J., MAO, F., YANG, F., ZHAO, Y., ZHANG, C., & YAMAMOTO, K., (2011). Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure–affinity relationship and influencing bioactivity aspects. **Molecular Nutrition and Food Research**. 55(11), 1637-1645.