

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto Sensu*  
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GRAZIELA BRAGUETO ESCHER

FLORES DE *Centaurea cyanus* L. E *Clitoria ternatea* L.: CARACTERIZAÇÃO  
QUÍMICA, ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS *in vitro*

PONTA GROSSA

2019

GRAZIELA BRAGUETO ESCHER

FLORES DE *Centaurea cyanus* L. E *Clitoria ternatea* L.: CARACTERIZAÇÃO  
QUÍMICA, ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS E PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS *in vitro*

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neiva Deliberali Rosso.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Azevedo.

PONTA GROSSA

2019

E74 Escher, Graziela Bragueto  
Flores de *Centaurea cyanus* L. e *Clitoria ternatea* L.: caracterização química, estabilidade das antocianinas e propriedades funcionais *in vitro* / Graziela Bragueto Escher. Ponta Grossa, 2019.  
214 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Neiva Deliberali Rosso.  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Azevedo.

1. Compostos fenólicos. 2. Compostos bioativos. 3. Alimentos não convencionais. 4. Atividade anti-hipertensiva. 5. Corante azul natural. I. Rosso, Neiva Deliberali. II. Azevedo, Luciana. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664

## TERMO DE APROVAÇÃO



**GRAZIELA BRAGUETO ESCHER**

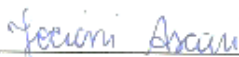
**Flores de *Centaurea cyanus* L. e *Clitoria ternatea* L.: caracterização química, estabilidade das antocianinas e propriedades funcionais *in vitro***

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Neiva Deliberati Rosso - UEPG



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Jociani Ascari - UTFPR



Prof. Dr. André Carlos Auler - UFPR



Prof. Dr. Egon Schnitzler - UEPG



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Mariza Boscacci Marques - UEPG

Ponta Grossa, 25 de novembro de 2019.

Aos meus pais, Israel e Maria Cleunice,  
pelo amor e apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo Luciano e ao nosso filho  
que cresce em meu ventre.

***Dedico este trabalho.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me mostrar à luz nos momentos difíceis, pela esperança, força, coragem, saúde, sabedoria, proteção e bênçãos todos os dias.

À Nossa Senhora da Salette por guiar, proteger e abençoar a minha vida.

À minha querida família pelo amor, apoio, carinho e segurança que sempre me transmitiu. Em especial aos meus pais, Israel e Maria Cleunice, pelo amor, carinho, ensinamentos, orações e apoio em todos os momentos.

Ao meu esposo Luciano, pelo amor, carinho, respeito, paciência, compreensão e apoio incondicional. Durante esses quatro anos seu apoio e compreensão foram fundamentais por mais essa nossa conquista. Ao nosso desejado e aguardado filho, que cresce em meu ventre, e que chegará para completar a nossa vida com muita felicidade.

Ao Professor Dr. Daniel Granato, pela orientação, confiança, conhecimento, paciência, incentivo, compreensão, conselhos e amizade. Sou grata por todos seus ensinamentos com muita admiração.

À Professora Dra. Neiva Deliberali Rosso, pela orientação, confiança, dedicação, conhecimento, apoio, paciência, conselhos e amizade. Deixo aqui registrado meu carinho e admiração.

À Professora Dra. Luciana Azevedo, pela coorientação, parceria, amizade, confiança e contribuições na realização deste trabalho.

As(os) Professoras(es) membros da banca de avaliação do projeto de pesquisa (Dra. Mariza Boscacci Marques e Dra. Eliane Dalva Godoy Danesi), membros da banca de qualificação (Dra. Neiva Deliberali Rosso, Dr. Egon Schnitzler, e Dr. Domingos Savio Nunes), e aos membros da banca de defesa (Dra. Jociani Ascari, Dr. André Carlos Auler, Dr. Egon Schnitzler, e Dra. Mariza Boscacci Marques) pela participação e valiosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores do Programa da Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que contribuíram para ampliação dos meus conhecimentos científicos.

À todos os professores e alunos parceiros de outras instituições (UNICAMP, UFRJ, UNIFAL, USP, MAPA, Anhui Agricultural University, e Memorial University of Newfoundland) por auxiliarem na realização de algumas análises.

Aos professores e técnicos dos laboratórios (Denise, Eliane, Rita, Cenilda e Fernando) do Departamento de Engenharia de Alimentos da UEPG.

À todos meus colegas da Pós-graduação, pelas conversas, longas horas de estudos e por tornarem esses anos mais divertidos.

À minha amiga Simone Lazzarotto pela parceria, carinho, conselhos, e incentivo. Que nossa amizade permaneça para sempre!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Jânio, Marina, Pablo, Aline, Thiago, e Mariana pela ajuda, incentivo, compreensão, carinho e amizade. Vou sentir falta das nossas conversas, almoços no RU e cafés na panificadora da Maria. Aos alunos de iniciação científica Jessyca, Lorena, Carol, Jean, André e Stephanie por todo o auxílio.

Ao Rodrigo Reckziegel pela produção e fornecimento das flores de *Clitoria ternatea*.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Engenharia de Alimentos, Departamento de Química, e ao Complexo de Laboratório Multiusuário (C-LABMU) pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa da Pós-graduação em Ciência e Tecnologia pela oportunidade do aprimoramento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária (FAPPR) pelo suporte financeiro e concessão da bolsa de doutorado.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

## RESUMO

As flores azuis de *Centaurea cyanus* L. e *Clitoria ternatea* L. são usadas na medicina popular tradicional por apresentarem propriedades terapêuticas. A maioria dos estudos dos compostos bioativos utilizam como solventes de extração álcool metílico e álcool etílico acidificados com HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo considerados prejudiciais ao organismo humano se consumidos. Os extratos destas plantas são consumidos na forma de chá, extraídos com água quente, pela população. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da temperatura e tempo na extração dos compostos bioativos com solvente atóxico e nas propriedades funcionais *in vitro* dos extratos das pétalas de *C. cyanus* e *C. ternatea*. O delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> foi utilizado para avaliar o efeito dos fatores temperatura e tempo na extração dos compostos bioativos. Os resultados foram analisados por meio da regressão linear múltipla e análise por componentes principais. No extrato aquoso de pétalas de *C. cyanus* somente a temperatura influenciou o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides não-antociânicos, e atividade antioxidante *in vitro* pela captura do radical DPPH. A temperatura de 68,3 °C e o tempo de 51,12 min foi a melhor condição para maximizar o teor de compostos bioativos e as propriedades funcionais *in vitro*. Os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, isoquercitrina, cumarina, cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo, e a apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglicosídeo) foram identificados no extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus*. As propriedades funcionais *in vitro* apresentadas foram inibição da peroxidação lipídica, atividade anti-hemolítica e anti-hipertensiva. E baixa citotoxicidade (> 900 µg/mL) para as linhagens celulares HepG-2, Caco-2 e A549 e ação pro-oxidante em célula HepG-2 (10-100 µg/mL) sem causar danos e morte celular. As antocianinas presentes no extrato otimizado apresentaram um equilíbrio reversível e atividade antioxidante com a variação do pH. No extrato aquoso de pétalas de *C. ternatea*, a otimização indicou que os teores de compostos bioativos, atividade antioxidante *in vitro*, e parâmetros de cor foram semelhantes entre as temperaturas de 11,7 a 68,3 °C por 8,47 a 51,12 min. A análise por componentes principais revelou a temperatura de 40 °C por 30 min para maximizar a extração de compostos fenólicos totais. O extrato bruto liofilizado de pétalas de *C. ternatea* (EBLPCT) apresentou propriedades funcionais *in vitro*, atividades anti-hemolítica, inibidoras da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I), das enzimas α-amilase e α-glicosidase, e da peroxidação lipídica em sistema biológico. O extrato parcialmente purificado de pétalas de *C. ternatea* (EPPCT) mostrou maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio, inibição da cisão de DNA por radicais peroxila, e inibição da oxidação do colesterol LDL induzida por cobre. Ambos os extratos EBLPCT e EPPCT apresentaram baixa citotoxicidade frente às linhagens celulares A549, HCT8, e IMR90 (> 900 µg/mL), e apresentaram atividade antioxidante intracelular contra espécies reativas de oxigênio (> 100 µg/mL). Doze compostos foram tentativamente identificados por UHPLC-Q-TOF-MS/MS nos extratos EBLPCT e EPPCT. Na titulação espectrofotométrica direta/reversa, as antocianinas apresentaram alterações estruturais com mudanças na cor com a variação do pH, e reversibilidade estrutural com a preservação da atividade antioxidante *in vitro*. As antocianinas em ambos os valores de pH, 3,6 e 5,4, em presença e ausência de frutooligossacarídeos apresentaram elevada energia de ativação. Os extratos exposto à luz apresentaram elevados tempo de meia vida em presença e ausência de frutooligossacarídeos. Os resultados obtidos



permitem uma ampliação do estudo com a determinação de novas propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo* para potencial aplicação tecnológica.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Corante azul natural. Atividade anti-hipertensiva. Metodologia de superfície de resposta.

## ABSTRACT

The blue flowers of the *C. cyanus* L. and the *C. ternatea* L. are used in traditional medicine because of their therapeutic properties. Most studies of bioactive compounds use methyl alcohol and ethyl alcohol acidified with HCl or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as extraction solvents and are considered harmful to the human organism if consumed. The extracts of these plants are consumed in the form of tea, extracted with hot water. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the influence of temperature and time in the extraction of bioactive compounds with nontoxic solvent and in the *in vitro* functional properties of extracts of the *C. cyanus* and the *C. ternatea* petals. The central rotational composite design 2<sup>2</sup> was used to evaluate the effect of temperature and time factors in the extraction of bioactive compounds. The results were analysed using multiple linear regression and principal component analysis. In the aqueous extract of the *C. cyanus* petals, only temperature influenced the content of total phenolic compounds, non-anthocyanic flavonoids, and *in vitro* antioxidant activity by capturing the DPPH radical. Temperature of 68.3 °C and time of 51.12 minutes was the best condition to maximize bioactive compound content and *in vitro* functional properties. Chlorogenic, caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids, isoquercitrin, coumarin, cyanidin 3-O-(6-O-succinylglucoside)-5-O-glucoside, and apigenin 7-O-glucuronide-4'-O-(6-O-malonylglucoside) were identified in the optimised aqueous extract of *C. cyanus* petals. The *in vitro* functional properties were inhibition of lipid peroxidation, antihemolytic and antihypertensive activity, low cytotoxicity (> 900 µg/mL) for HepG-2, Caco-2 and A549 cell lines, and pro-oxidant action on HepG-2 cell (10-100 µg/mL) without causing cell damage and death. The anthocyanins present in the optimised extract presented a reversible equilibrium and antioxidant activity with pH variation. In the aqueous extract of the *C. ternatea* petals, optimization indicated that bioactive compound contents, *in vitro* antioxidant activity, and colour parameters were similar between temperatures from 11.7 to 68.3 °C from 8.47 to 51.12 minutes. Principal component analysis revealed temperature of 40 °C for 30 minutes to maximize the extraction of total phenolic compounds. The crude lyophilised extract of the *C. ternatea* petals (CLECTP) presented *in vitro* functional properties, antihemolytic activities, inhibitors of angiotensin converting enzyme I (ACE-I), α-amylase and α-glycosidase enzymes, and lipid peroxidation in biological system. The partially purified extract of *C. ternatea* petals (PPECTP) showed higher oxygen radical absorption capacity, inhibition of DNA scission by peroxy radicals, and inhibition of copper-induced LDL cholesterol oxidation. Both CLECTP and PPECTP extracts presented low cytotoxicity against cell lines A549, HCT8, and IMR90 (> 900 µg/mL) and showed intracellular antioxidant activity against reactive oxygen species (> 100 µg/mL). Twelve compounds were tentatively identified by UHPLC-Q-TOF-MS/MS in CLECTP and PPECTP extracts. In direct/reverse spectrophotometric titration, anthocyanins showed structural changes with varying colour with pH variation, and structural reversibility with preservation of *in vitro* antioxidant activity. Anthocyanins at both pH values, 3.6 and 5.4, in the presence and absence of fructooligosaccharides showed high activation energy. The extracts exposed to light showed high half-life time in the presence and absence of fructooligosaccharides. The obtained results allow an expansion of the study with the of new functional properties *in vitro* and *in vivo* for potential technological application.

**Keywords:** Phenolic compounds. Antioxidant activity. Natural blue dye. Antihypertensive activity. Response surface methodology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Campo de <i>Centaureas cyanus</i> em Kortrijk, Bélgica.....	31
Figura 1.2 – Estruturas da antocianina (AN) e flavona (FL) na protocianina.....	35
Figura 1.3 – Estrutura cristalina da molécula de protocianina. ....	36
Figura 1.4 – <i>Clitoria ternatea</i> L. a) Flor azul; b) Flor branca. ....	43
Figura 1.5 – Estrutura química da diacilternatina (delfinidina 3,3',5'-tri-O-β-D-glucopiranosídeo).....	46
Figura 1.6 – Estrutura da delfinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos e as cadeias laterais presentes na pétala azul da <i>Clitoria ternatea</i> .....	47
Figura 1.7 – Estruturas dos flavonóis presentes na pétala azul da <i>Clitoria ternatea</i> .....	48
Figura 1.8 – Representação dos compostos fenólicos separados por classes.....	51
Figura 1.9 – Estrutura química geral das antocianidinas. ....	54
Figura 1.10 – Mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função de diferentes pHs. ....	57
Figura 2.1 – Flores desidratadas (A), cálices (B) e pétalas (C) de <i>Centaurea cyanus</i> .....	66
Figura 2.2 – Elaboração dos extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> .....	67
Figura 2.3 - Efeito da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), antocianinas totais (C), flavonoides não-antociânicos (D) e atividade antioxidante – FRAP (E) em extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> . ....	86
Figura 2.4 – Otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, dos fatores temperatura (°C) e tempo (min) considerando o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, e atividade antioxidante por FRAP dos extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> .....	91
Figura 2.5 – Espectro de massa dos fragmentos dos íons ( <i>m/z</i> ) no modo positivo da antocianina cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo (A), e no modo negativo da flavona apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-	

malonilglucosídeo), identificadas no extrato aquoso otimizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> . .....	95
Figura 2.6 – Efeito do pH na estabilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> . .....	96
Figura 2.7 – Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> .....	97
Figura 2.8 – Inibição da peroxidação lipídica do extrato aquoso otimizado e liofilizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> comparado a uma solução padrão de quercetina a 50 mg/L.....	99
Figura 2.9 – Atividade anti-hemolítica do extrato otimizado e liofilizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> . .....	100
Figura 2.10 – Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), e células de hepatocarcinoma humano (HepG-2) em relação a diferentes concentrações do extrato otimizado e liofilizado de pétalas de <i>C. cyanus</i> . .....	103
Figura 2.11 – Resultados da medição intracelular de ERO em células HepG2 por espectrofluorimetria .....	104
Figura 3.1 – Flores desidratadas (A), cálices (B) e pétalas (C) de <i>Clitoria ternatea</i> .....	109
Figura 3.2 – Efeito da temperatura e tempo na extração de flavonoides não-antociânicos (A), atividade quelante do íon Cu <sup>2+</sup> (B), tonalidade (C), pigmento amarelo (D), e pigmento azul (E) em extratos aquosos das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> .....	128
Figura 3.3 – Otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, dos fatores temperatura (°C) e tempo (min) considerando teor de flavonoides não-antociânicos, atividade quelante do íon Cu <sup>2+</sup> e a tonalidade dos extratos aquosos das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> . .....	133
Figura 3.4 – Análise por componente principal baseada na triplicata dos extratos aquosos das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> em relação a composição fenólica, atividade antioxidante <i>in vitro</i> e parâmetros físico-químicos....	134

Figura 3.5 – Atividade anti-hemolítica <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado das pétalas de <i>C. ternatea</i> em eritrócitos humano sob condições isotônicas (0,9% m/v NaCl). .....	136
Figura 3.6 – Atividade anti-hipertensiva <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> em comparação com uma solução padrão de quercetina. ....	137
Figura 3.7 – Atividade inibitória das enzimas $\alpha$ -amilase (A) e $\alpha$ -glicosidase (B) <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado das pétalas de <i>C. ternatea</i> . ....	138
Figura 3.8 – Atividade inibitória da peroxidação lipídica <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado das pétalas de <i>C. ternatea</i> comparado a uma solução padrão de quercetina. ....	139
Figura 3.9 – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado das pétalas de <i>C. ternatea</i> ...	140
Figura 3.10 – Atividade inibitória da cisão da fita de DNA induzida pelo radical peroxil (A e B) dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado das pétalas de <i>C. ternatea</i> .....	141
Figura 3.11 – Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão (A549), A-D; células epiteliais de carcinoma de cólon (HCT8), D-F; e células de fibroblasto humano de pulmão não tumoral (IMR90), G-I, em relação a diferentes concentrações dos extratos bruto liofilizado (EBLCT) e parcialmente purificado (EPPCT) das pétalas de <i>C. ternatea</i> .....	142
Figura 3.12 – Atividade antioxidante intracelular de ERO <i>in vitro</i> em células IMR90 (A, C) e A549 (B, D) dos extratos bruto liofilizado (EBLCT) e parcialmente purificado (EPPCT) das pétalas de <i>C. ternatea</i> por espectrofluorimetria.....	143
Figura 3.13 – Efeito inibitório dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> contra a oxidação do colesterol LDL humano. ....	144
Figura 4.1 – Cromatograma dos íons totais dos compostos fenólicos (A) e espectros de massa das ternatinas e derivados de delphinidina tentativamente identificados (B-G) no extrato bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas azuis de <i>C. ternatea</i> .....	157

Figura 4.2 – Efeito do pH na estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> .....	161
Figura 4.3 – Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> .....	164
Figura 4.4 – Efeito da temperatura em função do tempo na absorbância do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> em pH 3,6 e 5,4 em presença de 1,75 g e 3,5 g FOS/100 mL, e ausência de frutooligossacarídeos.....	166
Figura 4.5 – Cinética da reação de degradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> em pH 3,6 e 5,4 em presença de 3,5 g FOS/100 mL (A, D), 1,75 g FOS/100 mL (B, E), e ausência de FOS (C, F) nas temperaturas de 80, 90 e 100 °C. ....	168
Figura 4.6 – Cinética de fotodegradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> em pH 3,6 com a presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos expostos a luz (A) e protegidos da luz (B).....	172
Figura 4.7 – Cinética de fotodegradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> em pH 5,4 com a presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos expostos a luz.....	174

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Estruturas químicas dos flavonoides. ....	53
Tabela 2.1 – Matriz do planejamento fatorial DCCR 22 da <i>Centaurea cyanus</i> com os níveis codificados e os valores reais entre parênteses .....	67
Tabela 2.2 – Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^*$ ...	73
Tabela 2.3 – Composição química dos extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> de acordo com experimental design (valores codificados e reais).....	83
Tabela 2.4 – Atividade antioxidante, redutora e quelante de ferro dos extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> de acordo com experimental design (valores codificados e reais).....	84
Tabela 2.5 – Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos químicos e atividade antioxidante dos extratos aquosos de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> . ....	87
Tabela 2.6 – Composição química do extrato aquoso otimizado de pétalas de <i>Centaurea cyanus</i> analisado por LC-ESI-MS/MS. ....	93
Tabela 3.1 – Composição fenólica dos extratos aquosos de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> de acordo com experimental design (valores codificados e reais).....	119
Tabela 3.2 – Composição fenólica individual dos extratos aquosos de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> analisados por HPLC-DAD-UV. ....	121
Tabela 3.3 – Atividade antioxidante, redutora e quelante de cobre dos extratos aquosos de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> de acordo com experimental design (valores codificados e reais).....	124
Tabela 3.4 – Parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> de acordo com experimental design (valores codificados e reais).....	126



Tabela 3.5 – Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante <i>in vitro</i> , parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> .....	129
Tabela 3.6 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i> . .....	135
Tabela 4.1 – Compostos fenólicos identificados no extrato bruto liofilizado e no parcialmente purificado de pétalas azuis de <i>C. ternatea</i> .....	155
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura em função do tempo na estabilidade do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> (pH 3,6 e 5,4 em presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos.....	167
Tabela 4.3 – Efeito da luz em função do tempo na estabilidade do extrato de pétalas azuis de <i>Clitoria ternatea</i> (pH 3,6 e 5,4) em presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos .....	172

## LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ACP	Análise de componentes principais
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ANOVA	Análise de variância
CFT	Compostos fenólicos totais
CV	Coeficiente de variação
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DCCR	Delineamento composto central rotacional
EBLCT	Extrato bruto liofilizado de pétalas de <i>C. ternatea</i>
ECA-I	Enzima conversora de angiotensina I
EPPCT	Extrato parcialmente purificado de pétalas de <i>C. ternatea</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FRAP	Atividade antioxidante de redução do ferro
LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada a detector por arranjo de diodos
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MS	Espectrometria de massas
MSR	Metodologia de superfície de resposta
OT	Extrato otimizado
PBS	Tampão fosfato de sódio
Q-TOF-MS	Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo
R <sup>2</sup>	Coeficiente de regressão linear múltiplo
R <sup>2</sup> adj	Coeficiente de determinação ajustado
RMN	Ressonância magnética nuclear
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UFC	Unidade formadora de colônia
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-Vis	Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS .....	24
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA - <i>Centaurea cyanus</i> L. E <i>Clitoria ternatea</i> L.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....</b>	
25	
1.1 PLANTAS MEDICINAIS DE USO TRADICIONAL.....	25
1.2 FAMÍLIA ASTERACEAE .....	27
1.2.1 Gênero <i>Centaurea</i> .....	28
1.2.2 Espécie <i>Centaurea cyanus</i> L.....	31
1.2.2.1 Composição química das flores de <i>C. cyanus</i> .....	32
1.3 FAMÍLIA FABACEAE .....	39
1.3.1 Gênero <i>Clitoria</i> .....	40
1.3.2 Espécie <i>Clitoria ternatea</i> L. ....	42
1.3.2.1 Composição química das flores de <i>C. ternatea</i> .....	44
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	50
1.4.1 Ácidos Fenólicos .....	52
1.4.2 Flavonoides.....	52
1.4.2.1 Antocianinas.....	53
1.4.2.1.1 <i>Estabilidade das antocianinas</i> .....	55
1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	59
1.6 CORANTES NATURAIS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS .....	60
<b>CAPÍTULO 2 - ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-HIPERTENSIVA, E CITOTÓXICA/CITOPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO DE PÉTALAS DE <i>Centaurea cyanus</i> L.....</b>	
63	
2.1 INTRODUÇÃO.....	75
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.2.1 Produtos Químicos, Linhagens de Células e Micro-organismos.....	65
2.2.2 Matéria-Prima.....	66
2.2.3 Experimental Design e Elaboração dos Extratos Aquosos .....	66

2.2.4 Determinação da Composição Química e Atividade Antioxidante .....	68
2.2.5 Metodologia de Superfície de Resposta e Otimização .....	71
2.2.6 Determinação da Composição Química e Propriedades Funcionais do Extrato Otimizado.....	72
2.2.6.1 Composição química por LC-ESI-MS/MS.....	72
2.2.6.2 Identificação da estrutura da antocianina e flavona por MS/MS .....	75
2.2.6.3 Efeito do pH na estabilidade das antocianinas e atividade antioxidante .....	76
2.2.6.4 Inibição da peroxidação lipídica.....	76
2.2.6.5 Atividade anti-hemolítica <i>in vitro</i> .....	77
2.2.6.6 Atividade antimicrobiana .....	78
2.2.6.7 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I).....	79
2.2.6.8 Análise da citotoxicidade e proliferação celular <i>in vitro</i> .....	79
2.2.6.9 Atividade de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular .....	81
2.2.7 Análise Estatística .....	81
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
2.3.1 Composição Química, Atividade Antioxidante e Otimização do Extrato .....	81
2.3.2 Composição Química e Propriedades Funcionais <i>in vitro</i> do Extrato Otimizado.....	92
2.3.2.1 Composição química por LC-ESI-MS/MS.....	92
2.3.2.2 Identificação da antocianina e flavona por MS/MS .....	94
2.3.2.3 Efeito do pH na estabilidade das antocianinas e atividade antioxidante .....	96
2.3.2.4 Inibição da peroxidação lipídica.....	98
2.3.2.5 Atividade anti-hemolítica <i>in vitro</i> .....	99
2.3.2.6 Atividade antimicrobiana .....	100
2.3.2.7 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I).....	101
2.3.3.8 Viabilidade celular .....	102
2.3.3.9 Medição de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular .....	103
2.4 CONCLUSÕES.....	105

**CAPÍTULO 3 - COMPOSTOS BIOATIVOS DE PÉTALAS DE *Clitoria ternatea* L.  
MOSTRAM EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTI-HEMOLÍTICO E ANTI-  
HIPERTENSIVO, INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES DA  $\alpha$ -AMILASE E  $\alpha$ -**

<b>GLUCOSIDASE E REDUÇÃO DA OXIDAÇÃO INDUZIDA DO COLESTEROL LDL E DNA.....</b>	<b>106</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	107
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	108
3.2.1 Produtos Químicos e Linhagens de Células .....	108
3.2.2 Matéria-Prima.....	109
3.2.3 Determinação da Composição Fenólica, Atividade Antioxidante e Parâmetros Físico-Químicos dos Extratos Aquosos .....	110
3.2.4 Modelagem por Metodologia de Superfície de Resposta .....	112
3.2.5 Análise de Componentes Principais para Seleção do Extrato .....	112
3.2.6 Purificação Parcial das Antocianinas.....	113
3.2.7 Propriedades Funcionais <i>in vitro</i> .....	113
3.2.7.1 Propriedades funcionais <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado .....	113
3.2.7.2 Propriedades funcionais <i>in vitro</i> do extrato bruto liofilizado e parcialmente purificado .....	115
3.2.8 Análise estatística .....	117
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
3.3.1 Composição Fenólica, Atividade Antioxidante e Parâmetros Físico-Químicos dos Extratos Aquosos .....	117
3.3.2 Modelagem dos Dados por MSR e ACP .....	127
3.3.3 Propriedades Funcionais <i>in vitro</i> do Extrato Bruto Liofilizado .....	134
3.3.4 Propriedades Funcionais <i>in vitro</i> do Extrato Bruto Liofilizado e Parcialmente Purificado .....	139
3.4 CONCLUSÕES.....	145
 <b>CAPÍTULO 4 - ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR UHPLC-Q-TOF- MS/MS E ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE PÉTALAS AZUIS DE <i>Clitoria ternatea</i> L. (BUTTERFLY PEA).....</b>	<b>146</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	147
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	149
4.2.1 Produtos Químicos.....	149
4.2.2 Matéria-Prima e Elaboração do Extrato.....	150
4.2.3 Purificação Parcial e Composição Fenólica.....	150

4.2.4 Estudos da Estabilidade das Antocianinas do Extrato Aquoso .....	151
4.2.4.1 Efeito do pH e atividade antioxidante .....	151
4.2.4.2 Efeito da temperatura .....	152
4.2.4.3 Efeito da luz .....	153
4.2.5 Análise Estatística .....	153
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	154
4.3.1 Composição Fenólica do Extrato Bruto Liofilizado e Parcialmente Purificado.....	154
4.3.2 Estabilidade das Antocianinas do Extrato Aquoso.....	160
4.3.2.1 Efeito do pH .....	160
4.3.2.2 Efeito do pH na atividade antioxidante .....	163
4.3.2.3 Efeito da temperatura .....	165
4.3.3 Efeito da Luz .....	171
4.4 CONCLUSÕES .....	174
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>176</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>210</b>

## INTRODUÇÃO

Os pigmentos presentes em vegetais, frutas e flores podem ser uma fonte alternativa de corantes naturais em substituição aos corantes sintéticos utilizados em alimentos e bebidas. O consumo de corantes sintéticos tem sido potencialmente correlacionado com diversos problemas de saúde. A indústria alimentícia prioriza a utilização dos corantes sintéticos ao invés dos corantes naturais devido à intensidade de coloração, baixo custo, e estabilidade durante o processamento e armazenamento (CORRADINI, 2019). O pigmento azul é raro na natureza, mas é observado em algumas espécies de flores devido à presença de antocianinas complexadas com metais.

As antocianinas pertencem a classe dos compostos fenólicos que representam um dos principais grupos de substâncias bioativas presentes nas plantas, além de taninos, estilbenos, cumarinas e terpenóides (DA SILVA et al., 2005; WINK, 2013). Esses compostos podem atuar como antioxidantes por meio da doação de hidrogênio, transferência de elétrons e capacidade de quelar metais de transição (SANTOS; BRIZOLA; GRANATO; 2017).

Dentre as espécies de plantas com flores azuis, a *Centaurea cyanus* e a *Clitoria ternatea* amplamente utilizadas na medicina popular tradicional, são fontes de compostos bioativos com reconhecidas propriedades funcionais. Essas duas espécies de plantas são produzidas no Brasil, porém seu uso não é disseminado por questões culturais e de oferta em todo o território. Dados de produção não são informados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por não serem *commodities*.

A *Centaurea cyanus* é uma planta da família Asteraceae. O extrato aquoso (chá) das suas flores e partes aéreas é usado no tratamento de doenças oculares, cistite, tosse, doenças nervosas, gástricas entre outras (PIERONI et al., 2004; KUMARASAMY et al., 2007; REDŽIĆ, 2007). As pétalas das flores apresentam a coloração azul devido à presença de protocianina, uma espécie de metal-antocianina (KONDO et al., 1994), no qual os íons metálicos  $Fe^{3+}$  e  $Mg^{2+}$  e dois íons de  $Ca^{2+}$  coordenam-se com as antocianinas e flavonas (SHIONO; MATSUGAKI, TAKEDA, 2005; TAKEDA, 2006). Estudos demonstram propriedade antibacteriana (DAMTE et al., 2013), antioxidante (PIRVU et al., 2008), gastroprotetiva (PIRVU et

al., 2008; PIRVU et al., 2012), citotóxica (WEGIERA et al., 2012) e diurética (KLIMAS et al., 2007) do extrato aquoso.

A *Clitoria ternatea* é uma planta leguminosa pertencente à família Fabaceae. O chá obtido da infusão das suas flores é usado no tratamento de anemia, problemas hepáticos, intestinais entre outros (MUKHERJEE et al., 2008). Suas flores tem a cor azul brilhante e podem ser utilizadas como corante natural e fonte de compostos bioativos em alimentos e bebidas (GOMEZ; KALAMANI, 2003; MUKHERJEE et al., 2008; NAIR et al., 2015). As pétalas azuis contêm uma grande variedade de compostos fenólicos, principalmente a antocianina delphinidina e os flavonóis kaempferol, quercetina e miricetina (TERAHARA et al., 1998; KAZUMA; NODA, SUZUKI, 2003a). As propriedades funcionais demonstradas por estudos *in vivo* e *in vitro* foram: antioxidante (QASIM et al., 2017), analgésica (DEVI; BOOMINATHAN, MANDAL, 2003), antibacteriana (ARUMUGAM; PANNEERSELVAM, 2012), neuroprotetiva (RAGHU et al., 2017) e hepatoprotetora (NITHIANANTHAM et al., 2013).

Na literatura, a maioria dos estudos de compostos bioativos (antocianinas) utilizam como solventes de extração álcool metílico e álcool etílico acidificados com HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo considerados prejudiciais ao organismo humano se consumidos. Em contrapartida, os extratos destas plantas são consumidos na forma de chá, extraídos com água quente, pela população. Nesse contexto, considerando a forma de consumo dos extratos das plantas, faz-se necessário o estudo do extrato aquoso avaliando o efeito da temperatura e o tempo na extração dos compostos bioativos, propriedades funcionais *in vitro* e estabilidade das antocianinas.

Este trabalho está dividido em quatro capítulos:

- **Capítulo 1** apresenta uma revisão bibliográfica das espécies *C. cyanus* e *C. ternatea* em relação às características botânicas, composição química e propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo*.
- **Capítulo 2** aborda o estudo da influência da temperatura e do tempo na extração dos fitoquímicos e nas propriedades funcionais *in vitro* do extrato aquoso das pétalas de *C. cyanus*.
- **Capítulo 3** compreende o estudo do extrato aquoso bruto liofilizado e parcialmente purificado das pétalas de *C. ternatea*, utilizando uma abordagem estatística, com



objetivo de otimizar as condições experimentais de extração dos compostos bioativos e propriedades funcionais *in vitro*.

- **Capítulo 4** compreende o estudo da composição fenólica do extrato aquoso bruto e parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea* bem como a estabilidade das antocianinas frente ao pH, temperatura e luz em presença e ausência de frutooligossacarídeos.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, atividade antioxidante e propriedades funcionais *in vitro* dos extratos aquosos das pétalas de *Centaurea cyanus* e *Clitoria ternatea*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da temperatura e tempo na extração de antocianinas, flavonoides, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*;
- Modelar e otimizar as condições experimentais para a extração dos compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* usando técnicas estatísticas;
- Determinar a composição química por métodos cromatográficos (HPLC-DAD; HPLC-ESI-MS/MS; UHPLC-Q-TOF-MS/MS);
- Analisar as propriedades funcionais *in vitro* dos extratos otimizados;
- Analisar o efeito do pH na estabilidade das antocianinas do extrato aquoso das pétalas de *C. cyanus* e *C. ternatea*;
- Avaliar o efeito da temperatura e luz, em presença e ausência de frutooligossacarídeos, na estabilidade das antocianinas do extrato aquoso das pétalas de *C. ternatea* em pH 3,6 e 5,4.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA - *Centaurea cyanus* L. E *Clitoria ternatea* L.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

### **1.1 PLANTAS MEDICINAIS DE USO TRADICIONAL**

As plantas medicinais são utilizadas desde os tempos pré-históricos, sendo o conhecimento das suas propriedades curativas adquirido de forma totalmente empírica e constituindo durante muito tempo como a única forma de conhecimento disponível (ELIZABETSKY, 1986). Esse conhecimento é importante para a ciência por ser tratar de saberes resultantes da observação sistemática de fenômenos biológicos, sendo empregado no direcionamento de estudos químicos e farmacológicos das propriedades terapêuticas presentes nestas plantas (BALICK; COX, 1996).

A Organização Mundial da Saúde define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que apresenta, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (WHO, 1998). Estima-se que existem entre 350 a 400 mil espécies de plantas medicinais em todo mundo e a maior parte é usada no tratamento e prevenção de doenças (AZIZ et al., 2017).

A maioria da população mundial depende de produtos naturais obtidos das plantas medicinais devido principalmente ao baixo poder aquisitivo e também por residirem em áreas isoladas sem acesso a outras formas de tratamentos (AKERELE, 1993). Essas plantas são usadas na elaboração de extratos aquosos, chás, tinturas terapêuticas, geralmente etanólicas, xaropes, comprimidos e *sprays* orais (WICHTL, 2004; HALBERSTEIN, 2005).

As plantas medicinais representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e de diversidade molecular, com potencial reconhecido na elaboração de produtos naturais (MISHRA et al., 2008). Na medicina popular, esses produtos naturais são utilizados no alívio do estresse, fadiga, insônia, ansiedade e nervosismo (PAVLOVICH, 1999) e também como agentes antiinflamatórios, diuréticos, expectorantes, cardiotônicos, sedativos e tônicos (SHIKOV et al., 2014).

As propriedades farmacológicas, biológicas e antioxidantes das plantas medicinais são devido, basicamente, à presença dos compostos fenólicos e

terpenóides bioativos (LE MARCHAND, 2002; DAWIDOWICZA; WIANOWSKA; BARANIAK, 2006). Os compostos fenólicos, grupo de substâncias fitoquímicas formadas como metabólitos secundários, são os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes das plantas (JABERIAN et al., 2013). Várias propriedades funcionais têm sido descritas tais como: propriedades antioxidantes associadas com a redução do risco de doenças cardiovasculares (SHAYGANNI et al., 2016), aterosclerose (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2011), câncer (LE MARCHAND, 2002; SURH, 2003), diabetes (RANILLA et al., 2010), doenças respiratórias (ASADBEIGI et al., 2014), hipertensão (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014) e obesidade (MOPURI; ISLAM, 2017).

Diversas espécies de plantas medicinais empregadas pela medicina popular no tratamento e prevenção de diferentes doenças estão distribuídas mundialmente (ŠAVIKIN et al., 2013; AZIZ et al., 2017). Essa diversificação de espécies e formas de utilização são influenciadas pela cultura, história, religião e filosofia das comunidades (ŠAVIKIN et al., 2013; AZIZ et al., 2017).

Existe um grande interesse em medicamentos derivados de plantas por países desenvolvidos, principalmente da Europa, Ásia e Estados Unidos, pelo fato que o mercado mundial desta classe de fitomedicamentos recebe bilhões de dólares anualmente (DUTRA et al., 2016). Estima-se que 30% dos medicamentos terapêuticos disponíveis são derivados de fontes naturais, podendo chegar a 60% em algumas áreas, como na oncologia (DUTRA et al., 2016).

Extratos e compostos isolados de diversas plantas medicinais brasileiras têm demonstrado atividade biológica (TRENTIN et al., 1997; BRAGA et al., 2007; GOMIG et al., 2008; DE TOLEDO et al., 2011). Nesse aspecto, o Brasil possui uma rica biodiversidade, contendo mais de 45 mil espécies de plantas, o que representa aproximadamente 20% de todas as espécies vivas conhecidas globalmente (BOLZANI; CASTRO-GAMBOA; SILVA, 2010; DUTRA et al., 2016). Há uma grande diversidade de plantas medicinais nos biomas Amazônia e Cerrado, que ocupam 64% e 36% da região, respectivamente. E apresentam diversas espécies pertencentes às famílias Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae e Rubiaceae (RIBEIRO et al., 2017).

Dentre as principais plantas medicinais brasileiras utilizadas pela população estão as espécies: *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) conhecido como “picão preto”,

*Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) conhecido como “óleo de copaíba”, *Arnica montana* (Asteraceae), *Calendula officinalis* (Asteraceae), *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) conhecido como “unha-de-gato”, *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) conhecido como “sucupira”, *Siphocampylus verticillatus* (Campanulaceae) conhecido como “coral”, *Mikania glomerata* (Asteraceae) conhecido como “guaco”, *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) conhecido como “avelós”, *Phyllanthus* spp. (Phyllanthaceae) conhecido como “quebra-pedra”, *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) conhecido como “espinheira-santa”, *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) conhecido como “camomila”, *Baccharis trimera* Less. (Asteraceae) conhecido como “carqueja”, entre diversas outras espécies (DI STASI et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2006; DUTRA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017).

A família Asteraceae representa o maior número de espécies de plantas entre as Angiospermas, é encontrada na forma de ervas, arbustos, árvores e trepadeiras (DI STASI et al., 2002; RIBEIRO, 2010). São exemplos de espécies dessa família a *Lactuca sativa* (alface), *Bellis perenis* (margarida), *Cichorium intybus* (chicória), *Helianthus annuus* L (girassol), e a *Dahlia pinnata* Cav. (Dalia). A família Fabaceae é a terceira maior no mundo, ficando atrás da Asteraceae e Orchidaceae, e apresenta um grande número de espécies de ervas, arbustos e árvores (LEWIS et al., 2005). Fazem parte dessa família as espécies *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Pisum sativum* L. (ervilha), *Cicer arietinum* L. (grão de bico), *Arachis hypogaea* L. (amendoim), *Delonix regia* (Hook.) Raf. (árvore flamboyant), entre outras. Assim, entre as diversas famílias com importantes espécies utilizadas na medicina popular, a espécie *Centaurea cyanus* L., família Asteraceae, e a espécie *Clitoria ternatea* L., família Fabaceae, foram selecionadas para o presente estudo.

## 1.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae compreende aproximadamente entre 1.600 a 1.700 gêneros que contêm de 25 a 30 mil espécies de plantas distribuídas mundialmente, exceto na Antártida (FUNK et al., 2009). No Brasil, é estimada a presença de 250 gêneros e 2 mil espécies, distribuídas nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (SOUZA; LORENZI, 2008). Essas plantas são caracterizadas por apresentarem inflorescências do tipo capítulo, formado por flores

inseridas sobre um receptáculo, sendo este envolto e protegido por brácteas, anteras formando um anel e o cálice com um conjunto de apêndices apicais denominado *pappus* (FUNK et al., 2009; ERBAR; LEINS, 2015).

Essa família de plantas contém importantes substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário como compostos fenólicos, diterpenos, lactonas sesquiterpênicas, poliacetilenos, alcaloides pirrolizidínicos, entre outros (CRONQUIST, 1988; DA SILVA et al., 2005). A literatura demonstra que essas substâncias químicas presentes em várias espécies de Asteraceae são responsáveis pelas atividades antioxidante (SHAHAT; IBRAHIM; ELSAID, 2014), antimicrobiana (KENNY et al., 2014), antitumoral (KVIECINSKI et al., 2008) e analgésica (DEWAN et al., 2013).

Além de plantas usadas com fins terapêuticos, a família Asteraceae engloba algumas espécies que fazem parte da alimentação humana, da produção de cosméticos, fornecem néctar e pólen para apicultura e muitas são usadas para fins ornamentais (ROQUE; BAUTISTA, 2008). A família Asteraceae é dividida em 13 subfamílias, sendo Asteroideae, Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae, Corymbioideae, Famatinanthoideae, Gymnarrhenoideae, Pertyoideae, Hecastocleidoideae, Gochnatioideae, Wunderlichioideae, Stifftioideae e Mutisioideae (PANERO; FUNK, 2008; PANERO et al., 2014). Essas subfamílias são divididas em tribos, na qual a tribo Cynareae compreende o gênero *Centaurea* (PANERO; FUNK, 2008; PANERO et al., 2014).

### 1.2.1 Gênero *Centaurea*

A *Centaurea* é um gênero de plantas herbáceas que pertence à família Asteraceae, subfamília Carduoideae, tribo Cynareae e subtribo Centaureinae. O centro da diversidade das espécies da subtribo Centaureinae está localizado predominantemente no Hemisfério Norte (HELLWIG, 2004). A Centaureinae compreende cerca de 31 gêneros com aproximadamente 800 espécies, dentre os quais o gênero *Centaurea* possui cerca de 250 espécies nativas distribuídas em toda a Europa e Ásia, especialmente nas regiões Irano-Turaniana e Mediterrânea (HELLWIG, 2004; SUSANNA; GARCÍA-JACAS, 2007).

A Turquia contém uma grande quantidade destas espécies, principalmente no sudoeste e leste do país (WAGENITZ, 1986). Uma elevada proporção é endêmica, representando em torno de 55% das espécies localizadas em diversas áreas como montanhas, estradas, campos, entre outros (MARTIN; DINC; DURAN, 2009; UYSAL et al., 2016).

Na América do Norte, principalmente na região oeste dos Estados Unidos e Canadá, as espécies do gênero *Centaurea* são consideradas plantas invasoras de pastagens e áreas de cultivo (HERRON-SWEET et al., 2015). As principais espécies presentes na América do Norte são a *Centaurea stoebe* (HERRON-SWEET et al., 2015), *Centaurea diffusa* (LEJEUNE; SUDING; SEASTEDT, 2006; MEIMAN; REDENTE; PASCHKE, 2006), *Centaurea maculosa* (MEIMAN; REDENTE; PASCHKE, 2006), *Centaurea solstitialis* (SMITH et al., 2006) e a *Centaurea cyanus* (MUTH; PIGLIUCCI, 2006).

Em alguns países da América do Sul, como Brasil, Argentina e Chile, espécies do gênero *Centaurea* também estão presentes em áreas de pastagens e cultivo (NEGRETE et al., 1993; FORTUNA et al., 2002; FLORA DO BRASIL, 2017a). As espécies já identificadas foram a *Centaurea diffusa* (FORTUNA et al., 2002), *Centaurea tweediei* (FORTUNA et al., 2001) e a *Centaurea melitensis* (FLORA DO BRASIL, 2017a). No Brasil, algumas espécies estão distribuídas na região Sudeste, São Paulo, e na região Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, as quais são regiões pertencentes ao Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (FLORA DO BRASIL, 2017a). Entretanto, espécies desse gênero botânico ainda não são exploradas comercialmente nem para uso na fitoquímica nem para aplicação tecnológica em alimentos.

Diversos trabalhos apresentam formas de controle propagativo destas espécies, consideradas plantas invasivas que ameaçam a integridade das áreas de pastagens, agricultura e de plantas nativas por liberarem pelas raízes exsudados radiculares afetando a competição pelos nutrientes do solo (CALLAWAY; ASCHEHOUG, 2000; SMITH et al., 2006; HERRON-SWEET et al., 2015). Entretanto, em alguns países, espécies do gênero *Centaurea* têm as partes aéreas utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças (BAYTOP, 1999; SEZIK, 2001; ARIF; KÜPELI; ERGUN, 2004). Por exemplo, na Turquia as espécies *Centaurea drabifolia*, *Centaurea solstitialis*, *Centaurea pulchella* e

*Centaurea cyanus* são usadas na medicina popular para tratar hemorróidas, resfriados, abscessos e diarreia, respectivamente (HONDA et al., 1996; SEZIK et al., 2001; REYHAN; KÜPELİ; ERGUN, 2004). A espécie *Centaurea ornata* é usada popularmente como depurativo e antirreumático na Espanha (VÁZQUEZ; SUAREZ; PÉREZ, 1997). Na Tunísia, a espécie *Centaurea furfuracea* é usada como adstringente e diurético (FAKHFAKH; DAMAK, 2007). No Chile, a espécie *Centaurea chilensis* é usada tradicionalmente no tratamento de reumatismo e doenças inflamatórias (NEGRETE et al., 1993). Na medicina popular escocesa, as espécies *Centaurea cyanus* e a *Centaurea scabiosa*, são usadas como tônico e diurético (KUMARASAMY et al., 2007). Na Europa, pétalas de *C. cyanus* são comercializadas para o preparo de chás e para decoração de saladas exóticas.

Além disso, estudos com algumas espécies da *Centaurea* demonstraram propriedades funcionais *in vitro*: antioxidante em *C. polyclada* (EREL et al., 2014) e *C. antiochia* (OZSOY et al., 2015); antimicrobiana em *C. achaia* (SKALTSA et al., 2000), *C. deusta* (KARIOTI et al., 2002), *C. diffusa* (SKLIAR; TORIBIO; ORIANI, 2005), *C. depressa* e *C. urvillei* (KARAMENDERES et al., 2006) e *C. spruneri* (CIRIC et al., 2011); antiinflamatória em *C. chilensis* (NEGRETE et al., 1993), *C. iberica* (KOCA et al., 2009), *C. athoa* (EREL et al., 2014) e *C. antiochia* (OZSOY et al., 2015); efeito antiprotozoário de *C. hierapolitana* (KARAMENDERES et al., 2006) e citotóxico de *C. zuccariniana* e *C. thessala* (KOUKOULITSA et al., 2002), *C. africana* (SEGHIRI et al., 2009) e *C. diluta* (ZATER et al., 2016).

Dentre as diversas espécies que compõem o gênero *Centaurea*, o presente estudo compreende a análise do extrato das pétalas de *Centaurea cyanus*, utilizando como solvente de extração a água ultrapura e o ácido acético. Na literatura constam poucos estudos referentes às propriedades funcionais da *Centaurea cyanus*, nos quais os autores utilizaram o álcool metílico como solvente de extração (ROP et al., 2012; WEGIERA et al., 2012; DAMTE et al., 2013; PIRVU et al., 2015; ANVARI; JAMEI, 2016), álcool etílico (GARBACKI et al., 2009; PIRVU et al., 2012; RAHIMI-MADISEH et al., 2016; ANVARI; JAMEI, 2016; MIRZAIE; ZARE KARIZI, 2016) e a propanona (PIRVU et al., 2015). Não há descrição de estudos que utilizem sistemas de solventes atóxicos para extração de compostos bioativos de *C. cyanus*.



### 1.2.2 Espécie *Centaurea cyanus* L.

A espécie *Centaurea cyanus* L., conhecida popularmente como *cornflower* ou *bachelor's button*, é uma pequena planta nativa da Europa e Ásia (HELLWIG, 2004). Está presente também em outras partes do mundo como América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e América do Sul (Argentina, Chile e Equador) (GRIN, 2017a). No Brasil, conhecida popularmente como escovinha ou fidalguinho, está presente na região sul e também são comercializadas suas sementes para cultivo ornamental e uso na culinária (EMPÓRIO DAS SEMENTES, 2017). O nome popular *cornflower* (flor do milho) está associado ao seu crescimento selvagem, como uma erva daninha, nos campos de cultivo de cereais desde os tempos da idade média (RÖSCH, 1998; AL-SNAFI, 2015).

A *C. cyanus* é uma planta perene medindo de 1 a 1,5 m de altura com caule ramificado e cor verde-acinzentado. Suas folhas são lanceoladas com 1 a 4 cm de comprimento e estão dispostas alternadamente sobre o caule (CHIRU; CALALB; NISTREANU, 2013). As flores apresentam uma cor azul intensa com diâmetro de 1,5 a 3 cm, onde o conjunto de pétalas são fixadas no involúcro composto por pequenas brácteas que se sobrepõem como telhas, Figura 1.1 (ARMITAGE, 2001; CHIRU; CALALB; NISTREANU, 2013).

**Figura 1.1** – Campo de *Centaureas cyanus* em Kortrijk, Bélgica.



**Fonte:** Busselen (2017).

Na medicina tradicional europeia, o extrato aquoso (chá) de suas flores é usado não somente pelo seu sabor característico mas também como anti-inflamatório no tratamento tópico de doenças oculares, como inflamações e conjuntivites e lesões dermatológicas (BRUNETON, 1995; CAMPANINI, 1998; FRAUNFELDER, 2004; PIERONI et al., 2004; REDŽIĆ, 2007). Também é usada no tratamento de febre, problemas ginecológicos, digestivos e doenças hepáticas (KERN et al., 1972; HANSEL et al., 1992; REDŽIĆ, 2007). As flores secas da *Centaurea cyanus* apresentam propriedades antipruriginosa, adstringente, estimulante e tônica (ARIF; KÜPELI; ERGUN, 2004; KURIAN; SANKAR, 2007; AL-SNAFI, 2015).

Na medicina tradicional da Rússia, o extrato aquoso obtido das flores é utilizado como diurético e no tratamento de cistite, tosse, doenças nervosas e gástricas, hemorragias uterinas e diarreia em crianças (VERESCHAGIN; SOBOLEVSKAYA; YAKUBOVA, 1959). A dose recomendada para o uso como diurético é a ingestão de uma colher de sopa da infusão, 10 g das flores em 200 mL de água, por três vezes ao dia (SHIKOV et al., 2014).

Diante das propriedades medicinais do extrato aquoso de *C. cyanus*, alguns estudos foram realizados demonstrando atividade antiinflamatória *in vivo* (GARBACKI et al., 1999), antibacteriana *in vitro* (DAMTE et al., 2013), antioxidante *in vitro* (PIRVU et al., 2008), gastroprotetiva *in vivo* (PIRVU et al., 2008; PIRVU et al., 2012), citotóxica *in vitro* (WEGIERA et al., 2012) e diurética *in vivo* (KLIMAS et al., 2007).

#### 1.2.2.1 Composição química das flores de *C. cyanus*

O primeiro estudo da composição química da *Centaurea cyanus* isolou a antocianina, nomeada de cianina, foi realizado em 1913 por Willstätter e Evest (WILLSTÄTTER; EVEST, 1913). O pigmento antocianina foi obtido como um sal de oxônio vermelho e determinou a sua estrutura química. Em 1915, Willstätter e Mallison verificam o mesmo pigmento presente nas cores de rosas e descreveram a mudança na cor conforme o pH da solução, vermelho em solução ácida e azul em solução alcalina (WILLSTÄTTER; MALLISON, 1915). Em 1919, Shibata e colaboradores relataram que as antocianinas azuis presentes nas flores são

compostos complexos de flavonol reduzidos e coordenados com metais, como magnésio ou cálcio (SHIBATA; SHIBATA; KASIWAGI, 1919).

Em 1958, Bayer isolou da *Centaurea cyanus* um composto azul amorfo nomeado como protocianina, sendo um composto de coordenação da cianina, ácido poligalacturônico, ferro e alumínio. A protocianina é constituída por 19,2% de cianina junto com  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , outros íons metálicos em quantidades pequenas e aproximadamente 80% de polissacarídeos, principalmente o ácido galacturônico. A estrutura proposta da protocianina é que os íons metálicos são coordenados por duas moléculas de antocianinas e ácido poligalacturônico (BAYER, 1958; BAYER et al., 1966). A presença de elementos metálicos é capaz de formar quelatos de antocianinas (BAYER, 1958; BAYER; NETHER; EGETER, 1960).

Em 1961, Hayashi e colaboradores estudaram os cristais purificados da protocianina e identificaram a presença de K, Mg e Fe como componentes principais e o Ca e Al em quantidades insignificantes. A presença de Mg em maior quantidade que o alumínio foi estabelecida por análises repetidas de diferentes culturas de pigmentos cristalinos que se mostraram idênticos em todos os aspectos analisados. O Mg e o Fe constituem uma parte essencial responsável pela cor azul dos cristais da protocianina, e permaneceram fortemente ligados após 48 horas de diálise em água, enquanto que o K foi eliminado quase totalmente (HAYASHI et al., 1961).

O estudo de Saito et al. (1961) demonstrou que a protocianina é um composto organometálico com elevado peso molecular, cerca de 20.000 g/mol, sendo constituído principalmente por cianina (8 moles), Mg (2 átomos), Fe (1 átomo) e K (24 átomos). Os componentes orgânicos detectados foram a cianidina, glicose, galactose, arabinose, peptídeos (alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, hidroxiprolina, leucina, lisina, serina, prolina, treonina e a valina) e uma substância amarelo pálida semelhante aos flavonoides, podendo contribuir para a manutenção da cor azul.

Acredita-se que os pigmentos azuis presentes nas flores da *C. cyanus* são oriundos da formação de complexos de antocianinas mal elucidadas com copigmentos orgânicos ou com metais. A análise da influência de copigmentos orgânicos, como a quercitrina, ácido clorogênico e o galato de metilo não demonstrou efeito mensurável na cor ou estabilidade da cianidina-3-glicosídeo em solução aquosa entre pH 3 a 6,5; entretanto, na presença de sais de metal (Al)

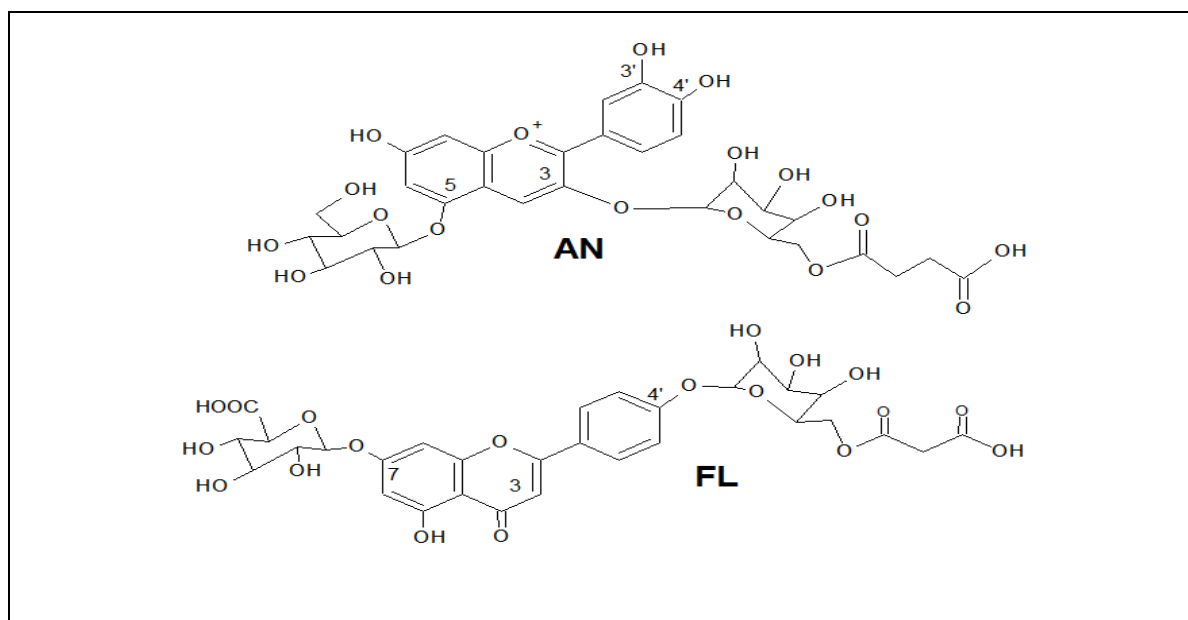
formaram complexos de coordenação estáveis antocianina-copigmento-metal (JURD; ASEN, 1966).

Asen e Jurd (1967) isolaram o pigmento azul cristalino das flores da *Centaurea cyanus* e identificaram um complexo de ferro de quatro moléculas de cianidina 3,5-diglicosídeo e três moléculas de glicosídeo bisflavona, sendo nomeado de cianocentaurina. Observaram, na hidrólise ácida do pigmento, que o glicosídeo bisflavona produziu o 7-O-metil-apigenina e uma segunda flavona não identificada claramente. Posteriormente, o copigmento glicosídeo bisflavona foi identificado como apigenina 7-O- $\beta$ -D-glucuronideo-4'-O- $\beta$ -D-glicosídeo (ASEN; HOROWITZ, 1974). Os pigmentos protocianina e cianocentaurina foram submetidos a estudos comparativos utilizando a peneira molecular, ultracentrifugação, eletroforese e espectrofotometria, e não foram encontradas diferenças na constituição molecular responsáveis pela cor azul (OSAWA, 1982).

Takeda e Tominaga (1983) ao estudarem a natureza química da antocianina presente na *Centaurea cyanus*, tornaram evidentes que a sua estrutura é formada pela cianidina 3-succinil glicosídeo 5-glicosídeo ao invés da cianidina 3,5-diglicosídeo (cianina), como citado anteriormente por Asen e Jurd (1967). A análise cromatográfica desta antocianina, chamada de centaurocianina, demonstrou que é idêntica à antocianina contida na protocianina cristalina que forma o pigmento azul (TAKEDA; TOMINAGA, 1983).

Tamura *et al.* (1983) obtiveram uma nova antocianina e flavona de pétalas de *C. cyanus* ao utilizarem como solventes de extração o ácido trifluoroacético, ácido acético, acetonitrila e água. O motivo do isolamento somente da cianina e flavona, pode ser explicada pela utilização do álcool metílico acidificado com HCl na extração dos pigmentos, ocasionando a hidrólise dos ésteres do ácido succínico e ácido malônico. As novas estruturas da antocianina e flavona foram determinadas como sendo cianidina 3-O-(6-O-succinil- $\beta$ -D-glucosil)-5-O-( $\beta$ -D-glucosil) e apigenina 7-O- $\beta$ -D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glicosídeo), respectivamente, Figura 1.2.

**Figura 1.2** – Estruturas da antocianina (AN) e flavona (FL) na protocianina.



**Fonte:** Adaptado de Takeda (2006).

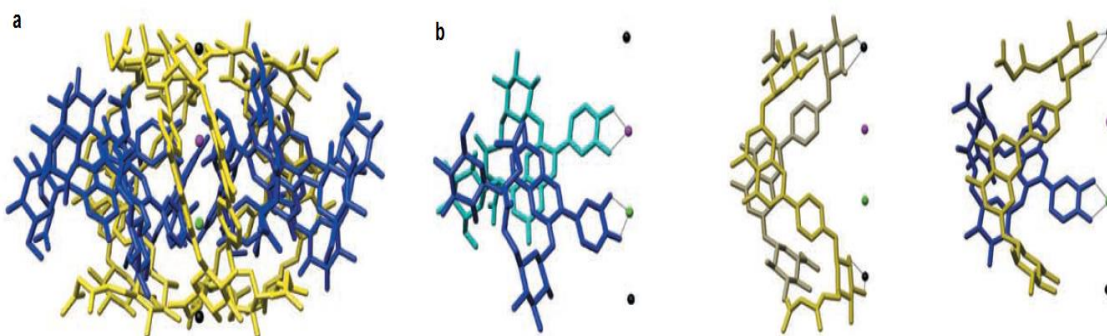
A composição da protocianina pura foi determinada por meio da reconstrução da sua estrutura por Kondo et al. (1994). A reconstrução da protocianina foi realizada utilizando a succinilcianina e a malonilflavona, estruturas da protocianina identificadas pelos pesquisadores Takeda e Tominaga (1983) e Tamura et al. (1983) utilizando os íons  $Mg^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ . A composição exata da protocianina foi estabelecida como antocianina complexada com metal,  $[Sucy_6Mafl_6Fe^{3+}Mg^{2+}]$  ( $C_{366}H_{384}O_{288}FeMg$ , peso molecular = 8511 g/mol), contendo seis moléculas cada uma de succinilcianina e malonilflavona, um íon de  $Fe^{3+}$ , um íon de  $Mg^{2+}$  em um arranjo supramolecular.

Em 1998, Kondo e colaboradores descreveram um novo mecanismo de desenvolvimento da cor azul da protocianina. Foi analisada a substituição dos íons metálicos presentes na protocianina por outros íons, no qual o  $Mg^{2+}$  foi substituído pelo  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$ , e o  $Fe^{3+}$  foi substituído pelo  $Al^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$  e  $Co^{3+}$ . Foi verificada que a cor azul da protocianina é desenvolvida por uma interação da transferência de carga de ligante para metal (LMCT) entre a antocianina e o íon férrico, em vez de resultar da formação de um ânion da anidrobases simples do cromóforo, e a estrutura do pigmento foi elucidada.

Takeda et al. (2005) identificaram a presença de outro fator essencial envolvido na formação da protocianina. Durante a reconstrução da protocianina utilizando antocianina altamente purificada [centaurocianina, cianidina 3-O-(6-O-

succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo], glicosídeo flavona [apigenina 7-O- $\beta$ -D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosido)], e os metais,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , foi revelada a presença essencial do  $\text{Ca}^{2+}$  na formação e estabilidade do pigmento azul. Estudos demonstraram que a protocianina não pode ser obtida a partir das misturas contendo somente ferro e magnésio como metais (TAKEDA et al., 2005). Na sequência, a protocianina foi reconstruída acrescentando-se o  $\text{Ca}^{2+}$  e isolada na forma de cristais pela primeira vez por Shiono, Matsugaki e Takeda (2005). Esta estrutura cristalina da protocianina foi analisada por meio da cristalografia de raio-X com uma resolução de 1.05 Å. A protocianina apresentou um íon de  $\text{Fe}^{3+}$ , um íon de  $\text{Mg}^{2+}$  e dois íons de  $\text{Ca}^{2+}$  alinhados ao longo do eixo pseudo-tríplo (Figura 1.3a), coordenadas a seis moléculas de antocianina (cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo) e seis de flavona (apigenina 7-O- $\beta$ -D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosídeo). No interior da estrutura, os íons de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são coordenados cada um por três moléculas de antocianina e os dois íons de  $\text{Ca}^{2+}$  são coordenados cada um por três moléculas de flavona (SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005).

**Figura 1.3** – Estrutura cristalina da molécula de protocianina.



(a – vista lateral ao longo do eixo pseudo-tríplo. As cores correspondem: azul (antocianina), amarelo (flavona), esfera vermelha ( $\text{Fe}^{3+}$ ), esfera verde ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e a esfera preta ( $\text{Ca}^{2+}$ ). b - vista lateral de pares de pigmentos associados. À esquerda, uma molécula de antocianina se liga ao  $\text{Fe}^{3+}$  (esfera vermelha) e a outra ao  $\text{Mg}^{2+}$  (esfera verde); centro, duas flavonas se ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera preta); direita, as moléculas de flavona e antocianina se ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , respectivamente).

**Fonte:** Adpatado de Shiono, Matsugaki e Takeda (2005) e Takeda (2006).

Os dois locais no interior do núcleo central da protocianina tem a mesma densidade de elétrons, que correspondem a média do  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sugerindo que esses sítios são ocupados por estes íons por causa da orientação aleatória da molécula ao longo do eixo pseudo-tríplo (SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005; TAKEDA, 2006). Diante disso, as estruturas da protocianina foram analisadas por

raios-X, com a substituição dos íons de metal por FeMgBa, FeMnBa e FeCdBa. Na protocianina substituída por FeMnBa, a densidade eletrônica dos núcleos internos foram aproximadamente a mesma da protocianina (FeMgCa), enquanto que nas protocianinas substituídos por FeMnBa e FeCdBa foram a média do  $\text{Fe}^{3+}$  e dos íons substituídos, respectivamente. A análise das distâncias entre os dois metais e os átomos de oxigênio de coordenação variaram de acordo com os raios dos metais substituídos, indicando que são heterogêneos e que o núcleo interno da protocianina contém os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005; TAKEDA, 2006).

Na molécula de protocianina, as antocianinas (AN) e as flavonas (FL) são associadas entre si como AN-AN e FL-FL em pares. Já os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são cada um coordenado por um diferente fragmento de AN associado ao par AN-AN. Enquanto os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  são cada um coordenado por um fragmento separado da FL associado ao par FL-FL (Figura 1.3b). O comprimento das ligações C-C e C-O no anel-B da antocianina indicam a forma de 4'-keto-quinoidal (TAKEDA, 2006; SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005).

A cor azul na protocianina é desenvolvida por um complexo de metal tetranuclear, portanto, composto pela cianidina com a formação do quelato de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  com a base 4'-keto-quinoidal das antocianinas e os dois íons de  $\text{Ca}^{2+}$  coordenados com as flavonas responsáveis pela co-pigmentação e estabilidade deste pigmento supramolecular (TAKEDA, 2006; SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005).

Também foram analisados outros componentes químicos presentes em extratos obtidos por diferentes métodos e solventes a partir das pétalas de *Centaurea cyanus*. Ao estudar a composição química das flores, Murav'eva e Bubenchikova (1986) uma quantidade considerável de ácidos fenolcarboxílicos detectaram em extratos etanólicos, incluindo isômeros de ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido cafeico e ácido quinico.

Litvinenko e Bubenchikova (1988) extraíram diferentes compostos da parte epigea da *Centaurea cyanus* utilizando uma solução composta por 80% de propanona. Os autores identificaram seis flavonoides como agliconas (quercetina, kaempferol, isoramnetina, apigenina, luteolina e hispidulina), oito flavonoides glicosilados (quercimeritrina, isoramnetina 7-O- $\beta$ -D-glicosídeo, kaempferol 7-O- $\beta$ -D-

glicosídeo, apigenina 4-O- $\beta$ -D-glicosídeo, cosmosina, cinarosídeo, apiina e graveobiosídeo), quatro ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, clorogênico, neoclorogênico e isoclorogênico) e dez aminoácidos. Na sequência, Bubenchikova (1990) verificou a presença das cumarinas escopoletina e umbeliferona.

Diferentes experimentos farmacológicos demonstraram que o extrato das pétalas de *Centaurea cyanus* contendo polissacarídeos, extraído do precipitado insolúvel em álcool etílico, apresentou propriedades antiinflamatórias *in vitro* (GARBACKI et al., 1999). Esses polissacarídeos foram compostos principalmente por ácido galacturônico, arabinose, glicose, ramnose e galactose (GARBACKI et al., 1999). Os polissacarídeos estão presentes em muitas plantas usadas na medicina popular, sendo considerados uma classe de compostos com propriedades bioativas. Dentre essas propriedades, destacam-se os efeitos antiinflamatório, imunestimulante, e anti-úlceras (SRIVASTAVA; KULSHRESHTHA, 1989).

Tan et al. (2008) prepararam extratos com hexano, clorofórmio e álcool metílico de partes aéreas secas da *Centaurea cyanus* com o objetivo de identificar e isolar metabólitos secundários. Foram identificados os seguintes compostos: siringina, ácido clorogênico, apigenina, homorientina, luteolina-3-O-glicosídeo, luteolina-4-O-glicosídeo, isorhamnetina 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e a apiina com a elucidação da estrutura química (TAN et al., 2008).

Estudos qualitativos com tinturas etanólicas e extratos aquosos contendo álcool etílico e propanona obtidos da flor e parte aérea da *Centaurea cyanus* foram realizados por Pirvu et al. (2012). A análise da tintura das flores por cromatografia de camada delgada de alto desempenho (HPTLC) demonstrou a presença de quercetina, apigenina, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico e cumarinas. Além da avaliação qualitativa, esse estudo revelou que os extratos aquosos obtidos da parte aérea por meio de extração a quente apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos que as tinturas elaboradas em temperatura ambiente.

Posteriormente, dois novos extratos da parte aérea da *Centaurea cyanus*, contendo polissacarídeos e polifenóis, foram estudados e a atividade gastroprotetora *in vivo* avaliada por Pirvu et al. (2015). Os extratos foram elaborados a partir de extrato aquoso da parte aérea da *Centaurea cyanus*, no qual o primeiro extrato foi tratado com o solvente álcool metílico (extrato P) e o segundo com os solventes propanona e clorofórmio (extrato A). A análise qualitativa por HPTLC do extrato P,



contendo frações de polissacarídeos, indicou uma quantidade menor de espécies de polifenóis (ácido clorogênico, rutina, quercetina-3-O-glicosídeo e ácido protocatecuico). Já o extrato A, contendo frações de polifenóis, continha cinco espécies principais de polifenóis (rutina, ácido clorogênico, quercetina-7-O-glicosídeo, apigenina-7-O-glicosídeo e ácido isoclorogênico). A combinação dos dois extratos se mostrou mais eficaz no tratamento de lesões gástricas *in vivo*.

Recentemente, compostos fitoquímicos foram identificados em extrato etanólico das pétalas de *C. cyanus* por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), principalmente o ácido *n*-hexadecanóico (36,4%) e o ácido linoléico (19,3%) (MIRZAIE; ZARE KARIZI, 2016).

Além de todos esses componentes presentes em diferentes extratos, as pétalas da *Centaurea cyanus* também são fontes de proteínas e minerais como ferro, cálcio, magnésio, fósforo, potássio, sódio, manganês, cobre, zinco e molibdênio (ROP et al., 2012; PIRVU et al., 2015).

Não foram encontrados na literatura trabalhos com a identificação de compostos bioativos utilizando como solvente de extração a água e o ácido acético, no qual representa a forma natural do chá da *Centaurea cyanus* consumido pela população mundial. Não obstante, até a presente data, não há registro do processo de otimização de compostos bioativos por meio da metodologia de superfície de resposta.

### 1.3 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae, conhecida como família das leguminosas, compreende aproximadamente 630 gêneros e 18 mil espécies distribuídas mundialmente (JUDD et al., 2007). As diversas espécies estão presentes em áreas alagadas, desertos frios ou florestas tropicais e subtropicais (NASCIMENTO et al., 2012). No Brasil, é considerada a maior família com cerca de 2,8 mil espécies e 190 gêneros, estando representadas nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa (LEWIS et al., 2005; ZAPPI et al., 2015). Sua característica principal é apresentar fruto do tipo legume, conhecido como vagem, porém existem exceções.

As leguminosas são as maiores contribuintes na fixação de nitrogênio da atmosfera por meio das suas raízes, formando uma relação simbiótica com bilhões

de bactérias do gênero *Rhizobium*, conferindo-lhes uma importante característica ecológica (PEIX et al., 2015). Além de que, são as principais fontes de proteína vegetal na alimentação humana (soja e feijão), e utilizadas na produção de óleos, resinas, perfumes, tinturas, medicamentos, inseticidas, adubo, forragem e fornecem madeiras com valor comercial (JUDD et al., 2007).

Essa família de plantas é uma importante fonte de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, taninos, cumarinas, terpenóides entre outros (VEITCH, 2010; AHUJA; KISSEN; BONES, 2012; WINK, 2013). Por serem plantas fixadores de nitrogênio, as leguminosas produzem também metabólitos secundários contendo nitrogênio como alcaloides, aminoácidos não proteicos e peptídeos (WINK, 2013). Esses metabólitos são responsáveis pelas propriedades antioxidante (AKTER et al., 2016), antimicrobiana (DUBE; MEYER; MARNEWICK, 2017), antiinflamatória (ANAM, 2001) e citotóxica (ARTHANARI et al., 2012).

A família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Cesalpinioideae (cesalpiniáceas), Faboideae (faseoláceas ou papilionáceas) e Mimosoideae (mimosáceas) (RIBEIRO, 2010). A subfamília Faboideae é considerada a maior e a mais diversificada dentre as leguminosas, sendo representados por gêneros lenhosos no hemisfério sul e trópicos e por gêneros herbáceos em regiões de clima temperado; compreendendo aproximadamente 28 tribos, 13,8 mil espécies e 478 gêneros, no qual integra o gênero *Clitoria* (LEWIS et al., 2005).

### 1.3.1 Gênero *Clitoria*

O gênero *Clitoria* é caracterizado por plantas lenhosas que pertencem à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae e subtribo Clitoriinae. A subtribo Clitoriinae consiste de aproximadamente 106 espécies compartilhadas entre os gêneros *Clitoria* L (ca. 62 spp.), *Periandra* Benth. (6 spp.), *Centrosema* (DC) Benth. (ca. 36 spp.), *Clitoriopsis* Huntch. (1 sp.) e *Barbieria* DC. (1 sp.) (LACKEY, 1981; FANTZ, 1996; SILVA, 2017). Algumas espécies estão distribuídas na América do Sul, América do Norte, Ásia, África, Austrália e algumas ilhas no Pacífico (GRIN, 2017b).

As espécies pertencentes ao gênero *Clitoria* estão presentes principalmente nas áreas pertencentes ao cinturão tropical e com clima temperado como na América do Sul, África, Ásia e Austrália (FANTZ, 1991). São caracterizadas como

uma planta lenhosa com flores vistosas, ressupinadas, papilionáceas, cálice tubuloso com bractéolas, estípulas e estípelas persistentes e ovário súpero (FANTZ, 1990). São cultivadas como plantas ornamentais devido às suas flores de várias formas e cores, variando entre branca, amarela, lilás e azul (FANTZ, 1993). Na América do Norte, principalmente nos Estados Unidos, algumas espécies são cultivadas como plantas ornamentais: *Clitoria annua*, *Clitoria bractystegia*, *Clitoria fairchildiana*, *Clitoria fragrans*, *Clitoria heterophylla*, *Clitoria laurifolia*, *Clitoria mariana* e a *Clitoria ternatea* (FANTZ, 1993).

Na América do Sul também estão presentes algumas espécies do gênero *Clitoria*. O Brasil concentra diversas espécies em todas as regiões e algumas são nativas, dentre as quais a *Clitoria amazonum*, *Clitoria arborea* Benth., *Clitoria brachycalyx* Harms, *Clitoria cavalcantei* Fantz, *Clitoria coriacea* Schery, *Clitoria densiflora* Benth., *Clitoria epetiolata* Burkart, *Clitoria fairchildiana* R.A.Howard, *Clitoria falcata* Lam., *Clitoria flexuosa* Fantz, *Clitoria froesii* Fantz, *Clitoria guianensis* (Aubl.) Benth., *Clitoria irwinii* Fantz, *Clitoria javitensis* (Kunth) Benth., *Clitoria laurifolia* Poir., *Clitoria leptostachya* Benth., *Clitoria mucronulata* Benth., *Clitoria nana* Benth., *Clitoria nervosa* Herzog, *Clitoria obidensis* Huber, *Clitoria rufescens* (Benth.) Benth., *Clitoria sagotii* Fantz, *Clitoria selloi* Benth., *Clitoria simplicifolia* (Kunth) Benth., *Clitoria snethlageae* Ducke, *Clitoria stipularis* Benth., *Clitoria ternatea* L. (naturalizada) e a *Clitoria tunuhiensis* Fantz (FLORA DO BRASIL, 2017b). Essas espécies estão presentes na forma de arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira e subarbusto (FLORA DO BRASIL, 2017b).

Apesar do gênero *Clitoria* apresentar diversas espécies, são poucas as espécies citadas na literatura com uso medicinal. Na medicina popular brasileira, são usadas o chá das raízes da *Clitoria guianensis* como afrodisíaco e para tratar a impotência sexual (YAZBEK et al., 2016). A espécie *Clitoria simplicifolia* tem o uso contraindicado pelos índios Krahô por ser considerada venenosa para o homem (RODRIGUES, 2007). Já a *Clitoria ternatea* é a principal espécie usada na medicina tradicional no tratamento de icterícia, enxaqueca, dor de garganta, tumores, doenças da pele, asma, febre, infecções do trato urinário, constipação e distúrbios do sistema nervoso central (KAVITHA; PREMALKSHMI, 2013).

### 1.3.2 Espécie *Clitoria ternatea* L.

A espécie *Clitoria ternatea* L., conhecida popularmente como *butterfly pea* e *blue pea*, é uma planta nativa da ilha de Ternate que faz parte do arquipélago de Moluca, localizado na Indonésia (JAIN et al., 2003). Atualmente está amplamente distribuída e naturalizada em regiões com clima tropical e subtropical como Ásia (Índia, China, Malásia), África, Austrália, América do Norte (Estados Unidos e México), Pacífico (Hawai, Ilhas Mariana, Polinésia Francesa, Samoa), América Central (Costa Rica) e na América do Sul (Brasil, Caribe, Colômbia, Equador, Peru, Uruguai, Venezuela) (FANTZ, 1991; GRIN, 2017c).

No Brasil, chamada popularmente de *clitória-azul* e *cunhã*, está presente em alguns estados do Norte (Acre), Nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), pertencentes aos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (HALL, 1985; FLORA DO BRASIL, 2017c; GRIN, 2017c).

A *C. ternatea* é cultivada como planta ornamental, forrageira ou medicinal (JAIN et al., 2003). É uma planta perene com galhos finos e folhas pinadas verdes com formato elíptica a lanceolada, crescendo até 3 metros de altura, fixando-se em suporte (HALL, 1985; JAIN et al., 2003). As flores apresentam uma grande pétala com a cor azul ou branca com o interior amarelo ou branco, sendo solitária e com comprimento de 2 a 4 cm que se assemelham a uma concha (HALL, 1985; JAIN et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2008). Os frutos são vagens de 6 a 12 cm de comprimento, parecidas com ervilhas finas, contendo até 10 sementes (HALL, 1985; JAIN et al., 2003). As sementes têm 4,5 a 7 mm de comprimento e 3 a 4 mm de largura com coloração verde, marrom ou preta, Figura 1.4 (HALL, 1985).

**Figura 1.4** – *Clitoria ternatea* L. a) Flor azul; b) Flor branca.



**Fonte:** Mukherjee et al. (2008).

No campo, a *Clitoria ternatea* é cultivada como planta forrageira servindo de alimento para os animais e está bem adaptada a várias condições climáticas (GOMEZ; KALAMANI, 2003). É considerada uma planta produtiva, fonte de proteínas, com boa qualidade de forragem e pode ser disponibilizada aos animais na forma de pastagem, cortada *in natura* ou feno (AVALOS et al., 2004).

A morfologia das flores da *C. ternatea* está associada com o aparelho sexual feminino, sendo utilizada como tratamento para aumentar a fertilidade, controlar a secreção menstrual, tratar a gonorreia e como estimulante sexual (FANTZ, 1991). Existe uma crença que as estruturas de plantas que se assemelham à porções do corpo humano indicam a sua capacidade de fornecer remédios para doenças (FANTZ, 1991).

Raízes, flores, folhas e sementes de *C. ternatea* são conhecidas por apresentarem várias propriedades terapêuticas na medicina popular indiana (MUKHERJEE et al., 2008). As suas raízes são usadas no tratamento de desordens mentais (VASISHT et al., 2016), dores no corpo, hemicrania, distúrbios urogenitais, leucoderma, bronquite, asma, tuberculose pulmonar, ascite, febre dentre outros (SALA, 1997; MUKHERJEE et al., 2008). Também contém propriedades laxativas e diuréticas (MUKHERJEE et al., 2008; RAGHU et al., 2017). A infusão das flores é utilizada na elaboração de colírio (JAIN, 2003), na indução da contração uterina e menstruação (MUKHERJEE et al., 2008). As folhas auxiliam no tratamento da dor de ouvido (otalgia) e doenças do fígado (hepatopatia), enquanto as sementes são laxantes (SALA, 1997).

No sistema indiano de medicina Ayurveda, a *C. ternatea* é chamada de Shankhpushpi e usada no preparo da Medhya Rasayana, indicada por aumentar a capacidade intelectual, rejuvenescer o corpo e sistema nervoso, melhorar a áurea e a saúde para um envelhecimento com qualidade (RAGHU et al., 2017). A Medhya Rasayana é um grupo de preparações Ayurveda a partir de extratos de plantas selecionadas com propriedades rejuvenescedoras do sistema nervoso (SINGH; NARSIMHAMURTHY; SINGH, 2008).

As pétalas azuis das flores da *C. ternatea* contém uma variedade de compostos fenólicos, principalmente antocianinas, usadas como corantes naturais em alimentos e bebidas devido à alta estabilidade (GOMEZ; KALAMANI, 2003; MUKHERJEE et al., 2008). Na Malásia, o extrato aquoso das flores secas é usado para colorir bolos de arroz e no prato popular “Nasi Kerabu” (LOWRY; CHEW, 1974; NEDA; RABETA; ONG, 2013).

As propriedades terapêuticas presentes na *C. ternatea* devem-se à presença de diversos metabólitos secundários, em especial os flavonoides e ácidos fenólicos. Dentre essas propriedades, destacam-se as seguintes: antidiabética (SHARMA; MAJUMDER, 1990; DAISY; RAJATHI, 2009), antidepressiva, anticonvulsivante e antiestresse (JAIN et al., 2003), antiinflamatória e analgésica e antipirética (DEVI; BOOMINATHAN; MANDAL, 2003), antiglicante (CHAYARATANASIN et al., 2015), antioxidante (KAMKAEN; WILKINSON, 2009; CHAYARATANASIN et al., 2015, QASIM et al., 2017), antibacteriana (ARUMUGAM; PANNEERSELVAM, 2012), neuroprotetiva (RAGHU et al., 2017), hepatoprotetora (NITHIANANTHAM et al., 2013) e aprimoramento da aprendizagem e memória (TARANALLI; CHEERAMKUZHY, 2000; RAI et al., 2001).

#### 1.3.2.1 Composição química das flores de *C. ternatea*

A composição de pigmentos presentes em pétalas das flores tem sido estudada por muitos anos. As pétalas azuis da *C. ternatea*, quando analisadas por espectroscópio, apresentaram as mesmas características espectroscópicas comparadas ao extrato das pétalas (RAMAN, 1969). Nesse período iniciaram os estudos com objetivo de identificar os compostos presentes nas pétalas da *C. ternatea*. Um dos primeiros estudos disponíveis na literatura foi realizado por

Srivastava e Pand (1977) que identificaram antocianinas em extrato metanólico acidificado das pétalas da *Clitoria ternatea*. Os pesquisadores isolaram as antocianinas por meio da cromatografia em papel e identificaram a malvidina-3- $\beta$ -glicosídeo e delphinidina-3- $\beta$ -glicosídeo. Em 1979, Ranaganayaki e Singh isolaram e identificaram o kaempferol a partir das pétalas da *C. ternatea*.

Saito e colaboradores (1985) isolaram seis antocianinas aciladas azuis das pétalas as quais permaneceram estáveis em solução neutra por vários meses. As antocianinas foram todas baseadas na delphinidina 3,3',5'-triglicosídeo e denominadas de ternatinas A-F. Também foram isolados flavonóis e identificados como kaempferol, kaempferol-3-glicosídeo, robinina, quercetina e quercetina-3-glicosídeo (SAITO et al., 1985).

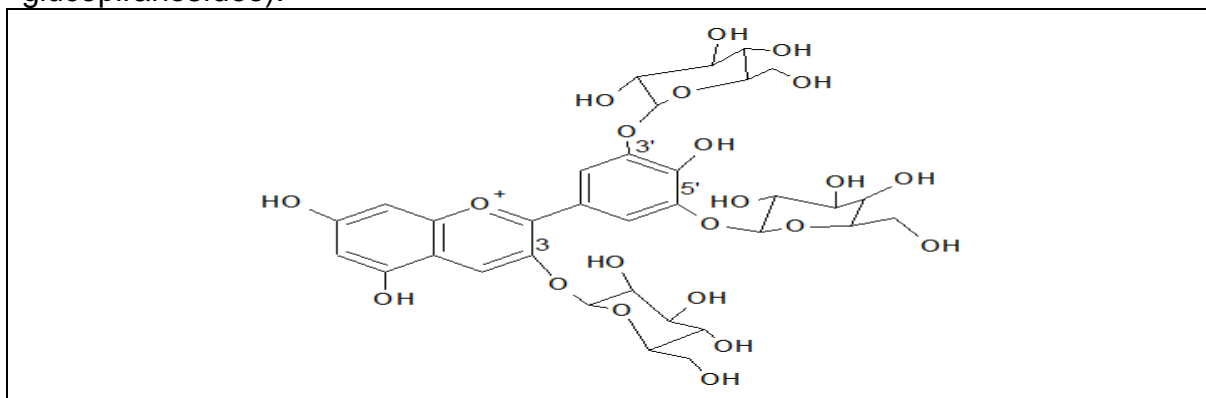
A estrutura das antocianinas aciladas presentes nas pétalas azuis da *Clitoria ternatea*, nomeadas de ternatinas A1, A2, B1, B2, D1 e D2, foi estudada e identificada por Terahara et al. (1989, 1990, 1996, 1998) e Kondo et al. (1990). A primeira estrutura elucidada refere-se à ternatina D1, sendo identificada como delphinidina 3-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-3',5'-di-O-(6-O-(E-4-O-(6-O-E-*p*-cumaryl- $\beta$ -D-glicopiranosil)-*p*-cumaryl)- $\beta$ -D-glicopiranosil) (TERAHARA et al., 1989). A estabilidade da cor da ternatina D1 em solução aquosa neutra é atribuída ao empilhamento intramolecular entre o núcleo da delphinidina e as cadeias laterais-GCGC (G: D-glucose e C: ácido *p*-cumárico), no qual a porção do cromóforo (forma de base quinonoidal) está protegida de ataques dos nucleófilos como moléculas de água (TERAHARA et al., 1989).

A mistura de ternatinas extraídas das pétalas e preparadas com a desacilação alcalina ou oxidação por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), determinou a presença de duas porções acil identificadas como ácido E-4-O-P-D-glicopiranosil-*p*-cumárico e 6-O-malonil-D-glicopiranosil, respectivamente. Na hidrólise alcalina observaram a antocianina desacilada comum, a diacilternatina (TERAHARA et al., 1990a), cuja estrutura foi originalmente proposta por Saito et al. (1985) como delphinidina 3,3',5'-triglicosídeo.

O estudo estereoquímico das porções glicosil na estrutura da diacilternatina foi realizado por Terahara et al. (1990b). A mistura de ternatinas foi desacilada com hidróxido de sódio e o hidrolisado alcalino, contendo diacilternatina e ácido 4- $\beta$ -D-glucosil-*p*-cumárico, foi separado e purificado. A estrutura da diacilternatina foi

determinada como delfinidina 3,3',5'-tri-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Figura 1.5) por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

**Figura 1.5** – Estrutura química da diacilternatina (delfinidina 3,3',5'-tri-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo).



**Fonte:** Adaptado de Terahara et al. (1990b).

A ternatina A1 é a maior antocianina presente nas pétalas da *C. ternatea*, assim como a mais estável em solução aquosa neutra (TERAHARA et al. 1990c). A sua estrutura foi identificada como delfinidina 3-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-3',5'-di-O-(6-O-((E)-4-O-(6-O-((E)-4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-*p*-cumaril)- $\beta$ -D-glicopiranosil)-*p*-cumaril)- $\beta$ -D-glicopiranosil) (TERAHARA et al. 1990c). A estrutura da ternatina A2 contém as cadeias laterais assimétricas, sendo identificada como delfinidina 3-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-3'-O-(6-O-(E-4-O-(6-O-(E-4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-*p*-cumaril)- $\beta$ -D-glicopyraonsyl)-*p*-cumaril)- $\beta$ -D-glicopiranosil)-5'-O-(6-O-(E-4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-*p*-cumaril)- $\beta$ -D-glicopiranosil) (TERAHARA et al., 1990d).

A ternatina B1 isolada das pétalas da *C. ternatea* foi identificada por Kondo, Ueda e Goto (1990). A ternatina B1 é uma antocianina pentacilada com anel-B substituído assimetricamente por duas cadeias longas. A sua estrutura foi determinada como delfinidina 3-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-3'-O-GPGPG-5'-O-PGPG, onde o P = E-*p*-cumaril e G =  $\beta$ -D-glicopiranosil (KONDO; UEDA, GOTO, 1990).

Em 1996, Terahara e colaboradores reportaram a presença de cinco novas antocianinas, as ternatinas A3, B4, B3, B2 e D2, nas pétalas da *C. ternatea*. As estruturas foram determinadas por métodos químicos e espectroscópicos como delfinidina 3-malonilG com cadeias laterais 3'-GCG-5'-GCG, 3'-GCG-5'-GC, 3'-

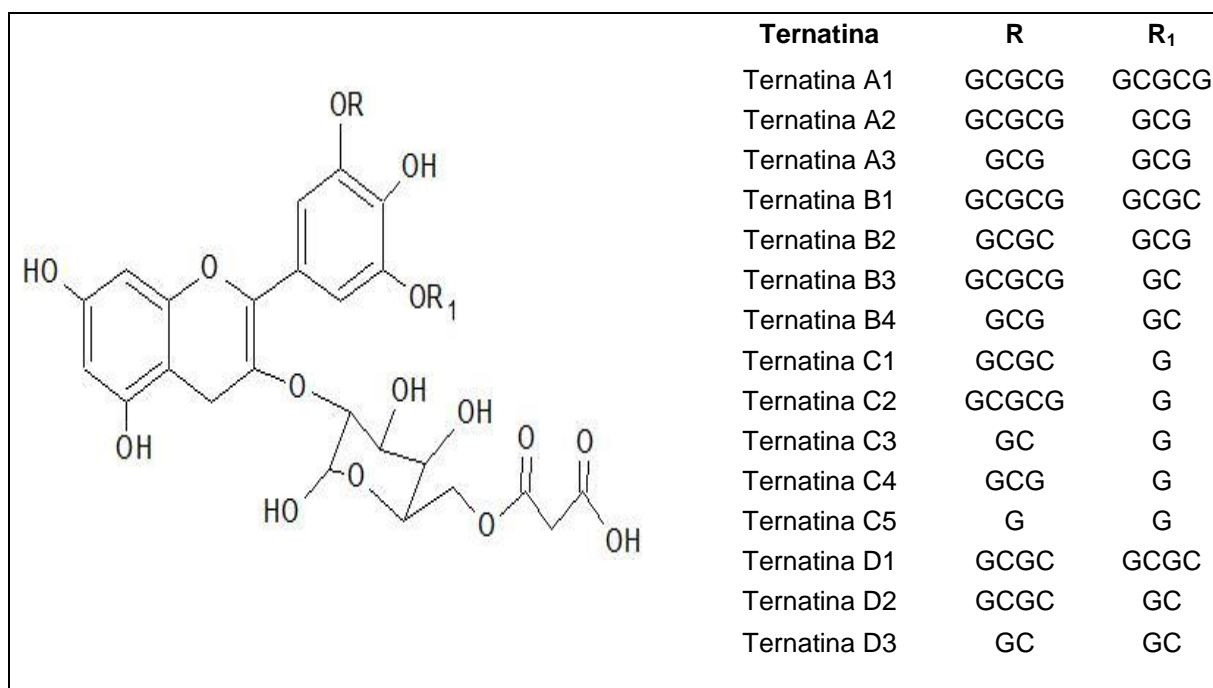


GCGCG-5'-GC, 3'-GCGC-5'-GCG e 3'-GCGC-5'-GC, no qual G é D-glicose e o C é ácido *p*-cumárico (TERAHARA et al., 1996).

Além dessas antocianinas, outras oito novas antocianinas (ternatinas C1, C2, C3, C4, C5 e D3; preternatinas A3 e C4), foram isoladas a partir de pétalas da *Clitoria ternatea* (TERAHARA et al., 1998). As estruturas das ternatinas C1, C2, C3, C4, C5 e D3 foram caracterizadas como delfinidina 3-malonilglicosídeo tendo como cadeias laterais 3'-GCGC-5'-G, 3'-GCGCG-5'-G, 3'-GC-5'-G, 3'-GCG-5'-G, 3'-G-5'-G, e 3'-GC-5'-GC, respectivamente. Os compostos preternatinas A3 e C4 apresentam a estrutura como delfinidina 3-glicosídeo com cadeias laterais 3'-GCG-5'-GCG e 3'-GCG-5'-G, respectivamente (TERAHARA et al., 1998).

Quinze antocianinas poliaciladas à partir das pétalas da *Clitoria ternatea*, chamadas de ternatinas A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, C5, D1, D2, e D3 foram identificadas. As antocianinas apresentaram uma estrutura única caracterizada como delfinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos, possuindo uma série de cadeias laterais 3', 5' com unidades D-glicose (G) e ácido *p*-cumárico (C) alternadas (TERAHARA et al., 1998). A estrutura da delfinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos está demonstrada na Figura 1.6.

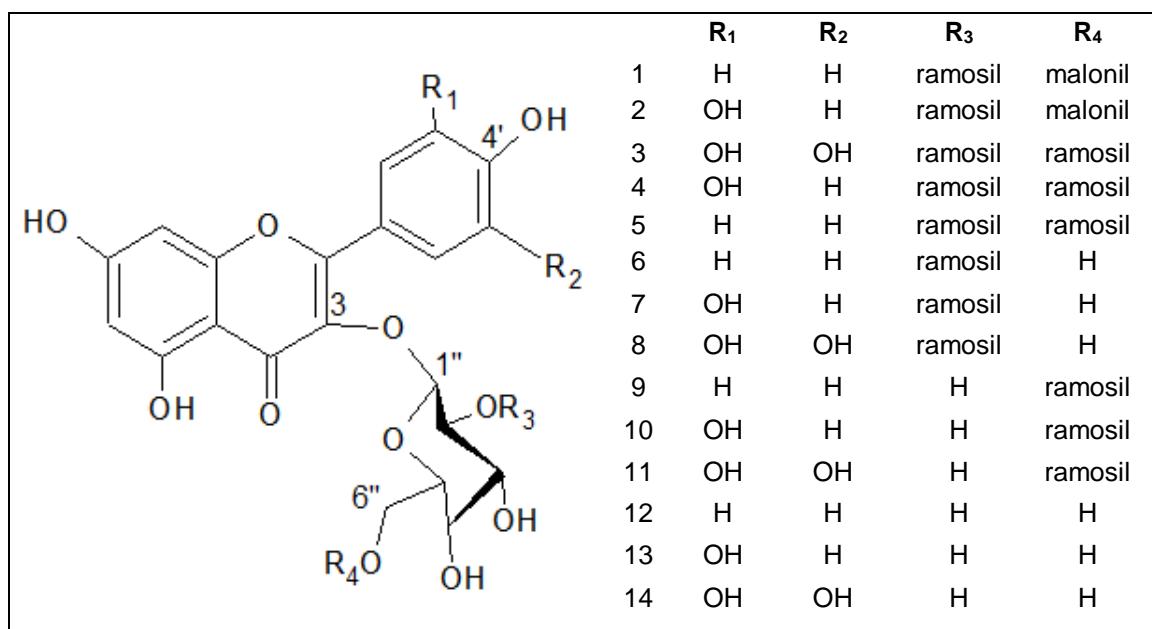
**Figura 1.6** – Estrutura da delfinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos e as cadeias laterais presentes na pétala azul da *Clitoria ternatea*.



Fonte: Adaptado de Mukherjee et al. (2008).

Também foram estudados outros componentes químicos presentes em extratos das pétalas azuis da *C. ternatea*, obtidos por diferentes métodos e solventes de extração. Os flavonóis presentes nas pétalas azuis foram isolados e identificados utilizando espectroscopia UV-Vis, LC-MS/MS e RMN (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). Quatorze glicosídeos flavonóis, incluindo três novos, foram isolados a partir de extrato aquoso contendo 1% de ácido trifluoroacético (TFA) e 50% de álcool metílico. Os três novos flavonóis foram identificados como kaempferol 3-O-(2''-O- $\alpha$ -ramosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo, quercetina 3-O-(2''-O- $\alpha$ -ramosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo e miricetina 3-O-(2'',6''-di-O- $\alpha$ -ramosil)- $\beta$ -glicosídeo, juntamente com os outros onze flavonóis identificados em estudos anteriores (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). A estrutura dos glicosídeos flavonóis está demonstrada na Figura 1.7.

**Figura 1.7** – Estruturas dos flavonóis presentes na pétala azul da *Clitoria ternatea*.



Nota: 1, kaempferol 3-O-(2''-O- $\alpha$ -ramosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo; 2, quercetina 3-O-(2''-O- $\alpha$ -ramosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo; 3, miricetina 3-2<sup>G</sup>-ramosilrutinosídeo; 4, quercetina 3-2<sup>G</sup>-ramosilrutinosídeo; 5, kaempferol 3-2<sup>G</sup>-ramosilrutinosídeo; 6, kaempferol 3-neohesperidoside; 7, quercetina 3-neohesperidoside; 8, miricetina 3-neohesperidoside; 9, kaempferol 3-rutinosídeo; 10, quercetina 3-rutinosídeo; 11, miricetina 3-rutinosídeo; 12, kaempferol 3-glicosídeo; 13, quercetina 3-glicosídeo; 14, miricetina 3-glicosídeo.

**Fonte:** Adaptado de Kazuma, Noda e Suzuki (2003).

No mesmo ano, Kazuma e colaboradores (2003b) identificaram flavonoides em extratos metanólicos de diferentes linhagens de cores das pétalas da *Clitoria ternatea* utilizando a espectroscopia UV-Vis, LC-MS/MS e RMN. As quinze

ternatinas identificadas anteriormente, estavam presentes nas flores com pétalas azul escura, clara e malva. Nas flores brancas não foi detectada a presença de antocianinas. A miricetina representou cerca de 0,21 a 0,55% m/m do total de flavonóis presentes nas pétalas azul escura, clara e malva. A mudança na cor das pétalas a partir da azul escura para malva não ocasionou a alteração na estrutura da antocianina delfidinina, mas somente a falta de substituições no grupo glicosil nas posições 3' e 5'. Os pesquisadores concluíram que as glicosilações nas posições 3' e 5' da antocianina estão relacionadas com a presença da cor azul nas pétalas da *C. ternatea* (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003b).

Em outro estudo com a hidrólise alcalina e ácida das antocianinas purificadas das pétalas da *C. ternatea* foi observado que as mesmas são derivadas somente da delfinidina. Essas antocianinas apresentaram alta estabilidade com absorção máxima a 545 nm em solução tampão pH 1 e continuaram a exibir cor mesmo em solução tampão com pH 4,5, enquanto outras antocianinas são incolores (WONGS-AREE; GIUSTI; SCHWARTZ, 2006). Em relação à estabilidade da cor da antocianina em extratos das pétalas da *C. ternatea* com diferentes pHs, Abdullah et al. (2010) observaram que as antocianinas apresentam uma variação entre a cor vermelha, violeta, azul, verde até amarela, em função das mudanças estruturais para várias espécies em equilíbrio à medida em que o pH variou entre 1 a 12, respectivamente.

Sarumathy e colaboradores (2011) analisaram o extrato etanólico de partes aéreas secas da *C. ternatea* com o objetivo de identificar a composição química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os compostos identificados foram o ácido n-hexadecanóico, varidifloreno, pterocarpanos, homopterocarpina, propano, ester étil e inositol. Além desses compostos, Verma e colaboradores (2013) verificaram a presença de alcalóides, compostos fenólicos, taninos, flavonoides, carboidratos, esteróis, terpenóides e proteínas em extrato etanólico das partes aéreas.

A composição química do extrato aquoso e metanólico das pétalas da *C. ternatea* foi estudada por Neda, Rabeta e Ong (2013). Na análise por CG-MS os pesquisadores identificaram a presença de inositol (38,7%) e pentanal (14,3%) no extrato aquoso. Já no extrato metanólico identificaram o inositol (33,6%), ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno) (7,1%), ácido acético, e hirsuteno (5,7%). As

pétalas também apresentaram fibras, proteínas e minerais (Ca, Mg e K) (NEDA; RABETA; ONG, 2013).

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos com a identificação de compostos bioativos em extrato aquoso das pétalas da *Clitoria ternatea* (NEDA; RABETA; ONG, 2013; IAMSAARD et al., 2014; MAKASANA et al., 2016; PASUKAMONSET; KWON; ADISAKWATTANA, 2016), o qual representa a forma consumida pela população. A maioria dos trabalhos citados acima utilizou como solventes de extração o álcool metílico, álcool etílico e a propanona.

Adicionalmente à pesquisa de artigos científicos, uma revisão foi realizada na base de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) utilizando as palavras chaves *Clitoria ternatea* e *clitória-azul*, nenhum resultado foi obtido. Assim, fica claro que o estudo químico, das propriedades antioxidante e citotóxica *in vitro* do extrato aquoso das pétalas de *Clitoria ternatea* pode apresentar potencial tecnológico.

#### 1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos ou polifenóis, representam uma das principais classes de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas (WARNER, 2015). Esses compostos estão disponíveis em alimentos à base de plantas, como frutas, vegetais e grãos, e podem contribuir na coloração, acidez, adstringência, sabor, odor e estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004). Pesquisas recentes demonstram que o consumo desses compostos está fortemente relacionado à redução do risco de câncer, distúrbios inflamatórios e doenças cardiovasculares, devido ao seu poder antioxidante (OLAS, 2016; FERNÁNDEZ-OCHOA et al., 2017).

As plantas produzem metabólitos primários e secundários com base na sua função e nas vias biossintéticas. Os metabólitos primários são substâncias orgânicas relacionadas com os processos biológicos (crescimento, desenvolvimento e reprodução), e incluem carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e ácidos orgânicos (HATAMI; KARIMAN; GHORBANPOUR, 2016). Já os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos nos processos biológicos, mas atuam na proteção das plantas contra insetos, doenças microbianas e em ambiente

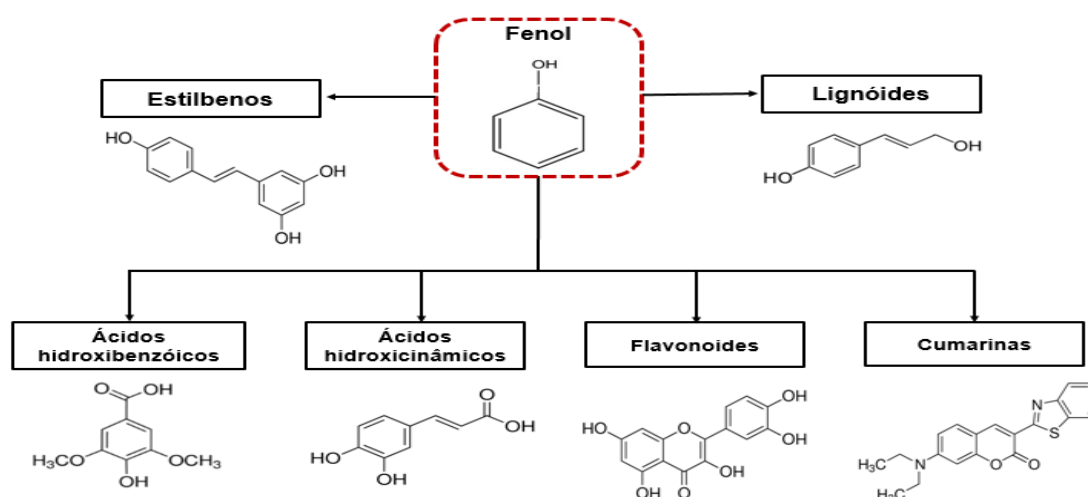
estressante por condições desfavoráveis de temperatura, luz e pH (HELENO et al., 2015; HATAMI; KARIMAN; GHORBANPOUR, 2016).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de metabólitos primários, sendo divididos em três grandes classes químicas: terpenos (formados por unidades isoprênicas de cinco carbonos), compostos fenólicos (formados por açúcares simples, anéis de benzeno, oxigênio e hidrogênio), e os compostos nitrogenados (formados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos) (BOURGAUD et al., 2001; GOYAL et al., 2012).

Dentre essas classes, os compostos fenólicos constituem uma importante classe de metabólitos secundários estando amplamente distribuídos na natureza, com mais de 8000 compostos individuais identificados (SOTO-VACA et al., 2012). São moléculas orgânicas formadas por um ou mais anéis benzênicos com grupos hidroxila (-OH) e apresentam como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (HARBONE, 1988).

Os compostos fenólicos são originados por meio de duas vias metabólicas principais: via do acetato malonato e via do ácido chiquímico (HARBONE, 1989). A biossíntese dos fenóis inicia na via do ácido chiquímico com a síntese de aminoácidos aromáticos e, ao final da via, são sintetizados em fenilalanina, tirosina e triptofano. A partir destes três compostos, são sintetizados os flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidrocinnâmicos, estilbenos, cumarinas e lignóides, Figura 1.8 (HARBONE, 1989).

**Figura 1.8** – Representação dos compostos fenólicos separados por classes.



**Fonte:** Adaptado de Granato et al. (2016).

### 1.4.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos principais, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (LIU, 2007). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem, dentre outros, os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, e sua estrutura contém sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), sendo os ácidos mais simples encontrados na natureza. Os ácidos hidroxicinâmicos incluem, dentre outros, os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico, e sua estrutura apresenta nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), mas são encontrados em vegetais com sete carbonos (YANG et al., 2001; LIU, 2007; GIADA, 2013). Estas substâncias caracterizam-se por apresentar um anel benzênico, um grupo carboxílico e um, ou mais, grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos vegetais (YANG et al., 2001).

### 1.4.2 Flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos naturais mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, compreendendo cerca de 4500 estruturas químicas diferentes (WARNER, 2015). Os flavonoides possuem propriedades antioxidantes favoráveis à saúde, tornando-se componente indispensável na dieta humana (COOK; SAMMAN, 1996). As propriedades antioxidantes dos flavonoides estão relacionadas com a sua estrutura química, que em geral consiste em dois anéis aromáticos (A e B), unidos por um anel pirano (C), Figura 1.8. Diferenças na estrutura do anel C classificam os flavonoides em diferentes classes (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavononas, antocianidinas e isoflavonoides) e nível de oxidação, enquanto compostos individuais dentro de cada classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000; KUMAR; PANDE, 2013). As estruturas químicas dos flavonoides estão demonstradas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Estruturas químicas dos flavonoides.

Classes	Estruturas	Exemplos
Flavona		 <b>Luteolina</b> <b>Apigenina</b> <b>Crisina</b>
Flavonóis		 <b>Quercetina</b> <b>Kaempferol</b> <b>Galangina</b>
Flavanonas		 <b>Hesperitina</b> <b>Nariagenina</b>
Isoflavonóides		 <b>Genisteína</b> <b>Daidzeína</b>
Flavanóis		 <b>Catequina</b> <b>Epicatequina</b>
Antocianidinas		 <b>Pelargonidina</b> <b>Cianidina</b> <b>Delfinidina</b>

Fonte: Adaptado de Kumar e Pande (2013).

A estrutura básica dos flavonoides pode sofrer substituições por hidroxilas, glicosídeos (glicose, galactose, ramnose, arabinose), metilas, prenilas e acilas. As antocianidinas são a principal classe encontrada em vegetais, denominadas de antocianinas, caracterizam-se por estarem ligadas a glicosídeos e conterem uma carga positiva e duas ligações duplas no anel C (WARNER, 2015).

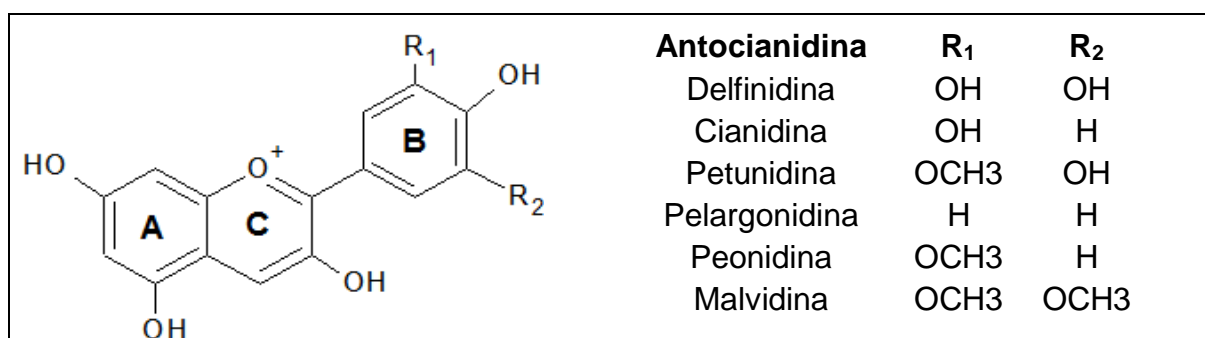
#### 1.4.2.1 Antocianinas

A cor azul intensa das flores da *C. cyanus* e *C. ternatea* se deve à presença das antocianinas. As antocianinas (do grego, *anthos* = flor e *kianos* = azul) pertencem ao grupo dos flavonoides, responsáveis pelas cores vermelha, azul, roxa ou laranja presentes em vegetais, frutas, flores e folhas (STRACK; WRAY, 1993). Por

dar cores a flores e frutos, desempenham um importante papel na atração de animais para polinização e dispersão de sementes (KONG et al., 2003).

A antocianidina é a estrutura química básica das antocianinas, e consiste de um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que contém oxigênio, que também faz uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B), Figura 1.9 (KONCZAK; ZHANG, 2004). As antocianinas são derivados glicosilados de antocianidinas, ou seja, apresentam uma ou mais hidroxilas nas posições 3, 5 e 7 ligadas a açúcares (LI; DENG, 2015). Os açúcares comumente ligados nas antocianidinas são a glicose, ramnose, xilose, galactose e arabinose (FRANCIS; MARKAKIS, 1989). As antocianinas podem estar aciladas com ácidos aromáticos e alifáticos, tais como ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, acético, gálico, malônico e málico, sendo consideradas quimicamente mais estáveis (PETERSSON et al., 2008; LI; DENG, 2015).

**Figura 1.9** – Estrutura química geral das antocianidinas.



Fonte: Adaptado de Li e Deng (2015).

As diferenças entre as moléculas de antocianinas se devem ao número de grupos hidroxílicos, grau de metilação, natureza e número de açúcares ligados e a posição dessas ligações (KONG et al., 2003). Os radicais R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> podem ser substituídos por grupos H, OH ou OCH<sub>3</sub> e a ligação glicosídica pode ser feita no grupo hidroxila nos carbonos 3, 5 e 7, Figura 1.9 (KONG et al., 2003).

O grau de hidroxilação e metoxilação influenciam na estabilidade das antocianinas, sendo que aquelas que contêm maior número de grupos hidroxilas são menos estáveis, e alto grau de metoxilação são mais estáveis (FRANCIS; MARKAKIS, 1989). E também influenciam na cor das antocianinas, pois devido à grande capacidade de doar elétrons dos grupos metoxila ocorre intensa absorção da



luz na faixa do espectro visível, causando uma maior mudança batocrômica comparada aos grupos hidroxilas (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010).

A glicosilação nas moléculas de antocianinas confere maior estabilidade e solubilidade em água (MAZZA; CACACE; KAY, 2004). Um número crescente de resíduos de açúcar e acilação com ácidos aromáticos ou alifáticos estabiliza as antocianinas contra os efeitos do pH, temperatura e luz. Além disso, as antocianinas também podem formar estruturas intermoleculares com flavonóis, ou com íons metálicos que, de maneira geral, são quimicamente mais estáveis se comparados aos compostos de origem (SKREDE; WROLSTAD, 2002).

As antocianinas são consideradas poderosos antioxidantes que proporcionam benefícios ao organismo humano. O consumo de alimentos fonte de antocianinas está associado com a redução do risco de doenças, dentre as quais doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e outras relacionadas ao estilo de vida (COOK; SAMMAN, 1996; HE; GIUSTI, 2010).

A atividade antioxidante das antocianinas está relacionada com a estrutura química, o átomo de oxigênio apresenta elétrons livres e está próximo do anel benzênico, liberando o átomo de hidrogênio para moléculas reativas (ZHANG; WANG, 2004). Além disso, os grupos substituintes do anel B influenciam na atividade antioxidante, sendo classificados de acordo com o maior potencial antioxidante em  $-OH > -OCH_3 > -H$  (ROSSETTO et al., 2007).

Já são conhecidas mais de 500 antocianinas e 23 antocianidinas, das quais apenas seis são frequentemente encontradas nas plantas: cianidina, pelargonidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina (KONG et al., 2003; LI; DENG, 2015). Os glicosídeos de três antocianinas não-metiladas, cianidina, delphinidina e pelargonidina, são os mais difundidos na natureza, presentes em 80% das folhas pigmentadas, 69% dos frutos e 50% das flores (KONG et al., 2003).

#### 1.4.2.1.1 *Estabilidade das antocianinas*

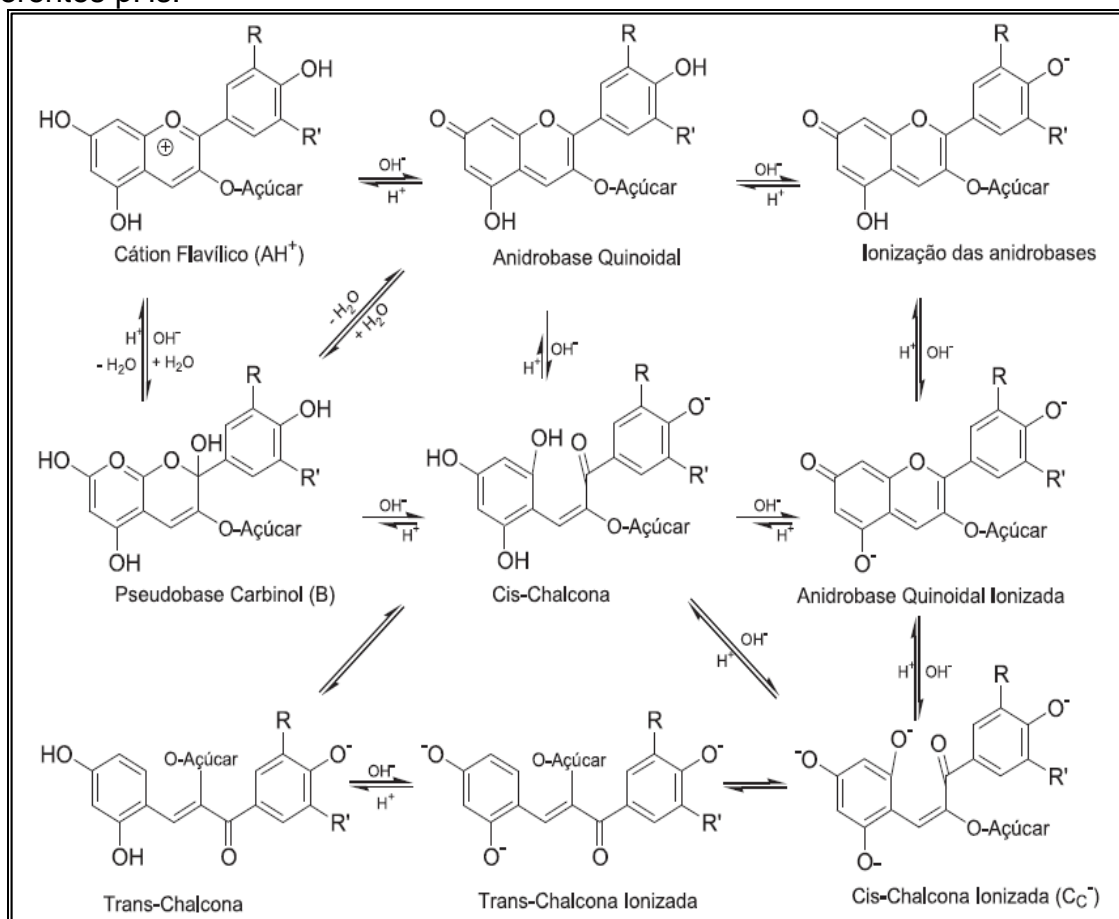
A estabilidade das antocianinas e a sua cor na forma concentrada como corante natural alimentar, depende de vários fatores (WEBER; BOCH; SCHIEBER, 2017). As antocianinas isoladas são altamente instáveis e suscetíveis à degradação por fatores como pH, temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigênio,

solventes, presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos (GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

Em soluções ácidas, as antocianinas são mais estáveis do que em meio neutro e alcalino (MARKAKIS, 1982). De acordo com o pH ocorre uma mudança na estrutura e na cor das antocianinas, Figura 1.10. Em condições ácidas (pH entre 1 a 2), a antocianina existe primariamente na forma de cátion flavílico ( $AH^+$ ), que é a forma mais estável e apresenta coloração vermelha. Com o aumento do pH (pH entre 2 e 4) ocorre a rápida perda do próton para produzir a forma quinoidal, de coloração azul ou violeta. Em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílico ( $AH^+$ ), gerando a pseudobase incolor ou carbinol (B) que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona incolor. Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura pseudobase carbinol e anidrobases quinoidal podem formar a espécie *cis*-chalcona. Com a formação destas estruturas ocorre a ruptura do anel heterocíclico, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Altas temperaturas podem influenciar na estabilidade das antocianinas durante o processamento e o armazenamento dos alimentos (LOIZZO; TUNDIS; MENICHINI, 2015). A utilização de temperaturas acima de 80 °C durante o processamento, pode ocasionar o aumento da taxa de degradação térmica das antocianinas, e resultar em concentrações mais baixas com alteração da cor e diminuição dos potenciais benefícios para a saúde (HOWARD et al., 2012; LOIZZO; TUNDIS; MENICHINI, 2015).

**Figura 1.10** – Mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função de diferentes pHs.



**Fonte:** Março, Poppi e Scarminio (2008).

O aquecimento desloca o equilíbrio para a forma chalcona, enquanto as formas estruturais do cátion flavílico e da base quinoidal são transformadas ocorrendo a formação de produtos de degradação com coloração marrom (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). A estrutura química da antocianina em presença de outros ácidos orgânicos e o aumento da temperatura têm uma forte influência na degradação térmica (PATRAS et al., 2010).

A luz ultra-violeta e visível acelera a degradação das antocianinas conforme demonstrado em diversos trabalhos. Wang, He e Li (2010) observaram a degradação de 49% das antocianinas de *blueberry* após oito dias de exposição à luz. O oxigênio também pode degradar as antocianinas, juntamente com a presença de ácido ascórbico e íons cobre, formam o peróxido de hidrogênio, que causa a descoloração e acelera o processo de degradação (MARKAKIS, 1982; SKREDE; WROLSTAD, 2002).

As enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenoloxidasas e peroxidases, também degradam as antocianinas. As glicosidases hidrolisam as ligações glicosídicas liberando o açúcar e a antocianidina, que por sua vez, é instável e degrada-se em derivados incolores (FRANCIS; MARKAKIS, 1989). As polifenoloxidasas não reagem diretamente com as antocianinas, mas antes catalisam a oxidação do ácido clorogênico formando a quinona, que é responsável pela degradação das antocianinas com a geração de pigmentos marrons (KADER et al., 1999).

As complexações de metais e antocianinas são comuns no reino vegetal, sendo responsáveis pelo espectro das cores nas flores (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). As antocianinas com grupos hidroxilas na posição orto interagem com íons metálicos polivalentes, produzindo alteração na cor do pigmento para o azul (MARKAKIS, 1982; SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010).

A alta concentração de açúcares pode estabilizar a degradação de antocianinas, provavelmente devido à diminuição da atividade de água, evitando o ataque nucleofílico do cátion flavílico e a formação da base carbinol incolor. Entretanto, as baixas concentrações de açúcares podem causar poucos efeitos sobre a atividade de água (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). A degradação das antocianinas está relacionada com a presença de furfural (originado de aldo pentoses) e hidroximetilfurfural (originado de ceto-hexoses), produtos resultantes da reação de Maillard ou pela oxidação do ácido ascórbico, no qual condensam-se com as antocianinas formando compostos marrons (MESCHTER, 1954; SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010).

As antocianinas podem formar complexos fracos com flavonoides não-antociânicos, proteínas, alcalóides, taninos, cumarina, ácidos cinâmicos e polissacarídeos por meio da copigmentação intermolecular, resultando em um aumento na estabilidade em meio aquoso (FRANCIS; MARKAKIS, 1989; SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). Na copigmentação intramolecular ocorre a estabilização da cor das antocianinas, provavelmente devido à força das ligações covalentes entre porções de glicosilação e acilação na molécula (FRANCIS; MARKAKIS, 1989; MALIEN-AUBERT; DANGLES; AMIOT, 2001). A copigmentação pode ser afetada pelo tipo e concentração de antocianina e copigmento, pH, temperatura, metais e interações entre todos (FRANCIS; MARKAKIS, 1989).

## 1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes mais abundantes na natureza pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, que englobam uma vasta gama de substâncias, as quais apresentam no mínimo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Os compostos fenólicos, juntamente com os carotenoides, são compostos bioativos abundantemente presentes nos vegetais, os quais têm sido associados à redução do risco de doenças crônicas (FERNÁNDEZ-OCHOA et al., 2017).

Os antioxidantes em alimentos são caracterizados como compostos que podem retardar ou inibir as reações de oxidação provocadas pelas espécies reativas de oxigênio, ERO (BOROSKI et al., 2015). Os compostos fenólicos atuam na eliminação de radicais livres devido à capacidade de doação de hidrogênio da molécula de flavonóides, que pode se ligar a espécies reativas de oxigênio, EROs, como o superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), peróxido ( $ROO^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $^{\cdot}OH$ ) (FUKUMOTO; MAZZA, 2000; POJER et al., 2013). Além disso, as antocianinas reforçam as defesas antioxidantes endógenas por meio da restauração ou aumento das atividades e expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (TOUFEKTSIAN et al., 2008; YAHYAPOUR et al., 2018).

Outro mecanismo antioxidante consiste na quelatação de íons de metais de transição, como  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , impedindo a sua participação em reações tipo Fenton e a geração de radicais hidroxil altamente reativos (YANG et al., 2001). A quelatação de metais pelos flavonoides ocorre devido à presença do grupamento orto-di-hidroxi no anel B e ao cetol no anel C da estrutura química, enquanto o grupamento 5,7-di-hidroxi no anel A não contribui para a capacidade antioxidante dessas substâncias (BOROSKI et al., 2015).

Além disso, os compostos fenólicos são capazes de exercer efeitos benéficos para a saúde ao atuarem como agentes pró-oxidantes eliminando células tumorais sem afetar drasticamente as células normais (CARMO et al., 2018). Os compostos fenólicos podem interferir no caráter “two-faced” das EROs, que atuam como mensageiros secundários em cascatas de sinalização intracelular, com a indução do fenótipo oncogênico de células cancerígenas e/ou apresentar atividade anti-tumorogênica induzindo a morte celular (KHAN et al., 2012; CARMO et al., 2018).

## 1.6 CORANTES NATURAIS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

As cores dos alimentos e bebidas tem uma influência direta nas escolhas alimentares por estarem associadas diretamente ao sabor. Normalmente, as pessoas associam as cores dos alimentos e bebidas com fontes naturais, por exemplo o vermelho com “morango”, amarelo com “laranja/manga”, roxo com “uva”, azul com “blueberry”, e verde com “limão” (VINHA et al., 2018). Os corantes alimentares podem ser classificados em corantes naturais que são sintetizados naturalmente por plantas, animais e fungos; corantes idênticos à natureza que são sintetizados nas indústrias mas apresentam a mesma estrutura química dos naturais; e os corantes artificiais ou sintéticos que não são idênticos à natureza e são obtidos por síntese química (MSAGATI, 2013; CORRADINI, 2019). A maioria dos alimentos e bebidas industrializadas sofre a adição de corantes sintéticos com objetivo de intensificar a cor garantindo a uniformidade e também como um indicativo da qualidade (CRINÓ et al., 2013).

A legislação brasileira por meio da Resolução nº 44/77 da CNNPA/MS estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas (BRASIL, 1977). A Portaria nº 540/97 da SVS/MS estabelece que sejam utilizados aditivos autorizados em concentrações tais que sua ingestão diária não supere os valores de ingestão diária aceitável (IDA) recomendados, e que atendam às exigências de pureza estabelecidas pela FAO-OMS, ou pelo *Food Chemical Codex* (BRASIL, 1997). Vários corantes sintéticos são permitidos pela legislação brasileira para o uso em alimentos.

Historicamente, a indústria de alimentos prioriza a utilização dos corantes sintéticos ao invés dos corantes naturais devido ao baixo custo, alta capacidade de coloração, e estabilidade durante o processamento e armazenamento (CORRADINI, 2019). Entretanto, o consumo de corantes sintéticos tem sido potencialmente associado como uma das principais causas de alergias, intolerância alimentar, hiperatividade, irritabilidade, inquietação e distúrbios do sono em crianças (FEKETE; TSABOURI, 2017; CORRADINI, 2019). Estudos correlacionam a ocorrência de reações adversas em crianças à quantidade de corantes sintéticos

consumidos diariamente em bebidas, doces, sorvetes, cereais matinais e salgadinhos (STEVENS et al., 2014; STEVENS et al., 2015).

Uma alternativa para substituir os corantes sintéticos é a utilização de pigmentos naturais extraídos de plantas (flores, frutas e vegetais), insetos (cochonilha), animais (moluscos, marisco, lula), fungos (*Blakeslea trispora* e *Monascus* spp.), e cianobactérias (*Arthrospira* spp.) (SINGH; SRIVASTAVA, 2015; VINHA et al., 2018). Os corantes naturais mais comuns são a clorofila, carotenoides, betalaínas e as antocianinas que fazem parte das classes dos compostos químicos tetrapirróis, tetraterpenos, N-heterocíclicos, e flavonoides, respectivamente (ABEROUMAND, 2011). Alguns corantes naturais são usados e legislados pela indústria de alimentos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

A clorofila é um grupo de pigmentos naturais produzido em todas as plantas fotossintéticas, incluindo algas comestíveis (*Ulva* sp., *Porphyra umbilicales*, e *Laminaria ochroleuca*) e algumas bactérias. Entre as cinco diferentes estruturas de clorofila que existem, apenas duas clorofilas (a e b) são usadas como corantes verdes em alimentos. Os corantes comerciais (INS 140I) são extraídos de alfafa (*Medicago sativa* L.), urtiga (*Urtica dioica* L.), e uma série de gramíneas (FRANCIS, 2002). São usados em cereais, massas alimentícias, sopas, bebidas e confeitos de açúcar.

Os carotenoides são um grupo de pigmentos lipossolúveis responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho (BRITTON; KHACHIK, 2009). Diversos corantes naturais compostos por carotenoides como a curcumina ou cúrcuma (INS 100), urucum (INS 160b), páprica (INS 160c),  $\beta$ -caroteno ou mistura de carotenos (INS 160a), luteína (INS 161b), licopeno (INS 160d), e cantaxantina (INS 161g) extraídos de plantas, fungos, algas e alguns insetos são utilizados em alimentos e bebidas (KENDRICK, 2012; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). Esses corantes são usados em refrigerantes, molhos, confeitos, produtos de panificação, sorvete, gorduras, margarina, iogurtes, crosta de queijos entre outros alimentos (KENDRICK, 2012).

As betalaínas são grupo de pigmentos encontrados na natureza, divididas em dois grupos estruturais: as betaxantinas de cor amarela e as betacianinas de cor vermelho-púrpura. Entretanto, estão presentes somente nas espécies de plantas *Caryophyllales* e nos fungos *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrosporus* (DELGADO-

VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). A única betalaína aprovada para uso como corante vermelho é betanina (INS 162) extraída da beterraba (*Beta vulgaris* L.), e tem aplicação em produtos para panificação, confeitos e carnes, entre outros (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

As antocianinas são responsáveis pelas cores vermelha, azul, roxa ou laranja presentes em vegetais, frutas, flores e folhas (STRACK; WRAY, 1993). As culturas de uvas e cenouras pretas e/ou roxas são as mais usadas para a produção do corante antocianina (INS 163). A maior parte da extração comercial de uvas ocorre na França e na Itália (KENDRICK, 2012). Atualmente existem diversas pesquisas sobre a aplicação de antocianinas de diferentes fontes como corantes naturais em alimentos. Pires et al. (2018b) aplicaram em iogurte extratos ricos em antocianinas obtidos de pétalas de flores comestíveis de *Dalia mignon*, *Centaurea cyanus* L., e *Rosa damascena* “Alexandria” misturada com *Rosa gallica* “Francesa” e *Rosa canina*. Os autores verificaram que as flores têm um grande potencial para serem usadas como corantes naturais, sendo uma excelente fonte de antocianinas para desenvolver produtos inovadores com novas características sensoriais e bioativas.

Mojica, Berhow e Mejia (2017) verificaram que o extrato da casca do feijão preto é uma boa fonte de pigmentos naturais, principalmente antocianinas, que podem substituir os corantes sintéticos comumente usados na indústria alimentícia, e aumentar os benefícios potenciais à saúde associados ao consumo de compostos bioativos. Arici et al. (2016) utilizaram pétalas de tulipas como fontes de antocianinas para a produção de corantes alimentares naturais. Os resultados demonstraram que as pétalas podem ser usadas como uma nova fonte para a produção de corantes alimentares naturais e podem ser adicionadas às formulações de alimentos considerando o pH da amostra. Díaz-García et al. (2014) obtiveram um corante alimentar rico em antocianinas das flores de *Thymus moroderi* e aplicaram em iogurte. Os autores sugeriram que *T. moroderi* pode ser uma fonte de corante alimentício rico em antocianinas (E 163), com alto conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante, e estável por conferir cor rosa em iogurte durante um mês de armazenamento sob refrigeração.



## CAPÍTULO 2 - ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-HIPERTENSIVA, E CITOTÓXICA/CITOPROTETORA DO EXTRATO AQUOSO DE PÉTALAS DE *Centaurea cyanus* L.

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar as condições experimentais de extração de compostos fitoquímicos e propriedades funcionais do extrato aquoso de pétalas de *Centaurea cyanus*. Os seguintes parâmetros foram determinados: a composição química (LC-ESI-MS/MS), os efeitos do pH na estabilidade e atividade antioxidante das antocianinas, inibição da peroxidação lipídica, atividades antioxidante, anti-hemolítica, antimicrobiana, anti-hipertensiva, efeito citotóxico/citoprotetor, e a atividade intracelular de espécies reativas de oxigênio. Os resultados demonstraram que a temperatura e o tempo influenciaram ( $p \leq 0,05$ ) o teor de flavonoides, antocianinas, e a atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP). Somente a temperatura influenciou o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides não-antociânicos e a atividade antioxidante frente ao DPPH\*. A análise estatística possibilitou a obtenção das condições experimentais de extração otimizada para aumentar o teor de compostos bioativos. Os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, isoquercitrina e cumarina, foram identificados como compostos majoritários no extrato otimizado. O extrato otimizado apresentou atividade anti-hemolítica e anti-hipertensiva *in vitro*, além de apresentar estabilidade e reversibilidade das antocianinas e atividade antioxidante com variação do pH. O extrato otimizado de *C. cyanus* exibiu valores elevados de IC<sub>50</sub> e GI<sub>50</sub> (> 900 µg/mL) para todas as linhagens celulares, significando baixa citotoxicidade. Enquanto, no ensaio de estresse oxidativo, o extrato exibiu ação pró-oxidante (10-100 µg/mL), mas não causou danos e morte celular.

**Palavras-chave:** LC-ESI-MS/MS, compostos fenólicos, metodologia de superfície de resposta, função de desejabilidade, flavonoides, protocianina.

O conteúdo desse capítulo foi publicado na revista Food and Chemical Toxicology (Anexo A).

## 2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, ocorreu um aumento no número de estudos científicos em torno das plantas utilizadas na medicina tradicional, em relação a composição química com benefícios à saúde humana. A espécie *Centaurea cyanus* L., conhecida como *cornflower*, é nativa da Europa e Ásia (HELLWIG, 2004). No Brasil, está presente em áreas de pastagens e cultivo, não sendo explorada comercialmente. Na medicina tradicional Europeia, o extrato aquoso das flores é utilizado no tratamento de doenças oculares, nervosas, dermatológicas e gástricas, e como diurético, estimulante e tônico (VERESCHAGIN; SOBOLEVSKAYA; YAKUBOVA, 1959; PIERONI et al., 2004; REDŽIĆ, 2007; AL-SNAFI, 2015).

As pétalas de *Centaurea cyanus* apresentam coloração azul por apresentar uma protocianina, que é um complexo formado entre o metal-antocianina, seis moléculas de antocianinas, e seis moléculas de flavonas com um íon  $Fe^{3+}$  e  $Mg^{2+}$  e dois íons  $Ca^{2+}$  (KONDO et al., 1994; SHIONO; MATSUGAKI; TAKEDA, 2005; TAKEDA, 2006). A cor azul resulta da complexação dos íons metálicos com a base quinoidal da antocianidina (YOSHIDA et al., 2015). O complexo metal-antocianina mantém a cor azul estável nas pétalas das flores, pois se o pH for levemente ácido a cor dos pigmentos seria roxo-vermelho (FEDENKO; SHEMET; LANDI, 2017).

Nos extratos das pétalas de *Centaurea cyanus*, com hexano, clorofórmio, propanona e álcoois metílico e etílico, foram identificados os ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides, cumarinas, e polissacarídeos. Esses extratos apresentaram propriedades funcionais *in vitro* como atividade antioxidante, antibacteriana, gastroprotetiva, e efeito citotóxico (LITVINENKO; BUBENCHIKOVA, 1988; BUBENCHIKOVA, 1990; GARBACKI et al., 1999; TAN et al., 2008; PIRVU et al., 2012; WEGIERA et al., 2012; DAMTE et al., 2013; PIRVU et al., 2015; ANVARI; JAMEI, 2016; MIRZAIE; ZARE KARIZI, 2016; PIRES et al., 2018a).

Como a flor de *C. cyanus* é utilizada na medicina tradicional na forma de extrato aquoso e na literatura não foram localizados estudos para a otimização das condições de extração dos fitoquímicos em meio aquoso levemente acidificado. Assim, faz-se necessário avaliar a influência da temperatura e tempo na extração dos fitoquímicos e nas propriedades funcionais *in vitro*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de extração, avaliar a composição química, e as

propriedades funcionais *in vitro* do extrato aquoso obtido das pétalas de *Centaurea cyanus*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Produtos Químicos, Linhagens de Células e Micro-organismos

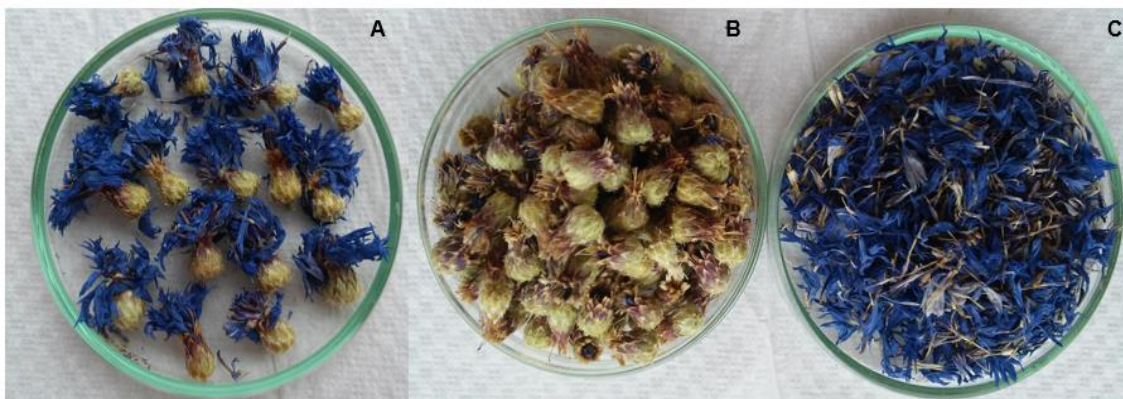
Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, São Paulo, Brasil). Os reagentes utilizados foram: acetonitrila, ácido fórmico, ácido gálico, ácido 2-tiobarbitúrico, cloreto de ferro (III) hexahidratado, DMEM/Baixa glicose, DMEM/Alta glicose, enzima conversora da angiotensina (ECA) de intestino de coelho, glicose DMEM/Ham-F12, DCFH-DA (dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato), DMSO (dimetil sulfóxido), DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), estreptomicina, ferrozina (3-(2-Piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5''), ferricianeto de potássio, Hip-His-Leu, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, penicilina, peróxido de hidrogênio, reagente de Folin-Ciocalteu 2 N, e TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ácido acético glacial, ácido ascórbico, ácido clorídrico, acetato de sódio anidro, carbonato de sódio, e hidróxido de potássio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Álcool etílico e cloreto de potássio foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Sulfato de ferro (II) heptahidratado, fostato de sódio monobásico e fostato de sódio dibásico foram adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil). Células de hepatocarcinoma humano (HepG-2), células epiteliais de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) e células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão (A549) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Soro fetal bovino Gibco foi adquirido da Thermo Fisher Scientific (São Paulo, Brasil). Os micro-organismos *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosas* (IAL 1853), *Escherichia coli* (IAL 2064), *Salmonella Enteritidis* (S 2887), *Penicillium roqueforti* (PR 11) e *Candida orthopsilosis* (LMQA LH 264) foram adquiridas na ATCC, IAL (Coleção de Cultura de Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), Instituto de Biologia (IB) Universidade de Campinas (UNICAMP, Brasil). Ágar nutriente e ágar de extrato de malte foram adquiridos da Kasvi (Itália) e ágar

Dichloran Glycerol da Neogen (EUA). A ampicilina e a cicloheximida foram adquiridas da Inlab (São Paulo, Brasil).

### 2.2.2 Matéria-Prima

Flores desidratadas da *Centaurea cyanus* (*Biologische Landbouw Skal*) cultivadas na Bélgica em 2016 foram adquiridas da Het Blauwe Huis (Ruinerwold, Países Baixos). As pétalas foram separadas do cálice (Figura 2.1), trituradas em moinho analítico (QUIMIS® modelo 6298A21) e padronizadas em peneira com 42 Tyler mesh. O conteúdo foi armazenado em frascos de polietileno de baixa densidade sob refrigeração (8 °C) até o momento das extrações. As flores de *Centaurea cyanus* foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da UEPG sob número 21879.

**Figura 2.1** - Flores desidratadas (A), cálices (B) e pétalas (C) de *Centaurea cyanus*.



**Fonte:** Autor.

### 2.2.3 Experimental Design e Elaboração dos Extratos Aquosos

Um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  com quatro pontos centrais foi utilizado para verificar o efeito dos fatores temperatura e tempo na extração de compostos fitoquímicos e na atividade antioxidante. Os valores dos fatores temperatura e tempo foram estabelecidos após um estudo inicial, e variaram de 11,7 (-1,41) a 68,3 °C (+1,41) e 8,78 (-1,41) a 51,21 min (+1,41), respectivamente; conforme planejamento experimental apresentado na Tabela 2.1. Os doze ensaios foram realizados de forma aleatória e as análises realizadas em triplicata.

**Tabela 2.1** - Matriz do planejamento fatorial DCCR 2<sup>2</sup> da *Centaurea cyanus* com os níveis codificados e os valores reais entre parênteses

Ensaio	Fatores	
	Temperatura de extração (°C)	Tempo da extração (min)
01	-1 (20)	-1 (15)
02	-1 (20)	1 (45)
03	1 (60)	-1 (15)
04	1 (60)	1 (45)
05	-1,41 (11,7)	0 (30)
06	1,41 (68,3)	0 (30)
07	0 (40)	-1,41 (8,78)
08	0 (40)	1,41 (51,21)
09	0 (40)	0 (30)
10	0 (40)	0 (30)
11	0 (40)	0 (30)
12	0 (40)	0 (30)

Os extratos das pétalas de *C. cyanus* foram preparados utilizando uma solução aquosa acidificada com ácido acético (0,545 mol/L; pH = 2,5). As extrações foram realizadas em uma cela termostatizada (Microquímica MQBTC 99-20, Alemanha) protegida da luz com agitação magnética constante, e uma proporção de amostra:solvente de 0,25:25 (m/v). Os extratos foram filtrados (papel filtro qualitativo) e o resíduo enxaguado com o solvente de extração até completar o volume de 25 mL (Figura 2.2). Os extratos foram armazenados sob refrigeração (8 °C) em frascos de polietileno protegidos da luz até o momento das análises.

**Figura 2.2** - Elaboração dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus*.



Fonte: Autor.

## 2.2.4 Determinação da Composição Química e Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos aquosos da *C. cyanus* foram quantificados seguindo o método Azul da Prússia (PRICE; BUTLER, 1977; MARGRAF et al., 2015). Uma alíquota de 100 µL da solução de cloreto de ferro hexahidratado (0,5 mmol/L) e 100 µL do extrato aquoso da *C. cyanus* diluído em água ultrapura (1:3 v/v) foram adicionados na microplaca. Após 2 minutos, 100 µL da solução de ferricianeto de potássio (0,5 mmol/L) foram adicionados nas amostras, e a microplaca foi agitada por 20 s. A absorbância foi registrada após 15 min em  $\lambda = 725$  nm em leitor de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com as mesmas proporções dos reagentes com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. O teor de compostos fenólicos totais foi calculado por meio da equação da curva analítica ( $y = 29,982x - 0,8347$ ;  $R^2 = 0,996$ ) elaborada com ácido gálico com concentrações de 0 – 250 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra seca (mg AGE/100 g).

Os flavonoides totais (FT) e antocianinas totais (AT) foram determinadas pelo método descrito por Lees e Francis (1972). Em um balão volumétrico de 5 mL foram adicionados 2,5 mL do extrato aquoso da *C. cyanus* e completado o volume com solução tampão (KCl 0,025 mol/L; pH 1) para obter absorbância próximo de 1, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. As absorbâncias foram analisadas no comprimento de onda de 374 nm para flavonoides e 535 nm para antocianinas em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão). O conteúdo de flavonoides e antocianinas foram determinados por meio das Equações 1 e 2, respectivamente; no qual 76,6 corresponde ao coeficiente de extinção da quercetina e 98,2 ao coeficiente de extinção da cianidina-3-glucosídeo. O teor de flavonoides totais foi expresso como mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra seca (mg QE/100 g), e antocianinas totais expresso como mg de cianidina-3-glucosídeo equivalente por 100 g de amostra seca (mg CGE/100 g).

$$\text{Flavonoides totais (mg quercetina equivalente/100 g)} = \frac{A_{374\text{nm}} * \text{fator de diluição}}{76,6} \quad (1)$$

$$\text{Antocianinas totais (mg cianidina-3-glucosídeo equivalente/100 g)} = \frac{A_{535\text{nm}} * \text{fator de diluição}}{98,2} \quad (2)$$

Os compostos fenólicos não flavonoides foram estimados subtraindo os teores de flavonoides totais dos compostos fenólicos totais. Já os flavonoides não antocianínicos foram estimados subtraindo os teores de antocianinas totais dos flavonoides totais. Os resultados foram expressos como mg/100 g.

A atividade antioxidante (AA) dos extratos aquosos da *C. cyanus* foi analisada pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrildidrazila (DPPH•) de acordo com método descrito por Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995), com pequenas modificações. Em um balão volumétrico de 5 mL foi adicionado 0,3 mL do extrato aquoso da *C. cyanus*, em seguida, completado o volume com solução etanólica de DPPH• ( $2,2 \times 10^{-4}$  mol/L), agitado e mantido em ambiente protegido da luz durante 60 min. A determinação da absorvância foi registrada em  $\lambda = 517$  nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão). O controle foi elaborado com a mesma proporção do DPPH• e amostra substituída por água ultrapura. A capacidade de captura do radical foi determinada a partir da Equação 3, e os resultados expressos em percentual de inibição do radical DPPH•.

$$\% \text{ inibição do radical DPPH}^\bullet = \left( 1 - \left( \frac{\text{Abs}_{517} \text{ amostra}}{\text{Abs}_{517} \text{ controle}} \right) \right) \times 100 \quad (3)$$

A capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP) dos extratos aquosos da *C. cyanus* foi realizada de acordo com método descrito por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. Primeiramente, a solução FRAP foi preparada a partir da mistura de 2,5 mL da solução de TPTZ (10 mmol/L diluída com HCl a 40 mmol/L), 2,5 mL da solução de cloreto de ferro hexahidratado (20 mmol/L) em 25 mL da solução tampão de acetato de sódio pH 3,6 (300 mmol/L). Na sequência, 20  $\mu$ L do extrato aquoso da *C. cyanus* diluído em água ultrapura (1:3 v/v) foi misturado com 280  $\mu$ L de reagente de FRAP na microplaca de 96 poços. Após 30 min de reação, a absorvância foi registrada em  $\lambda = 593$  nm em leitor de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com as mesmas proporções dos reagentes com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A capacidade antioxidante dos extratos foi quantificada por meio de uma curva analítica ( $y = 80,82x + 1,29$ ;  $R^2 = 0,998$ ) elaborada com ácido ascórbico

com concentrações de 0 – 120 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de amostra seca (mg AAE/100 g).

A capacidade redutora do reagente Folin–Ciocalteu foi analisada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer, e Lamuela-Raventós (1999), com pequenas modificações. Uma alíquota de 25 µL do extrato aquoso da *C. cyanus* diluído em água ultrapura (1:3 v/v), 25 µL do reagente de Folin–Ciocalteu (0,7 N) e 200 µL de água ultrapura foram adicionados na microplaca e a mistura agitada. Após 5 min, 25 µL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,943 mol/L) foram adicionados e a microplaca agitada novamente por 15 s. A mistura resultante foi protegida da luz por 60 min a 25 °C, e a absorbância registrada em  $\lambda = 725$  nm em leitor de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com as mesmas proporções dos reagentes com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A capacidade redutora foi quantificada por meio de uma curva analítica ( $y = 244,422x - 21,147$ ;  $R^2 = 0,978$ ) elaborada com ácido gálico com concentrações de 0 – 150 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE/100 g).

A capacidade do poder quelante frente ao íon ferro (Fe<sup>2+</sup>) foi determinada de acordo com o método proposto por Carter (1971), com modificações. Uma alíquota de 50 µL do extrato aquoso da *C. cyanus* diluído em água ultrapura (1:1 v/v), 160 µL de água ultrapura e 20 µL de solução de FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,30 mmol/L) foram adicionados na microplaca e a mistura agitada. Após 5 min, a reação foi iniciada com a adição de 30 µL da solução de ferrozina (0,80 mmol/L) e a mistura final incubada por 15 min à temperatura ambiente. A água ultrapura (30 µL) em substituição à solução de ferrozina foi usada como um controle negativo (utilizado para corrigir a diferença de cor das soluções). A absorbância do complexo de Fe<sup>2+</sup>-ferrozina foi medida em  $\lambda = 562$  nm em leitor de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos em percentual da formação do complexo de Fe<sup>2+</sup>-ferrozina determinado de acordo com a Equação 4:

$$\% \text{ formação do complexo Fe}^{2+}\text{-ferrozina} = \left[ \left( \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs solução sem ferrozina}}{\text{A controle}} \right) \right] \times 100 \quad (4)$$



### 2.2.5 Metodologia de Superfície de Resposta e Otimização

A metodologia de superfície de resposta (MSR), por meio da regressão linear múltipla, foi utilizada para gerar modelos polinomiais de segunda ordem para explicar a influência dos efeitos lineares e quadráticos, bem como as interações entre a temperatura e tempo, na composição química e atividade antioxidante dos extratos de pétalas de *C. cyanus* (SANTOS et al., 2018). Os resultados experimentais foram modelados usando a Equação 5:

$$Y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_i x_i^2 + \beta_j x_j + \beta_j x_j^2 + \beta_{ij} x_i x_j \quad (5)$$

onde o Y é a resposta (CFT e AA);  $\beta_0$  é o intercepto;  $\beta_i$  e  $\beta_j$  representam os coeficientes linear e quadrático, respectivamente;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes;  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação entre  $x_i$  e  $x_j$ . Os modelos foram analisados pela porcentagem de variabilidade do coeficiente de regressão linear múltiplo ( $R^2$ ), pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ), e pela significância do modelo ( $p \leq 0,05$ ) (GRANATO et al., 2014). Os resíduos também foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk.

A função de desejabilidade foi aplicada para definir as melhores condições na extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante utilizando a metodologia de otimização. A função desejabilidade consiste em converter cada resposta ( $y_i$ ) em função de uma desejabilidade individual ( $d_i$ ) com valores restritos no intervalo  $[0 \leq d_i \leq 1]$ , onde 0 é um valor inaceitável e 1 é o valor mais desejável (DERRINGER; SUICH, 1980). Usando essa abordagem estatística, 100 iterações foram realizadas com objetivo de extrair a máxima concentração de CFT e AA. A elaboração do extrato nas condições otimizadas, tempo e temperatura, seguiu o procedimento descrito no item 2.3. Na sequência, foi obtido o extrato aquoso em condições otimizadas e determinado o teor de compostos fenólicos totais (MARGRAF et al., 2015), flavonoides e antocianinas totais (LEES; FRANCIS, 1972; PEDRO; GRANATO; ROSSO, 2016), e a capacidade antioxidante de redução do ferro (BENZIE; STRAIN, 1996). O erro absoluto (EA) foi obtido de acordo com a Equação 6 (GRANATO et al., 2010):

$$\% \text{ Erro Absoluto} = \left[ \left( \frac{\text{Valor médio observado} - \text{Valor médio predito}}{\text{Valor médio predito}} \right) \right] \times 100 \quad (6)$$

O extrato aquoso otimizado foi congelado a -80 °C e liofilizado sob vácuo de 1200 µmL Hg (Terroni, modelo LD 1500A, Brasil) para análises posteriores.

## 2.2.6 Determinação da Composição Química e Propriedades Funcionais do Extrato Otimizado

### 2.2.6.1 Composição química por LC-ESI-MS/MS

Os compostos fenólicos presentes no extrato otimizado aquoso de pétalas de *C. cyanus* foram identificados e quantificados conforme a metodologia descrita por Seraglio et al. (2016), com pequenas modificações. Para isso, um sistema de cromatografia líquida (Agilent Technologies, série 1290 Infinity, EUA) acoplado à espectrometria de massas (5500 QTRAP, Sciex, EUA), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) foi empregado. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa utilizando fase estacionária C<sub>18</sub> (Venusil, 100 mm x 2,1 mm; 3 µm de tamanho da partícula; Bonna-Agela Technologies, EUA) com temperatura de 40 °C, volume de injeção de 5 µL e fluxo de 300 µL/min. A fase móvel consistiu de água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila adicionada de 0,1 % de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente de eluição seguiu as seguintes condições: 0-3 min (98% A), 3-10 min (80% A), 10-11 min (10% A) e 11-13 min (98% A), com 2 minutos de equilíbrio do sistema. A quantificação de cada composto foi realizada através da calibração externa com oito níveis de concentrações. Foi utilizada relação funcional linear (não ponderada) de concentração em µg/L (eixo x) versus área do pico em cps (eixo y). As curvas foram realizadas em triplicata. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como a menor concentração com aceitável precisão (10 µg/L; CV% ≤ 20%), sendo estabelecido como o primeiro ponto da curva analítica com comprovada recuperação (70-110% recuperação). O limite de detecção (LOD) foi a menor concentração detectável com reprodutibilidade aceitável (1 µg/L; CV% ≤ 30%).

A fonte ESI (turbo V™) trabalhou no modo de ionização positiva e negativa, e foi configurada com os seguintes parâmetros: voltagem Ion Spray (IS): 5500 V; gás de cortina: 25 psi; nebulizador de gás (GS1) e gás auxiliar (GS2): 55 psi, e temperatura da fonte: 400 °C. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e de

colisão. Os parâmetros do monitoramento múltiplo de reação em modo positivo  $[M + H]^+$  e negativo  $[M - H]^-$  estão expressos na Tabela 2.2. O *software* Analyst 1.6.2 (AB Sciex, Foster City, CA) foi utilizado para aquisição dos dados e o MultiQuant (AB Sciex, Foster City, CA) para o tratamento dos dados.

**Tabela 2.2** - Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo  $[M + H]^+$  e negativo  $[M - H]^-$ .

(continua)

Composto	Íon precursor (ESI)	Transições (m/z)	PD (V)	PE (V)	CE (V)	PSC (V)
Ácido benzoico	122,9 <sup>a</sup>	79,0 <sup>c</sup>	36	10	17	12
		51,0	36	10	51	24
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	138,0 <sup>a</sup>	77,0 <sup>c</sup>	56	10	29	10
		94,0	56	10	19	8
Cumarina	146,9 <sup>a</sup>	90,9 <sup>c</sup>	126	10	31	10
		103,0	126	10	23	8
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	155,0 <sup>a</sup>	109,9 <sup>c</sup>	41	10	29	20
		137,0	41	10	19	8
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	155,0 <sup>a</sup>	137,0 <sup>c</sup>	41	10	19	8
		114,0	41	10	29	52
Siringaldeído	183,0 <sup>a</sup>	123,1 <sup>c</sup>	41	10	17	8
		77,0	41	10	31	10
Ácido ferúlico	195,0 <sup>a</sup>	176,9 <sup>c</sup>	21	10	11	10
		89,0	21	10	41	10
Ácido siríngico	199,0 <sup>a</sup>	140,0 <sup>c</sup>	16	10	21	10
		155,1	16	10	13	10
Pinocembrina	257,0 <sup>a</sup>	153,0 <sup>c</sup>	96	10	33	10
		76,9	96	10	73	10
Galangina	271,0 <sup>a</sup>	153,0 <sup>c</sup>	176	10	43	10
		115,1	176	10	59	8
Apigenina	271,0 <sup>a</sup>	153,0 <sup>c</sup>	181	10	41	10
		90,9	181	10	49	14
Luteolina	286,9	153,0 <sup>c</sup>	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
Kaempferol	286,9 <sup>a</sup>	153,0 <sup>c</sup>	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10

**Tabela 2.2** - Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo  $[M + H]^+$  e negativo  $[M - H]^-$ .

(continuação)

Composto	Íon precursor (ESI)	Transições (m/z)	PD (V)	PE (V)	CE (V)	PSC (V)
(-)-Epicatequina	291,0 <sup>a</sup>	138,9 <sup>c</sup>	36	10	21	8
		123,0	36	10	21	8
(+) -Catequina	291,0 <sup>a</sup>	139,0 <sup>c</sup>	16	10	21	10
		123,0	16	10	19	8
Ácido clorogênico	355,1 <sup>a</sup>	163,0 <sup>c</sup>	46	10	21	10
		89,0	46	10	75	14
Hesperidina	611,2 <sup>a</sup>	303,0 <sup>c</sup>	51	10	31	16
		153,1	51	10	67	10
Ácido salicílico	136,9 <sup>b</sup>	93,1 <sup>c</sup>	-15	-10	-22	-5
		64,9	-15	-10	-36	-11
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	152,9 <sup>b</sup>	109,0 <sup>c</sup>	-75	-10	-20	-7
		90,9	-75	-10	-32	-13
Ácido <i>p</i> -cumárico	162,9 <sup>b</sup>	119,0 <sup>c</sup>	-90	-10	-20	-7
		93,0	-90	-10	-40	-5
Ácido vanílico	166,9 <sup>b</sup>	137,0 <sup>c</sup>	-140	-10	-12	-9
		109,1	-140	-10	-16	-7
Ácido gálico	168,9 <sup>b</sup>	124,9 <sup>c</sup>	-110	-10	-20	-7
		79,0	-110	-10	-30	-11
4-metilumbeliferona	174,9 <sup>b</sup>	133,0 <sup>c</sup>	-135	-10	-28	-9
		119,1	-135	-10	-36	-7
Coniferaldeído	177,0 <sup>b</sup>	134,0 <sup>c</sup>	-30	-10	-28	-9
		160,8	-30	-10	-28	-11
Ácido cafeico	178,9 <sup>b</sup>	135,0 <sup>c</sup>	-115	-10	-22	-9
		107,0	-115	-10	-30	-7
Sinapaldeído	206,9 <sup>b</sup>	177,0 <sup>c</sup>	-20	-10	-26	-11
		148,9	-20	-10	-34	-9
Ácido 3,5-dinitrobenzoico	210,9 <sup>b</sup>	167,0 <sup>c</sup>	-50	-10	-14	-9
		136,9	-50	-10	-22	-9
Ácido sinápico	223,0 <sup>b</sup>	163,9 <sup>c</sup>	-120	-10	-20	-9
		192,9	-120	-10	-28	-11
Crisina	252,9 <sup>b</sup>	142,9 <sup>c</sup>	-170	-10	-36	-9
		209,1	-170	-10	-30	-11

**Tabela 2.2** - Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo [M + H]<sup>+</sup> e negativo [M - H]<sup>-\*</sup>.

(conclusão)

Composto	Íon precursor (ESI)	Transições (m/z)	PD (V)	PE (V)	CE (V)	PSC (V)
Naringenina	270,9 <sup>b</sup>	151,0 <sup>c</sup>	-130	-10	-24	-25
		119,0	-130	-10	-34	-11
Pinobanksin	270,9 <sup>b</sup>	150,9 <sup>c</sup>	-140	-10	-24	-9
		119,1	-140	-10	-32	-7
Quercetina	301,0 <sup>b</sup>	150,9 <sup>c</sup>	-50	-10	-28	-9
		121,0	-50	-10	-34	-7
Isoramnetina	315,0 <sup>b</sup>	300,0 <sup>c</sup>	-225	-10	-28	-15
		150,9	-225	-10	-38	-9
(-)-Epigallocatequina galato	457,0 <sup>b</sup>	169,0 <sup>c</sup>	-165	-10	-20	-11
		125,0	-165	-10	-52	-9
Isoquercitrina	462,9 <sup>b</sup>	300,0 <sup>c</sup>	-215	-10	-36	-15
		271,0	-215	-10	-56	-13
Naringina	579,0 <sup>b</sup>	271,0 <sup>c</sup>	-255	-10	-42	-13
		151,0	-255	-10	-48	-9
Rutina	609,0 <sup>b</sup>	299,9 <sup>c</sup>	-230	-10	-48	-15
		270,9	-230	-10	-32	-9

\*Dados adaptados de Seraglio et al. (2016). PD: potencial de desagrupamento (V); PE: potencial de entrada (V); EC: energia de colisão (V); PSC: potencial de saída da célula de colisão (V);<sup>a</sup> Íon pai no modo íon positivo; <sup>b</sup> Íon pai no modo íon negativo; <sup>c</sup> Íon de quantificação.

#### 2.2.6.2 Identificação da estrutura da antocianina e flavona por MS/MS

A identificação da antocianina cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo e a flavona apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosídeo), foi realizada por meio da infusão do extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus* diretamente no espectrômetro de massa Sciex 5500 QTRAP (Sciex, Framingham, MA, USA). O software Analyst foi utilizado para controlar a espectrometria de massa. A fragmentação dos íons precursores foi realizada no segundo quadrupolo (Q2), utilizando nitrogênio como gás de colisão, e os fragmentos foram monitorados no terceiro quadrupolo (Q3), na faixa de 400 a 600 m/z.

### 2.2.6.3 Efeito do pH na estabilidade das antocianinas e atividade antioxidante

O efeito do pH em relação a estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus* foi analisado de acordo com Pedro, Granato e Rosso (2016). Em uma cela termostatizada a 25 °C, foram adicionadas 65 mL do extrato aquoso otimizado, sendo protegido da luz e mantido sob agitação constante. A titulação espectrofotométrica foi realizada em pHmetro (Micronal B-474, Brasil). Alíquotas de KOH 1,0 mol/L foram adicionadas no extrato, e a cada variação de 0,50 unidades do pH, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda = 515$  nm) até pH 7,01. Na sequência foi realizada uma titulação espectrofotométrica reversa, onde alíquotas de HCl 1,0 mol/L foram adicionadas, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de máxima absorção ao atingir o pH 2,79 inicial da solução. A atividade antioxidante do extrato aquoso otimizado da *C. cyanus* com diferentes pHs (2,79 a 7,01) foi analisada pela captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrildidrazila (DPPH•) de acordo com método descrito por Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995), e os resultados expressos em percentual de inibição do radical DPPH•.

### 2.2.6.4 Inibição da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica, de fosfolipídios e triacilgliceróis presentes na gema de ovo de aves induzida pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , foi avaliada frente a diferentes concentrações do extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* de acordo com Daker et al. (2008), com algumas modificações. O extrato otimizado liofilizado foi diluído em água ultrapura com concentrações entre 125 a 1000 mg/mL. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato diluído foi acrescido a 500  $\mu\text{L}$  de homogenato de gema (25 g/L gema de ovo emulsionada com solução tampão de fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,4) e 50  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso 4 mmol/L ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Os tubos foram mantidos em banho de água a 37 °C por 45 min e em seguida foram acrescidos de 500  $\mu\text{L}$  de solução de ácido acético 20% (pH 3,5), e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 46 mmol/L. Para finalizar a reação, os tubos foram colocados em um banho com glicerina a 95 °C por 30 min, e após centrifugados em 10000 g durante 15 min a 25 °C. A reação de lipoperoxidação foi monitorada em  $\lambda = 532$  nm. O controle consistiu de

homogenato de gema de ovo tamponado (500  $\mu$ L), solução de sulfato ferroso 4 mmol/L (50  $\mu$ L), e água ultrapura (50  $\mu$ L). Os resultados foram expressos em percentual de inibição da peroxidação lipídica determinado de acordo com a Equação 7:

$$\% \text{ Inibição peroxidação lipídica} = \left[ \left( \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \right] \times 100 \quad (7)$$

#### 2.2.6.5 Atividade anti-hemolítica *in vitro*

A análise da atividade anti-hemolítica do extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* foi realizada de acordo com método descrito por Antonini e Brunori (1971), e adaptado para leitor de microplacas por Santos et al. (2016). A amostra de sangue com tipagem sanguínea O<sup>+</sup> foi obtida do Hospital Universitário da UEPG, Ponta Grossa, Brasil. Primeiramente, os eritrócitos foram concentrados por meio da lavagem do sangue total em solução tampão de fosfato de sódio (PBS, 5 mmol/L; pH 7,3) contendo NaCl 154 mmol/L, e centrifugado a 700 g por 10 min até a obtenção do sobrenadante límpido e o precipitado contendo um hematócrito de 100%. O extrato foi diluído em PBS com concentrações entre 10 a 50 mg/mL e incubado com hematócrito de 0,8% m/v a 25 °C por 15 min. Na sequência os tubos foram centrifugados a 700 g por 10 min e a absorbância foi registrada em  $\lambda = 576$  nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três dias consecutivos para assegurar repetibilidade e a reprodutibilidade dos dados. A hemólise total (controle positivo) foi obtida por meio da solubilização de eritrócitos em água ultrapura. O efeito hemolítico (% hemólise) foi obtido em  $\lambda = 576$  nm para acompanhamento da concentração de hemoglobina liberada no sobrenadante, de acordo com a Equação 8:

$$\% \text{ Hemólise} = \left[ \left( \frac{Aa}{\text{AHT}} \right) \right] \times 100 \quad (8)$$

onde, Aa corresponde à absorbância do extrato da *C. cyanus* diluído e AHT corresponde à absorbância da hemólise total.

#### 2.2.6.6 Atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar na cavidade da placa foi realizada de acordo com Cleeland e Squires (1991). As suspensões celulares ( $10^5$  UFC/mL) de *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes* foram misturadas com ágar nutriente, *C. orthopsilosis* com ágar de extrato de malte, *P. roqueforti* com ágar Dichloran Glycerol, e inoculadas em placa de Petri. Quando o ágar solidificou três cavidades foram feitas equidistantes de 8 mm e o extrato otimizado e liofilizado foi adicionado em cada cavidade (2 mg/cavidade). O extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* foi dissolvido em água estéril ultrapura. As placas foram incubadas da seguinte maneira: *P. aeruginosa* e *B. cereus* (30 °C - 24 h); *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes* (37 °C - 24 h); *C. orthopsilosis* (30 °C - 3 a 5 dias), e *P. roqueforti* (25 °C - 3 a 5 dias). O controle positivo das cepas bacterianas e das cepas fúngicas constituiu-se de 10 mg/mL de ampicilina e 10 mg/mL de cicloheximida, respectivamente.

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* foi realizada de acordo com Siddiqi et al. (2011), com modificações. Uma alíquota de 100 µL de caldo esterilizado juntamente com 100 µL do extrato otimizado e liofilizado diluído em água ultrapura com concentrações entre 1,25 a 0,01 mg/mL, foram adicionados em microplaca de cultura estéril. Na sequência, foi acrescentada uma alíquota de 100 µL de cada micro-organismo ( $10^5$  UFC/mL). As microplacas foram separadas de acordo com a temperatura de incubação, para *P. roqueforti* e *C. orthopsilosis*, 25 °C, *B. cereus* e *P. aeruginosa*, 30 °C, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, e *S. Enteritidis*, 37 °C. Após 24 h, as cepas bacterianas, e 3-5 dias, as cepas fúngicas, foram avaliadas macroscopicamente. A CIM foi determinada para a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento. O controle positivo das cepas bacterianas foi a ampicilina a 10 mg/mL, e o controle de cepas de fungos a cicloheximida a 10 mg/mL. As análises foram realizadas em triplicata em dois dias diferentes para assegurar a repetibilidade/reprodutibilidade.



### 2.2.6.7 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I)

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I) do extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* foi determinada de acordo com o método proposto por Cushman e Cheung (1971), modificado por Ramchandran e Shah (2010). Primeiramente, 104 mg do extrato foi diluído em 30 mL de água ultrapura e centrifugado a 4000 g por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm. Em seguida, 200 µL de Hip-His-Leu (5 mmol/L em 0,1 mol/L tampão borato) foi misturado com 60 µL de tampão borato (solução 0,1 mol/L contendo 0,3 mol/L de NaCl, pH 8,3) e 30 µL do extrato, sendo a mistura incubada a 37 °C por 10 min. Na sequência, foram adicionados 20 µL de solução de enzima ECA (0,1 unidade/mL) e os tubos incubados a 37 °C por 30 min. A atividade enzimática foi encerrada com adição de 250 µL de HCl (1 mol/L). O ácido hipúrico formado foi extraído por mistura em 1,7 mL de acetato de etila. Após o repouso de 10 min, 1,2 mL da camada de solvente foi separada e seca em banho de água fervente. Após seco, o ácido hipúrico foi dissolvido em 1 mL de água deionizada e a absorbância registrada em 228 nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição da atividade da ECA de acordo com a Equação 9:

$$\% \text{ inibição da atividade da ECA} = \left[ 1 - \left( \frac{C-D}{A-B} \right) \right] \times 100 \quad (9)$$

onde, A é a absorbância na presença de ECA e sem o extrato; B é a absorbância sem ECA e o extrato; C é a absorbância com ECA e o extrato; e D é a absorbância com a amostra mas sem ECA.

### 2.2.6.8 Análise da citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*

O efeito citotóxico/citoprotetor *in vitro* do extrato otimizado e liofilizado da *C. cyanus* foi analisado em relação às linhagens celulares A549 (células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão), Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal) e HepG-2 (células de hepatocarcinoma humano). As células HepG2 foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/baixa glicose com adição de 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Brasil); Caco-2 em DMEM/alta

glicose suplementada com 20% de FBS; e as células A549 em DMEM/Ham-F12 suplementada com 10% de FBS; todos os meios continham 100 UI de penicilina/100 µg de estreptomicina, exceto no meio da A549. As linhagens celulares foram cultivadas em incubadora umificada a 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Um volume de 100 µL/poço das células foram transferidas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10<sup>4</sup> células/poço (HepG2 e Caco) e 5×10<sup>3</sup> células/poço (A549). Após 24 h, as células foram tratadas com 100 µL de concentrações seriadas (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900 µg/mL) do extrato otimizado e liofilizado de *Centaurea cyanus*. Após 48 h de tratamento, 10 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em água ultrapura) foram adicionados em cada poço. Após 4 h de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (LAO et al., 2016). A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas (IONTA et al., 2015). A absorbância foi monitorado em  $\lambda = 570$  nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek) e o software de análise de dados Gen5™. Foram avaliados três parâmetros diferentes de viabilidade celular de acordo com os estudos realizados por Ramirez-Mares, Kobayashi, e Mejia (2016). Primeiramente, IC<sub>50</sub>: a concentração do agente que inibe o crescimento em 50% é a concentração em que  $(T/C) \times 100 = 50$ , onde T = número de células no tempo t de tratamento; C = células controle no tempo t de tratamento. Na sequência, GI<sub>50</sub>: a concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas é a concentração em que  $([T - T_0]/[C - T_0]) \times 100 = 50$ , onde T e C são o número de células tratadas e controle, respectivamente, no tempo t de tratamento e  $T > T_0$ ; T<sub>0</sub> é o número de células no tempo zero. Para finalizar, LC<sub>50</sub>: a concentração do agente que resulta na morte de 50% das células em relação ao número no início do tratamento, sendo a concentração em que  $([T - T_0]/T_0) \times 100 = - 50$ ;  $T < T_0$ . Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata e as análises de dose-resposta foram determinadas por regressão não-linear (ajuste de curva) utilizando o software GraphPad Prism® (Software GraphPad, USA).

#### 2.2.6.9 Atividade de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular

Células HepG2 ( $1 \times 10^4$  por poço) foram tratadas com extrato de *Centaurea cyanus*, diluído em solução de DCFH-DA (25 mmol/L), com diferentes concentrações (10, 20, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). O procedimento seguiu o método proposto por Wolfe e Liu (2007), que foi modificado usando como pré-tratamento o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 15  $\mu\text{mol/L}$  para todos os experimentos. Subsequentemente, as células foram incubadas a 37 °C durante 1 h e lavadas com PBS. Para o controle positivo, as células foram tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  15  $\mu\text{mol/L}$ . Para o controle negativo, as células foram tratadas apenas com PBS, sendo usada como referência a porcentagem de proteção contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A intensidade da fluorescência foi mensurada a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e a um comprimento de onda de emissão de 538 nm. Os dados foram expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência em relação aos poços de controle.

#### 2.2.7 Análise Estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (exceto item 2.6.8), e os resultados expressos como média e desvio padrão. Primeiramente, foram analisadas a normalidade e homocedasticidade das variáveis de resposta pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. As diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Fisher de diferença mínima significativa, considerando  $p \leq 0,05$ . Os *software* Statistica v. 13.2 (Statsoft, USA) e Action 2.9 (Statcamp, Brazil) foram usados nas análises.

### 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 2.3.1 Composição Química, Atividade Antioxidante e Otimização do Extrato

A composição química e a atividade antioxidante dos extratos aquosos da *Centaurea cyanus* estão apresentadas nas Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente. Todos os resultados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, e

diferenças significativas entre os valores médios foram verificadas. Os teores de CFT variaram de  $393 \pm 1$  a  $485 \pm 8$  mg AGE/100 g, o efeito da temperatura e tempo, na extração dos fenólicos, apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), Tabela 2.3. Wegiera et al. (2012) verificaram, por Folin-Ciocalteu, teores de CFT de 1249 mg AGE/100 g no extrato aquoso metanólico de inflorescências de *C. cyanus*. Esses valores corroboram com o estudo realizado por Margraf et al. (2015), que compararam os métodos Azul da Prússia e o Folin-Ciocalteu na determinação de compostos fenólicos totais em amostras de suco de uva e chás, no qual o método Folin-Ciocalteu apresentou maiores valores. Os mesmos autores sugerem que existe a interferência de outros compostos químicos presentes em alimentos e ervas, além dos compostos fenólicos, que agem como redutores do reagente de Folin-Ciocalteu afetando os resultados. Além de diferentes metodologias de quantificação dos CFT, outros fatores podem interferir como as condições climáticas de produção, metodologias de extração e a parte da planta analisada.

O maior teor de CFT foi obtido com a temperatura de 60 °C e 45 min, e não foram observadas diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos dos extratos obtidos a 60 e 40 °C e tempos de 15 e 51,21 min, respectivamente (Tabela 2.3, Figura 2.3A). A análise de regressão do modelo proposto para CFT foi significativo ( $p < 0,001$ ) e apresentou  $R^2_{adj} = 0,73$ , indicando que o modelo MSR foi capaz de explicar 73% da variabilidade dos dados, e os resíduos seguiram uma distribuição normal. O efeito do modelo linear da temperatura e do modelo quadrático do tempo levaram a um aumento no conteúdo de CFT, enquanto o modelo linear do tempo tendeu a diminuir o conteúdo de CFT, Tabela 2.5.

De acordo com Setford et al. (2017) os principais fatores que afetam a concentração de compostos fenólicos durante a extração são o solvente, área de contato, temperatura, tempo e a estrutura molecular da matriz. Esses fatores influenciam a taxa de difusão do solvente para o interior da matriz e a difusão do soluto do interior para o solvente, e conseqüentemente na concentração dos compostos fenólicos (GERTENBACH, 2002; SETFORD et al., 2017). A temperatura apresenta uma influência significativa no processo de extração, pois diminuiu a viscosidade do solvente de extração facilitando a sua permeabilidade na membrana celular, e aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos, ocasionando a difusão para o solvente (CACACE; MAZZA, 2003).

**Tabela 2.3** - Composição química dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus* de acordo com experimental design (valores codificados e reais).

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Compostos Fenólicos Totais (mg AGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Antocianinas (mg CGE/100 g)	Fenólicos não-flavonoides (mg/100 g)	Flavonoides não-antociânicos (mg/100 g)
1	-1 (20)	-1 (15)	425 ± 3 <sup>cd</sup>	142 ± 1 <sup>j</sup>	135 ± 1 <sup>k</sup>	283 ± 3 <sup>abc</sup>	7 ± 1 <sup>h</sup>
2	-1 (20)	1 (45)	451 ± 3 <sup>b</sup>	162 ± 1 <sup>i</sup>	154 ± 1 <sup>j</sup>	289 ± 3 <sup>ab</sup>	8 ± 1 <sup>h</sup>
3	1 (60)	-1 (15)	478 ± 6 <sup>a</sup>	210 ± 1 <sup>c</sup>	163 ± 1 <sup>e</sup>	268 ± 6 <sup>cd</sup>	47 ± 1 <sup>c</sup>
4	1 (60)	1 (45)	485 ± 8 <sup>a</sup>	214 ± 1 <sup>b</sup>	158 ± 1 <sup>h</sup>	271 ± 8 <sup>cd</sup>	56 ± 1 <sup>b</sup>
5	-1,41 (11,70)	0 (30)	393 ± 1 <sup>e</sup>	133 ± 1 <sup>k</sup>	127 ± 1 <sup>l</sup>	260 ± 1 <sup>d</sup>	6 ± 1 <sup>i</sup>
6	1,41 (68,30)	0 (30)	447 ± 15 <sup>b</sup>	223 ± 1 <sup>a</sup>	155 ± 1 <sup>i</sup>	224 ± 15 <sup>e</sup>	68 ± 1 <sup>a</sup>
7	0 (40)	-1,41 (8,78)	456 ± 11 <sup>b</sup>	167 ± 1 <sup>h</sup>	159 ± 1 <sup>g</sup>	290 ± 11 <sup>a</sup>	7 ± 1 <sup>h</sup>
8	0 (40)	1,41 (51,21)	480 ± 15 <sup>a</sup>	189 ± 1 <sup>d</sup>	172 ± 1 <sup>a</sup>	291 ± 15 <sup>a</sup>	17 ± 1 <sup>d</sup>
9	0 (40)	0 (30)	446 ± 7 <sup>b</sup>	173 ± 1 <sup>g</sup>	160 ± 1 <sup>f</sup>	272 ± 7 <sup>bcd</sup>	14 ± 1 <sup>e</sup>
10	0 (40)	0 (30)	456 ± 11 <sup>b</sup>	173 ± 1 <sup>g</sup>	164 ± 1 <sup>d</sup>	282 ± 11 <sup>abc</sup>	9 ± 1 <sup>g</sup>
11	0 (40)	0 (30)	420 ± 14 <sup>d</sup>	182 ± 1 <sup>f</sup>	165 ± 1 <sup>c</sup>	238 ± 13 <sup>e</sup>	16 ± 1 <sup>d</sup>
12	0 (40)	0 (30)	441 ± 16 <sup>bc</sup>	184 ± 1 <sup>e</sup>	171 ± 1 <sup>b</sup>	257 ± 16 <sup>d</sup>	13 ± 1 <sup>f</sup>
OT	68,3	51,21	565 ± 2	234 ± 1	173 ± 1	381 ± 2	61 ± 1
<i>p</i> -Valor (normalidade)			0,975	0,944	0,834	0,945	0,720
<i>p</i> -Valor (homoscedasticidade)			0,761	0,959	0,852	0,778	0,759
<i>p</i> -Valor (one-way ANOVA)			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: OT = extrato otimizado. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.4** - Atividade antioxidante, redutora e quelante de ferro dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus* de acordo com experimental design (valores codificados e reais).

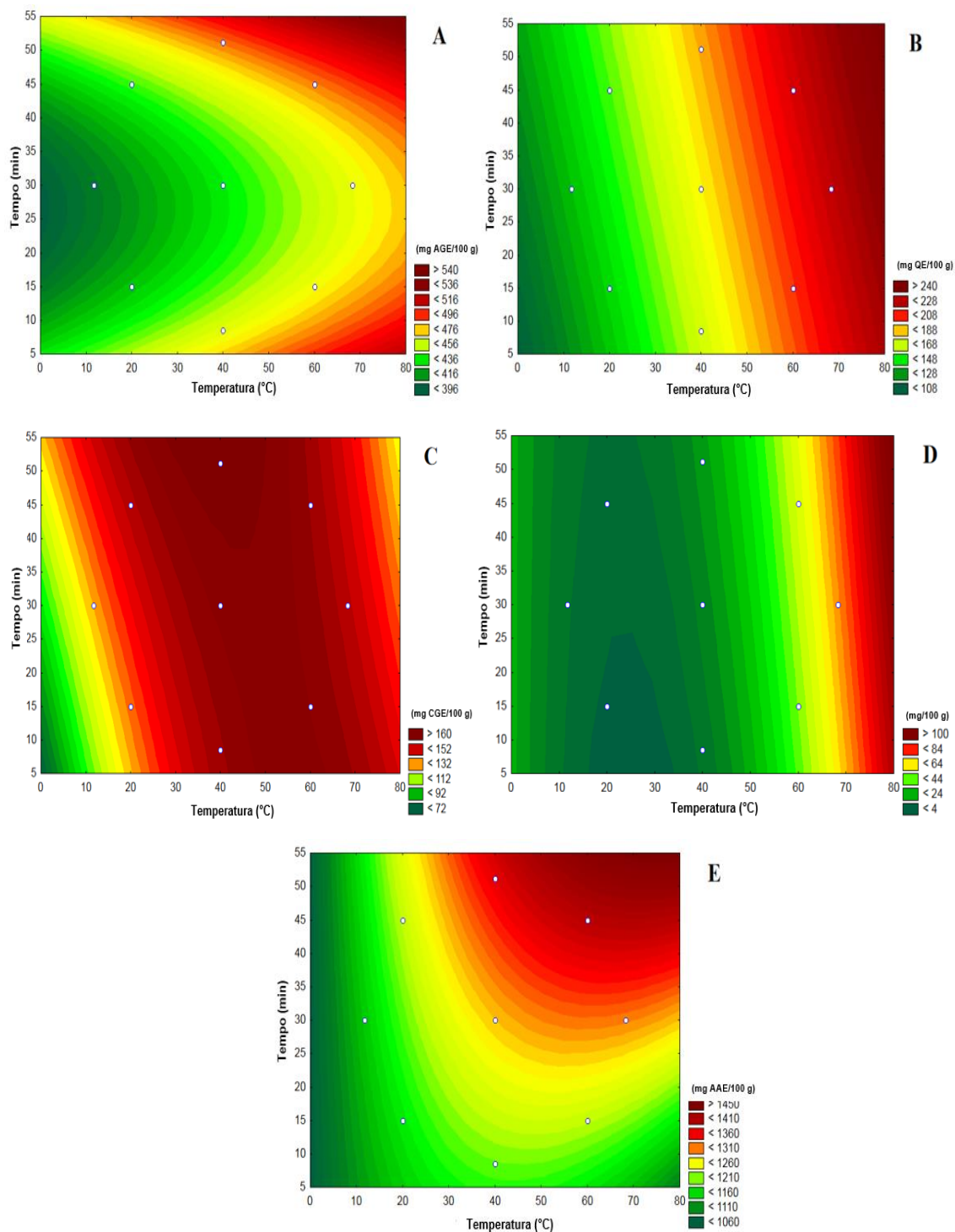
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	DPPH* (% inibição)	FRAP (mg AAE/100 g)	Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (mg AGE/100 g)	Atividade quelante de ferro (% formação do complexo Fe <sup>2+</sup> - ferrozina)
1	-1 (20)	-1 (15)	51 ± 1 <sup>g</sup>	1134 ± 16 <sup>e</sup>	487 ± 46 <sup>e</sup>	79 ± 1 <sup>a</sup>
2	-1 (20)	1 (45)	55 ± 1 <sup>ef</sup>	1135 ± 23 <sup>e</sup>	688 ± 25 <sup>c</sup>	79 ± 1 <sup>a</sup>
3	1 (60)	-1 (15)	58 ± 1 <sup>d</sup>	1216 ± 19 <sup>cde</sup>	787 ± 10 <sup>ab</sup>	79 ± 1 <sup>a</sup>
4	1 (60)	1 (45)	58 ± 2 <sup>d</sup>	1411 ± 100 <sup>a</sup>	679 ± 51 <sup>c</sup>	77 ± 3 <sup>a</sup>
5	-1,41 (11,70)	0 (30)	54 ± 1 <sup>f</sup>	1216 ± 50 <sup>cde</sup>	781 ± 35 <sup>ab</sup>	76 ± 1 <sup>ab</sup>
6	1,41 (68,30)	0 (30)	59 ± 2 <sup>c</sup>	1284 ± 44 <sup>bcd</sup>	584 ± 40 <sup>d</sup>	72 ± 4 <sup>c</sup>
7	0 (40)	-1,41 (8,78)	61 ± 1 <sup>b</sup>	1205 ± 12 <sup>de</sup>	821 ± 70 <sup>ab</sup>	76 ± 1 <sup>ab</sup>
8	0 (40)	1,41 (51,21)	63 ± 1 <sup>a</sup>	1359 ± 69 <sup>ab</sup>	771 ± 62 <sup>b</sup>	79 ± 1 <sup>a</sup>
9	0 (40)	0 (30)	59 ± 1 <sup>cd</sup>	1276 ± 26 <sup>bcd</sup>	843 ± 17 <sup>a</sup>	78 ± 1 <sup>a</sup>
10	0 (40)	0 (30)	61 ± 1 <sup>b</sup>	1269 ± 45 <sup>bcd</sup>	846 ± 28 <sup>a</sup>	79 ± 3 <sup>a</sup>
11	0 (40)	0 (30)	56 ± 1 <sup>e</sup>	1316 ± 79 <sup>b</sup>	810 ± 43 <sup>ab</sup>	74 ± 1 <sup>bc</sup>
12	0 (40)	0 (30)	62 ± 1 <sup>a</sup>	1304 ± 75 <sup>bc</sup>	830 ± 31 <sup>ab</sup>	78 ± 1 <sup>a</sup>
OT	68,3	51,21	ND	1400 ± 32	ND	ND
<i>p</i> -Valor (normalidade)			0,954	0,967	0,881	0,920
<i>p</i> -Valor (homoscedasticidade)			0,209	0,805	0,982	0,404
<i>p</i> -Valor (one-way ANOVA)			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: ND = não determinado; OT = extrato otimizado; Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

Os teores de FT variaram de  $133 \pm 1$  a  $223 \pm 1$  mg QE/100 g, demonstrando que a temperatura e o tempo influenciaram na extração destes compostos. O maior teor de FT foi obtido a  $68,3$  °C por 30 min (Tabela 2.3, Figura 2.3B). A análise de regressão do modelo proposto para FT foi significativo ( $p < 0,001$ ) e apresentou os valores de  $R^2$  e  $R^2_{adj} = 0,97$ , sendo capaz de explicar acima de 97% da variabilidade dos dados, e os resíduos seguiram uma distribuição normal. O efeito do modelo linear da temperatura e do tempo originou um aumento no teor de FT (Tabela 2.5). Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por Xu et al. (2013) e Xie et al. (2015) que avaliaram o efeito da temperatura no rendimento da extração de FT à partir de *Fructus sophorae* e *Cyclocarya paliurus*, respectivamente.

Os teores de AT variaram de  $127 \pm 1$  a  $172 \pm 1$  mg CGE/100 g, demonstrando que a temperatura e o tempo também influenciaram na extração destes compostos. Já o maior teor de AT foi obtido no extrato com o tempo máximo de extração (51,21 min) e temperatura intermediária de  $40$  °C (Tabela 2.3; Figura 2.3C). Os extratos obtidos com temperatura acima de  $40$  °C apresentaram uma redução nos teores de AT. Pires et al. (2018b) obtiveram  $2,6$  mg/100 g de antocianinas, extraídas a  $25$  °C por 60 min, em extrato aquoso e liofilizado da *C. cyanus*. Cacace e Mazza (2003) observaram uma redução no teor de antocianinas extraídas de groselhas pretas utilizando temperaturas acima de  $40$  °C devido a degradação destes compostos. Sang et al. (2017) observaram um maior rendimento no conteúdo de antocianinas extraídas da semente de *Nitraria tangutorun* a  $70$  °C por 15 min. A análise de regressão do modelo proposto para AT foi significativo ( $p=0,013$ ) e o valor de  $R^2_{adj} = 0,94$ , indicando que o modelo MSR foi capaz de explicar 94% da variabilidade, e os resíduos seguiram uma distribuição normal. O efeito do modelo linear da temperatura e do tempo ocasionaram um aumento no teor de AT. O efeito quadrático da temperatura e a interação linear da temperatura e tempo influenciaram na redução do teor de AT, Tabela 2.5.

**Figura 2.3** - Efeito da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), antocianinas totais (C), flavonoides não-antociânicos (D) e atividade antioxidante – FRAP (E) em extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus*.





**Tabela 2.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos químicos e atividade antioxidante dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus*.

(continua)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 95% Confiança	+ 95% Confiança
<b>Compostos fenólicos totais - CFT</b>	Constante	453,53	24,92	18,20	<0,001	374,23	532,83
	(A) Temperatura (L)	1,01	0,27	3,77	0,033	0,16	1,87
	(B) Tempo (L)	- 4,48	1,59	- 2,82	0,067	- 9,55	0,58
	Tempo (Q)	0,084	0,026	3,242	0,048	0,002	0,167
	R <sup>2</sup>	0,80					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,73					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,82					
<b>Flavonoides totais - FT</b>	Constante	103,99	5,75	18,08	<0,001	85,68	122,30
	(A) Temperatura (L)	1,54	0,10	15,74	<0,001	1,23	1,85
	(B) Tempo (L)	0,46	0,13	3,54	0,038	0,05	0,87
	R <sup>2</sup>	0,97					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,97					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,58					
<b>Antocianinas totais - AT</b>	Constante	66,24	12,44	5,33	0,013	26,66	105,82
	(A) Temperatura (L)	3,49	0,45	7,78	0,004	2,06	4,92
	Temperatura (Q)	- 0,031	0,005	- 6,586	0,007	- 0,045	- 0,016
	(B) Tempo (L)	1,08	0,34	3,20	0,049	0,01	2,16
	AB	- 0,02	0,01	- 2,55	0,084	- 0,05	0,01
	R <sup>2</sup>	0,96					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,94					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,41						
<b>Fenólicos não-flavonoides</b>	Constante	326,23	28,67	11,38	0,001	234,97	417,48
	(B) Tempo (L)	- 4,76	2,03	- 2,34	0,101	- 11,23	1,71
	Tempo (Q)	0,08	0,03	2,45	0,092	- 0,02	0,19
	R <sup>2</sup>	0,46					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,34					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,86						
<b>Flavonoides não-antociânicos</b>	Constante	21,77	4,32	5,04	0,015	8,01	35,52
	(A) Temperatura (L)	- 1,66	0,23	- 7,08	0,006	- 2,40	- 0,91
	Temperatura (Q)	0,033	0,003	11,669	0,001	0,024	0,041
	AB	0,0050	0,0016	3,1472	0,051	0,0001	0,0101
	R <sup>2</sup>	0,98					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,98					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,42						

**Tabela 2.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos químicos e atividade antioxidante dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus*.

(conclusão)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 95% Confiança	+ 95% Confiança
<b>Atividade sequestradora de radicais livres - DPPH*</b>	Constante	45,77	4,31	10,62	0,002	32,06	59,49
	(A) Temperatura (L)	0,59	0,23	2,58	0,082	- 0,14	1,32
	Temperatura (Q)	- 0,006	0,003	- 2,179	0,117	- 0,015	0,003
	R <sup>2</sup>	0,53					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,42					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,64					
<b>Poder antioxidante de redução do ferro - FRAP</b>	Constante	1053	33,42	31,51	<0,001	946,56	1159
	(A) Temperatura (L)	5,66	1,81	3,13	0,050	- 0,09	11,41
	Temperatura (Q)	- 0,071	0,022	- 3,280	0,046	- 0,139	0,002
	AB	0,09	0,01	7,64	0,005	0,06	0,13
	R <sup>2</sup>	0,78					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,70					
<b>Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu</b>	Constante	- 11,65	49,48	- 0,24	0,829	- 169,11	145,81
	(A) Temperatura (L)	26,73	1,55	17,19	<0,001	21,78	31,67
	Temperatura (Q)	- 0,24	0,02	- 14,66	<0,001	- 0,29	- 0,19
	(B) Tempo (L)	20,35	2,06	9,90	0,002	13,81	26,90
	Tempo (Q)	- 0,17	0,03	- 5,80	0,010	- 0,26	- 0,07
	AB	- 0,26	0,03	- 9,46	0,003	- 0,34	- 0,17
	R <sup>2</sup>	0,59					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,25					
<b>Atividade quelante de ferro</b>	Constante	78.61	1.19	65.96	<0.001	74.81	82.40
	Temperature (Q)	- 0.0008	0.0005	- 1.4772	0.2361	- 0.0024	0.0009
	R <sup>2</sup>	0.21					
	Adjusted R <sup>2</sup>	0.13					
	p-Value (normality of residuals)	0.93					

O conteúdo de compostos fenólicos não-flavonoides variou de 224 ± 15 a 291 ± 15 mg/100 g. A temperatura e o tempo não influenciaram na extração destes compostos nos ensaios 1, 2, 7, 8 e 10 (Tabela 2.3). Os principais compostos fenólicos não-flavonoides identificados em diferentes extratos da *C. cyanus* foram os ácidos cafeico, clorogênico, *p*-cumárico, neoclorogênico e isoclorogênico (LITVINENKO; BUBENCHIKOVA, 1988; PIRVU et al., 2012; PIRES et al., 2018a). A

análise de regressão do modelo proposto para compostos fenólicos não-flavonoides não foi adequado para descrever os dados experimentais, pois o modelo MSR foi capaz de explicar somente 34% da variabilidade dos dados, Tabela 2.5.

Os teores de flavonoides não-antociânicos variaram de  $6 \pm 1$  a  $68 \pm 1$  mg/100 g, somente a temperatura influenciou significativamente a extração destes compostos. O maior teor de flavonoides não-antociânicos ocorreu acima de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o tempo não influenciou significativamente (Tabela 2.3, Figura 2.3D). Pirvu et al. (2015) analisaram dois diferentes extratos, obtidos a partir da extração aquosa à quente da parte aérea da *C. cyanus*, e identificaram a presença de quercetina, rutina e apigenina. A análise de regressão do modelo proposto para flavonoides não-antociânicos foi significativo ( $p=0,015$ ) e os valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{adj}} = 0,98$ , indicando que o modelo MSR foi capaz de explicar acima de 98% da variabilidade, e os resíduos seguiram uma distribuição normal. O efeito do modelo quadrático da temperatura e a interação linear da temperatura e tempo induziram um aumento no teor de flavonoides não-antociânicos. O modelo linear da temperatura tendeu a diminuir o teor de flavonoides não-antociânicos, Tabela 2.5.

A atividade antioxidante dos extratos por meio da captura do radical livre DPPH• foi influenciada pelas condições de extração, variou de 51 a 63% de inibição, somente a temperatura influenciou significativamente, Tabela 2.4. O extrato, ensaio 8, apresentou maior atividade antioxidante, 63% inibição, com alto teor de compostos fenólicos totais, 480 mg AGE/100 g. A análise de regressão do modelo proposto para DPPH• não foi adequado para descrever os dados experimentais, pois o modelo MSR foi capaz de explicar somente 42% da variabilidade dos dados, Tabela 2.5.

A atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP) variou de  $1134 \pm 16$  a  $1411 \pm 100$  mg AAE/100 g, ambos temperatura e o tempo influenciaram na atividade antioxidante. Os extratos obtidos com temperatura e tempo acima de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 30 min, respectivamente; apresentaram atividade antioxidante por FRAP mais elevada (Tabela 2.4; Figura 2.3E). A MSR mostrou que o modelo foi significativo e o valor de  $R^2_{\text{adj}} = 0,70$ , explicando 70% da variabilidade dos dados, e os resíduos seguiram uma distribuição normal. O modelo linear da temperatura e interação entre temperatura e tempo apresentaram efeito positivo na atividade antioxidante por

FRAP, enquanto o efeito quadrático da temperatura tendeu a diminuir a atividade antioxidante, Tabela 2.5.

A capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu variou de  $487 \pm 46$  a  $846 \pm 28$  mg AGE/100 g. O tempo e a temperatura não influenciaram a capacidade redutora dos extratos nos ensaios 3, 5, 7, 9, 10, 11 e 12, Tabela 2.4. O modelo proposto não foi significativo ( $p=0,829$ ) e adequado para descrever os dados experimentais, pois foi capaz de explicar somente 25% da variabilidade dos dados, Tabela 2.5.

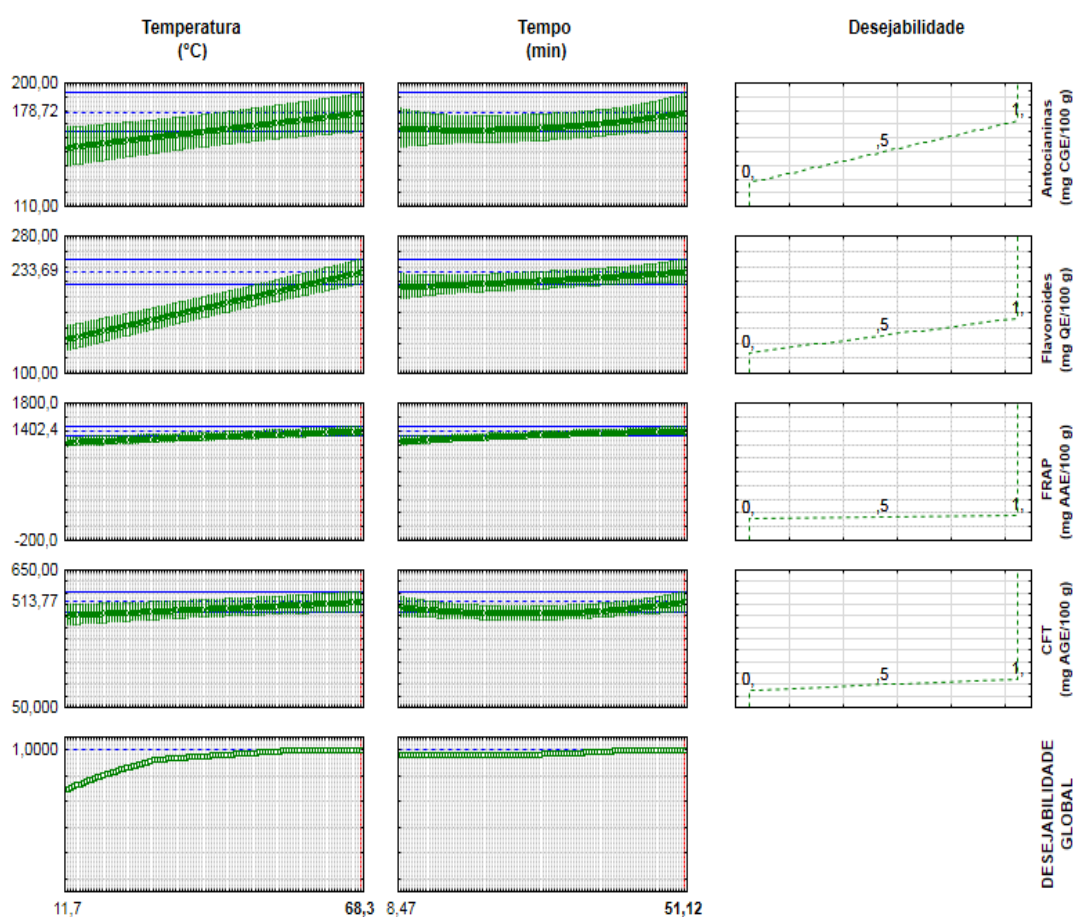
A atividade quelante de ferro avaliou a capacidade dos compostos fenólicos presentes nos extratos em se ligar ao íon  $Fe^{2+}$  competindo com o ligante ferrozina. Os extratos apresentaram entre 72 a 79 % de formação do complexo  $Fe^{2+}$ -ferrozina, ou seja, uma baixa capacidade de ligação do ferro com os compostos presentes nos extratos. Entretanto, quando a amostra contém substâncias que formam complexos estáveis com  $Fe^{2+}$ , ocorre uma ruptura da ligação  $Fe^{2+}$ -ferrozina, associada a uma redução da absorbância em 562 nm, e indicando a presença de atividade antioxidante (SANTOS; BRIZOLA; GRANATO, 2017). As variações de temperatura e tempo não influenciaram significativamente a atividade quelante  $Fe^{2+}$  entre a maioria dos extratos, Tabela 2.4. O modelo proposto não foi adequado para descrever os dados experimentais, pois o modelo MSR foi capaz de explicar somente 13% da variabilidade dos dados, Tabela 2.5.

A atividade antioxidante dos extratos vegetais está relacionada com a presença dos flavonoides, atuando contra espécies reativas de oxigênio, dentre os quais, radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e também quelando íons de metais (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Neste estudo, houve uma correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) da atividade antioxidante dos extratos de pétalas de *C. cyanus* com flavonoides ( $r_{FRAP} = 0,6231$ ) e com as antocianinas ( $r_{DPPH} = 0,8082$ ), e DPPH $\cdot$  com o FRAP ( $r = 0,5807$ ). Aktumsek et al. (2011) observaram que a *Centaurea cheirolopha* apresentou maior atividade antioxidante devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais.

A metodologia de superfície de resposta permitiu gerar os modelos da extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos de pétalas de *Centaurea cyanus*. E estabeleceu as melhores condições de extração por meio da aplicação da otimização simultânea baseada na função de desejabilidade. A

otimização simultânea utilizando o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e a atividade antioxidante de redução de  $\text{Fe}^{2+}$ , sugeriram a temperatura de 68,3 °C e tempo de 51,12 min (Figura 2.4). A desejabilidade global obtida nestas condições de extração foi igual à 1, indicando que o procedimento de otimização foi totalmente satisfeito.

**Figura 2.4** - Otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, dos fatores temperatura (°C) e tempo (min) considerando o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, e atividade antioxidante por FRAP dos extratos aquosos de pétalas de *Centaurea cyanus*.



A condição 68,3 °C e 51,12 min foi aplicada para a obtenção do extrato otimizado (OT), analisado utilizando os mesmos ensaios experimentais, e os resultados observados e os valores preditos, juntamente com o cálculo do erro absoluto (EA), foram: compostos fenólicos totais (observado: 565 mg AGE/100 g; predito: 514 mg AGE/100 g; EA = 9,9%), flavonoides totais (observado: 234 mg QE/100 g; predito: 234 mg QE/100 g; EA = 0%), antocianinas totais (observado: 173 mg CGE/100 g; predito: 179 mg CGE/100 g; EA = 3,3%) e FRAP (observado: 1400

mg AAE/100 g; predito: 1402 mg AAE/100 g; EA = 0,1%). Todos os dados experimentais permaneceram dentro do intervalo de predição  $\pm 95\%$ , mostrando que os modelos gerados podem ser considerados preditivos.

### 2.3.2 Composição Química e Propriedades Funcionais *in vitro* do Extrato Otimizado

#### 2.3.2.1 Composição química por LC-ESI-MS/MS

A Tabela 2.6 apresenta os compostos químicos analisados e quantificados no extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus* por LC-ESI-MS/MS. Foram quantificados os ácidos clorogênico ( $m/z$  355,10; 3897 mg/100 g), ferúlico ( $m/z$  195,00; 1,4 mg/100 g), cafeico ( $m/z$  178,92; 1,6 mg/100 g), *p*-cumárico ( $m/z$  162,92; 1,3 mg/100 g), isoquercitrina ( $m/z$  462,98; 116 mg/100 g), e cumarina ( $m/z$  146,90; 1,5 mg/100 g). Pires et al. (2018a) identificaram na infusão de flores de *C. cyanus* os ácidos clorogênico (41 mg/100 g) e *p*-cumárico (130 mg/100 g), e a quercetina (51 mg/100 g). Os autores observaram traços do ácido cafeico e não identificaram o ácido ferúlico e a cumarina. Litvinenko e Bubenchikova (1988), Bubenchikova (1990) e Pirvu et al. (2015) identificaram em extratos da *C. cyanus* obtidos com diferentes solventes (propanona, álcool metílico e clorofórmio) os ácidos neoclorogênico e isoclorogênico, kaempferol, isorhamnetina, apigenina, luteolina, hispidulina, rutina e cumarina. Portanto, o ácido cafeico, ácido ferúlico e a cumarina foram quantificados pela primeira vez, neste trabalho, no extrato aquoso de pétalas de *C. cyanus*.

Albayrak, Atasagun e Aksoy (2017) identificaram a isoquercitrina, 1009 mg/100 g e 349,60 mg/100 g, no extrato metanólico de *C. aksoyi* e *C. amaena*, respectivamente. Os mesmos autores quantificaram o ácido clorogênico (492,40 mg/100 g) somente na *C. aksoyi*, e o ácido ferúlico (273,90 mg/100 g) e o *p*-cumárico (212,30 mg/100 g) na *C. amaena*, estando esses ácidos fenólicos presentes no extrato aquoso da *C. cyanus*. Dalar et al. (2015) analisaram nove compostos fenólicos no extrato etanólico liofilizado da flor da *C. karduchorum* por LC-DAD-MS/MS, e quantificaram somente o ácido clorogênico (360 mg/100 g).

**Tabela 2.6** - Composição química do extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus* analisado por LC-ESI-MS/MS.

(continua)

Composto	Tempo de retenção (min)*	Faixa linear ( $\mu\text{g/L}$ )*	R <sup>2</sup> *	Conteúdo (mg/100 g) <sup>a</sup>
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	2,30	10–1000	0,999	ND
Ácido gálico	2,32	1,6–25,0	0,988	ND
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	2,49	10–1000	0,982	ND
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	3,05	1,6–20,9	0,987	ND
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,18	25,0–225,0	0,998	ND
Ácido clorogênico	3,76	0,4–25,0	0,997	3897 $\pm$ 54
(+)-Catequina	3,82	1,6–25,0	0,987	ND
Ácido cafeico	4,25	3,2–20,9	0,996	1,6 $\pm$ 0,1
(-)-Epicatequina	4,27	1,6–25,0	0,998	ND
Ácido siríngico	4,30	1,6–25,0	0,995	ND
(-)-Epigallocatequina galato	4,33	0,8–20,9	0,999	ND
Isoquercitrina	4,55	10–1000	0,991	116 $\pm$ 1
Rutina	4,82	0,4–25,0	0,991	ND
Coniferaldeído	4,97	10–1000	0,992	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,99	0,8–25,0	0,995	1,3 $\pm$ 0,1
Siringaldeído	5,07	1,6–20,9	0,994	ND
Ácido sinápico	5,13	0,8–25,0	0,996	ND
Ácido ferúlico	5,20	3,2–25,0	0,987	1,4 $\pm$ 0,2
Naringenina	5,32	0,8–25,0	0,996	ND
Cumarina	5,34	10–1000	0,998	1,5 $\pm$ 0,1
Hesperidina	5,38	0,4–25,0	0,990	ND
Ácido 3,5-dinitrobenzoico	5,52	10–1000	0,987	ND
Sinapaldeído	5,64	0,4–25,0	0,998	ND
4-metilumbeliferona	5,78	0,8–25,0	0,990	ND
Ácido benzoico	5,84	25,0–250,0	0,992	ND
Ácido salicílico	6,10	25,0–225,0	0,995	ND
Luteolina	6,24	0,4–25,0	0,992	ND
Quercetina	6,29	0,8–25,0	0,987	ND
Ácido vanílico	6,38	0,4–25,0	0,986	ND
Apigenina	6,73	0,8–25,0	0,997	ND

**Tabela 2.6** - Composição química do extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus* analisado por LC-ESI-MS/MS.

(conclusão)

Composto	Tempo de retenção (min)*	Faixa linear (µg/L)*	R <sup>2</sup> *	Conteúdo (mg/100 g) <sup>a</sup>
Naringina	6,80	0,2–20,9	0,994	ND
Pinobanksin	6,83	0,5–28,7	0,996	ND
Kaempferol	6,85	1,6–25,0	0,997	ND
Isoramnetina	6,92	0,5–26,1	0,998	ND
Crisina	7,96	0,8–20,9	0,998	ND
Pinocebrina	8,10	0,4–25,0	0,994	ND
Galangina	8,13	1,6–25,0	0,994	ND

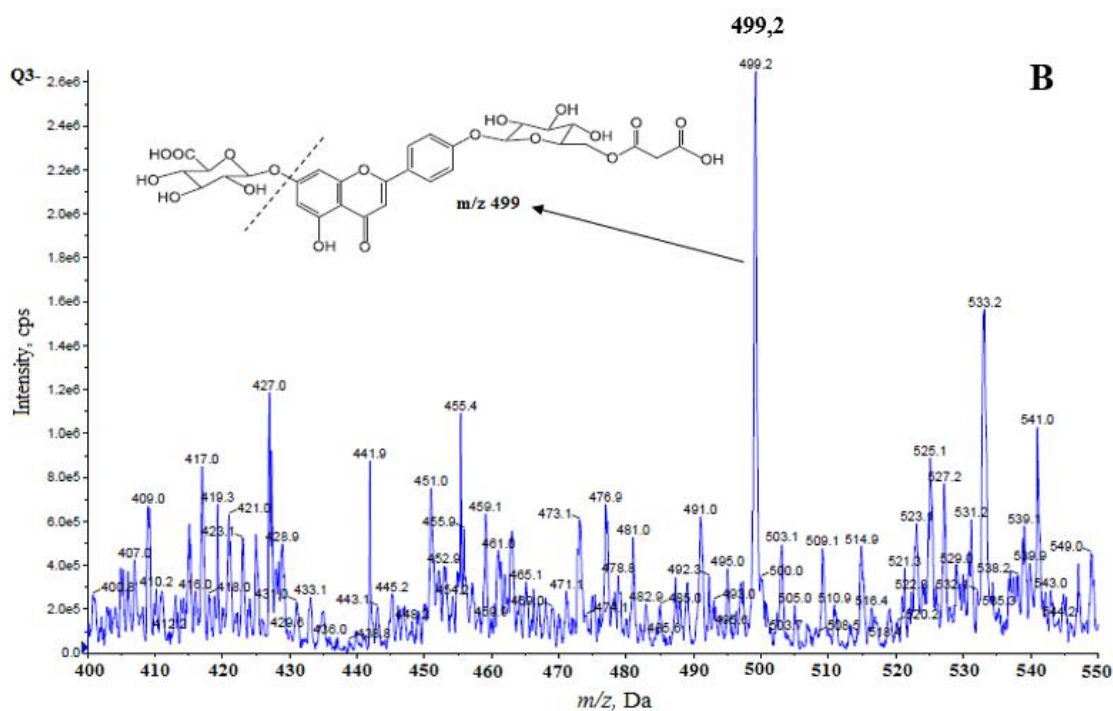
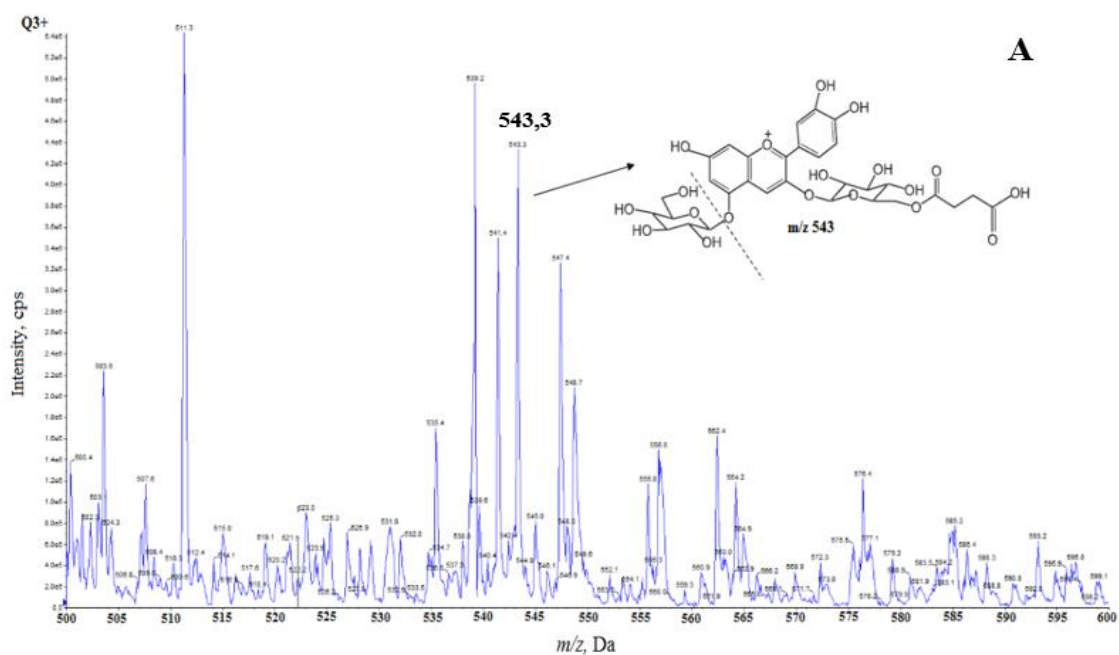
\*Dados adaptados de Seraglio et al. (2016). ND: não detectado. <sup>a</sup>Média e desvio padrão.

### 2.3.2.2 Identificação da antocianina e flavona por MS/MS

A antocianina cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo, AN, e a flavona apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosídeo), FL, integrantes da molécula da protocianina, foram identificadas no extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus*. A Figura 2.5A mostra a estrutura da cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo identificada por comparação da massa molecular fragmentada ( $m/z$  543,3) com a massa molecular da estrutura intacta (MM=704). A Figura 2.5B, a flavona apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosídeo) foi identificada por comparação da massa molecular fragmentada ( $m/z$  499,2) com a massa molecular da estrutura intacta (MM=693). Estudos para elucidar a estrutura da protocianina, presente na *C. cyanus*, mostraram que a composição química consiste em 6 AN: 6 FL: 1 Fe(II): 2 Mg(II): 3 Ca(II) (TAKEDA et al., 2005).



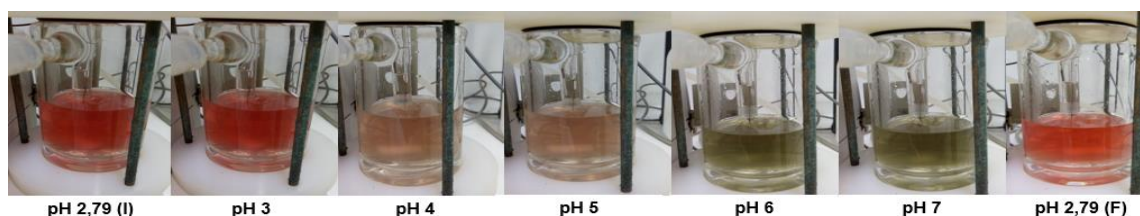
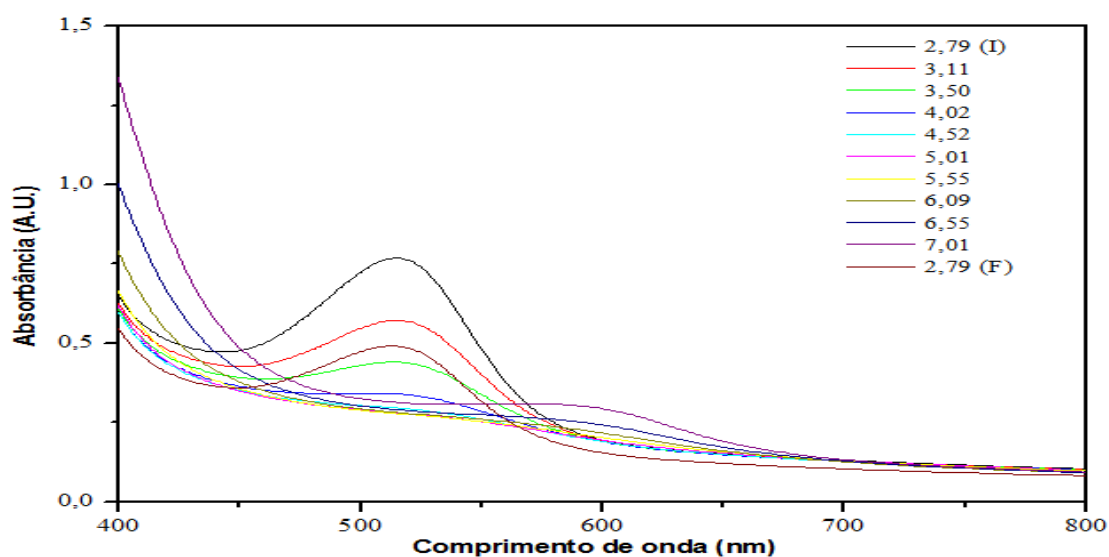
**Figura 2.5** - Espectro de massa dos fragmentos dos íons ( $m/z$ ) no modo positivo da antocianina cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo (A), e no modo negativo da flavona apigenina 7-O- $\beta$ -D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglicosídeo), identificadas no extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus*.



### 2.3.2.3 Efeito do pH na estabilidade das antocianinas e atividade antioxidante

A estabilidade das antocianinas depende de vários fatores como pH, temperatura, estrutura química, luz, oxigênio e solventes (GIUSTI; WROLSTAD, 2003). A estabilidade da cor das antocianinas em soluções é influenciada principalmente pelo pH, em razão do deslocamento da estrutura de equilíbrio reversível ou irreversível desses compostos (MAZZA; BROUILLARD, 1987). A titulação espectrofotométrica direta, mostrou o efeito do pH na estabilidade (Figura 2.6) e atividade antioxidante (Figura 2.7) das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus*. A absorbância de 515 nm diminuiu entre os valores de pH 2,79 a 5,55, devido ao efeito hipocrômico, e entre os valores de pH 6,09 a 7,01 ocorreu o efeito hiperacrômico, Figura 2.6. A titulação espectrofotométrica reversa, pH 7,01 a 2,79 mostrou que as antocianinas presentes no extrato da *C. cyanus* apresentaram reversibilidade no deslocamento de equilíbrio, sendo que a coloração vermelha em pH 2,79 indicou a mudança da estrutura para a forma de cátion flavilium.

**Figura 2.6** - Efeito do pH na estabilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus*.

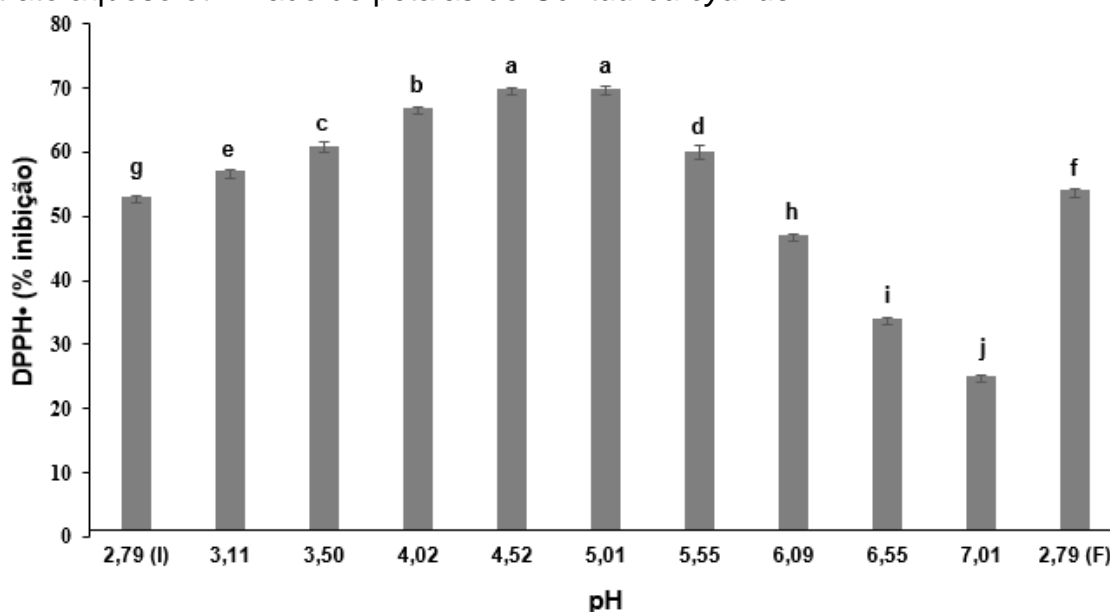


Nota: I = inicial; F = final.

As variações no valor do pH alteram o equilíbrio das antocianinas e ocorrem mudanças na estrutura do cátion flavilium, produzindo anidrobases quinoidais, pseudobases carbinol e *cis*-chalcona. Dependendo do tipo de antocianina, a formação destas estruturas ocasiona a ruptura do anel heterocíclico, e a reação pode ser irreversível (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977). Ekici et al., (2014) analisaram a estabilidade das antocianinas da casca da uva, cenoura preta e repolho vermelho, com variação dos valores de pH 3 a 7 e temperatura de 70 a 90 °C, e verificaram que a estabilidade das antocianinas diminuíram gradualmente com o aumento do pH e temperatura.

A atividade antioxidante do extrato da *C. cyanus* por meio da captura do radical livre DPPH•, foi influenciada significativamente pelas variações do pH, apresentando de 25 a 70% de inibição, Figura 2.7. O aumento do pH de 2,79 até 5,01, proporcionou um aumento na inibição do DPPH• de 53 a 70%, respectivamente. Quando o pH aumentou para 7,01, a atividade antioxidante diminuiu, ou seja, apresentou uma inibição de 25%. Na titulação reversa, em pH 2,79, a atividade antioxidante do extrato apresentou uma inibição de 54%.

**Figura 2.7** - Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato aquoso otimizado de pétalas de *Centaurea cyanus*.



Nota: I = inicial; F = final. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

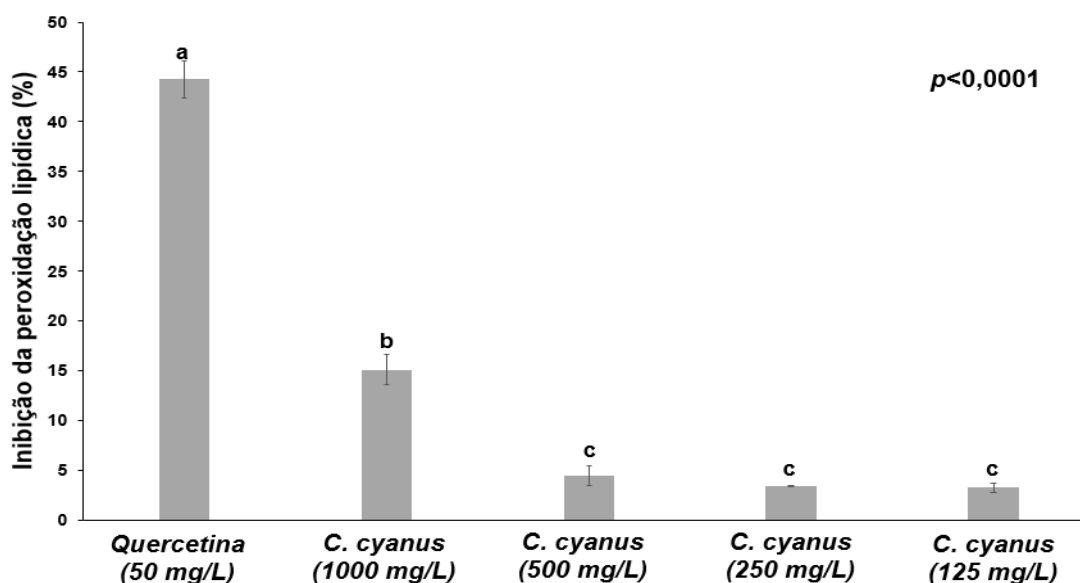
Altunkaya, Gökmen e Skibsted (2016) verificaram a influência do pH na atividade antioxidante de extratos de alface combinados com quercetina, extrato de chá verde e sementes de uva. Os autores observaram que houve um aumento na atividade antioxidante dos extratos com o aumento dos valores do pH. Esse aumento na atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se ao aumento da capacidade de doação de elétrons após desprotonação da estrutura molecular e estabilização em meio alcalino levando a reação de polimerização.

#### 2.3.2.4 Inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica ocasiona a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, responsáveis pela manutenção das membranas celulares, alterando a permeabilidade e fluidez da bicamada lipídica, composição e a integridade celular. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são alguns dos oxidantes mais comuns nas células. Os produtos gerados na peroxidação lipídica são tóxicos ao organismo, induzindo a inflamação, envelhecimento, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, e câncer (GUÉRAUD et al., 2010; GASCHLER; STOCKWEL, 2017).

As concentrações de 125 a 500 mg/L de extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus* apresentaram uma baixa inibição da peroxidação lipídica, Figura 2.8. O aumento da concentração para 1000 mg/L elevou a inibição da peroxidação lipídica. A quercetina que foi utilizada como controle positivo, é considerada uma eliminadora de EROs e inibidora da peroxidação lipídica (D'ANDREA, 2015).

**Figura 2.8** - Inibição da peroxidação lipídica do extrato aquoso otimizado e liofilizado de pétalas de *Centaurea cyanus* comparado a uma solução padrão de quercetina a 50 mg/L.

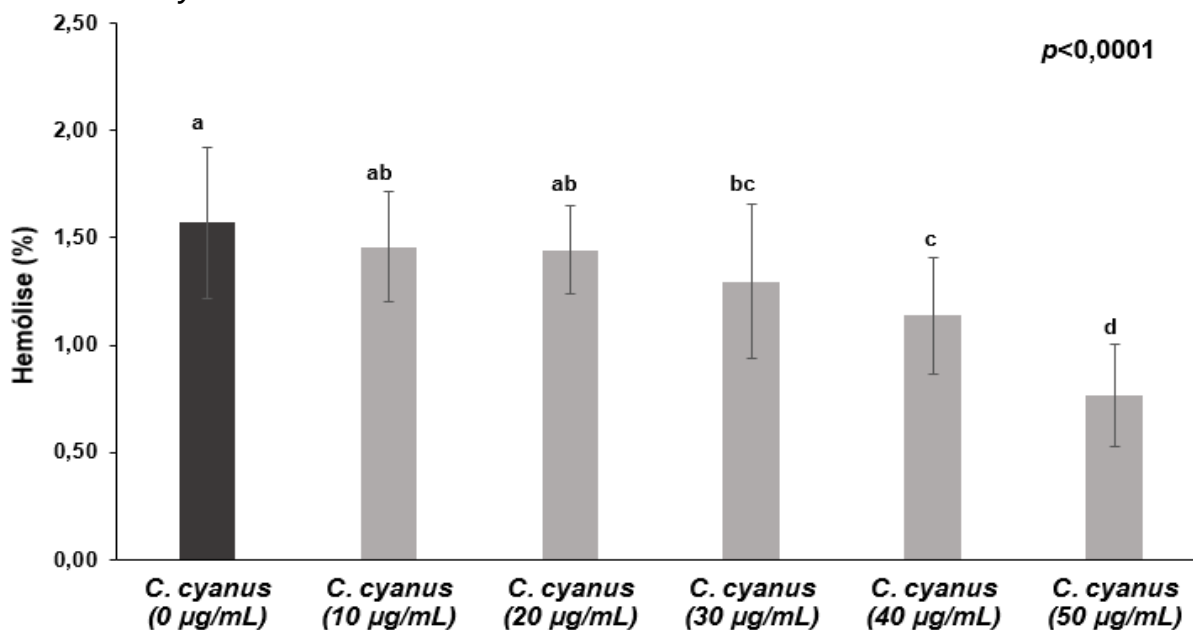


Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

### 2.3.2.5 Atividade anti-hemolítica *in vitro*

A atividade anti-hemolítica *in vitro* do extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus* (0 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ) foi avaliada frente aos eritrócitos de sangue humano com tipagem O<sup>+</sup>. A Figura 2.9 mostra que o extrato da *C. cyanus* apresentou uma interação benéfica com os eritrócitos, e um efeito protetor contra a hemólise com o aumento da concentração (efeito de dose-dependência). Os eritrócitos que sofreram hemólise mecânica (0  $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram diferença significativa dos eritrócitos em presença de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  de extrato. No entanto, os eritrócitos adicionados de 30 a 50  $\mu\text{g/mL}$  de extrato apresentaram um efeito protetor quando comparadas com os eritrócitos hemolisados mecanicamente, ocorrendo uma diminuição da atividade hemolítica com o aumento da concentração do extrato da *C. cyanus*. Os eritrócitos são suscetíveis aos danos oxidativos devido à constituição da membrana celular por ácidos graxos poliinsaturados, a presença de oxigênio e ferro na hemoglobina, podendo sofrer uma série de modificações causando a hemólise (ÇIMEN, 2008). A hemólise consiste na lise dos eritrócitos com a liberação da hemoglobina no plasma. A hemoglobina livre pode induzir à apoptose celular e a interrupção no consumo de oxigênio resultando em danos ao organismo (TRACZ; ALAM; NATH, 2007).

**Figura 2.9** - Atividade anti-hemolítica do extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *Centaurea cyanus*.



Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

Compostos bioativos presentes em extratos vegetais protegem a membrana dos eritrócitos contra os danos originados por espécies reativas de oxigênio (SINGH; RAJINI, 2008). Belwal et al. (2017) observaram que o extrato de folhas de *Berberis asiatica* apresentou atividade antihemolítica e atividade protetora contra os danos aos eritrócitos, esta atividade está relacionada com a mistura de compostos que atuam de forma sinérgica e exercem efeito protetor. Os mesmos autores obtiveram maiores concentrações do ácido clorogênico e da catequina comparado com os outros compostos fenólicos. Singh e Rajini (2008) observaram que o extrato da casca de batata protegeu os eritrócitos humanos contra danos oxidativos *in vitro*, induzidos por sulfato de ferro e ácido ascórbico, devido às suas propriedades antioxidantes.

### 2.3.2.6 Atividade antimicrobiana

O extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus*, pelos métodos de difusão em ágar e concentração inibitória mínima de 0,01 até 1,25 mg/mL, não inibiu o crescimento do *Penicillium roqueforti*, *Candida orthopsilosis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis. Damte et al. (2013) avaliaram 97 extratos

metanólicos de plantas, e observaram que o extrato da *C. cyanus* não apresentou inibição do crescimento da *Pseudomona aeruginosa*. Pires et al. (2018a) verificaram que o extrato aquoso das flores de *C. cyanus* apresentou atividade antimicrobiana em relação a *Pseudomona aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com CIM acima de 20 mg/mL. Assim, novos estudos do extrato aquoso otimizado de pétalas de *C. cyanus* com concentrações acima de 1,25 mg/mL são necessários.

#### 2.3.2.7 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA-I)

A enzima conversora de angiotensina I (ECA) desempenha um papel fisiológico duplo na regulação da pressão sanguínea por meio da conversão de angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor, e na degradação da bradicinina, um vasodilatador (MURRAY; FITZGERALD, 2007). A hipertensão, aumento da pressão sanguínea acima de 140/90 mmHg, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e doença renal (LI et al., 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a inibição da atividade da ECA está associada com a redução da pressão arterial (LI et al., 2012; LUO et al., 2017).

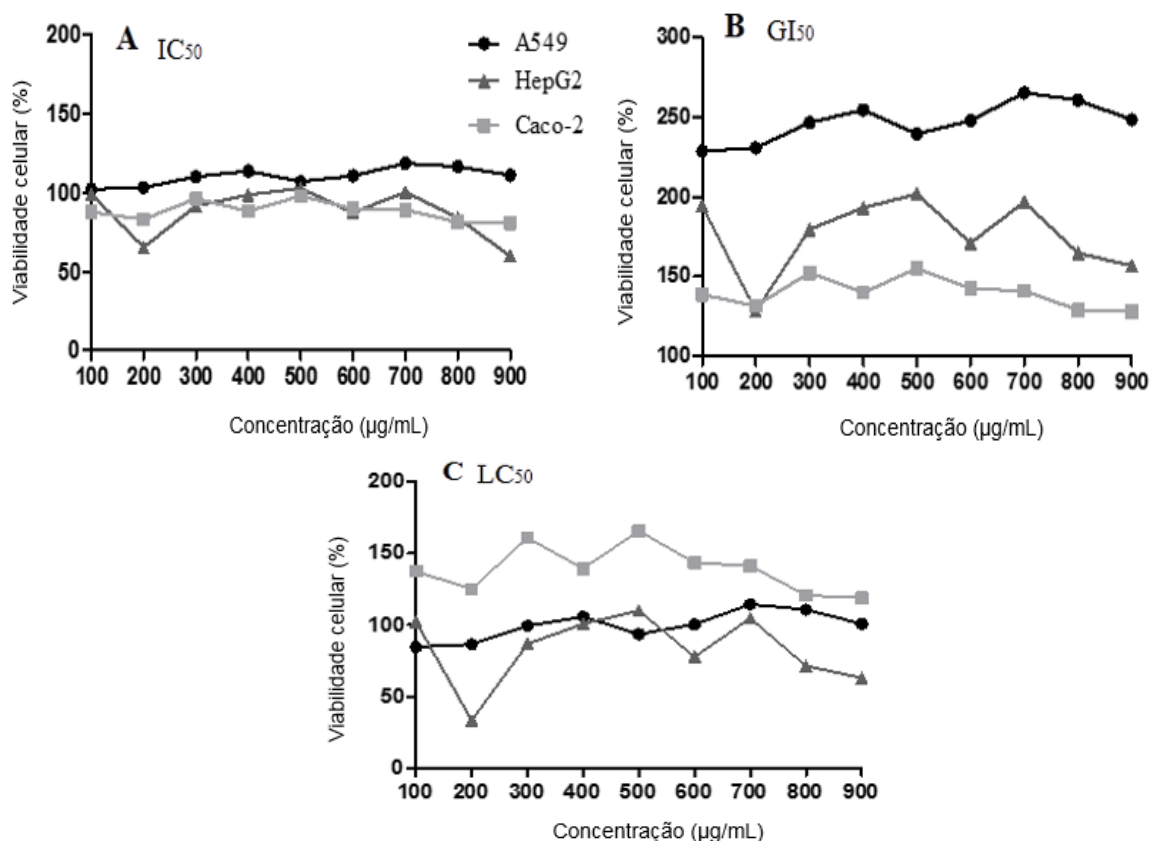
O extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus*, 3,46 mg/mL, apresentou uma inibição de 45,62%  $\pm$  1 em relação a atividade da enzima conversora de angiotensina I. Estudos relacionam a atividade anti-hipertensiva dos alimentos com os compostos fenólicos e peptídeos (HÜGEL et al., 2016; RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017). O ácido clorogênico identificado no extrato aquoso da *C. cyanus* pode ter influenciado na inibição da atividade da enzima ECA. Ojeda et al. (2010) observaram que o extrato aquoso, 50 mg/mL de *Hibiscus sabdariffa* inibiu 31,16% da atividade da enzima ECA, enquanto as antocianinas delfinidina-3-O-sambubiosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo, 0,2 mg/mL, inibiram 79,27 e 68,70%, respectivamente. Os autores sugerem que as antocianinas presentes no cálice de *Hibiscus sabdariffa* inibiram a atividade enzimática da ECA ao competir pelo sítio ativo.

### 2.3.3.8 Viabilidade celular

O extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus* foi utilizado para avaliar o efeito citotóxico nas linhagens celulares HepG-2, Caco-2 e A549. Os resultados e comportamento celular dos testes de viabilidade celular *in vitro* (IC<sub>50</sub>, IG<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub>) são apresentados na Figura 2.10. O extrato apresentou valores altos de IC<sub>50</sub> e IG<sub>50</sub> (> 900 µg/mL) para todas as linhagens celulares, sugerindo que é necessário utilizar concentrações mais elevadas para inibir o crescimento de metade das células, significando baixa citotoxicidade e ação antiproliferativa. Pires et al. (2018a) observaram que o extrato hidrometanólico e a infusão das flores de *C. cyanus* exibiram pouca ou nenhuma atividade antiproliferativa, com valores de GI<sub>50</sub> superiores a 400 µg/mL em todas as células testadas, incluindo HepG2, sugerindo ausência de hepatotoxicidade. Em outro estudo, o extrato metanólico de diferentes frações de *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana* não exibiu citotoxicidade em células Caco-2 (IC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL) (OSTAD et al., 2016). De acordo com Radan et al. (2017) a alta concentração (2000 µg/mL) do extrato aquoso de *Centaurea ragusina* L. reduziu a viabilidade celular em 15% comparado com as células não tratadas, corroborando com baixa citotoxicidade em diferentes espécies de *Centaurea*.



**Figura 2.10** - Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), e células de hepatocarcinoma humano (HepG-2) em relação a diferentes concentrações do extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus*.



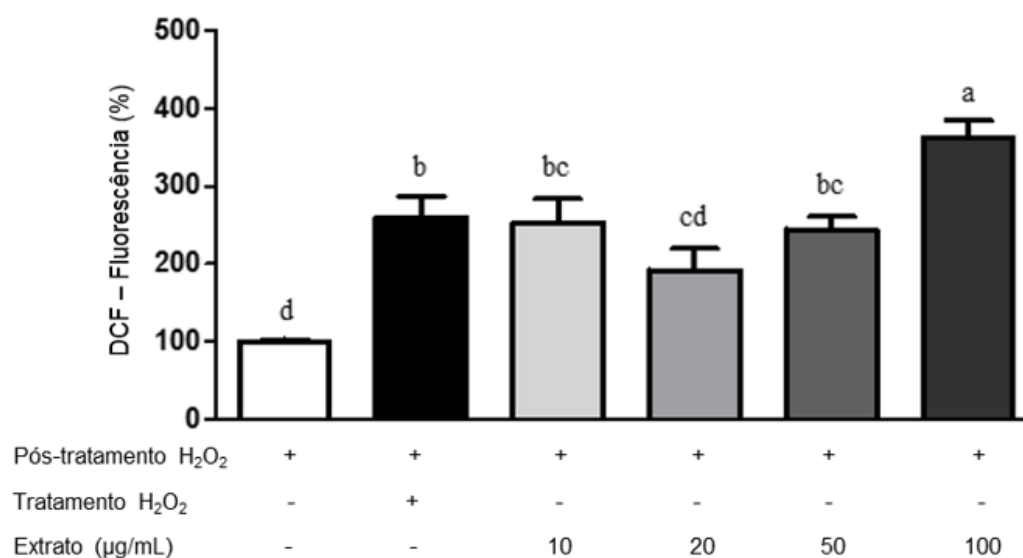
### 2.3.3.9 Medição de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular

Neste estudo, as EROs produzidas em células HepG2 foram expostas a diferentes concentrações do extrato de *C. cyanus* diluído em DCFH-DA. Os níveis de ERO induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram maiores que o controle e similares a alguns grupos de tratamento, Figura 2.11. O extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *C. cyanus* aumentou a produção de EROs em todas as concentrações testadas.

Os polifenóis são conhecidos como sequestradores de vários radicais livres (SOBEH et al., 2017); no entanto, a maioria dos polifenóis possui propriedades antioxidantes e pró-oxidantes devido à eliminação de espécies reativas de oxigênio, que então formam radicais livres semiquinona que podem danificar importantes macromoléculas, como proteínas ou DNA. Além disso, essas reações acompanham a geração de radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e OH<sup>•</sup>, que originam o estresse oxidativo (KHAN et al., 2012).

Apesar do aumento dos níveis de EROs poder induzir a apoptose por meio da ativação de caspases dependente de EROs (CHOI et al., 2016), no presente estudo, a morte celular não foi observada. Baixas concentrações (10 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato de *C. cyanus* originaram a indução de EROs; no entanto, esse aumento não foi suficiente para causar a morte celular. Portanto, os sistemas de reparo antioxidante celular podem ter neutralizado a superprodução de radicais livres, impedindo novas lesões e morte celular. Os sistemas antioxidantes incluem enzimas, como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, que neutralizam os radicais livres adicionais e protegem as células contra os efeitos adversos (YAHYAPOUR et al., 2018). Apesar do extrato otimizado e liofilizado de *C. cyanus* demonstrar ação pró-oxidante neste ensaio, isso não foi suficiente para causar danos nas linhagens celulares. Por outro lado, podemos destacar o fato de que em concentrações semelhantes (0 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) do mesmo extrato apresentou efeito antioxidante e protetor no ensaio de atividade anti-hemolítica.

**Figura 2.11** - Resultados da medição intracelular de ERO em células HepG2 por espectrofluorimetria



Nota: Tratamento = extrato otimizado e liofilizado de pétalas de *Centaurea cyanus* (10-100  $\mu\text{g/mL}$ ). Dados quantitativos são a média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro indicam uma diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.4 CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta foi apropriada para modelar a extração dos compostos fenólicos e propriedades funcionais *in vitro* do extrato das pétalas da *Centaurea cyanus*. A temperatura e o tempo de extração influenciaram significativamente os teores de flavonoides, antocianinas e atividade antioxidante por FRAP. Somente a temperatura influenciou os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides não-antociânicos e atividade antioxidante por DPPH\*. A temperatura de 68,3 °C e o tempo de 51,12 min foi a melhor condição para maximizar o teor de compostos fitoquímicos e as propriedades funcionais *in vitro* do extrato da *C. cyanus*. Os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e os flavonóides isoquercitrina e cumarina, foram os compostos majoritários no extrato otimizado. As antocianinas presentes no extrato otimizado da *C. cyanus* apresentaram um equilíbrio reversível e atividade antioxidante com variação do pH. O extrato aquoso apresentou inibição da peroxidação lipídica, atividade anti-hemolítica e anti-hipertensiva, e baixa citotoxicidade e ação pro-oxidante sem causar danos e morte celular.

Esse é o primeiro trabalho que identifica a presença da antocianina cianidina 3-O-(6-O-succinilglicosídeo)-5-O-glicosídeo e da flavona apigenina 7-O-β-D-glucuronido-4'-O-(6-O-malonilglucosídeo) no extrato aquoso das pétalas de *C. cyanus*, e quantifica os teores de ácido cafeico, ácido ferúlico e cumarina, por meio do LC-ESI-MS/MS. E determina as propriedades funcionais *in vitro* em relação ao efeito do pH na estabilidade e atividade antioxidante das antocianinas, inibição da peroxidação lipídica, atividade anti-hemolítica e anti-hipertensiva, efeito citotóxico/citoprotetor das linhagens celulares A549 e Caco-2, e a atividade de espécies reativas de oxigênio intracelular. Os resultados obtidos permitem uma ampliação do estudo com a aplicação dos compostos fitoquímicos e a determinação de novas propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo*.

### **CAPÍTULO 3 - COMPOSTOS BIOATIVOS DE PÉTALAS DE *Clitoria ternatea* L. MOSTRAM EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTI-HEMOLÍTICO E ANTI-HIPERTENSIVO, INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES DA $\alpha$ -AMILASE E $\alpha$ -GLUCOSIDASE E REDUÇÃO DA OXIDAÇÃO INDUZIDA DO COLESTEROL LDL E DNA**

#### **RESUMO**

A proposta deste estudo foi utilizar uma abordagem estatística com objetivo de otimizar as condições experimentais de extração dos compostos bioativos e analisar as propriedades funcionais *in vitro* do extrato aquoso bruto liofilizado (EBL) e parcialmente purificado (EP) das pétalas de *Clitoria ternatea*. Os resultados demonstraram que os fatores temperatura e o tempo influenciaram ( $p \leq 0,05$ ) na extração dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros físico-químicos. A otimização simultânea indicou que os mesmos teores de compostos bioativos foram extraídos entre 11,7 a 68,3 °C por 8,47 a 51,12 min. A análise por componentes principais revelou a condição experimental de extração baseada no maior teor de compostos fenólicos (40 °C/30 min). O EBLPCT apresentou atividade antimicrobiana, efeito protetor contra a hemólise dos eritrócitos, inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e conversora de angiotensina-I (ECA-I), e inibição da peroxidação lipídica. Os extratos EBLPCT e EPPCT demonstraram capacidade de absorção de radicais de oxigênio, inibição da cisão de DNA, inibição da oxidação do colesterol LDL, atividade antioxidante intracelular contra espécies reativas de oxigênio ( $>100 \mu\text{g/mL}$ ), e nenhuma citotoxicidade ( $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IG}_{50}$  e  $\text{LC}_{50} > 900 \mu\text{g/mL}$ ) frente às linhagens celulares A549, HCT8 e IMR90.

**Palavras-chave:** análise de componentes principais; metodologia de superfície de resposta; antocianinas; alimentos não convencionais; atividade anti-hipertensiva; inibidora da cisão do DNA.

O conteúdo desse capítulo foi publicado na revista Food Research International (Anexo B).

### 3.1 INTRODUÇÃO

A *Clitoria ternatea* L., conhecida como *butterfly pea* e *blue pea*, está amplamente distribuída em regiões com clima tropical e subtropical (JAIN et al., 2003; GRIN, 2017c). As raízes, flores, folhas e sementes são utilizadas na medicina popular indiana por apresentarem várias propriedades terapêuticas (VASISHT et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2008). No Brasil, chamada popularmente de *cunhã*, cultivada como planta forrageira em alguns estados do Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (FLORA DO BRASIL, 2017c; DUEBEUX JUNIOR et al., 2009).

As pétalas azuis contêm uma grande variedade de compostos fenólicos, principalmente as antocianinas nomeadas de ternatinas (A1–A3, B1–B4, C1–C5, D1–D3), e os flavonóis kaempferol, quercetina e mirecitina (TERAHARA et al., 1998; KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). Estudos das propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo* dos diferentes extratos das flores de *C. ternatea* apresentaram atividades antioxidante (MEHMOOD et al., 2019; KAMKAEN; WILKINSON, 2009), anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica (DAISY et al., 2009), antimicrobiana (KAMILLA et al., 2009), e hepatoprotetora (NITHIANANTHAM et al., 2013).

A extração dos compostos bioativos presentes em diferentes matrizes vegetais pode ser otimizado por meio de modelos matemáticos, que descrevem o efeito de diferentes variáveis independentes (por exemplo, tempo, temperatura, solvente) isolados e combinados, utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR) (BELWAL et al., 2016; ESCHER et al., 2018; SANTOS et al., 2018). A MSR é uma ferramenta estatística baseada na análise de regressão aplicada no desenvolvimento, melhoria e otimização de diferentes produtos e processos (YOLMEH; JAFARI, 2017). A metodologia de otimização, baseada na função de desejabilidade (DERRINGER; SUICH, 1980), permite definir as melhores condições na extração de compostos bioativos, e estabelece os valores otimizados para os fatores analisados.

Chong and Gwee (2015) aplicaram a MSR na extração de antocianinas de pétalas frescas de *C. ternatea* por meio do planejamento fatorial. As condições ótimas de extração das antocianinas foram 50 °C, 150 min, proporção sólido para líquido 1 g:15 mL, e poder de sonificação 240 W. Estas condições foram utilizadas por Mehmood et al. (2019) para extrair, por método convencional e ultrassom, os

compostos bioativos das flores de *C. ternatea* e analisarem as atividades biológicas de proteção do DNA, inibição da oxidação plasmática e hemólise de eritrócitos. Entretanto, não foram localizados estudos em relação ao efeito de diferentes temperaturas e tempos na extração dos compostos fenólicos totais e individuais, atividade antioxidante e parâmetros físico-químicos de pétalas de *C. ternatea*. Portanto, no presente estudo, o objetivo foi utilizar uma abordagem estatística para otimizar as condições experimentais de extração dos compostos bioativos e analisar as propriedades funcionais *in vitro* do extrato aquoso bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas de *C. ternatea* em meios químicos, enzimáticos e biológicos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Produtos Químicos e Linhagens de Células

As soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, São Paulo, Brasil). Padrões de ácidos fenólicos (Ácidos gálico, siríngico, 2-hidroxicinâmico, protocatecuico, 2,4-dihidroxibenzóico, 2,5-dihidroxibenzóico, *p*-cumárico, 5-*O*-cafeoilquínico, cafeico, ferulico, rosmarinico, e elágico), flavonoides (quercetina-3-rutinosídeo, procianidina A2, (-)-epicatequina, (+)-catequina, e quercetina), ácido 2-tiobarbitúrico, AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, DMEM/Baixa glicose, glicose DMEM/Ham-F12, DCFH-DA (diacetato de diclorofluoresceína), DMSO (dimetil sulfóxido), DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), enzima conversora da angiotensina-I de intestino de coelho (EC 3.4.15.1), Human LDL, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio), reagente Folin-Ciocalteu, resina Amberlite®XAD7HP e TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (USA). *trans*-Resveratrol, malvidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3-*O*-glucosídeo, delphinidina-3-*O*-glucosídeo, cianidina-3-*O*-glucosídeo, e pelargonidina-3-*O*-glucosídeo foram obtidos da Extrasynthese (France). Ácidos 2,4-dihidroxibenzóico e 2,5-dihidroxibenzóico foram adquiridos da Carl Roth (Karlsruhe, Germany). As células A549, HCT8, e IMR90 foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

### 3.2.2 Matéria-Prima

Flores desidratadas de *C. ternatea*, cultivadas em Campo Grande no estado de Mato Grosso do Sul – Brasil (20° 28' 53" sul, 54° 36' 58" oeste a 592 m altitude) foram adquiridas em setembro de 2016. As pétalas desidratadas foram trituradas em moinho analítico (QUIMIS® modelo 6298A21), e padronizadas com 42 Tyler mesh. Uma exsicata das flores de *C. ternatea* foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob número 21878. O projeto de pesquisa foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil - [www.sisgen.gov.br](http://www.sisgen.gov.br) (protocolo AFEEFA9).

**Figura 3.1** - Flores desidratadas (A), cálices (B) e pétalas (C) de *Clitoria ternatea*.



**Fonte:** Autor.

O delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  contendo quatro repetições no ponto central foi usado para avaliar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* e parâmetros físico-químicos, Tabelas 3.1, 3.3 e 3.4. A temperatura de extração variou de 11,7 (-1,41) a 68,3 °C (+1,41), e o tempo de 8,78 (-1,41) a 51,21 min (+1,41). Os doze extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* foram obtidos aleatoriamente com uma proporção de 0,125:25 (massa:água ultrapura, m/v) em uma cela termostaticada (Microquímica MQBTC 99-20, Brasil) protegida da luz com agitação magnética constante. Os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo, armazenados (8 °C) protegidos da luz e analisados após 24 h da extração. Os valores dos fatores temperatura e tempo, e a proporção de massa:solvente foram definidos após estudos iniciais (dados não apresentados).

### 3.2.3 Determinação da Composição Fenólica, Atividade Antioxidante e Parâmetros Físico-Químicos dos Extratos Aquosos

Os compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos aquosos das pétalas de *C. ternatea* foram quantificados pelo método colorimétrico Azul da Prússia (PRICE; BUTLER, 1977; MARGRAF et al., 2015), e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra seca (mg AGE/100 g).

Os flavonoides totais (FT) e antocianinas totais (AT) foram quantificados de acordo com Lees e Francis (1972) e Pedro et al. (2016). Os teores de FT foram expressos como mg de quercetina equivalente por 100 g de pétalas (mg QE/100 g), e das AT como mg de cianidina-3-glicosídeo equivalente por 100 g de pétalas (mg CGE/100 g).

Os compostos fenólicos não-flavonoides (FNF) e os flavonoides não-antociânicos (FNA) foram estimados subtraindo os teores de flavonoides totais dos compostos fenólicos totais e os teores de antocianinas totais dos flavonoides totais, respectivamente; os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra seca (mg/100 g).

Os compostos fenólicos individuais foram quantificados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, LC-20T Prominence, Japão) equipado com detector de arranjo de fotodiodo (DAD; SPD-M20A), detector de fluorescência (RF-20A), amostrador automático e coluna de forno. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa em coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula 3.5 µm; Agilent, EUA) a 40 °C, volume da injeção de 10 µL e fluxo de 0.5 mL/min. Os compostos fenólicos foram quantificados de acordo com Fidelis et al. (2018). Na quantificação das antocianinas, a fase móvel consistiu de água acidificada com 0,2% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente de eluição foi de 0-3 min, 90% A; 3-6 min, 77% A; 6-10 min, 65% A; 10-12 min, 20% A; e 12-20 min, 100% A. O extrato aquoso das pétalas de *C. ternatea* foi diluído em água ultrapura (1:1 v/v), filtrado em membrana de nylon (45 µm), e injetado em triplicata para análise de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas. Os comprimentos de onda utilizados no detector DAD foram 255, 272, 318, 325 e 360 nm para ácidos fenólicos, 280 e 360 nm para flavonoides, e 520 nm para as antocianinas. No detector de fluorescência foram utilizados o  $\lambda_{\text{emissão}} = 320$



nm e  $\lambda_{\text{extinção}} = 210$  nm para a (-)-epicatequina. A quantificação foi realizada por meio de curva analítica elaborada para cada padrão de compostos fenólicos disponível, e os resultados expressos em mg por 100 g de pétalas (mg/100 g).

A atividade antioxidante (AA) dos extratos aquosos das pétalas de *C. ternatea* foi analisada pela captura do radical DPPH de acordo com Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995), e os resultados expressos em percentual de inibição do radical DPPH. A capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi determinada conforme Benzie e Strain (1996), e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de pétalas (mg AAE/100 g). A capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (CRFC) dos extratos foi determinada conforme Singleton et al. (1999), e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de pétalas (mg GAE/100 g). A atividade quelante frente ao íon  $\text{Cu}^{2+}$  (AQC) foi determinada de acordo com Santos et al. (2017), e os resultados expressos em percentual da formação do complexo de  $\text{Cu}^{2+}$ - violeta de pirocatecol.

As análises de cor instrumental (AC) compreendendo a intensidade de cor (IC), tonalidade (T), proporção dos pigmentos amarelo (PA), vermelho (PV), e azul (PZ) foram determinadas conforme Glories (1984). Uma alíquota de 1.25 mL de extrato aquoso foi diluído com água ultrapura (1:3 v/v). As absorbâncias foram registradas nos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão). A intensidade de cor, tonalidade, e proporção dos pigmentos amarelo, vermelho e azul foram calculadas com as Equações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

$$\text{Intensidade de cor} = \text{Abs}_{420 \text{ nm}} + \text{Abs}_{520 \text{ nm}} + \text{Abs}_{620 \text{ nm}} \quad (1)$$

$$\text{Tonalidade} = \frac{\text{Abs}_{420 \text{ nm}}}{\text{Abs}_{520 \text{ nm}}} \quad (2)$$

$$\% \text{ Pigmento amarelo} = \left( \frac{\text{Abs}_{420 \text{ nm}}}{\text{IC}} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ Pigmento vermelho} = \left( \frac{\text{Abs}_{520 \text{ nm}}}{\text{IC}} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Pigmento azul} = \left( \frac{\text{Abs}_{620 \text{ nm}}}{\text{IC}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Os valores de pH dos extratos aquosos a 25 °C foram determinados por meio da leitura direta em pHmetro (Labmeter, Brasil) previamente calibrado.

### 3.2.4 Modelagem por Metodologia de Superfície de Resposta

Os efeitos da temperatura e tempo na composição fenólica, atividade antioxidante *in vitro* e parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* foi realizada por meio da regressão linear múltipla utilizando a MSR (ESCHER et al., 2018). Os resultados experimentais referentes aos efeitos lineares e quadráticos, e de interação foram modelados com a Equação 6:

$$Y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_i x_i^2 + \beta_j x_j + \beta_j x_j^2 + \beta_{ij} x_i x_j \quad (6)$$

onde o Y é a resposta prevista;  $\beta_0$  é o intercepto;  $\beta_i$  e  $\beta_j$  representam os coeficientes linear e quadrático, respectivamente;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes;  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação entre  $x_i$  e  $x_j$ .

A qualidade estatística do modelo proposto foi analisada pela porcentagem de variabilidade explicada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), e pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ), e pela significância do modelo,  $p \leq 0,10$  (RAMOS et al., 2017). Em adição, a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Na otimização das condições de extração, temperatura e tempo, a função de desejabilidade foi empregada para maximizar a extração de CFT (flavonoides não-antociânicos), atividade antioxidante (atividade quelante do íon  $Cu^{2+}$ ), e parâmetros físico-químicos (tonalidade). Foram consideradas 100 iterações com objetivo de extrair a máxima concentração de CFT, AA e AC (DERRINGER; SUICH, 1980).

### 3.2.5 Análise de Componentes Principais para Seleção do Extrato

Para a análise de componentes principais (ACP) foi considerada a correlação dos doze extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* com as análises da composição fenólica, atividade antioxidante, e parâmetros físico-químicos. A partir dessa correlação foi selecionado o extrato com maior teor de CFT, AA e parâmetros de cor. As triplicatas foram transformadas em escore-z (Equação 7) para a padronização dos resultados em variância unitária. Na sequência, foi elaborada a matriz de correlação dos extratos ( $n = 36$ ) em linhas, e as variáveis de resposta ( $n = 15$ ) em colunas, totalizando 540 pontos de dados (GRANATO et al., 2018).

$$Z_{ij} = \frac{x_{ij} \times \bar{x}_j}{s_j} \quad (7)$$

onde o  $Z$  é o valor padronizado para cada valor de resposta;  $X_{ij}$  representa o valor original para o objeto ( $i$ ) do atributo medido ( $j$ );  $\bar{X}_j$  é o valor médio da variável  $j$ ;  $S_j$  é o desvio padrão para a variável de resposta.

Os fatores de carga maiores ou iguais a 0.60 foram usados para projetar as variáveis no plano bidimensional (CP1 x CP2). O extrato selecionado por ACP foi elaborado seguindo o procedimento descrito no item 2.2, congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e liofilizado sob vácuo de 830  $\mu\text{mL Hg}$  (Liotop, modelo L202, Brasil) para análises posteriores.

### 3.2.6 Purificação Parcial das Antocianinas

A purificação parcial das antocianinas presentes no extrato bruto liofilizado da *C. ternatea* foi realizada conforme Zhang et al. (2011) e Pedro et al. (2016). O extrato liofilizado foi diluído em solução tampão com pH 1 (KCl 0,025 mol/L), e eluído lentamente em coluna de vidro (1.0 cm x 20.0 cm) contendo a resina Amberlite®XAD7HP. Após a adsorção das antocianinas, lavagens com água ultrapura foram efetuadas para a remoção dos compostos solúveis. As antocianinas foram eluídas com 100 mL de solução aquosa contendo 50% de álcool etílico acidificada com 340  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético, TFA (0.04 mol/L), seguida de 150 mL de álcool etílico 100% acidificado com 340  $\mu\text{L}$  de TFA. As soluções foram acondicionadas em local escuro até evaporação total dos solventes. As antocianinas purificadas foram armazenadas protegidas da luz em dessecador.

### 3.2.7 Propriedades Funcionais *in vitro*

#### 3.2.7.1 Propriedades funcionais *in vitro* do extrato bruto liofilizado

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar na cavidade da placa conforme Cleeland e Squires (1991). As suspensões celulares padronizadas ( $10^8$  UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1853), *Salmonella* Enteritidis (S 2887), *Salmonella* Typhimurium (IAL 2431), *Escherichia coli* (IAL 2064), *Bacillus cereus* (IAL 55), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foram misturadas com ágar nutriente; *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1006) com Wort agar, e inoculados na placa de Petri. O EBLPCT

foi diluído em DMSO, e adicionado 2 mg por cavidade. As placas contendo o *B. cereus*, *S. aureus*, e *S. cerevisiae* foram incubadas a 30 °C por 24 h, e as placas com *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, e *L. monocytogenes* a 37 °C por 24 h. O controle positivo constituiu-se de 10 µg/mL de ampicilina, e o controle negativo de DMSO. Os resultados foram expressos como halo de inibição (mm).

A atividade anti-hemolítica do EBLPCT em meio isotônico (NaCl 154 mmol/L) foi realizada conforme as condições experimentais descritas por Escher et al. (2018). A amostra de sangue com tipagem sanguínea O<sup>+</sup> foi obtida do Hospital Universitário da UEPG – Ponta Grossa, Brasil; após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CAAE: 94830318.1.0000.0105; ANEXO C). O extrato foi diluído em solução tampão fosfato de sódio (PBS, 5 mmol/L, pH 7,3) com concentrações de 40, 80 e 120 µg/mL, e os resultados expressos em percentual de hemólise.

A atividade inibitória da enzima ECA-I foi determinada conforme as condições experimentais descritas por Escher et al. (2018). O EBLPCT, 6.7 mg/mL, foi centrifugado e o sobrenadante filtrado (0,45 µm). A quercetina foi usada como padrão de referência, e os resultados expressos em percentual de inibição da atividade da ECA-I. As atividades inibitórias das enzimas α-amilase e α-glicosidase foram determinadas conforme Johnson et al. (2011). O EBLPCT foi diluído em PBS com concentrações de 1 a 20 mg/mL e 50 a 500 µg/mL para a análise da inibição da α-amilase e α-glicosidase, respectivamente. Os resultados foram expressos em percentual de inibição das enzimas.

A inibição da peroxidação lipídica, induzida pelo Fe<sup>2+</sup>, em tecido cerebral de ratos Wistar foi avaliada pela produção de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico conforme as condições experimentais descritas por Stocks et al. (1974), com modificações propostas por Fidelis et al. (2018). O EBLPCT foi diluído em água ultrapura, até concentrações de 1000 a 5000 mg/L, e os resultados expressos em percentual de inibição da peroxidação lipídica. Os tecidos cerebrais de ratos Wistar foram obtidos no biotério da UEPG após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Processo n° 047/2017; ANEXO D).

### 3.2.7.2 Propriedades funcionais *in vitro* do extrato bruto liofilizado e parcialmente purificado

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) do EBLPCT e do EPPCT foi determinada conforme Ambigaipalan et al. (2015) usando a fluoresceína como *probe* e AAPH como indutor da oxidação, e os resultados foram expressos em mg de (+)-catequina equivalente por 100 g de amostra (mg CE/100 g).

A atividade inibitória da cisão do DNA frente ao radical peroxila foi determinada de acordo com Ambigaipalan e Shahidi (2015). O DNA plasmidial superenrolado pBR322 (50 µg/mL) e o padrão de (+)-catequina (10 µg/mL) foram diluídos em PBS (10 mmol/L; pH 7,4), e os extratos (100 µg/mL) foram diluídos em água destilada. Em um tubo 2 µL do extrato foram adicionados juntamente com 2 µL de PBS, 2 µL de DNA, e 4 µL de AAPH (11,25 mmol/L). Os controles foram elaborados com DNA e radical peroxila (controle negativo), (+)-catequina (controle positivo), e DNA (branco). Após 1 h de incubação no escuro a 37 °C, 1 µL do corante de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 50% de glicerol) foram adicionados à mistura de reação. Uma alíquota de 10 µL da mistura foi aplicada em gel de agarose 0,7% preparado com tampão TAE (40 mmol/L Tris; 1 mmol/L EDTA; pH 8,5). A eletroforese foi realizada a 80 V por 90 min usando uma cuba de eletroforese mini gel horizontal (Modelo B1A, Owl Separation Systems Inc., EUA). As bandas de DNA foram visualizadas sob transiluminação de luz UV usando o sistema de documentação em gel Alpha-Imager (Cell Biosciences, EUA). A intensidade (% área) das bandas foi quantificada com o *software* Chemi-Imager 4400 (Cell Biosciences, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de retenção da fita de DNA superenrolado de acordo com a Equação 8:

$$\% \text{ Retenção de DNA} = \left( \frac{\text{DNA hidrolisado}}{\text{DNA controle}} \right) \quad (8)$$

onde, DNA hidrolisado é a área de DNA superenrolado com radical oxidativo e proteína hidrolisada; DNA controle é a área de DNA superenrolado no controle.

A citotoxicidade *in vitro* em relação às linhagens celulares A549 (células epiteliais de adeocarcinoma de pulmão), HCT8 (células epiteliais de carcinoma de cólon), e IMR90 (células de fibroblasto humano de pulmão não tumoral) foi determinada conforme as condições experimentais descritas por Escher et al. (2018). Em microplaca de 96 poços foram transferidos 100 µL/poço das células A549 e HCT8 (1

× 10<sup>4</sup> células/poço) e IMR90 (2 × 10<sup>3</sup> células/poço). As células foram tratadas com 100 µL dos extratos com concentrações de 100 a 900 µg/mL. Os parâmetros de viabilidade celular (IC<sub>50</sub>, IG<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub>) foram calculados de acordo com Ramirez-Mares et al. (2016). Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata e as análises de dose-resposta foram determinadas por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism® (Software GraphPad, USA).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular foi analisada usando a técnica de fluorescência conforme descrito por Escher et al. (2018). As células (6 × 10<sup>4</sup>/poço; IMR90: 2 × 10<sup>4</sup>/poço) foram expostas a três efetivas concentrações de extratos, 10, 50 e 100 µg/mL, meio de cultura (controle negativo) ou 15 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle positivo), por 1 h em solução de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA; 25 mmol/L), a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 µmol/L). A intensidade de fluorescência intracelular das células foi medida em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e com um comprimento de onda de emissão de 538 nm, e os resultados foram expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência.

A atividade inibitória da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) induzida por cobre foi determinada conforme Ambigaipalan e Shahidi (2015). LDL humano foi dialisado em PBS (10 mmol/L; pH 7,4) usando um tubo de diálise com um limite de peso molecular de 12-14 kDa (Fisher Scientific, Canadá). A diálise foi realizada a 4 °C sob uma manta de nitrogênio no escuro por 10 h. LDL diluído (0,4 mL; 0,04 mg/mL) foi misturado com o extrato (50 µL; 2,5 µg/mL). A catequina foi usada como controle positivo (2,5 µg/mL). As amostras e o sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>) foram incubados a 37 °C por 10 min. Após, foi adicionado 50 µL do CuSO<sub>4</sub> (50 µM) nas amostras e incubadas a 37 °C por 10 h. O controle negativo foi elaborado com LDL, CuSO<sub>4</sub> e PBS, e o controle nativo com LDL e PBS. A formação de dienos conjugados foi registrada em 234 nm usando um espectrofotômetro de matriz de diodos (Agilent, Palo Alto, EUA). Os brancos foram executados para cada amostra, substituindo LDL e CuSO<sub>4</sub> por PBS para correção de fundo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da formação de dienos conjugados de acordo com a Equação 9:

$$\% \text{ inhibition CD} = \left[ \left( \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle} - Abs_{nativo}} \right) \right] \times 100 \quad 9$$

$$Abs_{controle} = (A_0^{\circ} - A_t^{\circ})$$

$$Abs_{amostra} = (A_0 - A_t)$$

onde,  $Abs_{controle}$  é a absorbância do controle negativo;  $Abs_{amostra}$  é a absorbância de LDL,  $CuSO_4$  e extrato/catequina; e  $Abs_{nativo}$  é a absorbância do controle nativo.  $A_0$  e  $A_t$  são as absorbâncias no tempo zero e após a incubação, respectivamente; enquanto  $A_0^{\circ}$  e  $A_t^{\circ}$  são os valores das absorbâncias corrigidas para o controle no tempo zero e no tempo  $t$  após a incubação, respectivamente.

### 3.2.8 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em triplicata, e os resultados expressos como média e desvio padrão. O teste de Brown-Forsythe foi aplicado para analisar a homocedasticidade. As diferenças entre os tratamentos foram verificadas pela análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Fisher de diferença mínima significativa, considerando  $p \leq 0,05$ . Os testes  $t$ -Student não pareado e pareado ( $p \leq 0,05$ ) foram aplicados para comparar os resultados obtidos nas análises da atividade inibitória da ECA-I e ORAC, respectivamente. As correlações lineares entre os resultados ( $n=36$ ) foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson considerando  $p \leq 0,05$ . O *software* TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Statistica™ Ltd, USA) foi usado nas análises.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Composição Fenólica, Atividade Antioxidante e Parâmetros Físico-Químicos dos Extratos Aquosos

A composição fenólica total dos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* está representada na Tabela 3.1. Os teores de CFT variaram de 594 a 692 mg AGE/100 g ( $p \leq 0,05$ ). A extração máxima de CFT foi alcançada com a temperatura de 40 °C e tempo de 30 min, mas diferenças significativas não foram observadas em relação ao extrato obtido a 20 °C/15 min. As temperaturas e os tempos de 20 °C/45 min, 60 °C/15 min, 60 °C/45 min, e 11,7 °C/30 min não apresentaram diferenças significativas, ou seja, teores similares de CFT foram extraídos com temperaturas baixas (11,7 °C) e altas (60 °C) por 15, 30 ou 45 min. Do ponto de vista tecnológico,

esses resultados sugerem que é possível elaborar um produto alimentício com as pétalas da *C. ternatea* com os mesmos teores de CFT utilizando temperaturas entre 11,7 a 60 °C.

Na literatura, outros estudos demonstraram teores de compostos fenólicos superiores estando relacionados com o uso de flores integrais de *C. ternatea*, metodologias de extração e quantificação. Mehmood et al. (2019) determinaram 7200 mg AGE/100 g de CFT no extrato aquoso obtido a 50 °C/150 min e liofilizado de flores secas de *C. ternatea*. Azima et al. (2017) quantificaram 7690 mg AGE/100 g de CFT no extrato aquoso obtido a 100 °C/10 min e liofilizado de flores frescas de *C. ternatea*.

Os teores de FT variaram de 546 a 621 mg QE/100 g ( $p \leq 0,05$ ). Na extração com a temperatura de 60 °C/45 min obteve-se o maior teor de FT, Tabela 3.1. Azima et al. (2017) determinaram, no extrato aquoso obtido a 100 °C/10 min e liofilizado de flores frescas de *C. ternatea*, o valor de 1619 mg QE/100 g de FT.

Os teores de AT variaram de 353 a 393 mg CGE/100 g ( $p \leq 0,05$ ). A extração máxima de AT foi alcançada com a temperatura de 40 °C/30 min, mas diferenças significativas não foram observadas em relação ao extrato obtido a 60 °C/45 min. O mesmo teor de antocianinas, 374 mg CGE/100 g, foi extraído com a menor (11,7 °C) e maior (68,3 °C) temperatura do DCCR, Tabela 3.1. Chong e Gwee (2015) observaram, em extrato etanólico acidificado com HCl, o valor de 32,5 mg/100 g, e em extrato aquoso o valor de 112,6 mg delfidina-3-glucosídeo/100 g em pétalas frescas de *C. ternatea*. Enquanto Azima et al. (2017) determinaram, no extrato aquoso liofilizado de flores frescas de *C. ternatea*, teores de 693 mg CGE/100 g de AT.

O teor de compostos fenólicos não-flavonoides (FNF) variou de 25 a 100 mg/100 g ( $p \leq 0,05$ ). O teor máximo de FNF foi a 40 °C/30 min, ensaio 10, não apresentou diferença significativa do extrato obtido a 20 °C/15 min. Também não foram observadas diferenças significativas entre os extratos obtidos com as temperaturas e os tempos de 20 °C/45 min, 60 °C/15 min, 60 °C/45 min, 40 °C/8,78 min, 40 °C/51,21 min, e 40 °C/30 min. Os teores de flavonoides não-antociânicos (FNA) variaram de 180 a 225 mg/100 g ( $p \leq 0,05$ ). As maiores temperaturas influenciaram na extração destes compostos, o maior teor de FNA ocorreu acima de 60 °C, o tempo não influenciou significativamente, Tabela 3.1.



**Tabela 3.1** – Composição fenólica dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea* de acordo com experimental design (valores codificados e reais).

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Compostos Fenólicos Totais (mg AGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Antocianinas (mg CGE/100 g)	Fenólicos não-flavonoides (mg/100 g)	Flavonoides não-antociânicos (mg/100 g)
1	-1 (20)	-1 (15)	677 ± 7 <sup>ab</sup>	580 ± 1 <sup>f</sup>	382 ± 1 <sup>d</sup>	97 ± 7 <sup>a</sup>	199 ± 1 <sup>g</sup>
2	-1 (20)	1 (45)	646 ± 6 <sup>cd</sup>	594 ± 1 <sup>c</sup>	386 ± 1 <sup>c</sup>	52 ± 6 <sup>c</sup>	208 ± 1 <sup>d</sup>
3	1 (60)	-1 (15)	652 ± 22 <sup>c</sup>	600 ± 1 <sup>b</sup>	379 ± 1 <sup>f</sup>	52 ± 22 <sup>bc</sup>	222 ± 1 <sup>b</sup>
4	1 (60)	1 (45)	665 ± 8 <sup>bc</sup>	621 ± 1 <sup>a</sup>	395 ± 1 <sup>a</sup>	45 ± 8 <sup>cd</sup>	225 ± 1 <sup>a</sup>
5	-1,41 (11,7)	0 (30)	649 ± 11 <sup>cd</sup>	576 ± 1 <sup>h</sup>	374 ± 1 <sup>g</sup>	72 ± 11 <sup>b</sup>	202 ± 0 <sup>e</sup>
6	1,41 (68,3)	0 (30)	620 ± 18 <sup>ef</sup>	594 ± 1 <sup>c</sup>	374 ± 1 <sup>g</sup>	25 ± 17 <sup>d</sup>	221 ± 1 <sup>c</sup>
7	0 (40)	-1,41 (8,78)	594 ± 16 <sup>g</sup>	549 ± 1 <sup>j</sup>	369 ± 1 <sup>h</sup>	46 ± 16 <sup>cd</sup>	180 ± 0 <sup>l</sup>
8	0 (40)	1,41 (51,21)	630 ± 13 <sup>de</sup>	589 ± 1 <sup>e</sup>	389 ± 1 <sup>b</sup>	41 ± 13 <sup>cd</sup>	200 ± 1 <sup>f</sup>
9	0 (40)	0 (30)	596 ± 8 <sup>g</sup>	546 ± 1 <sup>l</sup>	353 ± 1 <sup>l</sup>	50 ± 8 <sup>c</sup>	193 ± 1 <sup>j</sup>
10	0 (40)	0 (30)	692 ± 14 <sup>a</sup>	591 ± 1 <sup>d</sup>	396 ± 1 <sup>a</sup>	100 ± 14 <sup>a</sup>	195 ± 1 <sup>i</sup>
11	0 (40)	0 (30)	620 ± 7 <sup>e</sup>	578 ± 1 <sup>g</sup>	381 ± 1 <sup>e</sup>	42 ± 7 <sup>cd</sup>	197 ± 0 <sup>h</sup>
12	0 (40)	0 (30)	599 ± 8 <sup>fg</sup>	562 ± 1 <sup>i</sup>	367 ± 1 <sup>j</sup>	37 ± 8 <sup>cd</sup>	194 ± 0 <sup>i</sup>
<i>p</i> -Valor <sup>1</sup>			0,919	0,986	0,852	0,928	0,985
<i>p</i> -Valor <sup>2</sup>			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: <sup>1</sup>Valores de probabilidade obtidos para a avaliação da homocedasticidade. <sup>2</sup>Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

Os compostos fenólicos individuais quantificados por HPLC-DAD-UV nos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* estão demonstrados na Tabela 3.2. Os ácidos fenólicos quantificados foram o ácido gálico (1,3 a 21,8 mg/100 g), síringico (9,3 a 11,1 mg/100 g), 2-hidroxicinâmico (1,1 a 2,0 mg/100 g), protocatecuico (23,1 a 39,3 mg/100 g), 2,4 dihidroxibenzóico (74,2 a 77,5 mg/100 g), *p*-cumárico (8,3 a 20,3 mg/100 g), cafeico (21,4 a 23,3 mg/100 g), ferúlico (7,1 a 8,5 mg/100 g), além do ácido elágico (40,0 a 70,8 mg/100 g). Os flavonoides quantificados foram a quercetina-3-rutinosídeo (29,0 a 36,8 mg/100 g), procianidina A2 (33,1 a 73,8 mg/100 g), (-)-epicatequina (0,9 a 2,6 mg/100 g), e delphinidina-3-glicosídeo (31,8 a 40,5 mg/100 g).

A maior concentração de ácidos fenólicos, 201,3 mg/100 g, foi verificada no extrato obtido com a temperatura de 68,3 °C e tempo de 30 min. Diferenças significativas não foram observadas no teor do ácido síringico no extrato obtido a 60 °C/45 min, assim como nos teores dos ácidos 2-hidroxicinâmico extraídos a 11,7 e 40 °C por 30 min; protocatecuico a 40 °C/30 min; *p*-cumárico a 40 °C/30 min; cafeico a 20 e 60 °C por 45 min; e elágico a 40 °C/30 min, 60 °C por 15 e 45 min, Tabela 3.2. Azima et al. (2017) identificaram os ácidos gálico (67 mg/100 g), protocatecuico (72 mg/100 g), e o clorogênico (54 mg/100 g) no extrato aquoso liofilizado de flores frescas de *C. ternatea*. Kaisoon et al. (2011) identificaram os ácidos gálico (3,3 mg/100 g), protocatecuico (0,2 mg/100 g), *p*-cumárico (1,2 mg/100 g), cafeico (1,0 mg/100 g), e o ferúlico (3,5 mg/100 g) no extrato metanólico das flores de *C. ternatea* contendo ácido clorídrico e *tert*-butil-hidroquinona.

Os flavonoides procianidina A2 e (-)-epicatequina foram quantificados nos doze extratos aquosos, em contrapartida a quercetina-3-rutinosídeo foi quantificada somente nos extratos obtidos acima de 60 °C. Temperaturas próximas a 100 °C por longo tempo aumentam a transferência de massa da amostra para o solvente de extração, mas podem ocasionar a degradação da maioria dos flavonoides por serem compostos termo sensíveis (CHUA, 2013).

**Tabela 3.2** - Composição fenólica individual dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea* analisados por HPLC-DAD-UV.  
(continua)

Compostos identificados	Extratos						
	20 °C/15 min	20 °C/45 min	60 °C/15 min	60 °C/45 min	11,7 °C/30 min	68,3 °C/30 min	40 °C/8,78 min
<b>Ácidos fenólicos</b>							
Ácido gálico	4,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	ND	12,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	ND	21,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	ND
Ácido síringico	9,5 ± 0,2 <sup>def</sup>	10,1 ± 0,3 <sup>bc</sup>	10,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	10,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,1 <sup>ef</sup>	11,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,2 <sup>f</sup>
Ácido 2-hidroxicinâmico	1,4 ± 0,1 <sup>bcd</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>d</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>cd</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>bc</sup>
Ácido protocatecuico	23,1 ± 0,3 <sup>e</sup>	34,5 ± 0,2 <sup>bc</sup>	33,4 ± 1,7 <sup>bcd</sup>	35,5 ± 2,0 <sup>bc</sup>	35,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	39,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	30,5 ± 1,2 <sup>d</sup>
Ácido 2,4-dihidroxibenzóico	77,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	77,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	74,2 ± 0,2 <sup>g</sup>	77,0 ± 0,2 <sup>bc</sup>	76,6 ± 0,2 <sup>cd</sup>	76,2 ± 0,1 <sup>e</sup>	76,6 ± 0,1 <sup>d</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	13,4 ± 0,7 <sup>de</sup>	15,7 ± 1,4 <sup>cd</sup>	10,6 ± 0,7 <sup>fg</sup>	8,3 ± 1,0 <sup>g</sup>	17,0 ± 0,8 <sup>bc</sup>	20,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,7 ± 0,9 <sup>ef</sup>
Ácido cafeico	21,4 ± 0,1 <sup>g</sup>	23,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	22,1 ± 0,4 <sup>f</sup>	22,9 ± 0,3 <sup>abc</sup>	22,8 ± 0,1 <sup>bcd</sup>	23,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	22,4 ± 0,2 <sup>def</sup>
Ácido ferúlico	ND	7,7 ± 0,1 <sup>bc</sup>	7,1 ± 0,1 <sup>d</sup>	7,8 ± 0,2 <sup>bc</sup>	8,0 ± 0,1 <sup>abc</sup>	7,4 ± 0,1 <sup>cd</sup>	7,6 ± 0,1 <sup>bcd</sup>
<i>Total de ácidos fenólicos (mg/100 g)</i>	150,4	169,7	170,7	167,6	171,7	201,3	160,4
<b>Flavonoides</b>							
Quercetina-3-rutinosídeo	ND	ND	36,8 ± 6,0 <sup>a</sup>	29,0 ± 3,5 <sup>b</sup>	ND	33,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	ND
Procianidina A2	63,2 ± 6,5 <sup>abcd</sup>	66,1 ± 10,0 <sup>abc</sup>	67,4 ± 4,4 <sup>abc</sup>	64,5 ± 6,2 <sup>abc</sup>	56,2 ± 2,3 <sup>cd</sup>	71,4 ± 2,0 <sup>ab</sup>	42,0 ± 6,6 <sup>ef</sup>
(-)-Epicatequina	1,6 ± 0,1 <sup>cde</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>g</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>g</sup>
<i>Total de flavonoides (mg/100 g)</i>	64,8	68,0	106,5	95,7	57,0	107,7	42,9
<b>Antocianinas</b>							
Delfinidina 3-glicosídeo	40,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	32,9 ± 0,1 <sup>de</sup>	33,1 ± 1,4 <sup>de</sup>	32,2 ± 0,3 <sup>de</sup>	31,8 ± 0,9 <sup>e</sup>	35,4 ± 1,5 <sup>c</sup>	32,7 ± 0,4 <sup>de</sup>
<i>Total de antocianinas (mg/100 g)</i>	40,5	32,9	33,1	32,2	31,8	35,4	32,7
<b>Outros</b>							
Ácido elágico	58,8 ± 3,5 <sup>bcd</sup>	60,4 ± 4,9 <sup>bcd</sup>	70,8 ± 8,8 <sup>a</sup>	67,3 ± 7,4 <sup>ab</sup>	53,5 ± 2,0 <sup>def</sup>	65,9 ± 1,4 <sup>ab</sup>	44,9 ± 3,9 <sup>fg</sup>
<i>Total de outros (mg/100 g)</i>	58,8	60,4	70,8	67,3	53,5	65,9	44,9

**Tabela 3.2** - Composição fenólica individual dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea* analisados por HPLC-DAD-UV. (conclusão)

Compostos identificados	Extratos					p-Valor <sup>1</sup>
	40 °C/51,21 min	40 °C/30 min	40 °C/30 min	40 °C/30 min	40 °C/30 min	
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Ácido gálico	2,1 ± 0,5 <sup>d</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	p<0,001
Ácido síringico	9,9 ± 0,4 <sup>bcd</sup>	9,7 ± 0,3 <sup>bcd</sup>	9,8 ± 0,3 <sup>bcd</sup>	9,6 ± 0,3 <sup>bcd</sup>	9,9 ± 0,2 <sup>bc</sup>	p<0,001
Ácido 2-hidroxicinâmico	1,1 ± 0,2 <sup>cd</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>d</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>bcd</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	p<0,001
Ácido protocatecuico	34,1 ± 2,2 <sup>bc</sup>	32,6 ± 2,2 <sup>cd</sup>	35,6 ± 4,1 <sup>bc</sup>	34,8 ± 2,0 <sup>bc</sup>	39,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	p<0,001
Ácido 2,4 dihidroxibenzóico	77,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	77,2 ± 0,2 <sup>ab</sup>	77,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	76,7 ± 0,1 <sup>cd</sup>	75,7 ± 0,1 <sup>f</sup>	p<0,001
Ácido p-cumárico	13,6 ± 2,0 <sup>de</sup>	13,2 ± 2,0 <sup>e</sup>	14,9 ± 2,7 <sup>cde</sup>	14,0 ± 1,6 <sup>de</sup>	18,2 ± 1,1 <sup>ab</sup>	p<0,001
Ácido cafeico	22,5 ± 0,4 <sup>cdef</sup>	22,5 ± 0,3 <sup>cdef</sup>	22,3 ± 0,2 <sup>ef</sup>	22,3 ± 0,2 <sup>ef</sup>	22,5 ± 0,1 <sup>cde</sup>	p<0,001
Ácido ferúlico	7,5 ± 0,1 <sup>cd</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>cd</sup>	8,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>bc</sup>	8,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>	p<0,001
Total de ácidos fenólicos (mg/100 g)	168,4	165,1	169,6	166,5	175,9	
<b>Flavonoides</b>						
Quercetina-3-rutinosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	p<0,001
Procianidina A2	42,7 ± 6,8 <sup>ef</sup>	52,5 ± 7,9 <sup>de</sup>	33,1 ± 3,6 <sup>f</sup>	73,8 ± 7,5 <sup>a</sup>	60,3 ± 10,2 <sup>bcd</sup>	p<0,001
(-)-Epicatequina	1,4 ± 0,1 <sup>def</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>cd</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>fg</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>cd</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>ef</sup>	p<0,001
Total de flavonoides (mg/100 g)	44,1	54,1	34,2	75,4	61,6	
<b>Antocianinas</b>						
Delfinidina 3-glicosídeo	33,9 ± 1,2 <sup>cd</sup>	32,1 ± 0,4 <sup>de</sup>	37,4 ± 2,3 <sup>b</sup>	38,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	32,2 ± 1,2 <sup>de</sup>	p<0,001
Total de antocianinas (mg/100 g)	33,9	32,1	37,4	38,3	32,2	
<b>Outros</b>						
Ácido elágico	47,2 ± 4,2 <sup>efg</sup>	54,5 ± 4,8 <sup>de</sup>	40,0 ± 1,3 <sup>g</sup>	64,7 ± 4,9 <sup>abc</sup>	56,7 ± 6,7 <sup>cd</sup>	p<0,001
Total de outros (mg/100 g)	47,2	54,5	40,0	64,7	56,7	

Nota: ND = não detectado. <sup>1</sup>Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA. Letras diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

O maior teor de flavonoides, 107,7 mg/100 g, ocorreu a 68,3 °C/30 min, e diferenças significativas não foram observadas nos teores da quercetina-3-rutinosídeo (60 °C/15 min) e procianidina A2 (20 °C/15 e 45 min; 40 °C/30 min; 60 °C/15 e 45 min). A delphinidina-3-glicosídeo foi quantificada com maior teor, 40,5 mg/100 g, no extrato obtido a 20 °C/15 min, Tabela 3.2. Destaca-se que Azima et al. (2017) quantificaram os compostos, no extrato aquoso liofilizado de flores frescas de *C. ternatea*, quercetina-3-rutinosídeo (296 mg/100 g), (-)-epicatequina (321 mg/100 g), miricetina (100 mg/100 g), quercetina (1 mg/100 g), kaempferol (18 mg/100 g), e a delphinidina (74 mg/100 g). Enquanto, Kaisoon et al. (2011) quantificaram os compostos, no extrato metanólico das flores de *C. ternatea* em HCl e *tert*-butil-hidroquinona, quercetina-3-rutinosídeo (3,8 mg/100 g), miricetina (0,5 mg/100 g), quercetina (6,9 mg/100 g), e o kaempferol (0,4 mg/100 g).

A Tabela 3.3 apresenta a atividade antioxidante dos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea*. Os extratos apresentaram 55 a 65% de inibição do radical DPPH ( $p \leq 0,05$ ). Somente os extratos acima de 40 °C influenciaram significativamente, os extratos a 60 °C/15 e 45 min apresentaram maior atividade antioxidante, 65% inibição, e alto teor de flavonoides e antocianinas, 621 mg QE/100 g e 395 mg CGE/100 g, respectivamente. O extrato metanólico das flores de *C. ternatea* contendo ácido clorídrico e *tert*-butil-hidroquinona inibiu 32,7% do radical DPPH (Kaisoon et al., 2011).

A temperatura e o tempo influenciaram os valores da atividade antioxidante por FRAP e CRFC, variaram de 1243 a 1574 mg AAE/100 g e de 1382 a 1837 AGE/100 g ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente (Tabela 3.3). Os maiores valores de FRAP e de CRFC ocorreram a 20 °C por 45 min. Na análise por FRAP diferenças significativas não foram observadas entre a temperatura de 11,7 °C e as temperaturas de 40, 60 e 68,3 °C – ensaios 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, e 12. Enquanto para o ensaio de CRFC, os extratos obtidos a 20 °C/45 min e 40 °C/30 min não apresentaram diferenças significativas. Os extratos apresentaram entre 66 a 81% de formação do complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -violeta de pirocatecol ( $p \leq 0,05$ ), indicando uma baixa capacidade de ligação do íon  $\text{Cu}^{2+}$  com os compostos *orto*-difenólicos presentes nos extratos. A maior atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$  ocorreu no extrato a 60 °C/15 min, Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** - Atividade antioxidante, redutora e quelante de cobre dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea* de acordo com experimental design (valores codificados e reais).

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	DPPH* (% inibição)	FRAP (mg AAE/100 g)	Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu (mg AGE/100 g)	Atividade quelante de cobre (% formação do complexo Cu <sup>2+</sup> - violeta de pirocatecol)
1	-1 (20)	-1 (15)	56 ± 0 <sup>c</sup>	1243 ± 69 <sup>c</sup>	1652 ± 157 <sup>bc</sup>	77 ± 1 <sup>cd</sup>
2	-1 (20)	1 (45)	56 ± 1 <sup>c</sup>	1574 ± 15 <sup>a</sup>	1837 ± 80 <sup>a</sup>	81 ± 0 <sup>a</sup>
3	1 (60)	-1 (15)	65 ± 1 <sup>a</sup>	1447 ± 11 <sup>b</sup>	1548 ± 81 <sup>cdef</sup>	66 ± 2 <sup>g</sup>
4	1 (60)	1 (45)	65 ± 0 <sup>a</sup>	1362 ± 55 <sup>b</sup>	1611 ± 32 <sup>cd</sup>	69 ± 2 <sup>f</sup>
5	-1,41 (11,7)	0 (30)	60 ± 1 <sup>b</sup>	1357 ± 104 <sup>b</sup>	1454 ± 29 <sup>fg</sup>	75 ± 1 <sup>de</sup>
6	1,41 (68,3)	0 (30)	64 ± 0 <sup>a</sup>	1387 ± 66 <sup>b</sup>	1462 ± 60 <sup>efg</sup>	70 ± 0 <sup>f</sup>
7	0 (40)	-1,41 (8,78)	60 ± 1 <sup>b</sup>	1251 ± 81 <sup>c</sup>	1382 ± 74 <sup>g</sup>	71 ± 0 <sup>f</sup>
8	0 (40)	1,41 (51,21)	61 ± 0 <sup>b</sup>	1437 ± 23 <sup>b</sup>	1587 ± 83 <sup>cde</sup>	74 ± 0 <sup>e</sup>
9	0 (40)	0 (30)	55 ± 1 <sup>c</sup>	1250 ± 75 <sup>c</sup>	1539 ± 21 <sup>cdef</sup>	81 ± 2 <sup>ab</sup>
10	0 (40)	0 (30)	63 ± 2 <sup>ab</sup>	1440 ± 48 <sup>b</sup>	1504 ± 16 <sup>defg</sup>	79 ± 0 <sup>ab</sup>
11	0 (40)	0 (30)	61 ± 1 <sup>b</sup>	1406 ± 62 <sup>b</sup>	1473 ± 66 <sup>efg</sup>	78 ± 2 <sup>bc</sup>
12	0 (40)	0 (30)	61 ± 5 <sup>b</sup>	1398 ± 55 <sup>b</sup>	1772 ± 112 <sup>ab</sup>	77 ± 2 <sup>cd</sup>
<i>p</i> -Valor <sup>1</sup>			0,194	0,866	0,824	0,429
<i>p</i> -Valor <sup>2</sup>			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: <sup>1</sup>Valores de probabilidade obtidos para a avaliação da homocedasticidade. <sup>2</sup>Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

Neste estudo, os extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea* apresentaram correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) da atividade antioxidante com flavonoides ( $r_{FRAP} = 0,4869$ ;  $r_{DPPH} = 0,5268$ ), antocianinas ( $r_{FRAP} = 0,4608$ ), e com os flavonoides não-antociânicos ( $r_{AQC} = -0,5264$ ;  $r_{DPPH} = 0,4895$ ). Entre os compostos individuais, os ácidos síringico e gálico apresentaram correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) com a atividade quelante do íon  $Cu^{2+}$ ,  $r = -0,3503$  e  $r = -0,5643$ , e com a inibição do radical DPPH,  $r = 0,4610$  e  $r = 0,5988$ , respectivamente; o ácido protocatecuico com FRAP ( $r = 0,3677$ ) e DPPH ( $r = 0,4132$ ). As diferentes estruturas químicas dos compostos fenólicos permitem a estabilização dos radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio e elétrons, e o poder quelante de íons de metais devido ao arranjo de grupos hidroxila/metoxila e do grupo carbonila (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A Tabela 3.4 apresenta os parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea*. Os índices de cor dos extratos foram influenciados pelas diferentes temperaturas e tempos de extração, no qual a intensidade de cor variou de 0,982 a 1,088 u. a., e a tonalidade variou de 0,446 a 0,600 u. a. ( $p \leq 0,05$ ). A intensidade de cor máxima foi observada no extrato a 20 °C/45 min. A tonalidade máxima foi verificada no extrato obtido a 40 °C/30 min, podendo estar relacionada com o menor teor de antocianinas, 353 mg CGE/100 g.

A cor azul intensa dos extratos aquosos de pétalas de flores *C. ternatea* é devido a presença das antocianinas. A análise de correlação da intensidade de cor demonstrou uma correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) com os compostos fenólicos totais ( $r = 0,5113$ ), antocianinas totais ( $r = 0,5856$ ), e com os fenólicos não-flavonoides ( $r = 0,4279$ ). A tonalidade apresentou uma correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) com os flavonoides ( $r = -0,5135$ ) e flavonoides não-antociânicos ( $r = -0,5606$ ). Segundo Glories (1984) a intensidade de cor é a soma das densidades ópticas, medidas nos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm, que correspondem às cores amarela, vermelha e violeta-azul (antocianinas), respectivamente. A diminuição do valor da tonalidade ( $A_{420nm}/A_{520nm}$ ) ocorre devido a maiores teores de antocianinas (GLORIES, 1984).

**Tabela 3.4** - Parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea* de acordo com experimental design (valores codificados e reais)

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Intensidade de cor (u. a.)	Tonalidade (u. a.)	Pigmento amarelo (% $\lambda=420$ nm)	Pigmento vermelho (% $\lambda=520$ nm)	Pigmento azul (% $\lambda=620$ nm)	pH
1	-1 (20)	-1 (15)	1,075 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>	0,596 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>	16,739 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>	28,084 $\pm$ 0,015 <sup>f</sup>	55,177 $\pm$ 0,024 <sup>j</sup>	5,04 $\pm$ 0,06 <sup>g</sup>
2	-1 (20)	1 (45)	1,088 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,597 $\pm$ 0,00 <sup>bc</sup>	17,346 $\pm$ 0,062 <sup>a</sup>	29,053 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	53,601 $\pm$ 0,063 <sup>m</sup>	4,70 $\pm$ 0,03 <sup>i</sup>
3	1 (60)	-1 (15)	1,006 $\pm$ 0,001 <sup>h</sup>	0,450 $\pm$ 0,002 <sup>i</sup>	12,554 $\pm$ 0,050 <sup>i</sup>	27,923 $\pm$ 0,016 <sup>h</sup>	59,523 $\pm$ 0,034 <sup>b</sup>	5,07 $\pm$ 0,01 <sup>fg</sup>
4	1 (60)	1 (45)	1,050 $\pm$ 0,001 <sup>f</sup>	0,498 $\pm$ 0,001 <sup>i</sup>	14,004 $\pm$ 0,008 <sup>h</sup>	28,136 $\pm$ 0,049 <sup>e</sup>	57,860 $\pm$ 0,048 <sup>d</sup>	5,14 $\pm$ 0,01 <sup>de</sup>
5	-1,41 (11,,7)	0 (30)	1,080 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,599 $\pm$ 0,001 <sup>ab</sup>	16,950 $\pm$ 0,018 <sup>b</sup>	28,280 $\pm$ 0,023 <sup>d</sup>	54,770 $\pm$ 0,005 <sup>l</sup>	5,11 $\pm$ 0,03 <sup>ef</sup>
6	1,41 (68,3)	0 (30)	0,983 $\pm$ 0,001 <sup>i</sup>	0,446 $\pm$ 0,002 <sup>l</sup>	12,343 $\pm$ 0,048 <sup>j</sup>	27,670 $\pm$ 0,028 <sup>i</sup>	59,986 $\pm$ 0,031 <sup>a</sup>	5,17 $\pm$ 0,02 <sup>cd</sup>
7	0 (40)	-1,41 (8,78)	1,008 $\pm$ 0,002 <sup>h</sup>	0,537 $\pm$ 0,002 <sup>f</sup>	14,347 $\pm$ 0,043 <sup>g</sup>	26,711 $\pm$ 0,023 <sup>j</sup>	58,942 $\pm$ 0,040 <sup>c</sup>	5,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
8	0 (40)	1,41 (51,21)	1,051 $\pm$ 0,001 <sup>f</sup>	0,527 $\pm$ 0,002 <sup>g</sup>	14,811 $\pm$ 0,043 <sup>e</sup>	28,100 $\pm$ 0,034 <sup>ef</sup>	57,089 $\pm$ 0,054 <sup>e</sup>	5,19 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
9	0 (40)	0 (30)	0,982 $\pm$ 0,002 <sup>i</sup>	0,600 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	16,768 $\pm$ 0,034 <sup>c</sup>	27,936 $\pm$ 0,030 <sup>h</sup>	55,295 $\pm$ 0,011 <sup>i</sup>	5,11 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>
10	0 (40)	0 (30)	1,054 $\pm$ 0,001 <sup>e</sup>	0,509 $\pm$ 0,001 <sup>h</sup>	14,606 $\pm$ 0,016 <sup>f</sup>	28,707 $\pm$ 0,023 <sup>c</sup>	56,687 $\pm$ 0,007 <sup>f</sup>	4,80 $\pm$ 0,01 <sup>h</sup>
11	0 (40)	0 (30)	1,065 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	0,557 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	15,613 $\pm$ 0,034 <sup>d</sup>	28,035 $\pm$ 0,036 <sup>g</sup>	56,352 $\pm$ 0,035 <sup>g</sup>	5,16 $\pm$ 0,02 <sup>cd</sup>
12	0 (40)	0 (30)	1,039 $\pm$ 0,001 <sup>g</sup>	0,542 $\pm$ 0,002 <sup>e</sup>	15,651 $\pm$ 0,038 <sup>d</sup>	28,865 $\pm$ 0,032 <sup>b</sup>	55,484 $\pm$ 0,006 <sup>h</sup>	5,24 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<i>p</i> -Valor <sup>1</sup>			0,777	0,981	0,947	0,990	0,802	0,477
<i>p</i> -Valor <sup>2</sup>			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: <sup>1</sup>Valores de probabilidade obtidos para a avaliação da homocedasticidade. <sup>2</sup>Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).



Os pigmentos amarelo, vermelho e azul dos extratos foram influenciados pelas condições de extração, variando de 12,34 a 17,35%, 26,71 a 29,05%, 53,60 a 59,99% ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente. Maior porcentagem do pigmento amarelo (17,35%) e do vermelho (29,05%) foi verificada na extração a 20 °C/45 min, enquanto o pigmento azul (59,99%) foi na extração a 68,3 °C/30 min, Tabela 3.4. O pigmento amarelo apresentou uma correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ) com flavonoides ( $r = -0,4128$ ), fenólicos não-flavonoides ( $r = 0,3360$ ), e flavonoides não-antociânicos ( $r = -0,4783$ ). O pigmento vermelho correlacionou-se com os compostos fenólicos totais ( $r = 0,3813$ ) e as antocianinas totais ( $r = 0,3370$ ). Enquanto o pigmento azul correlacionou-se com os fenólicos não-flavonoides ( $r = -0,3509$ ).

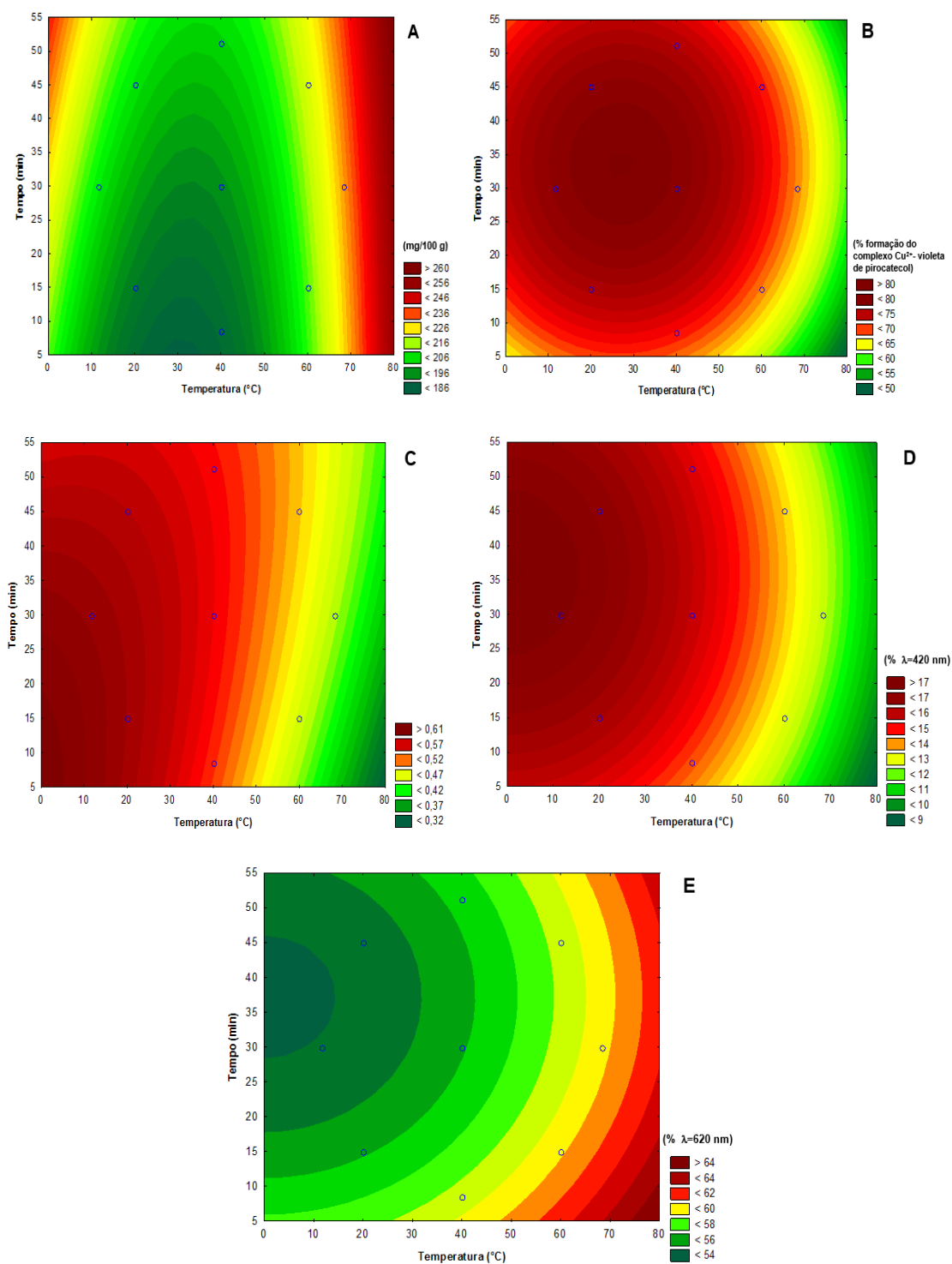
Os valores de pH dos extratos variaram de 4,70 a 5,30 ( $p \leq 0,05$ ). O maior valor de pH foi verificado no extrato a 40 °C/8,78 min. Diferenças significativas não foram observadas entre os extratos obtidos a 68,3 °C/30 min, 40 °C/51,21 min e 40 °C/30 min, Tabela 3.4.

### 3.3.2 Modelagem dos Dados por MSR e ACP

A MSR foi aplicada para avaliar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, e parâmetros físico-químicos, e os resultados foram modelados estatisticamente, Tabela 3.5. Somente os modelos de regressão múltipla propostos para flavonoides não-antociânicos, atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , tonalidade, pigmento amarelo e azul foram significativos ( $p < 0,001$ ), e explicaram acima de 77% ( $R^2_{\text{adj}} > 0,77$ ), a variabilidade dos dados e os resíduos seguiram a distribuição normal.

As curvas de contorno demonstram os efeitos da temperatura e do tempo nas variáveis de resposta ( $p < 0,10$ ), Figura 3.2A-E. O teor de flavonoides não-antociânicos apresentou efeito positivo do tempo linear e da maior temperatura quadrática, Figura 3.2A. A formação do complexo  $\text{Cu}^{2+}$ - violeta de pirocatecol mostrou uma influência positiva da temperatura e do tempo linear, Figura 3.2B. Menores temperaturas e tempos intermediários de extração apresentaram um efeito positivo na tonalidade e porcentagem do pigmento amarelo, Figura 3.2C-D. O pigmento azul apresentou um efeito positivo da maior temperatura e tempo intermediário, Figura 3.2E.

**Figura 3.2** - Efeito da temperatura e tempo na extração de flavonoides não-antocianônicos (A), atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$  (B), tonalidade (C), pigmento amarelo (D), e pigmento azul (E) em extratos aquosos das pétalas de *Clitoria ternatea*.



**Tabela 3.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea*.

(continua)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 90% Confiança	+ 90% Confiança
<b>Compostos fenólicos totais</b>	Constante	690	24	28	<0,001	648	732
	(A) Temperatura (L)	- 2,80	1,30	- 2,16	0,040	- 5,01	- 0,59
	Temperatura (Q)	0,031	0,016	1,984	0,058	0,004	0,058
	R <sup>2</sup>	0,10					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,05					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,96					
<b>Flavonoides totais</b>	Constante	593	10	59	<0,001	576	611
	(A) Temperatura (L)	- 2,16	0,52	- 4,14	<0,001	- 3,05	- 1,27
	Temperatura (Q)	0,03	0,01	5,13	<0,001	0,02	0,04
	Tempo (Q)	0,013	0,003	5,215	<0,001	0,009	0,017
	R <sup>2</sup>	0,56					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,52					
<b>Antocianinas totais</b>	Constante	371	3	121	<0,001	366	376
	Tempo (Q)	0,008	0,002	3,165	0,004	0,003	0,012
	R <sup>2</sup>	0,22					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,20					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,93					
<b>Fenólicos não-flavonoides</b>	Constante	93,64	10	9	<0,001	76	111
	(A) Temperatura (L)	- 0,74	0,21	- 3,57	<0,001	- 1,10	- 0,39
	Tempo (Q)	- 0,009	0,005	- 1,881	0,071	- 0,016	- 0,001
	R <sup>2</sup>	0,32					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,27					
<b>Flavonoides não-antociânicos</b>	Constante	210	2	108	<0,001	206	213
	(A) Temperatura (L)	- 1,72	0,06	- 28,19	<0,001	- 1,82	- 1,61
	Temperatura (Q)	0,03	0,00	45,00	<0,001	0,03	0,03
	(B) Tempo (L)	0,42	0,08	5,26	<0,001	0,29	0,56
	Tempo (Q)	0,00191	0,00112	1,70801	0,099	0,00001	0,00381
	AB	- 0,005	0,001	- 4,504	<0,001	- 0,007	- 0,003
	R <sup>2</sup>	0,80					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,77					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,96						

**Tabela 3.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea*.

(continuação)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 90% Confiança	+ 90% Confiança
<b>Poder antioxidante de redução do ferro - FRAP</b>	Constante	827	98	8	<0,001	659	994
	(A) Temperatura (L)	10,64	2,31	4,60	<0,001	6,71	14,58
	(B) Tempo (L)	18,14	3,08	5,89	<0,001	12,89	23,39
	AB	- 0,35	0,07	- 4,78	<0,001	- 0,47	- 0,22
	R <sup>2</sup>	0,57					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,53					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,94					
<b>Atividade sequestradora de radicais livres - DPPH*</b>	Constante	57	1	77	<0,001	56	58
	Temperatura (Q)	0,0018	0,0003	5,7115	<0,001	0,0013	0,0024
	R <sup>2</sup>	0,47					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,46					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,96					
<b>Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu</b>	Constante	1434	47	30	<0,001	1353	1515
	(B) Tempo (L)	7,29	2,01	3,63	<0,001	3,87	10,72
	AB	- 0,07	0,03	- 2,03	0,052	- 0,13	- 0,01
	R <sup>2</sup>	0,21					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,17					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,95					
<b>Atividade quelante de Cu<sup>2+</sup></b>	Constante	61	2	29	<0,001	57	64
	(A) Temperatura (L)	0,39	0,08	5,16	<0,001	0,26	0,52
	Temperatura (Q)	- 0,007	0,001	- 7,826	<0,001	- 0,009	- 0,006
	(B) Tempo (L)	0,85	0,10	8,58	<0,001	0,68	1,02
	Tempo (Q)	- 0,013	0,002	- 7,829	<0,001	- 0,015	- 0,010
	R <sup>2</sup>	0,81					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,78					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,97						
<b>Intensidade de cor</b>	Constante	1	0,01	116	<0,001	1	1
	(A) Temperatura (L)	- 0,0023	0,0003	- 7,5010	<0,001	- 0,0028	- 0,0017
	AB	0,00002	0,00001	3,54876	<0,001	0,00001	0,00004
	R <sup>2</sup>	0,63					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,60					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,84					

**Tabela 3.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea*.

(continuação)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 90% Confiança	+ 90% Confiança
<b>Tonalidade</b>	Constante	0,64	0,02	29	<0,001	0,60	0,68
	(A) Temperatura (L)	- 0,00177	0,00110	- 1,61975	0,117	- 0,00364	0,00009
	Temperatura (Q)	- 0,00003	0,00001	- 2,49579	0,019	- 0,00005	- 0,00001
	Tempo (Q)	- 0,000026	0,000012	- 2,069573	0,048	- 0,000047	- 0,000005
	AB	0,00004	0,00002	2,50939	0,018	0,00001	0,00008
	R <sup>2</sup>	0,85					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,83					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,90						
<b>Pigmento amarelo</b>	Constante	15	0,45	34	<0,001	14	16
	Temperatura (Q)	- 0,0011	0,0001	- 17,1070	<0,001	- 0,0012	- 0,0010
	(B) Tempo (L)	0,13	0,03	4,26	<0,001	0,08	0,18
	Tempo (Q)	- 0,002	0,001	- 3,616	<0,001	- 0,003	- 0,001
	R <sup>2</sup>	0,88					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,87					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,95					
<b>Pigmento vermelho</b>	Constante	26	0,23	113	<0,001	26	27
	(B) Tempo (L)	0,13	0,02	7,75	<0,001	0,10	0,16
	Tempo (Q)	- 0,0014	0,0003	- 5,4073	<0,001	- 0,0019	- 0,0010
	AB	- 0,0004	0,0001	- 4,9273	<0,001	- 0,0006	- 0,0003
	R <sup>2</sup>	0,63					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,60					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,86					
<b>Pigmento azul</b>	Constante	58	0,34	172	<0,001	58	59
	Temperatura (Q)	0,00124	0,00005	25,62408	<0,001	0,00116	0,00132
	(B) Tempo (L)	- 0,25	0,02	- 10,54	<0,001	- 0,29	- 0,21
	Tempo (Q)	0,0033	0,0004	8,6731	<0,001	0,0027	0,0040
	R <sup>2</sup>	0,90					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,90					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,86					

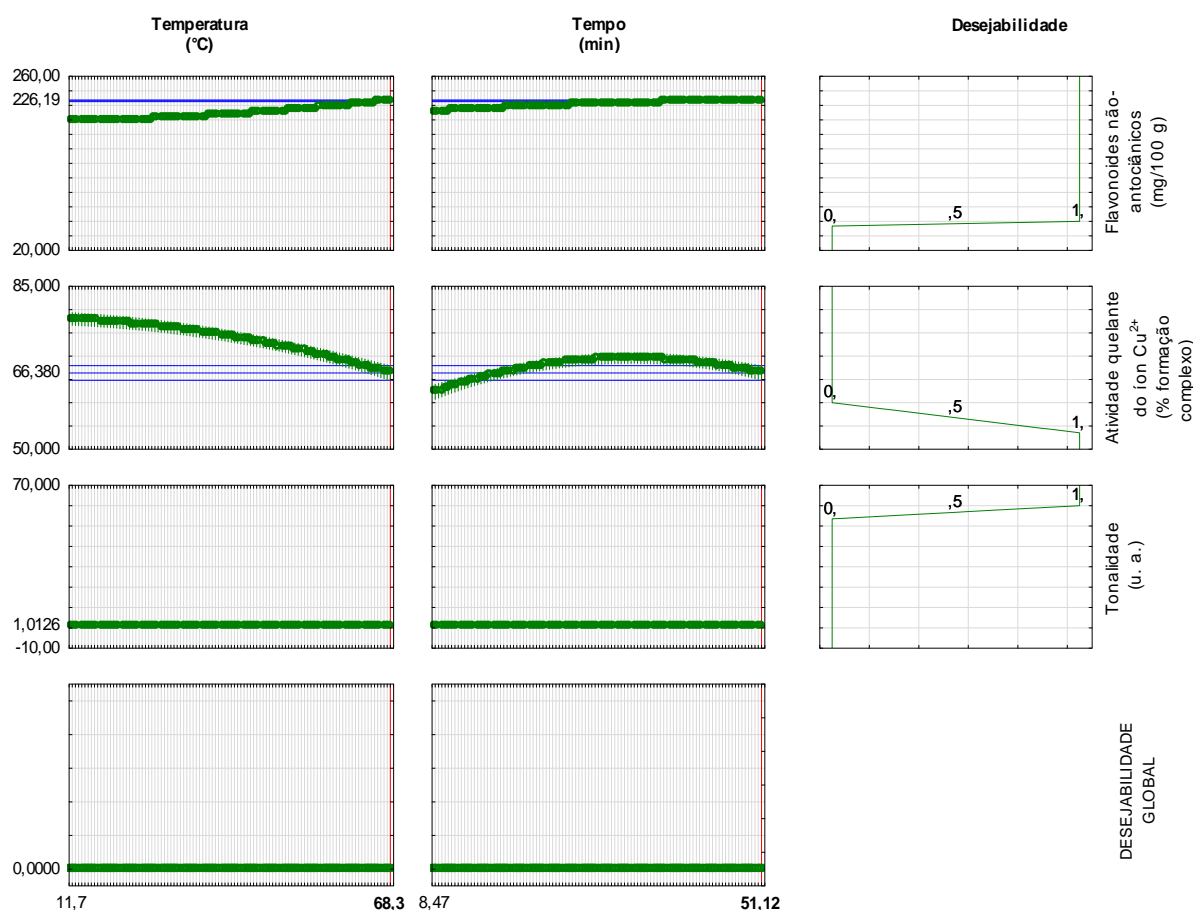
**Tabela 3.5** - Coeficientes de regressão obtidos por metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, parâmetros físico-químicos dos extratos aquosos de pétalas de *Clitoria ternatea*.

(conclusão)

Variáveis dependentes	Propriedades	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	- 90% Confiança	+ 90% Confiança
pH	Constante	5	0,08	63	<0,001	5	5
	Temperatura (Q)	- 0,00008	0,00004	- 2,19766	0,037	- 0,00014	- 0,00002
	(B) Tempo (L)	- 0,0167	0,0041	- 4,1267	<0,001	- 0,0236	- 0,0098
	AB	0,0003	0,0001	3,5295	0,002	0,0002	0,0005
	R <sup>2</sup>	0,32					
	R <sup>2</sup> ajustado	0,26					
	p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,93					

A otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, foi aplicada utilizando o teor de flavonoides não-antociânicos, atividade quelante do íon Cu<sup>2+</sup> e a tonalidade, Figura 3.3. A otimização verificou que as temperaturas entre 11,7 a 68,3 °C e os tempos entre 8,47 a 51,12 min não apresentaram diferenças significativas. Isto indica que independentemente da temperatura e do tempo de extração, dentro da faixa estudada, podem ser obtidos os mesmos teores de flavonoides não-antociânicos, atividade quelante do íon Cu<sup>2+</sup> e tonalidade nos extratos aquosos de pétalas de *C. ternatea*.

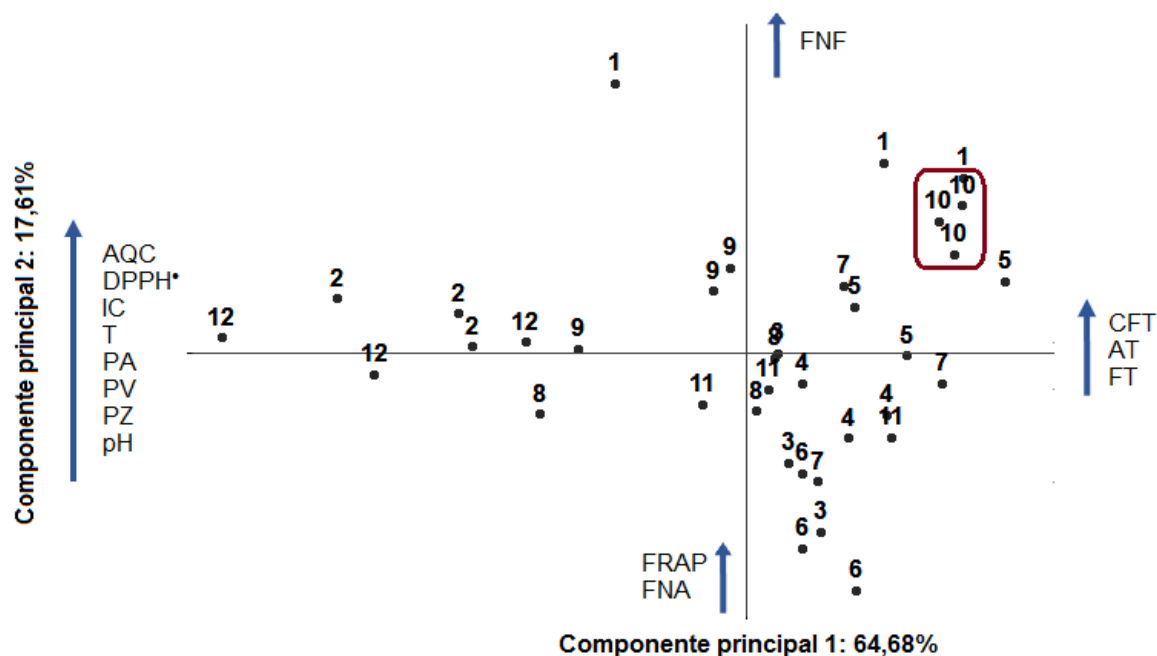
**Figura 3.3** - Otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, dos fatores temperatura (°C) e tempo (min) considerando teor de flavonoides não-antocianicos, atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$  e a tonalidade dos extratos aquosos das pétalas de *Clitoria ternatea*.



Assim, a análise por componentes principais foi aplicada com o objetivo de explorar a relação dos extratos aquosos com a composição fenólica, atividade antioxidante *in vitro*, e parâmetros físico-químicos. A projeção bidimensional explicou 82,29% da variabilidade dos dados, sendo que a primeira componente principal (CP1) explicou 64,68% da variabilidade dos dados, e a segunda componente principal (CP2) explicou 17,61%, Figura 3.4. A CP1 mostrou que os extratos obtidos a 20 °C/45 min e 40 °C/30 min apresentaram maior atividade antioxidante (CRFC, AQC e DPPH) e parâmetros físico-químicos (IC, T, PA, PV, PZ, e pH). Já os extratos obtidos a 20 °C/15 min, 11,7 °C/30 min, 40 °C/8,78 min, e 40 °C/30 min apresentaram maiores teores de CFT, AT, FT, e FNF. Na CP2, os extratos a 60 °C/15 min e 68,3 °C/30 min mostraram uma correlação com a atividade antioxidante por FRAP e FNA. A maior atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$  foi verificada nos extratos que apresentaram maiores teores de AT e FT.

A análise estatística multivariada indicou que o extrato obtido a 40 °C/30 min (ensaio 10) apresentou menor variabilidade e maiores teores de CFT, AT e FNF em comparação aos outros extratos. Portanto, o extrato obtido a 40 °C/30 min, ensaio 10, foi selecionado para as análises das propriedades funcionais *in vitro*.

**Figura 3.4** - Análise por componente principal baseada na triplicata dos extratos aquosos das pétalas de *Clitoria ternatea* em relação a composição fenólica, atividade antioxidante *in vitro* e parâmetros físico-químicos.



Nota: FNF: fenólicos não-flavonoides; CFT: compostos fenólicos totais; AT: antocianinas totais; FT: flavonoides totais; FRAP: atividade antioxidante de redução do ferro; FNA: flavonoides não-antocianínicos; DPPH\*: inibição do radical livre; PZ: pigmento azul; PV: pigmento vermelho; PA: pigmento amarelo; AQC: atividade quelante do íon  $\text{Cu}^{2+}$ ; e CRFC: capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu. A numeração dos extratos aquosos em relação a temperatura e tempo de extração pode ser obtida na Tabela 3.1.

### 3.3.3 Propriedades Funcionais *in vitro* do Extrato Bruto Liofilizado

O EBLPCT inibiu o crescimento da *L. monocytogenes* (8,37 mm), *B. cereus* (2,45 mm), e *S. cerevisiae* (3,79 mm), Tabela 3.6. O extrato não inibiu o crescimento da *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus*. Anthika et al. (2015) observaram a inibição do crescimento do *S. aureus* usando 70  $\mu\text{L}$  do extrato de pétalas de *C. ternatea*:água de 1:4 (g:mL). Como o EBLPCT não inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados sugere-se a utilização de outras técnicas de análise bem como o estudo com outros micro-organismos.



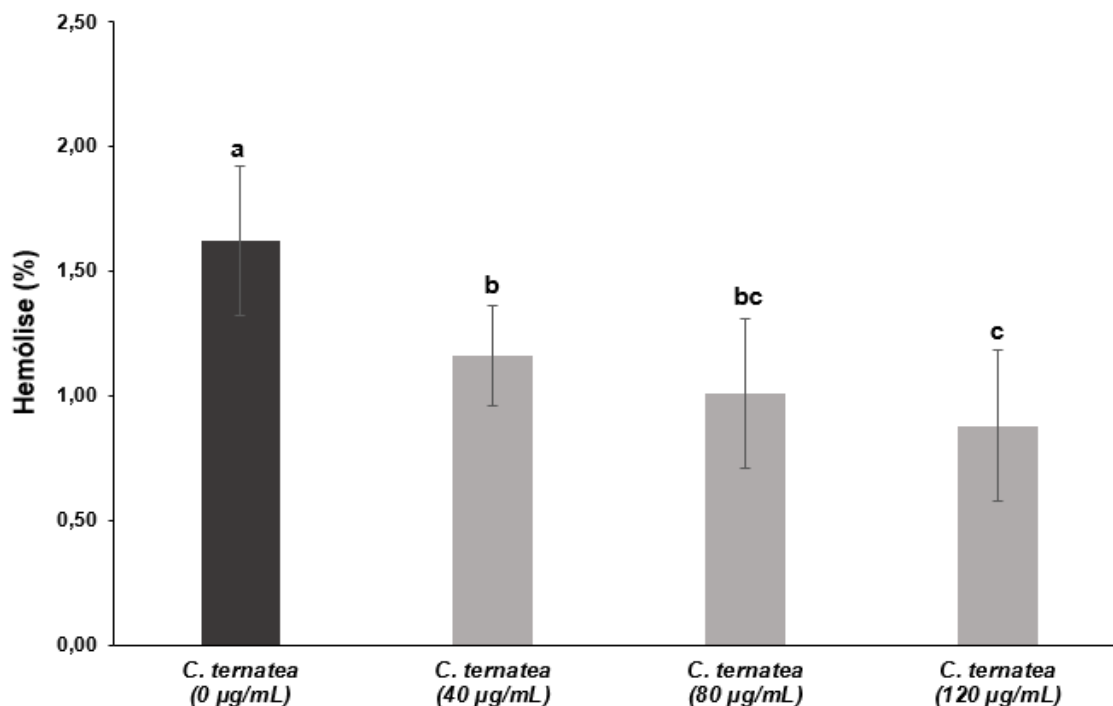
**Tabela 3.6** - Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado das pétalas de *Clitoria ternatea*.

Micro-organismo	Halo de inibição (mm)	
	Controle positivo <sup>a</sup>	Extrato <i>C. ternatea</i>
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	27,82 ± 0,43	8,37 ± 1,08
<i>P. aeruginosa</i> (IAL 1853)	10,86 ± 1,51	NI
<i>S. Typhimurium</i> (IAL 2431)	27,02 ± 0,11	NI
<i>S. Enteritidis</i> (S 2887)	23,67 ± 1,59	NI
<i>B. cereus</i> (IAL 55)	7,73 ± 0,02	2,45 ± 0,81
<i>E. coli</i> (IAL 2064)	18,83 ± 1,69	NI
<i>S. aureus</i> (ATCC 13565)	7,86 ± 0,58	NI
<i>S. cerevisiae</i> (NCYC 1006)	7,65 ± 0,27	3,79 ± 0,49

Nota: Concentração do extrato = 2 mg/cavidade. NI = extrato não inibiu o crescimento. <sup>a</sup>Controle positivo: 10 µg/mL ampicilina para todas as bactérias e leveduras.

As concentrações de 40 a 120 µg/mL do EBLPCT mostraram efeito protetor contra a hemólise dos eritrócitos de sangue humano com tipagem O<sup>+</sup>, Figura 3.5. Uma interação benéfica do extrato com os eritrócitos foi observada, pois os eritrócitos que sofreram hemólise mecânica (0 µg/mL) apresentaram diferenças significativas em relação aos eritrócitos em presença do extrato (40, 80 e 120 µg/mL). Os eritrócitos com 80 e 120 µg/mL de extrato apresentaram uma redução da hemólise de 38 e 46%, respectivamente. Phrueksanan et al. (2014) observaram que concentrações entre 50 a 400 µg/mL do extrato aquoso liofilizado de pétalas de *C. ternatea* protegeram os eritrócitos caninos contra hemólise induzida por AAPH. De acordo com Bonarska-Kujawa et al. (2012) as antocianinas penetram na região externa da membrana dos eritrócitos alterando o empacotamento lipídico e protegendo contra os danos oxidativos.

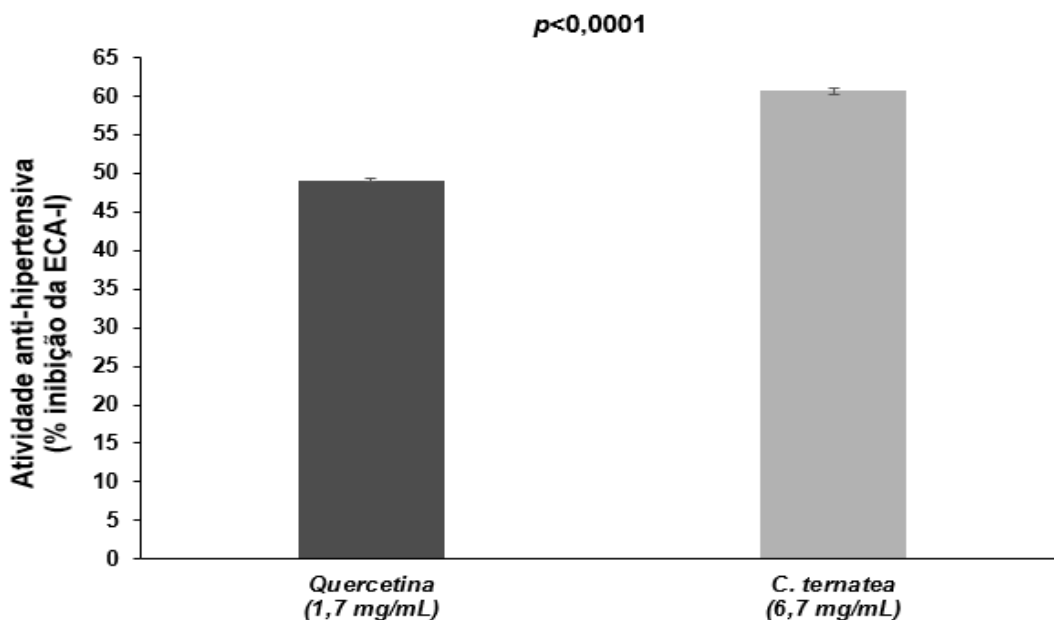
**Figura 3.5** - Atividade anti-hemolítica *in vitro* do extrato bruto liofilizado das pétalas de *C. ternatea* em eritrócitos humano sob condições isotônicas (0,9% m/v NaCl).



Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

O EBLPCT, 6.7 mg/mL, demonstrou uma inibição de 61% da atividade da ECA-I, Figura 3.6. A quercetina, 1,7 mg/mL, foi utilizada como controle positivo por apresentar atividade anti-hipertensiva (PEREZ-VIZCAINO et al., 2010). A conversão da angiotensina I em angiotensina II estimula a produção do hormônio aldosterona elevando a pressão arterial, a inibição da ECA-I exerce um efeito anti-hipertensivo (PRIPP; ARDÖ, 2007). Guerrero et al. (2012) verificaram que dentre 17 flavonoides a quercetina-3-rutinosídeo, quercetina, kaempferol, e a epicatequina apresentaram acima de 42% de atividade inibitória da ECA-I. A atividade anti-hipertensiva dos flavonoides está associada com a posição e o número de grupos hidroxila aliada com a presença de duplas ligações nos anéis formando complexos quelantes estáveis com o zinco no sítio ativo da ECA-I (LOIZZO et al., 2007).

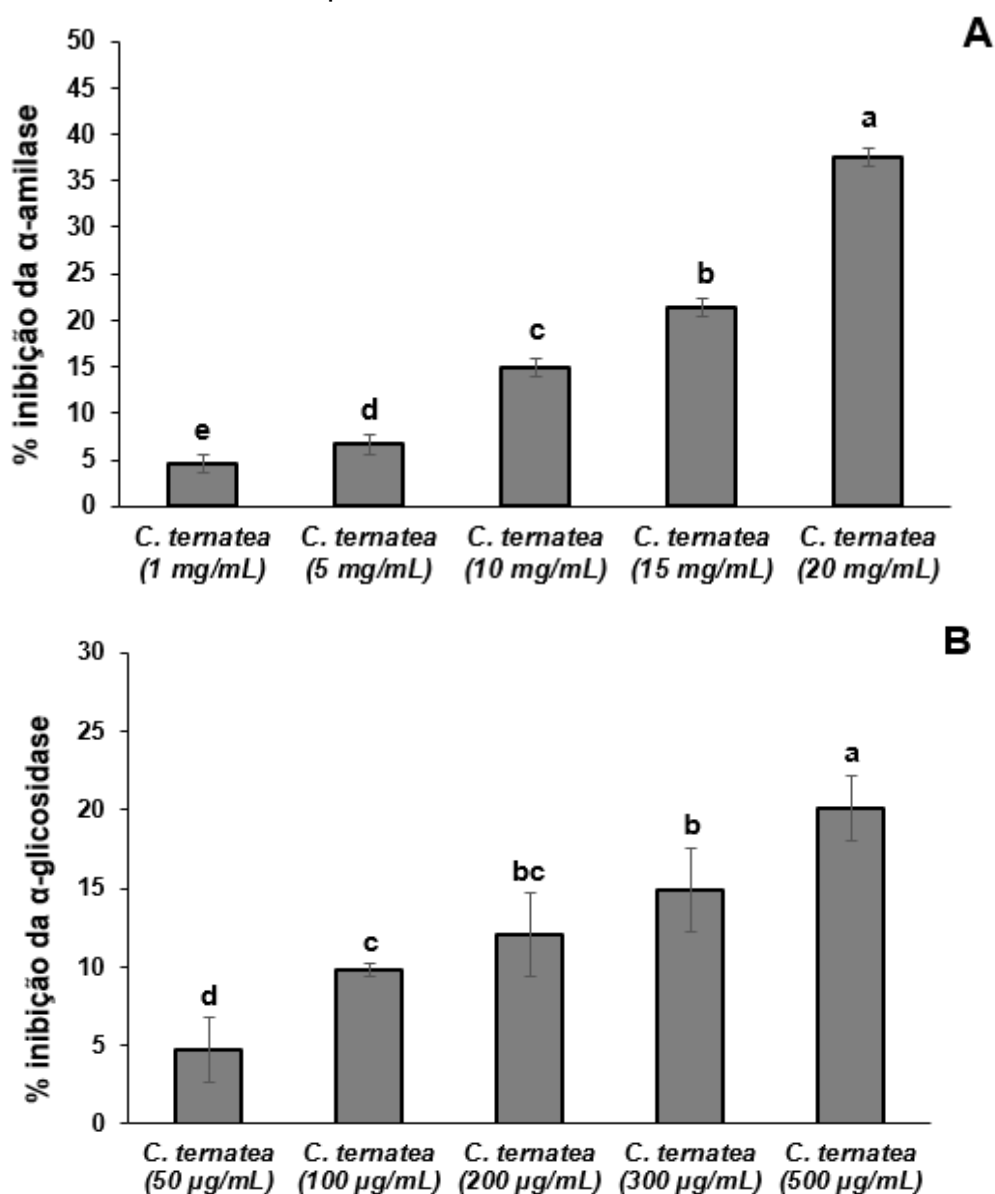
**Figura 3.6** - Atividade anti-hipertensiva *in vitro* do extrato bruto liofilizado das pétalas de *Clitoria ternatea* em comparação com uma solução padrão de quercetina.



Nota: As diferenças estatísticas foram obtidas usando o teste *t*-Student não pareado ( $p < 0,0001$ ).

O EBLPCT, 20 mg/mL inibiu 38% da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase, o aumento da concentração de extrato mostrou um efeito de dose-dependência, Figura 3.7A. Para a enzima  $\alpha$ -glicosidase, 500  $\mu$ g/mL do extrato inibiu 20% da atividade enzimática. As concentrações de 100 a 300  $\mu$ g/mL de extrato não apresentaram diferenças significativas na atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -glicosidase, Figura 3.7B. Daisy et al. (2009) observaram uma redução nos níveis de glicose sérica e de hemoglobina glicosilada em ratos diabéticos com a administração oral do extrato aquoso de flores e folhas da *C. ternatea* (400 mg/kg de peso corporal por 84 dias). Chusak et al. (2019) verificaram a redução na digestibilidade do amido *in vitro* do arroz branco cozido com o extrato de flores de *C. ternatea*, 1,25% e 2,5% (p/v), comparado ao controle nas fases oral, gástrica e intestinal após 20-90 min de digestão.

**Figura 3.7** - Atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -amilase (A) e  $\alpha$ -glicosidase (B) *in vitro* do extrato bruto liofilizado das pétalas de *C. ternatea*.

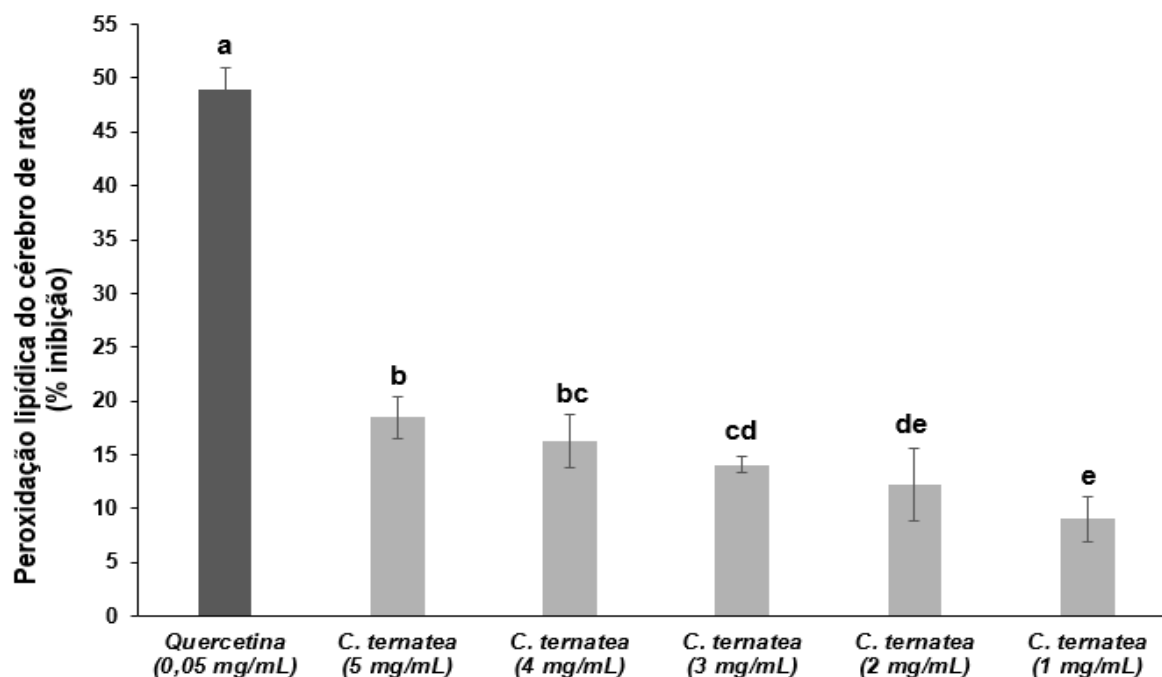


Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

Concentrações de 1 a 5 mg/mL de EBLPCT inibiram de 9 a 18% a peroxidação lipídica em meio biológico, Figura 3.8. A quercetina, 0,05 mg/mL, foi utilizada como controle positivo por apresentar atividade inibidora da peroxidação lipídica (SAIJA et al., 1995). A inibição da peroxidação lipídica pelos compostos fenólicos é atribuída a sua ação antioxidante, que depende da estrutura química. Alguns flavonoides podem interagir no núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana celular (SELVARAJ et al., 2015). Jabeur et al. (2017) observaram que o extrato hidroetanólico (0,26 mg/mL) e a infusão (0,27 mg/mL) das

flores e inflorescências do *Hibiscus sabdariffa* inibiram 50% da peroxidação lipídica no tecido cerebral de suíno. O efeito combinado dos flavonoides e ácidos fenólicos presentes no extrato metanólico das frutas de *Tetrapleura tetraptera* inibiram a peroxidação lipídica do fígado, pulmão e rins de ratos (IRONDI et al., 2016).

**Figura 3.8** - Atividade inibitória da peroxidação lipídica *in vitro* do extrato bruto liofilizado das pétalas de *C. ternatea* comparado a uma solução padrão de quercetina.

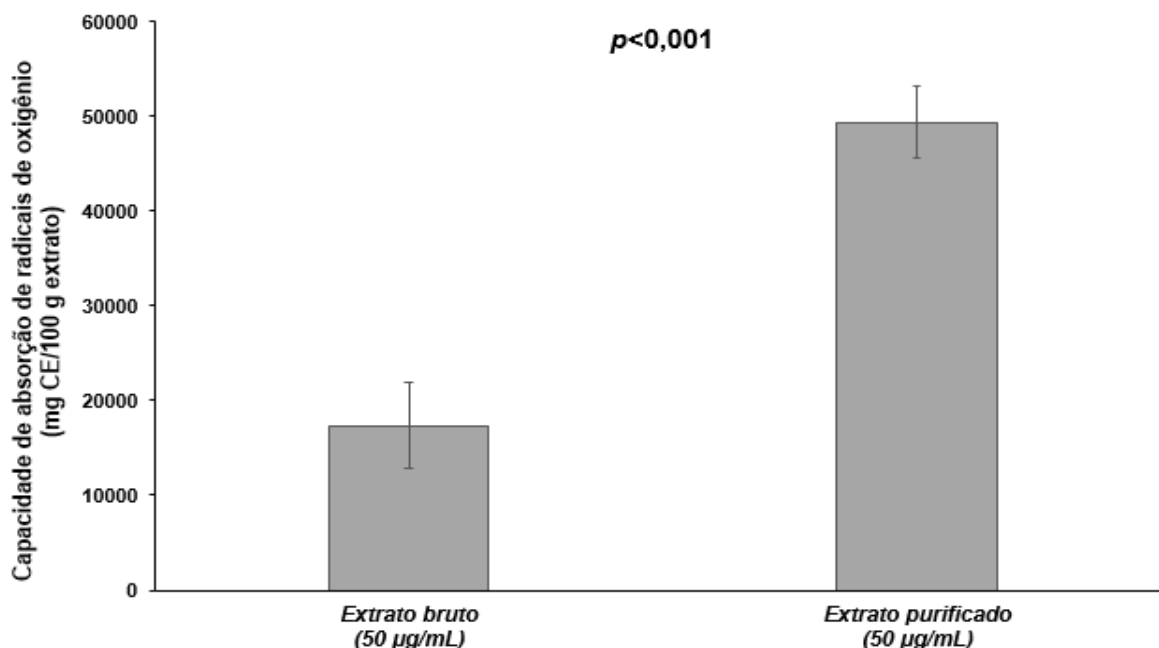


Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

### 3.3.4 Propriedades Funcionais *in vitro* do Extrato Bruto Liofilizado e Parcialmente Purificado

O potencial antioxidante dos extratos de pétalas de *C. ternatea* foi determinado por ORAC, decréscimo da fluorescência da fluoresceína como consequência dos danos oxidativos causados pelos radicais peroxila. O EPPCT apresentou maior atividade antioxidante em relação ao EBLPCT, Figura 3.9. Os valores de ORAC foram significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ), indicando que os compostos presentes no EPPCT (principalmente antocianinas) apresentaram uma maior ação antioxidante contra o radical peroxila. Em sistemas biológicos, a produção do radical peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) está envolvida na peroxidação lipídica das membranas das células podendo induzir a patogênese de várias doenças (TAIRA et al., 2015).

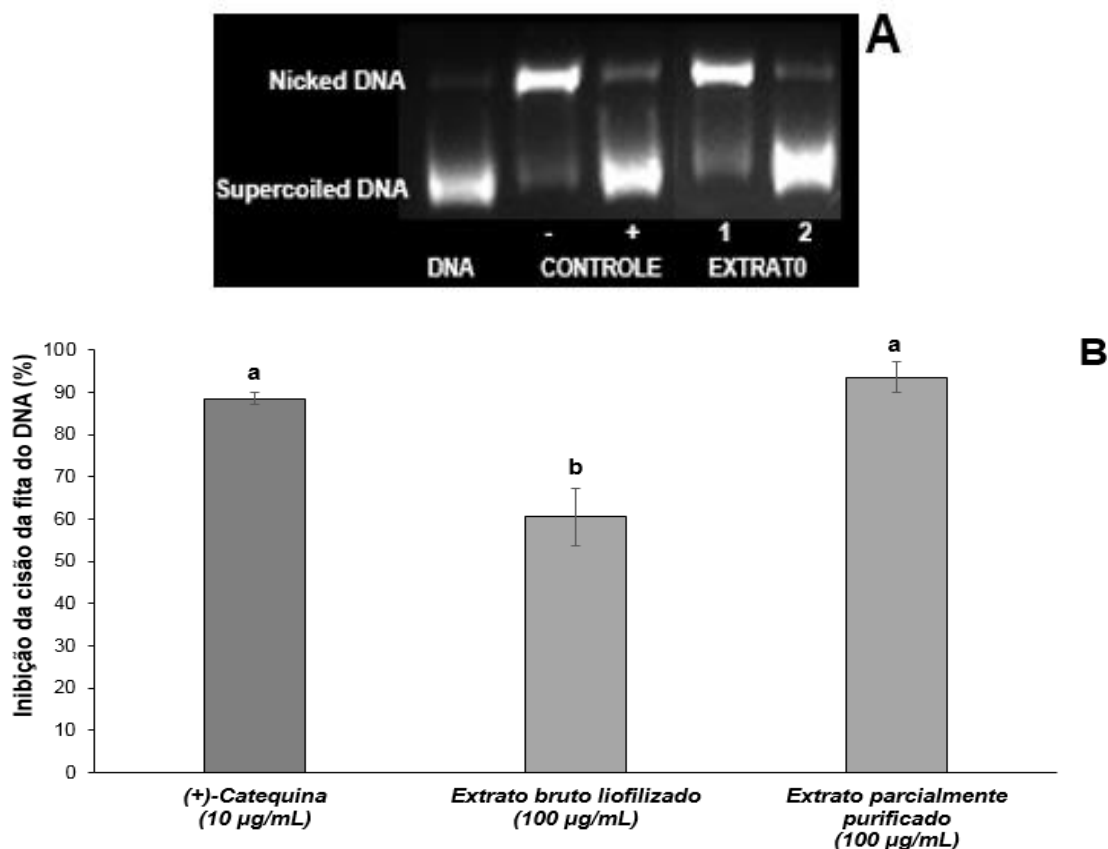
**Figura 3.9** - Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado das pétalas de *C. ternatea*.



Nota: As diferenças estatísticas foram obtidas usando o teste *t*-Student pareado ( $p < 0,001$ ).

Os extratos EBLPCT e EPPCT apresentaram um efeito inibitório da cisão do DNA induzido por radicais peroxila em comparação ao controle positivo, Figura 3.10A. Os extratos EBLPCT e EPPCT inibiram 61 e 94% da cisão do DNA, respectivamente (Figura 3.10B). O controle positivo, (+)-catequina, inibiu 89% da cisão do DNA. O desequilíbrio do sistema redox, reações de oxidação e redução, em sistemas biológicos pode causar o acúmulo de moléculas oxidantes capazes de oxidar o DNA, proteínas e lipídios, alterar a estrutura, atividade e propriedades físicas (GASCHLER; STOCKWEL, 2017). No DNA ocorrem modificações das bases e a cisão da fita, podendo induzir mutações e carcinogênese (AMBIGAIPALAN; SHAHIDI, 2015; ASHOK; ALI, 1999). Este estudo demonstrou que o EPPCT apresentou um efeito inibitório da cisão do DNA superior ao EBLPCT. No entanto, o efeito antimutagênico e/ou anticarcinogênico deve ser avaliado em modelos experimentais. Mehmood et al. (2019) reportaram que os extratos aquosos das flores de *C. ternatea*, 500 a 2000 µg/mL, obtidos por extração convencional e ultrassom protegeram contra os danos ao DNA plasmidial pBR322 induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

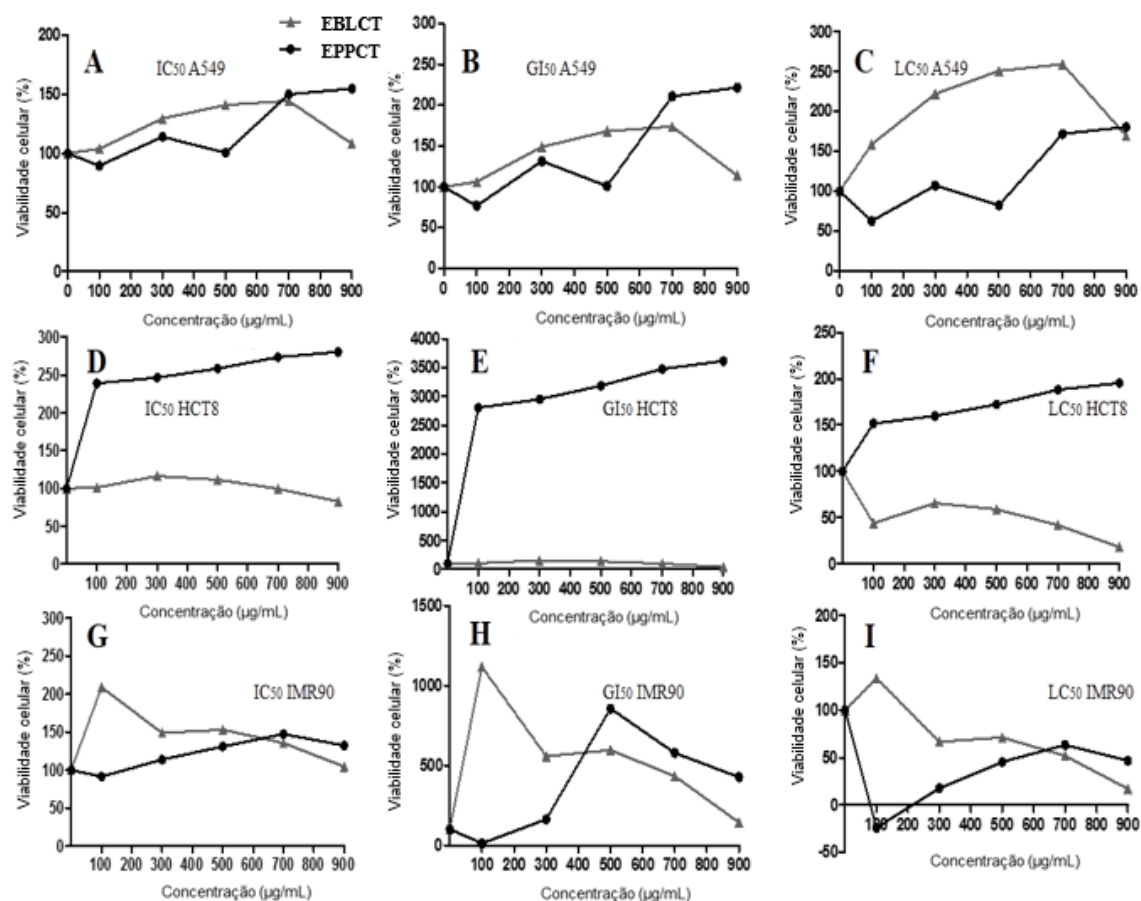
**Figura 3.10** - Atividade inibitória da cisão da fita de DNA induzida pelo radical peroxil (A e B) dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado das pétalas de *C. ternatea*.



Nota: A: controle negativo é DNA com radical peroxil; controle positivo é o DNA com (+)-catequina (10 µg/mL); 1 = extrato bruto liofilizado (100 µg/mL); e 2 = extrato parcialmente purificado (100 µg/mL). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes,  $p < 0,001$  (B).

O efeito citotóxico dos extratos EBLPCT e EPPCT foi avaliado em relação às linhagens celulares A549, HCT8 e IMR90 (Figura 3.11). Para as células cancerosas HCT8 tratadas com EBLPCT, foi observada uma pequena redução na viabilidade celular para todos os parâmetros, significando baixo efeito antiproliferativo ( $IG_{50} = 887,2 \mu\text{g/mL}$ ). Por outro lado, os gráficos apontaram que o EBLPCT estimulou a proliferação celular em células A549 (Figura 3.11A-C) e IMR90 (Figura 3.11G-I) agindo como pró-carcinogênico em concentrações mais baixas, embora tenha revelado efeito antiproliferativo em concentrações mais altas. Similarmente, Rietjens et al. (2005) apontaram que o flavonoide quercetina estimulou a proliferação celular em baixas doses *in vitro*, enquanto esse mesmo flavonoide atuou como agente antiproliferativo em doses mais altas. Já o extrato de EPPCT aumentou a viabilidade celular das células cancerosas A549 (Figura 3.11A-C) e HCT8 (Figura 3.11D-F), comportando-se apenas como agente pró-carcinogênico.

**Figura 3.11** - Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão (A549), A-D; células epiteliais de carcinoma de cólon (HCT8), D-F; e células de fibroblasto humano de pulmão não tumoral (IMR90), G-I, em relação a diferentes concentrações dos extratos bruto liofilizado (EBLCT) e parcialmente purificado (EPPCT) das pétalas de *C. ternatea*.



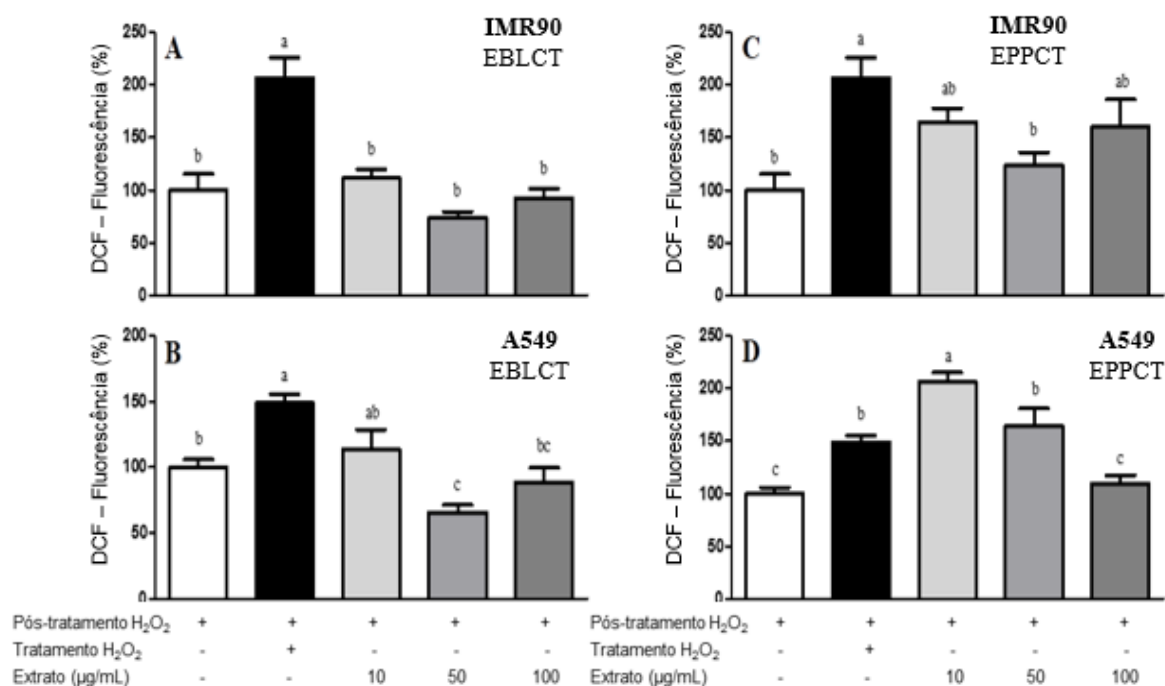
Esses resultados estão de acordo com Migliorini et al. (2019), que mostraram que o extrato aquoso de folhas de *C. intybus* também estimulou a proliferação celular em células tumorais HepG2, Caco-2 e HCT8. No presente estudo, esse efeito pró-carcinogênico também foi observado nas células IMR90 (normais), com uma discreta diminuição na proliferação celular em concentrações maiores de EPPCT (Figura 3.11G-I). Por outro lado, Neda et al. (2013) verificaram que o extrato aquoso de flores de *C. ternatea* teve um efeito inibitório no crescimento celular (IC<sub>50</sub>) em relação ao MCF7 (1159,2 µg/mL), Caov3 (857,1 µg/mL), HepG2 (481,5 µg/mL), e MDA-MB-231 (481,5 µg/mL), e não inibiu o crescimento celular Hs27 (não tumoral). Ambos os extratos EBLPCT e EPPCT não apresentaram efeitos citotóxicos contra as linhagens celulares testadas e estimularam à sua proliferação. Os compostos fenólicos podem apresentar efeitos pró-cancerígenos e antiproliferativos,



dependendo da concentração do extrato (Rietjens et al., 2005), tipo de linhagem celular humana (Takashina et al., 2017) e solvente utilizado na extração.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas nas células IMR90 e A549 expostas aos extratos EBLPCT e EPPCT foram avaliadas por DCFH-DA. Os resultados revelaram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 µmol/L) induziu um aumento nos níveis de EROs em comparação ao controle negativo (Figura 3.12). Os extratos EBLPCT e EPPCT não promoveram a geração de EROs para as células normais IMR90, enquanto o extrato EBLPCT teve efeito citoprotetor nas linhagens celulares A549 contra a oxidação induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figura 3.12** - Atividade antioxidante intracelular de EROs *in vitro* em células IMR90 (A, C) e A549 (B, D) dos extratos bruto liofilizado (EBLCT) e parcialmente purificado (EPPCT) das pétalas de *C. ternatea* por espectrofluorimetria.



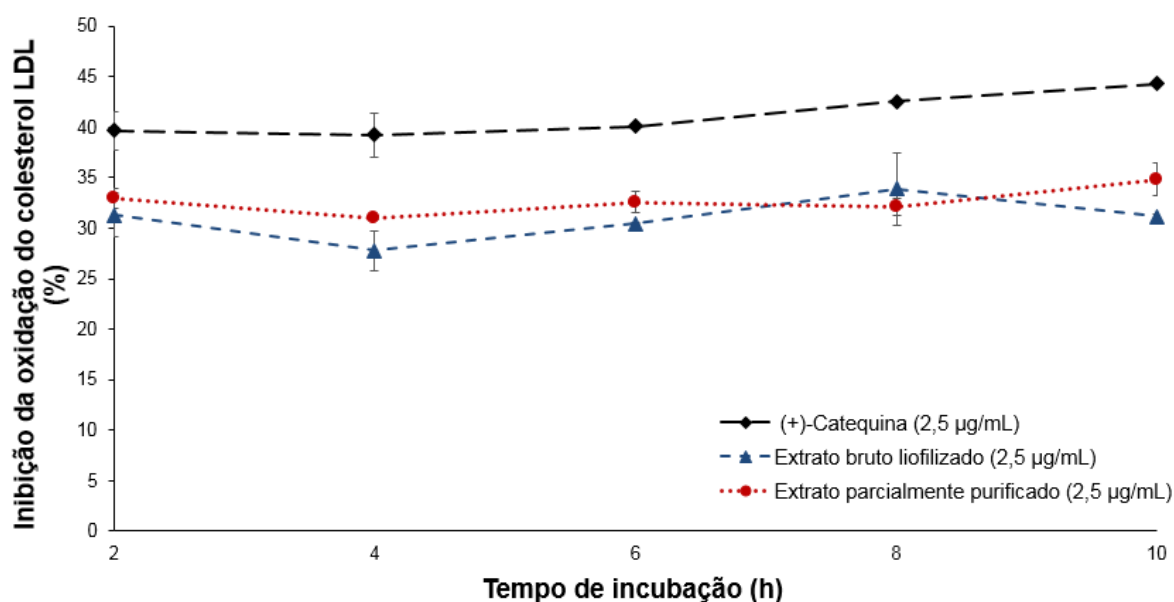
Nota: Dados quantitativos são a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro representam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Considerando que o EPPCT foi obtido do extrato bruto liofilizado, a atividade antioxidante intracelular do EBLPCT pode ser explicada pela complexidade da composição, uma vez que suas antocianinas são capazes de se autoassociar, interagir com compostos flavonoides de estrutura semelhante e também reagir com muitos outros como resultado de sua carga positiva na estrutura central do anel (HOU et al., 2004). Portanto, o perfil químico do EBLPCT conferiu um sistema com uma taxa de eliminação de EROs mais alto que o extrato parcialmente purificado,

atingindo níveis inferiores ao controle negativo. Além disso, o EPPCT promoveu a indução de EROs nas células A549 em concentrações mais baixas (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ), atingindo níveis acima/semelhantes ao controle positivo e diminuiu a geração de EROs em 100  $\mu\text{g/mL}$  para o nível espontâneo (Figura 3.12D), comportando-se de maneira dependente da dose. Migliorini et al. (2019) também observaram que concentrações mais altas de extrato de folhas de *C. intybus* conferiram proteção às células Caco-2, HCT8 e HepG2 contra o estresse oxidativo induzido.

Os extratos EBLPCT e EPPCT na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram um efeito protetor contra a oxidação do colesterol LDL induzido por cobre em comparação a (+)-catequina, Figura 3.13. Os extratos EBLPCT e EPPCT inibiram 34 e 32% da oxidação do colesterol LDL após 8 h de incubação, respectivamente. Em 10 h de incubação, observou-se uma inibição da oxidação do colesterol LDL de 31% do EBLPCT e de 35% do EPPCT. A (+)-catequina, controle positivo, inibiu 44% da oxidação do colesterol LDL em 10 h de incubação. Diferenças significativas não foram observadas entre o EBLPCT e EPPCT em 8 h de incubação. Já o EPPCT apresentou maior efeito protetor em relação ao EBLPCT contra a oxidação do colesterol LDL em 10 h de incubação. O nível elevado de colesterol LDL oxidado está relacionado com a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (ZHONG et al., 2019).

**Figura 3.13** – Efeito inibitório dos extratos bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas de *Clitoria ternatea* contra a oxidação do colesterol LDL humano.



### 3.4 CONCLUSÕES

A otimização simultânea mostrou que os teores de compostos bioativos, atividade antioxidante, e parâmetros de cor foram semelhantes entre as temperaturas de 11,7 a 68,3 °C por 8,47 a 51,12 min. As condições experimentais definidas pela análise por componentes principais para obter o maior teor de compostos fenólicos foi 40 °C por 30 min. O EBLPCT apresentou propriedades funcionais *in vitro*, atividades anti-hemolítica, inibidoras da ECA-I, das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, e da peroxidação lipídica em sistema biológico. O EPPCT mostrou maior capacidade de absorção de radicais de oxigênio, inibição da cisão de DNA por radicais peroxila, e inibição da oxidação do colesterol LDL induzida por cobre. Ambos os extratos EBLPCT e EPPCT apresentaram baixa citotoxicidade frente às linhagens A549, HCT8, e IMR90 e apresentaram atividade antioxidante intracelular contra espécies reativas de oxigênio (>100  $\mu\text{g/mL}$ ). Esse é o primeiro estudo que determina as propriedades funcionais *in vitro* em relação à inibição da ECA-I, inibição da oxidação do colesterol LDL, efeito citotóxico das linhagens celulares A549, HCT8 e IMR90, e a atividade antioxidante intracelular contra espécies reativas de oxigênio. Esses resultados sugerem que estudos *in vivo* sejam realizados para comprovar as propriedades funcionais de extratos aquosos de flor de *C. ternatea*.

## CAPÍTULO 4 - ESTUDO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA POR UHPLC-Q-TOF-MS/MS E ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE PÉTALAS AZUIS DE *Clitoria ternatea* L. (BUTTERFLY PEA)

### RESUMO

As pétalas azuis de *Clitoria ternatea* são compostas por antocianinas com potencial para serem usadas como corante natural. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição fenólica do extrato aquoso bruto (EBLPCT) e parcialmente purificado (EPPCT) de pétalas azuis de *C. ternatea* bem como a estabilidade das antocianinas frente ao pH, temperatura e luz em presença e ausência de frutooligossacarídeos. Doze compostos foram tentativamente identificados por UHPLC-Q-TOF-MS/MS nos extratos EBLPCT e EPPCT, sendo antocianinas ternatinas (B2/B3, B4, e D2), derivados de delphinidina, flavonóis e flavanóis. Na titulação espectrofotométrica direta/reversa, as antocianinas apresentaram alterações estruturais com mudanças na cor entre o pH 2,25 a 10,20, e reversibilidade estrutural com a preservação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Os extratos aquosos em pH 3,6 e 5,4 exibiram estabilidade térmica com a presença e ausência de frutooligossacarídeos. A energia de ativação dos extratos em pH 3,6 e 5,4 foi superior a 99 kJ/mol. A adição de frutooligossacarídeos nos extratos em pH 3,6 e 5,4 expostos a luz proporcionou um efeito protetor contra a fotodegradação das antocianinas. Os dados mostram potencial tecnológico do extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* como corante natural em um sistema modelo de bebida funcional.

**Palavras-chave:** corante azul natural; epigalocatequina-3-galato; frutooligossacarídeos; ternatinas.

O conteúdo desse capítulo será submetido para a revista *Food Chemistry*.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As antocianinas são flavonoides responsáveis pelas cores vermelha, azul, roxa ou laranja presentes em vegetais, frutas, flores e folhas (STRACK; WRAY, 1993). Além das características de coloração, as antocianinas apresentam propriedades bioativas como atividade antioxidante *in vitro* (ESCHER et al., 2018; MIGLIORINI et al., 2019), atividade antioxidante sérica *in vivo* (PLAZA et al., 2016), antibacteriana *in vitro* (SAGDIC et al., 2013), anti-hemolítica *in vitro* (ESCHER et al., 2018), citotóxica *in vitro* (SAGDIC et al., 2013), e efeito hipoglicêmico *in vitro* e *in vivo* (DAISY; RAJATHI, 2009; JANG et al., 2019).

O uso de antocianinas como potenciais corantes alimentares naturais com propriedades bioativas deve ser incentivado. No entanto, a estabilidade desses pigmentos é influenciada por alguns fatores como pH, temperatura, luz, presença de oxigênio, estrutura química, solvente, presença de copigmentos, íons metálicos e enzimas (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; MARTYNENKO; CHEN, 2016). A utilização de temperaturas superiores a 50 °C durante o processamento pode ocasionar a degradação térmica parcial ou total das antocianinas e, conseqüentemente, diminuir a intensidade da cor (PATRAS et al., 2010; HOWARD et al., 2012; LOIZZO; TUNDIS; MENICHINI, 2015). Sui, Bary, e Zhou (2016) observaram a redução nos teores de antocianinas do extrato aquoso de arroz preto com a elevação da temperatura do tratamento térmico e armazenamento. Chung et al. (2016) avaliaram que a adição de goma arábica em um modelo de bebida, pH 3, e em presença de ácido ascórbico aumentou a estabilidade fotooxidativa das antocianinas durante o armazenamento a 40 °C por 5 dias.

Em fontes naturais, as antocianinas podem estar aciladas com ácidos fenólicos (ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinapico, gálico), e/ou ácidos orgânicos (ácidos malônico, acético, málico, succínico ou oxálico), consideradas quimicamente mais estáveis para aplicações alimentares (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; PETERSSON et al., 2008). Torskangerpoll e Andersen (2005) observaram que a antocianina acilada é mais estável que as formas não-aciladas frente às variações de pH, temperatura e armazenamento. De acordo com Giusti e Wrolstad (2003) a acilação na molécula da antocianina aumenta a estabilidade por meio da copigmentação intramolecular e/ou intermolecular, e reações de auto-associação. Na copigmentação intramolecular, o cromóforo da antocianina interage com os

ácidos aromáticos e/ou alifáticos ligados a uma ou mais unidades de glicose presentes na molécula. Esses grupos são flexíveis e podem adquirir uma configuração na forma de sanduiche com o cromóforo da antocianina, proporcionando uma proteção contra ataque nucleofílico da água e de outras espécies presentes no meio reacional (DANGLES; SAITO; BROUILLARD, 1993).

Estudos sobre a aplicação de extratos ricos em antocianinas como corantes naturais em alimentos, em substituição aos corantes sintéticos, têm aumentado nos últimos anos devido à preocupação dos consumidores com a saúde (GERARDI et al., 2018; PIRES et al., 2018b). O consumo de corantes sintéticos tem sido potencialmente associado a alergias, intolerância alimentar, hiperatividade, irritabilidade, e distúrbios do sono em crianças (FEKETEÁ; TSABOURI, 2017; CORRADINI, 2019). A busca de fontes naturais de corantes alimentícios é incentivada. Alguns corantes naturais compostos por carotenoides como o urucum, páprica,  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina,  $\beta$ -criptoxantina, fucoxantina, licopeno, e astaxantina extraídos de plantas, algas e alguns insetos são usados na indústria de alimentos (KENDRICK, 2012; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). Os corantes azuis naturais são raros na natureza, mas algumas empresas estão extraindo da spirulina, algas verde-azuladas, e aplicando em alimentos e bebidas (NACHAY, 2019).

A pétala azul de *Clitoria ternatea* L., conhecida como butterfly pea, é composta principalmente pela delfinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeo. Estudos isolaram e identificaram as diferentes estruturas da antocianina delfinidina poliacilada, nomeadas de ternatinas A1–A3, B1–B4, C1–C5, D1–D3, e também dos flavonóis kaempferol, quercetina e mirecitina (SAITO et al., 1985; KONDO et al., 1990; TERAHARA et al., 1989, 1990, 1996, 1998; KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). Foram também identificados, no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea*, os ácidos gálico, *p*-cumárico, 2,4 dihidroxibenzóico, protocatecuico, cafeico, clorogênico, e elágico; os flavonoides quercetina-3-rutinosídeo, procianidina A2, e (-)-epicatequina; e a antocianina delfinidina 3-glicosídeo (ESCHER et al., 2020; AZIMA; NORIHAM; MANSHOOR, 2017). Similarmente, as ternatinas foram identificadas na flor azul clara e malva, exceto na flor branca, de diferentes linhagens de *Clitoria ternatea*. A mudança na cor das flores de azul escuro para a cor malva está relacionada com ausência do grupo glicosil nas posições 3' e 5' da delfinidina (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003b). Wongs-Aree, Giusti, e Schwartz (2006)

observaram que as antocianinas purificadas de pétalas azuis de *C. ternatea* são derivadas somente da delphinidina, e apresentaram alta estabilidade cromática em solução tampão com pH 1 e 4,5.

O extrato aquoso das flores de *C. ternatea* é utilizado tradicionalmente na Ásia como corante natural em alimentos e bebidas devido à elevada estabilidade. Na Malásia, o extrato aquoso é usado para colorir bolo de arroz e no prato popular “Nasi Kerabu” (NEDA; RABETA; ONG, 2013). O extrato azul também é adicionado em pão, biscoitos, farinhas, sobremesas tradicionais e em outros alimentos. O extrato aquoso das flores de *C. ternatea* também é usado na medicina popular indiana e Ayurveda por apresentar propriedades terapêuticas (MUKHERJEE et al., 2008). O extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* não apresentou citotoxicidade em células IMR90 ( $LC_{50} >900 \mu\text{g/mL}$ ), mostrou efeito protetor em eritrócitos humanos e em DNA plasmidial pBR322, o que comprova a sua segurança toxicológica (ESCHER et al., 2020; MEHMOOD et al., 2019). Nesse contexto, a flor de *C. ternatea* pode ser uma promissora fonte de corante azul natural com propriedades bioativas como alternativa de substituição dos corantes sintéticos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição fenólica por UHPLC-Q-TOF-MS/MS do extrato bruto e parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea* bem como a estabilidade das antocianinas do extrato aquoso frente ao pH, temperatura e luz em presença e ausência de frutooligossacarídeos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Produtos Químicos

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore, São Paulo, Brasil). DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e resina Amberlite®XAD7HP foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Acetonitrila grau LC-MS foi adquirida da Tedia Company Inc. (Fairfield, USA). Ácido fórmico grau HPLC foi adquirido da ROE Scientific Inc. (Newark, USA). Ácido clorídrico, ácido trifluoroacético e hidróxido de potássio foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Álcool etílico e álcool metílico foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Os frutooligossacarídeos (FOS) foram adquiridos da New Nutrition (São Paulo, Brasil). Citrato de sódio e ácido cítrico ambos da Merck (São Paulo, Brasil).

#### 4.2.2 Matéria-Prima e Elaboração do Extrato

Flores desidratadas de *Clitoria ternatea*, cultivadas em Campo Grande - Mato Grosso do Sul em 2016, foram adquiridas diretamente com o produtor. As pétalas azuis foram separadas do cálice, trituradas em moinho analítico (QUIMIS® modelo 6298A21) e padronizadas com peneira de 42 Tyler mesh. As pétalas trituradas foram armazenadas em frascos de polietileno de baixa densidade sob refrigeração (8 °C) até o momento das extrações. As flores de *Clitoria ternatea* foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da UEPG sob número 21878.

A condição experimental de extração dos compostos fenólicos de pétalas azuis de *C. ternatea*, 40 °C por 30 min foi definida após a modelagem dos dados usando a análise por componentes principais descrito por Escher et al. (2020). O extrato foi elaborado com água ultrapura em uma cela termostaticada (Microquímica MQBTC 99-20, Brasil) com uma relação de massa: solvente de 0,125:25 (m/v), e protegido da luz com agitação magnética constante. Na sequência, o extrato foi filtrado (papel filtro qualitativo) e o resíduo enxaguado com o solvente de extração até completar o volume de 25 mL. O extrato aquoso foi congelado a -80 °C e liofilizado sob vácuo de 830 µmHg (Liotop, modelo L202, Brasil) para estudo da composição fenólica. Outra parte do extrato aquoso foi armazenado em frasco de polietileno protegido da luz sob refrigeração (8 °C) para o estudo da estabilidade das antocianinas.

#### 4.2.3 Purificação Parcial e Composição Fenólica

A purificação parcial das antocianinas presentes no extrato bruto liofilizado de pétalas azuis de *C. ternatea* foi realizada de acordo com Zhang, Fu e Zhang (2011) e Pedro, Granato, e Rosso (2016). Primeiramente o extrato liofilizado foi diluído em solução tampão com pH 1 (KCl 0,025 mol/L). Na sequência, a solução foi eluída lentamente em coluna de vidro (1.0 cm x 20.0 cm) contendo a resina Amberlite®XAD7HP. Após a resina adsorver as antocianinas, foram efetuadas lavagens com volumes de 50 mL de água ultrapura, totalizando 150 mL, para a remoção dos compostos solúveis em meio aquoso. A eluição das antocianinas da resina foi realizada por meio da utilização de 100 mL de solução aquosa contendo 50% de álcool etílico acidificada com 340 µL de ácido trifluoroacético (TFA; 0,04



mol/L), seguida de 150 mL de álcool etílico 100% acidificado com 340 µL de TFA. As duas soluções (50% e 100% álcool etílico) contendo as antocianinas foram acondicionadas em um local escuro até evaporação total dos solventes. As antocianinas purificadas foram armazenadas em frascos de polietileno de baixa densidade em dessecador contendo sílica de gel.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos, bruto liofilizado e parcialmente purificado, foram identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, Agilent Technologies, série 1290 Infinity, EUA) acoplada ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, Agilent Technologies, modelo G6545, EUA). A separação foi realizada em fase reversa utilizando coluna RP18 (Symmetry Shield, 3 mm x 150 mm; 3,5 µm de tamanho da partícula; Waters, EUA) equipada com pré-coluna C<sub>18</sub> (Phenomenex, Torrance, EUA), temperatura de 40 °C, volume de injeção de 2 µL, e fluxo de 0,150 mL/min. A fase móvel consistiu de água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B), e o gradiente linear foi 0-30 min (5 a 45% B); 30-35 min (45% B); 35-40 min (45 a 5% B) e 40-45 min (5% B).

Os parâmetros do Q-TOF-MS com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo foram: voltagem do capilar, 3500 V; temperatura do gás, 300 °C; fluxo do gás, 8 L/min; pressão do gás nebulizador, 35 psig; temperatura do gás de cortina, 350 °C; fluxo do gás de cortina, 11 L/min; fragmentador, 175 V; e energia de colisão, 50 V. Os íons precursores e os fragmentos foram monitorados no intervalo de 100 a 1700 *m/z* e o tempo de varredura foi de 4 s. O *software* Masshunter versão B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado na aquisição e processamento dos dados.

#### 4.2.4 Estudos da Estabilidade das Antocianinas do Extrato Aquoso

##### 4.2.4.1 Efeito do pH e atividade antioxidante

O efeito do pH em relação a estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* foi analisado de acordo com Pedro, Granato e Rosso (2016). Primeiramente, 50 mL do extrato aquoso foi diluído com 50 mL de solução de HCl pH 1. Em uma cela termostatizada a 25 °C adicionou-se 65 mL do extrato diluído, protegido da luz e mantido sob agitação

constante. A titulação espectrofotométrica foi realizada em pHmetro (Micronal B-474, Brasil). Pequenas alíquotas de KOH foram adicionadas ao extrato, para acompanhar a variação do pH de 2,25 até 10,20. Inicialmente observou-se uma região fortemente tamponada, pH 2,25 até 4,21, assim utilizou-se uma base com concentração mais elevada (5,0 mol/L). A partir de pH 4,21 até 10,20 utilizou-se alíquotas de KOH 1,0 mol/L. A absorbância foi registrada no comprimento de onda de absorção máxima, 546 nm. Na sequência foi realizada uma titulação espectrofotométrica reversa, alíquotas de ácido clorídrico (HCl; 1,0 mol/L) foram adicionadas até atingir o pH inicial de 2,25.

A atividade antioxidante do extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* com diferentes pHs (2,25 a 10,20) foi analisada pela captura do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). Uma alíquota de 0,950 mL do extrato, em diferentes valores de pH, foi misturada com 4,050 mL da solução de DPPH ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L), a solução foi agitada e mantida em ausência de luz por 60 min a 25 °C. Os resultados foram expressos em percentual de inibição do radical DPPH.

#### 4.2.4.2 Efeito da temperatura

O efeito do aumento da temperatura em relação a estabilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* foi determinado de acordo com Reyes e Cisneros-Zevallos (2007) e Maciel et al. (2018). Duas soluções do extrato foram preparadas, uma solução com água ultrapura em pH 5,4, e a outra em solução tampão com citrato de sódio e ácido cítrico 0,05 mol/L em pH 3,6. Os frutooligossacarídeos, 1,75 e 3,5 g/100 mL, foram adicionados nas duas soluções. Cada solução foi dividida em três tubos em triplicata, sendo 30 mL da solução com 3,5 g FOS/100 mL, 30 mL da solução com 1,75 g FOS/100 mL, e 30 mL da solução em ausência do FOS. Os tubos foram vedados e imersos em banho termostático (60, 70, e 80 °C), e em banho com glicerina (90 e 100 °C). A absorbância máxima,  $\lambda = 617$  nm, foi registrada com intervalos de 30 min para a temperatura de 100 °C, e 60 min para as temperaturas de 60 a 90 °C. A partir dos dados foram calculadas a porcentagem de retenção de cor (%R), constante de velocidade de degradação das antocianinas ( $k$ ), tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), e a energia de ativação ( $E_A$ ) com as Equações 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

$$\%R = A_t / A_0 \times 100 \quad (1)$$

$$\ln (A_t) / A_0 = - k \times t \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (3)$$

$$\ln k = \ln k_0 - (E_A) / RT \quad (4)$$

Onde,  $A_t$  = absorvância no tempo  $t$ ;  $A_0$  = absorvância inicial;  $t$  = tempos determinados (min);  $R$  = constante dos gases (8,31447 J/mol K);  $T$  = temperatura absoluta (K);  $k_0$  = fator de frequência (min).

#### 4.2.4.3 Efeito da luz

O efeito da luz em relação a estabilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* foi determinado de acordo com Amr e Al-Tamimi (2007) e Pedro, Granato, e Rosso (2016). Duas soluções do extrato foram preparadas, uma solução com água ultrapura em pH 5,4, e a outra em solução tampão com citrato de sódio e ácido cítrico 0,05 mol/L em pH 3,6. Os frutooligossacarídeos, 1,75 e 3,5 g/100 mL, foram adicionados nas duas soluções. Cada solução foi dividida em três tubos com volumes de 10 mL, e adicionadas de 3,5 g FOS/100 mL, 1,75 g FOS/100 mL, e em ausência de FOS em cada tubo em triplicata. Três tubos (ausência de FOS, 1,75 e 3,5 g FOS/100 mL) em triplicata, cada solução, foram protegidos com papel alumínio, e outros três tubos de cada solução foram expostos a luz direta à conjunto de seis lâmpadas fluorescentes brancas (20 W). Os tubos foram acondicionados na câmara de madeira fechada com temperatura interna de  $32 \pm 2$  °C. A absorvância máxima,  $\lambda = 573$  nm, foi registrada com intervalos de 24 h até o decréscimo de 50% da absorvância inicial. A porcentagem de retenção de cor (%R), constante de velocidade de degradação das antocianinas ( $k$ ), e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) foram calculadas com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

#### 4.2.5 Análise Estatística

Os experimentos foram conduzidos em triplicata, e os resultados expressos como média e desvio padrão. As diferenças entre os resultados foram verificadas pela análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste de Fisher de

diferença mínima significativa, considerando  $p \leq 0,05$ . O software TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Statistica™ Ltd, USA) foi usado nas análises.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Composição Fenólica do Extrato Bruto Liofilizado e Parcialmente Purificado

A composição fenólica do extrato bruto liofilizado e do parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea* foi analisada por UHPLC-Q-TOF-MS/MS, e em ambos os extratos foram caracterizados os compostos representados na Tabela 4.1 e Figura 4.1A. No entanto, no extrato parcialmente purificado foi identificado o composto 6 com íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  1551,42. Doze compostos foram tentativamente identificados nos extratos, sendo seis antocianinas ternatinas e derivados de delphinidina responsáveis pela cor azul de pétalas de *C. ternatea*, Tabela 4.1. A estrutura da ternatina é composta pela delphinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos com D-glucose (G) e malonato (M) na posição 3, e alternância da D-glucose e do ácido *p*-cumárico (C) nas posições 3' e 5' das cadeias laterais (TERAHARA et al., 1990b).

O composto 1 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  773,16 tentativamente identificado como miricetina-3-2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil. O composto 2 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  1329,33, e os fragmentos identificados foram o  $m/z$  1021,24  $[M-G-C]^+$  e o  $m/z$  788,43  $[M-G-2C-malonato]^+$ . Esses dados sugerem que na estrutura da delphinidina estão ligados nas posições 3, 3' e 5' os grupos G-M, G-C-G e G-C, tentativamente identificada como ternatina B4, Figura 4.1C.

O composto 3 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  459,09, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  289,07, pode corresponder a catequina. Esse composto poder ser tentativamente identificado como epigallocatequina-3-galato (EGCG). O composto 4 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  830,21, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  303,05 que corresponde a delphinidina, Figura 4.1D. O composto 5 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  757,22, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  303,05 que pode corresponder a quercetina. Esse composto pode ser tentativamente identificado como quercetina-3-(2G-rutinosídeo ramnosil).

**Tabela 4.1** - Compostos fenólicos identificados no extrato bruto liofilizado e no parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea*

Pico	Tempo (min)	Íon molecular [M + H] <sup>+</sup>	Fragmentos (MS <sup>2</sup> )			Compostos tentativamente identificados
1	7,55	773,16	-			Miricetina-3-(2 <sup>G</sup> -rutinosídeo-ramnosil)
2	9,25	1329,33	<u>1021,24</u> ;	810,41;	<u>788,43</u> ;	Ternatina B4
			692,13;	684,14;	676,16;	
			475,33;	361,15;	253,01	
3	9,63	459,09	<u>289,07</u> ;	158,97		Epigallocatequina-3-galato
4	10,80	830,21	706,18;	639,17;	<u>303,05</u> ;	Derivado de delphinidina
			147,04			
5	11,26	757,22	<u>303,05</u> ;	548;65		Quercetina-3-(2 <sup>G</sup> -rutinosídeo-ramnosil)
6*	11,63	1551,42	<u>1389,37</u> ;	<u>1228,32</u> ;	<u>1081,28</u> ;	Derivado de delphinidina
			<u>919,22</u> ;	<u>773,19</u> ;	<u>611,13</u> ;	
			<u>465,12</u> ;	<u>303,05</u> ;	147,04	
7	11,86	1637,42	<u>1389,38</u> ;	<u>1081,28</u> ;	<u>919,23</u> ;	Ternatina B2 ou B3
			<u>773,19</u> ;	<u>611,13</u> ;	<u>465,11</u> ;	
			<u>303,05</u> ;	147,04		
8	12,35	741,22	<u>595,16</u> ;	<u>449,11</u> ;	<u>287,06</u> ;	Kaempferol-3-(2 <sup>G</sup> -rutinosídeo-ramnosil)
			129,05			
9	12,81	1475,36	<u>1227,31</u> ;	<u>919,23</u> ;	<u>611,14</u> ;	Ternatina D2
			<u>551,10</u> ;	<u>303,05</u>		
10	13,64	595,17	467,92;	<u>287,06</u>		Kaempferol-3-neohesperidosídeo
11	13,98	903,22	779,19;	639,16;	489,06;	Derivado de delphinidina
			<u>303,05</u> ;	147,04		
12	14,98	681,16	<u>577,73</u> ;	443,82;	350,90;	Kaempferol-3-O-(2"-O- $\alpha$ -rhamnosil-6"-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo
			<u>287,05</u>			

Nota: \*Composto tentativamente identificado somente no extrato parcialmente purificado.

O composto 6,  $m/z$  1551,42, presente exclusivamente no extrato parcialmente purificado produziu os fragmentos identificados com  $m/z$ : 1389,37 [M-G]<sup>+</sup>; 1228,32 [M-2G]<sup>+</sup>; 1081,28 [M-2G-C]<sup>+</sup>; 919,22 [M-3G-C]<sup>+</sup>; 773,19 [M-3G-2C]<sup>+</sup>; 611,13 [M-4G-2C]<sup>+</sup>; e 465,12 [M-4G-3C]<sup>+</sup>. Esse íon molecular produziu um fragmento principal com  $m/z$  303,05 o qual corresponde a delphinidina, Figura 4.1B. A partir dos dados pode-se inferir que na estrutura da delphinidina os grupos G, G-C-G-C e G-C-G ou os grupos G, G-C-G-C-G e G-C estão ligados nas posições 3, 3' e 5', respectivamente.

O composto 7 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  1637,42, e produziu os fragmentos identificados com  $m/z$ : 1389,38  $[M-G-M]^+$ ; 1081,28  $[M-2G-C-M]^+$ ; 919,23  $[M-3G-C-M]^+$ ; 773,19  $[M-3G-2C-M]^+$ ; 611,13  $[M-4G-2C-M]^+$ ; e 465,11  $[M-4G-3C-M]^+$ . Esse íon molecular produziu um fragmento principal com  $m/z$  303,05 o qual corresponde a delphinidina. Esses dados sugerem que na estrutura da delphinidina estão ligados nas posições 3, 3' e 5' os grupos G-M, G-C-G-C-G e G-C ou os grupos G-M, G-C-G-C e G-C-G podendo ser tentativamente identificado como ternatina B3 ou B2, respectivamente, Figura 4.1E.

O composto 8 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  741,22, e produziu os fragmentos identificados com  $m/z$  595,16  $[M\text{-ramnose}]^+$  e o  $m/z$  449,11  $[M\text{-2ramnose}]^+$ . Esse íon molecular produziu um fragmento principal com  $m/z$  287,06 que pode corresponder ao kaempferol. Esse composto poder ser tentativamente identificado como kaempferol-3-(2G-rutinosídeo ramnosil). O composto 9 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  1475,36, e produziu os fragmentos identificados com  $m/z$ : 1227,31  $[M-G\text{-malonato}]^+$ ; 919,23  $[M-2G-C\text{-malonato}]^+$ ; 611,14  $[M-3G-2C\text{-malonato}]^+$ ; e 551,10  $[M-4G-3C\text{-malonato}]^+$ . O íon molecular produziu um fragmento principal  $m/z$  303,05 que corresponde a delphinidina. Esses dados sugerem que na estrutura da delphinidina estão ligados nas posições 3, 3' e 5' os grupos G-M, G-C-G-C e G-C, tentativamente identificada como ternatina D2, Figura 4.1F.

O composto 10 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  595,17, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  287,05, kaempferol. Esse composto pode ser tentativamente identificado como kaempferol-3-neohesperidosídeo. O composto 11 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  903,22, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  303,05 o qual corresponde a delphinidina, Figura 4.1G. O composto 12 apresentou o íon molecular  $[M]^+$  com  $m/z$  681,16, e produziu um fragmento principal com  $m/z$  287,05, kaempferol. Esse composto pode ser tentativamente identificado como kaempferol-3-O-(2"-O- $\alpha$ -rhamnosil-6"-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo.

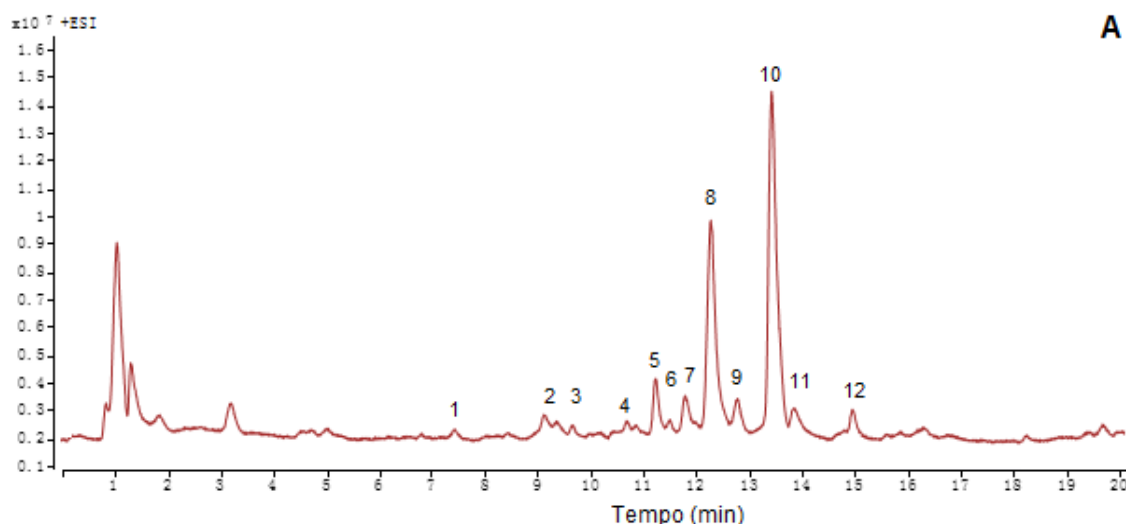
As ternatinas tentativamente identificadas neste trabalho corroboram com o estudo realizado por Terahara et al. (1996), que isolaram e elucidaram a estrutura das ternatinas A3, B4, B3, B2 e D2 das flores de *Clitoria ternatea*. Esses autores verificaram que as ternatinas apresentaram os íons moleculares com  $m/z$  de 1491 (A3), 1329 (B4), 1637 (B3), 1637 (B2) e 1475 (D2) correspondente a  $C_{66}H_{75}O_{39}^+$ ,  $C_{60}H_{65}O_{34}^+$ ,  $C_{75}H_{81}O_{41}^+$ ,  $C_{75}H_{81}O_{41}^+$ , e  $C_{69}H_{71}O_{36}^+$ , respectivamente. Kazuma, Noda e Suzuki (2003b) quantificaram um maior teor da ternatina B2 no extrato contendo

50% MeOH e 1% TFA de pétalas de *C. ternatea*. Nair et al. (2015) identificaram as ternatinas B3 ( $m/z$  1638), D3 ( $m/z$  1167), B2 ( $m/z$  1638), B4 ( $m/z$  1329), C2 ( $m/z$  1491), D1 ( $m/z$  1783), e derivados de delphinidina ( $m/z$  1296;  $m/z$  1534; e  $m/z$  950) no extrato contendo MeOH, propanona e água das flores de *C. ternatea*.

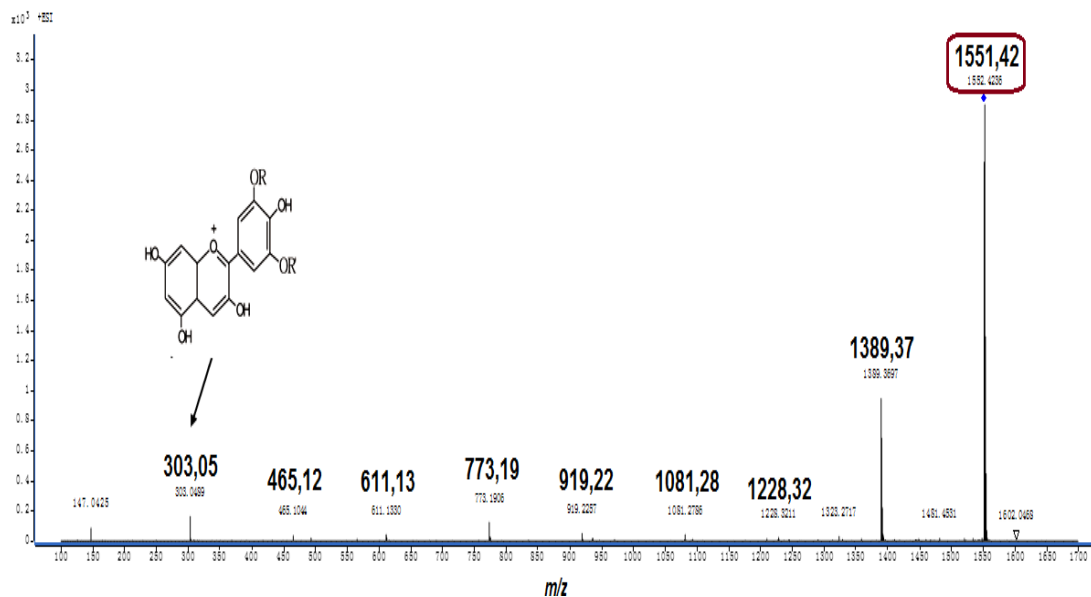
Os flavonóis glicosídeos tentativamente identificados neste trabalho corroboram com os compostos verificados por Kazuma, Noda e Suzuki (2003a). Esses autores isolaram e elucidaram a estrutura de três novos flavonóis glicosídeos juntamente com outros onze flavonóis em pétalas da *C. ternatea* cv. Double Blue. Os flavonóis miricetina-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), quercetina-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), kaempferol-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), kaempferol-3-neohesperidosídeo, e o kaempferol-3-O-(2''-O- $\alpha$ -rhamnosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo apresentaram os íons moleculares [M]<sup>+</sup> com  $m/z$  de 773, 757, 741, 595 e 681, respectivamente (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a); correspondendo aos íons moleculares identificados nos extratos analisados (Tabela 4.1).

Kazuma, Noda e Suzuki (2003b) quantificaram maiores teores do kaempferol-3-neohesperidosídeo seguido do kaempferol-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil). Esses flavonóis correspondem aos compostos 10 e 8 tentativamente identificados que apresentaram uma maior intensidade, Tabela 4.1, Figura 4.1A. Esse trabalho é o pioneiro em reportar a presença de epigalocatequina-3-galato em extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea*.

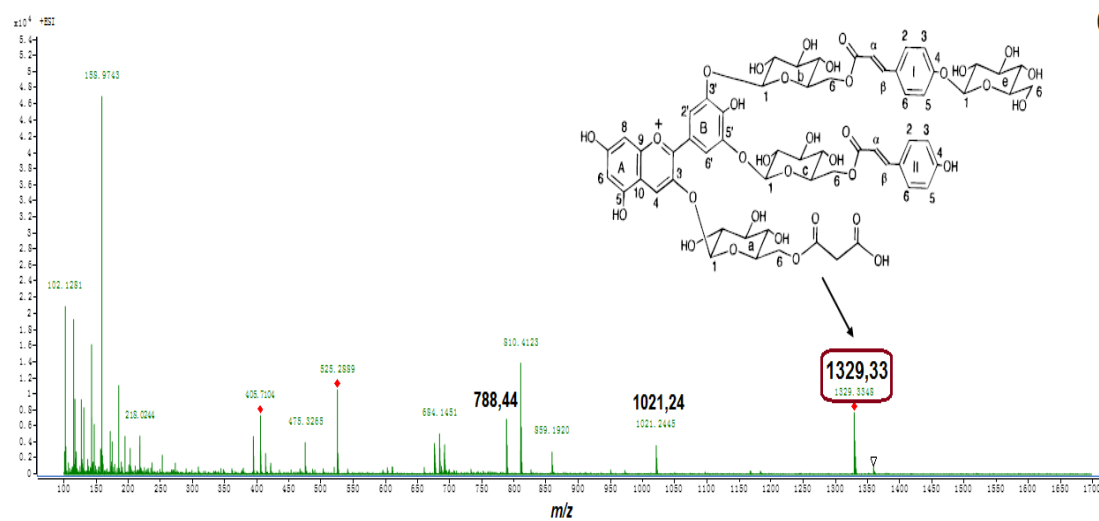
**Figura 4.1** - Cromatograma dos íons totais dos compostos fenólicos (A) e espectros de massa das ternatinas e derivados de delphinidina tentativamente identificados (B-G) no extrato bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea*



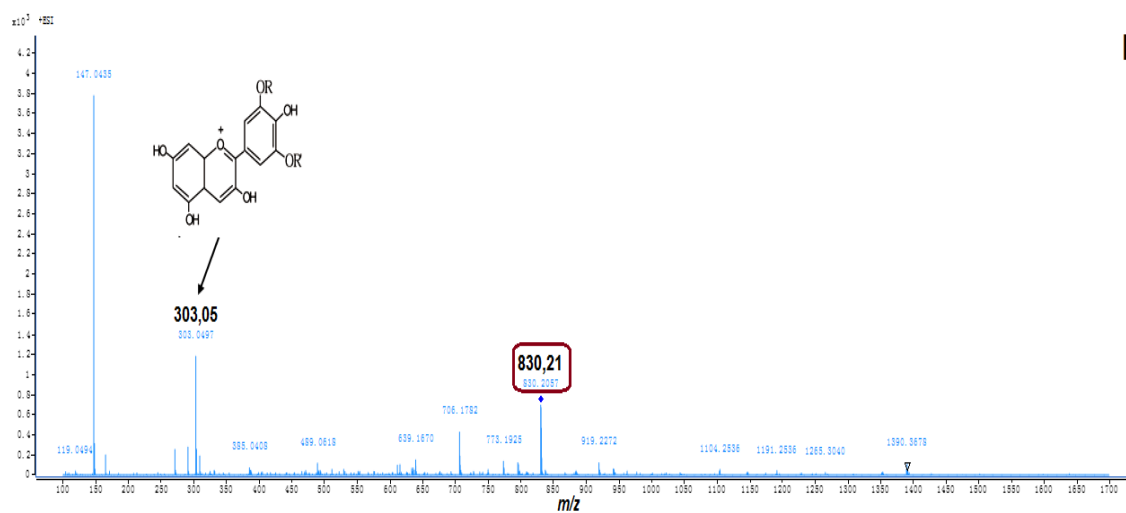
B



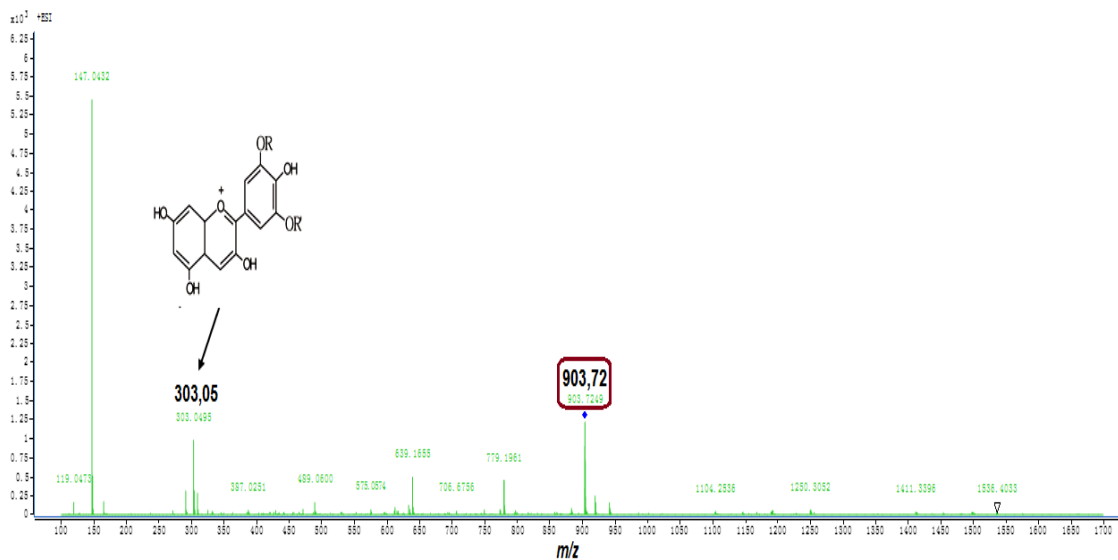
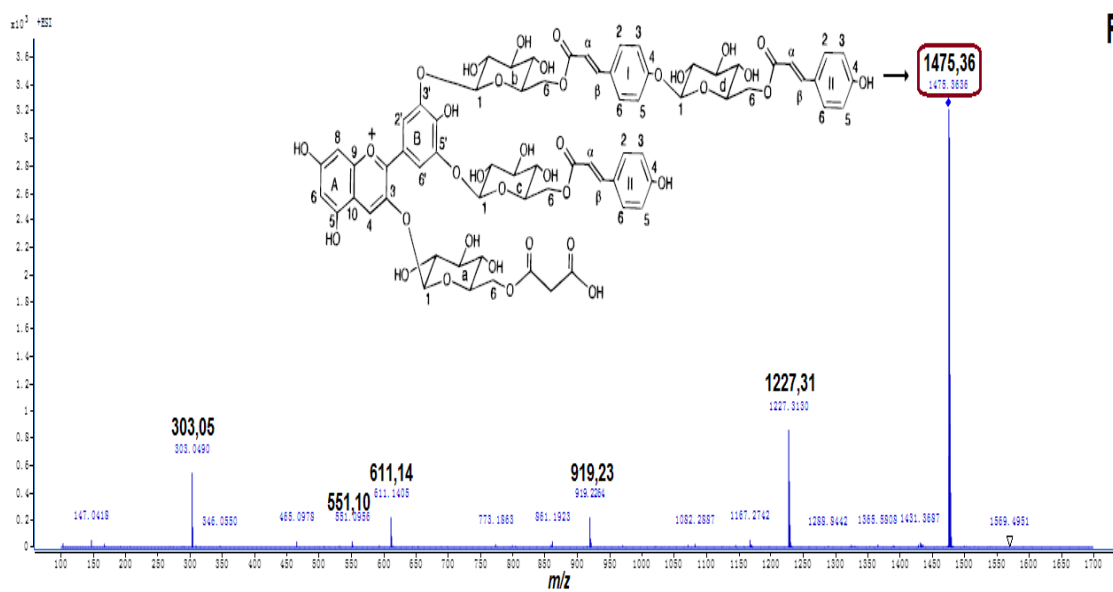
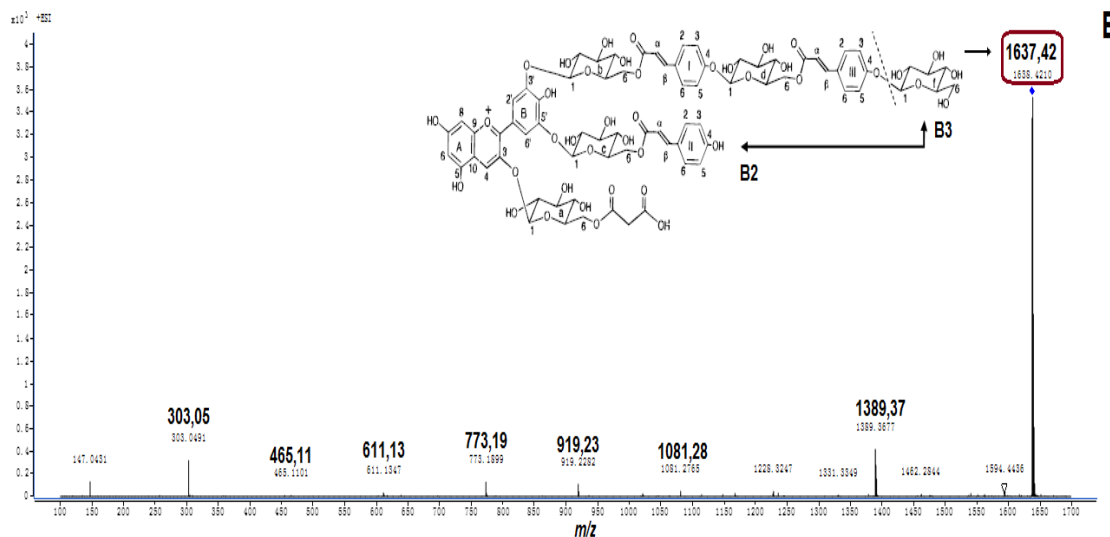
C



D





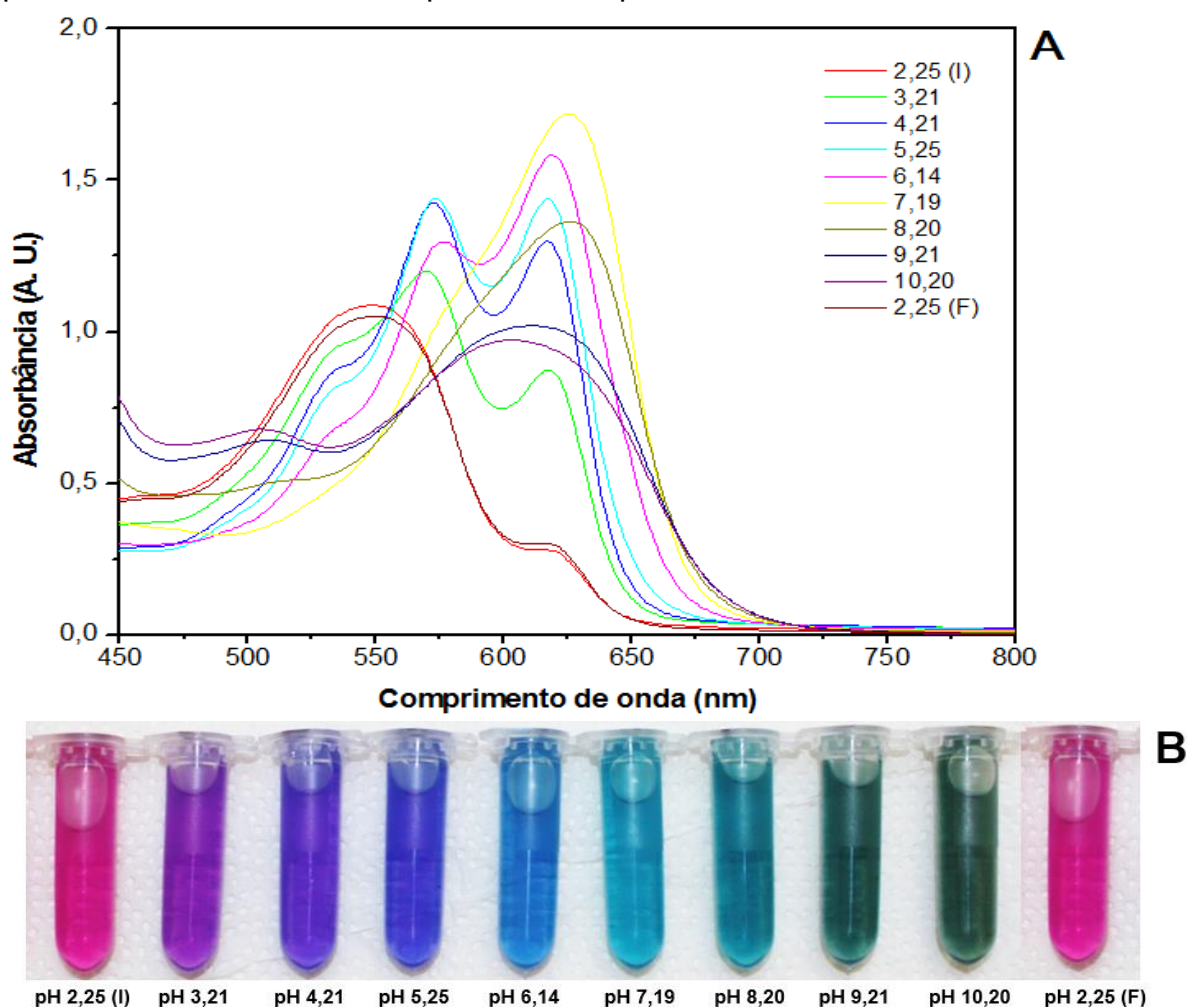


### 4.3.2 Estabilidade das Antocianinas do Extrato Aquoso

#### 4.3.2.1 Efeito do pH

A estabilidade das antocianinas e a sua cor é influenciada principalmente pelo pH do meio. A Figura 4.2 mostra o efeito do pH na estabilidade e reversibilidade das antocianinas ternatinas e derivados de delphinidina presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea*. As antocianinas do extrato apresentaram uma variação na cor entre vermelho a verde com a alteração do pH de 2,25 a 10,20, respectivamente, Figura 4.2B. No pH 2,25, a absorvância máxima das antocianinas ternatinas e derivados de delphinidina do extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* foi registrada no comprimento de onda de 546 nm, Figura 4.2A. Entre o pH 3,21 e 6,14, observou-se uma menor intensidade de absorção em 546 nm, efeito hipocrômico, e um deslocamento batocrômico com a formação de duas novas bandas em 570 e 618 nm com aumento na absorvância, efeito hiperacrômico. No pH 7,19, observou-se a presença de uma banda com aumento na absorção, efeito hiperacrômico, e com deslocamento batocrômico para 625 nm. Entre o pH 8,20 e 10,20, observou-se um decréscimo na absorvância, efeito hipocrômico, e um deslocamento batocrômico entre 626 a 605 nm.

**Figura 4.2** - Efeito do pH na estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea*



Nota: I = inicial; F = final.

As mudanças no pH ocasionam alterações estruturais e na cor das antocianinas, e o deslocamento batocrômico correspondente ao comprimento de onda com absorção máxima (MA et al., 2018). De acordo com Mazza e Brouillard (1987) em condições ácidas, pH entre 1 e 2, as antocianinas existem na forma de cátion flavílico ( $AH^+$ ), e apresentam a coloração vermelha. Em pH entre 3 e 5, ocorre a perda do próton para produzir a forma quinoidal neutra com coloração violeta ou azul (geralmente no carbono C'4, C5 e C7), e a hidratação do cátion flavílico ( $AH^+$ ) gerando a pseudobase carbinol (incolor). Em valores de pH acima de 6, a estrutura pseudobase carbinol e anidrobases quinoidais tendem a formar as espécies *cis*-chalcona e *trans*-chalcona, ocorrendo a ruptura do anel heterocíclico, e assim torna a reação irreversível (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008; SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019). Em  $pH \geq 8$ ,

pode ocorrer uma segunda perda de próton (geralmente no carbono C7) para produzir a forma quinoidal aniônica, e causar efeitos batocrômicos e hiper-crômicos (SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019).

A coloração violeta a azul do extrato aquoso de *C. ternatea* entre o pH 3,21 a 7,19 (Figura 4.2B), ocorreu pela formação da estrutura na forma quinoidal. De acordo com Abdullah, Lee e Hung (2010), entre o pH 3 a 5, o cátion flavílico vermelho e os dois tautômeros das espécies quinonoidais neutras azuis em equilíbrio produzem a coloração violeta no extrato de *C. ternatea*; e entre pH 5 a 7, o extrato contém predominantemente espécies quinonoidais neutras azuis. A presença de um ou mais grupos acila na molécula de antocianina impede a hidrólise do cátion flavílico para a forma pseudobase carbinol, e permite a formação da forma quinoidal (azul) com menor sensibilidade as alterações do pH em meio levemente ácido ou neutro (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997). Saito et al. (1985) verificaram que as pétalas azuis da *C. ternatea* são compostas por antocianinas aciladas estáveis em solução neutra. Terahara et al. (1989) atribuíram a estabilidade da cor da ternatina D1, em solução aquosa neutra, ao empilhamento intramolecular entre o núcleo da delphinidina e as cadeias laterais-GCGC, onde a porção do cromóforo (forma quinoidal) está protegido do ataque nucleofílico pela água. Moloney et al. (2018) sugeriram que as antocianinas diaciladas do repolho roxo expressam a cor azul intensa estável, em condições neutras e alcalinas, devido as interações da copigmentação intramolecular, cianidina e ácidos hidroxicinâmicos, e a auto-associação, cianidina-cianidina. Stintzing et al. (2002) relataram que as antocianinas não aciladas, em pH 6, apresentam índices de cor transitórios por degradarem rapidamente.

Entre o pH 8,20 e 10,20, a cor do extrato aquoso de *C. ternatea* alterou de azul para verde, Figura 4.2B. Abdullah, Lee e Hung (2010) observaram, entre o pH de 7 a 8, a alteração da cor do extrato de *C. ternatea* de azul para verde. E atribuíram isso a presença de bases quinoidais neutras e bases quinoidais aniônicas em equilíbrio. Moloney et al. (2018) verificaram em pH 8, a mudança estrutural das antocianinas para a forma de bases quinoidais aniônicas azuis, e o deslocamento batocrômico com o aumento no coeficiente de absorção molar. Yong et al. (2019) observaram a presença da cor azul no extrato de berinjela roxa entre o pH 7 a 10, e o deslocamento batocrômico com efeito hiper-crômico. Entre o pH 10 e 12, os extratos de plantas ricos em antocianinas alteram a cor para amarelo devido a

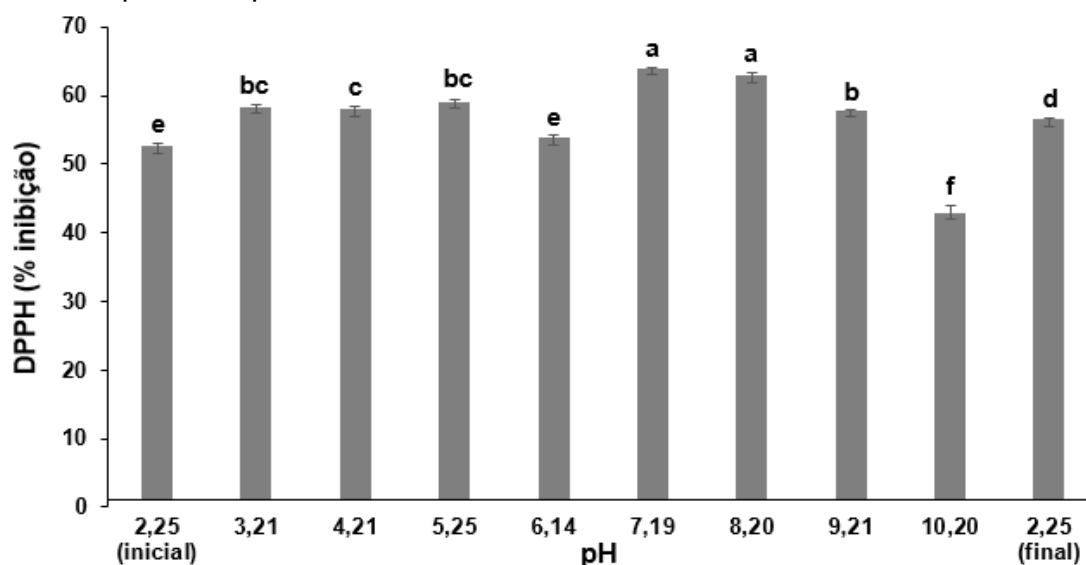
degradação das bases quinoidais para chalconas iônicas (ABDULLAH; LEE; HUNG, 2010; YONG et al., 2019).

A degradação química das antocianinas causa a perda irreversível das cores devido principalmente a clivagem das ligações entre os carbonos C2-C1', C2-C3 ou C3-C4 dos cromóforos (TROUILLAS et al., 2016; MOLONEY et al., 2018). A titulação espectrofotométrica reversa, pH 10,20 a 2,25 mostrou que as antocianinas ternatinas e derivados de delphinidina presentes no extrato da *C. ternatea* apresentaram uma recuperação de 96,2% da absorção inicial, Figura 4.2A. Esse resultado sugere que as antocianinas do extrato de *C. ternatea* apresentaram reversibilidade no deslocamento da estrutura de equilíbrio, visto que a coloração vermelha do extrato no pH 2,25 (F) indicou a mudança da forma quinoidal aniônica para a forma de cátion flavílico, Figura 4.2B. Maciel et al. (2018) observaram a reversibilidade da estrutura das antocianinas do extrato de *Hibiscus sabdariffa*, pH 7,5 a 2,7, e uma recuperação de 72,1% da absorção inicial. Pedro, Granato e Rosso (2016) verificaram que as antocianinas presentes no extrato de arroz preto apresentaram reversibilidade estrutural ao processo de desprotonação-protonação. As estruturas de equilíbrio das antocianinas na forma quinoidal são reversíveis para a forma de cátion flavílico com a redução do pH, enquanto que as espécies *cis* e *trans*-chalconas são irreversíveis (PINA et al., 2012).

#### 4.3.2.2 Efeito do pH na atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* por meio da captura do radical DPPH, foi influenciada significativamente pelas variações do pH, apresentou de 43 a 64% de inibição ( $p \leq 0,05$ ), Figura 4.3. O aumento do pH de 2,25 até 5,25 ocasionou um aumento de 53 para 59% de inibição do DPPH, respectivamente. No pH 6,14, a atividade antioxidante diminuiu para 54% de inibição do DPPH, não diferindo estatisticamente do pH inicial 2,25. O aumento do pH para 7,19 proporcionou um aumento na atividade antioxidante, ou seja, apresentou uma inibição de 64% não diferindo estatisticamente do pH 8,20. No pH 10,20, a atividade antioxidante diminuiu para 43% de inibição. Na titulação reversa, em pH 2,25 inicial, a atividade antioxidante do extrato apresentou uma inibição de 56% do radical DPPH.

**Figura 4.3** - Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea*



Nota: Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Estudos da atividade antioxidante de extratos de flores de *Centaurea cyanus* e de *Hibiscus sabdariffa* mostraram uma maior inibição do radical DPPH entre o pH 4 e 5, e a preservação da atividade antioxidante após a titulação reversa com inibição acima de 54% (MACIEL et al., 2018; ESCHER et al., 2018). Borkowski et al. (2005) observaram que as antocianinas desprotonadas aumentaram a capacidade de eliminação de radicais livres, isto é, com a conversão do cátion flavílico para a forma de base quinoidal, pseudobase carbinol e *cis* e *trans*-chalconas. De acordo com Altunkaya, Gökmen, e Skibsted (2016) o aumento na atividade antioxidante dos compostos fenólicos dependente dos valores de pH, pode estar relacionada com a elevação da capacidade de doação de elétrons após a desprotonação da estrutura molecular e estabilização em meio alcalino.

A atividade antioxidante das antocianinas de pétalas azuis de *C. ternatea* pode ser influenciado pelo pH da matriz alimentícia, e também pelo pH dos fluidos corporais durante o processo digestivo. As antocianinas são absorvidas parcialmente no estômago (pH 1,5-2,0), mas a maior taxa de absorção é no intestino delgado em pH entre 5,0 a 7,0. Alguns fatores como pH intestinal, temperatura, enzimas e microbiota intestinal podem afetar a absorção das antocianinas (HRIBAR; ULRICH, 2014; HAN et al., 2019). Pasukamonset, Kwon, e Adisakwattana (2016) verificaram que o extrato aquoso de *C. ternatea* e a sua microencapsulação preservaram teores significativos de compostos fenólicos e atividade antioxidante após a digestão

gastrointestinal simulada. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* apresenta atividade antioxidante *in vitro* em uma faixa ampla de acidez (pH 3,21 a 5,25), mas estudos *in vivo* são necessários para avaliar a biodisponibilidade, bioacessibilidade e bioatividade das antocianinas de pétalas azuis de *C. ternatea*.

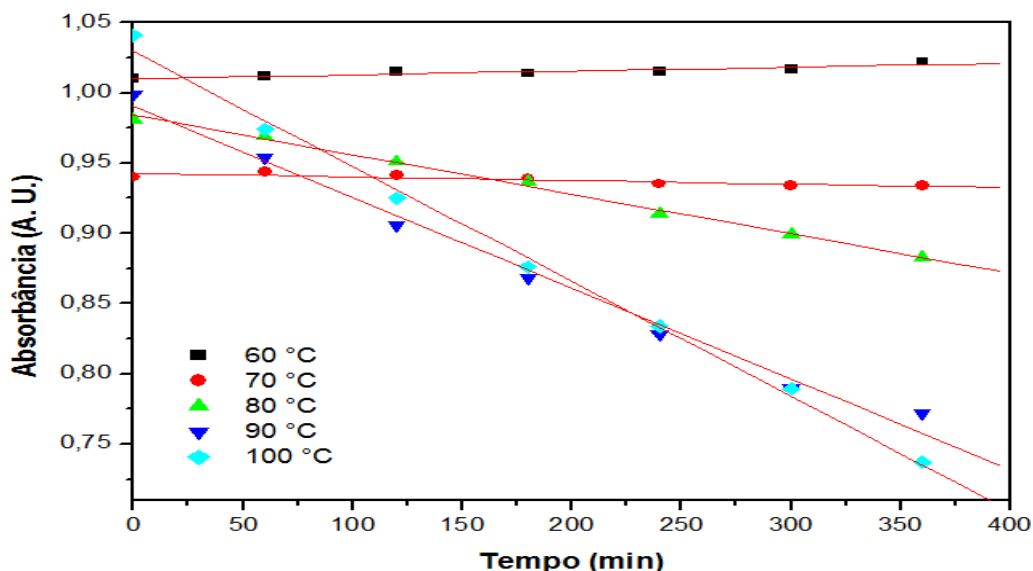
#### 4.3.2.3 Efeito da temperatura

A estabilidade das antocianinas presentes no extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 3,6 e 5,4, foi avaliada nas temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 100 °C, em presença de 1,75 g e 3,5 g FOS/100 mL e ausência de frutooligossacarídeos. Os FOS são fibras solúveis extraídas de plantas que estimulam a proliferação de eubactérias no intestino e que proporcionam benefícios à saúde humana (KOCA; TASCI, 2016). Nesse estudo foi avaliado a influência dos frutooligossacarídeos na estabilidade das antocianinas dos extratos de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 3,6 e 5,4, e submetidas em diferentes temperaturas.

Os extratos de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 3,6 e 5,4, em presença e ausência de FOS, apresentaram estabilidade térmica a 60 e 70 °C por 360 min. A elevação da temperatura para 80, 90 e 100 °C resultou no decréscimo na absorvância dos extratos em pH 3,6 e 5,4 tanto em presença como em ausência de FOS, Figura 4.4.

Os extratos em pH 3,6, com 1,75 g FOS/100 mL e ausência de FOS, apresentaram um decréscimo de 24 e 23% na absorvância à 90 °C durante 360 min, respectivamente, enquanto o extrato com 3,5 g FOS/100 mL reduziu 26% em relação a absorvância inicial. Na temperatura de 100 °C por 180 min, os extratos com 1,75 g FOS/100 mL e em ausência de FOS reduziram 29% na absorvância, e o extrato com 3,5 g FOS/100 mL reduziu 35% em relação a absorvância inicial. Os extratos em pH 3,6, em presença e ausência de FOS, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as porcentagens de redução das absorvâncias ao serem submetidos nas temperaturas de 90 e 100 °C.

**Figura 4.4** – Efeito da temperatura em função do tempo na absorbância do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* em pH 3,6 e 5,4 em presença de 1,75 g e 3,5 g FOS/100 mL, e ausência de frutooligossacarídeos.



Os extratos em pH 5,4, com 1,75 g e 3,5 g FOS/100 mL, apresentaram um decréscimo de 34 e 35% na absorbância à 90 °C durante 360 min, respectivamente; enquanto o extrato em ausência de FOS reduziu 36% em relação a absorbância inicial. Na temperatura de 100 °C por 180 min, o extrato com 3,5 g FOS/100 mL apresentou um decréscimo na absorbância de 45% em relação a absorbância inicial. Os extratos com 1,75 g FOS/100 mL e ausência de FOS à 100 °C por 180 min, demonstraram um decréscimo na absorbância de 42 e 43% em relação a absorbância inicial, respectivamente. Diferenças estatísticas significativas não foram observadas entre as porcentagens de redução das absorbâncias dos extratos de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 5,4, com a presença e ausência de FOS, expostos a temperaturas de 90 e 100 °C.

A Tabela 4.2 apresenta a porcentagem de retenção de cor (%R), constante de velocidade de degradação das antocianinas ( $k$ ), e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ). De acordo com Patras et al. (2010) a cinética da reação de degradação pode ser usada para prever a perda de compostos como as antocianinas, durante o tratamento térmico e período de armazenamento, por meio do conhecimento da ordem de reação, constante de velocidade e energia de ativação. Observa-se que com o aumento da temperatura de 80 a 100 °C ocorreu uma elevação nos valores das constantes de velocidade de degradação das antocianinas dos extratos de pétalas azuis de *C. ternatea*. Da mesma forma, ocorreu um decréscimo no tempo de meia



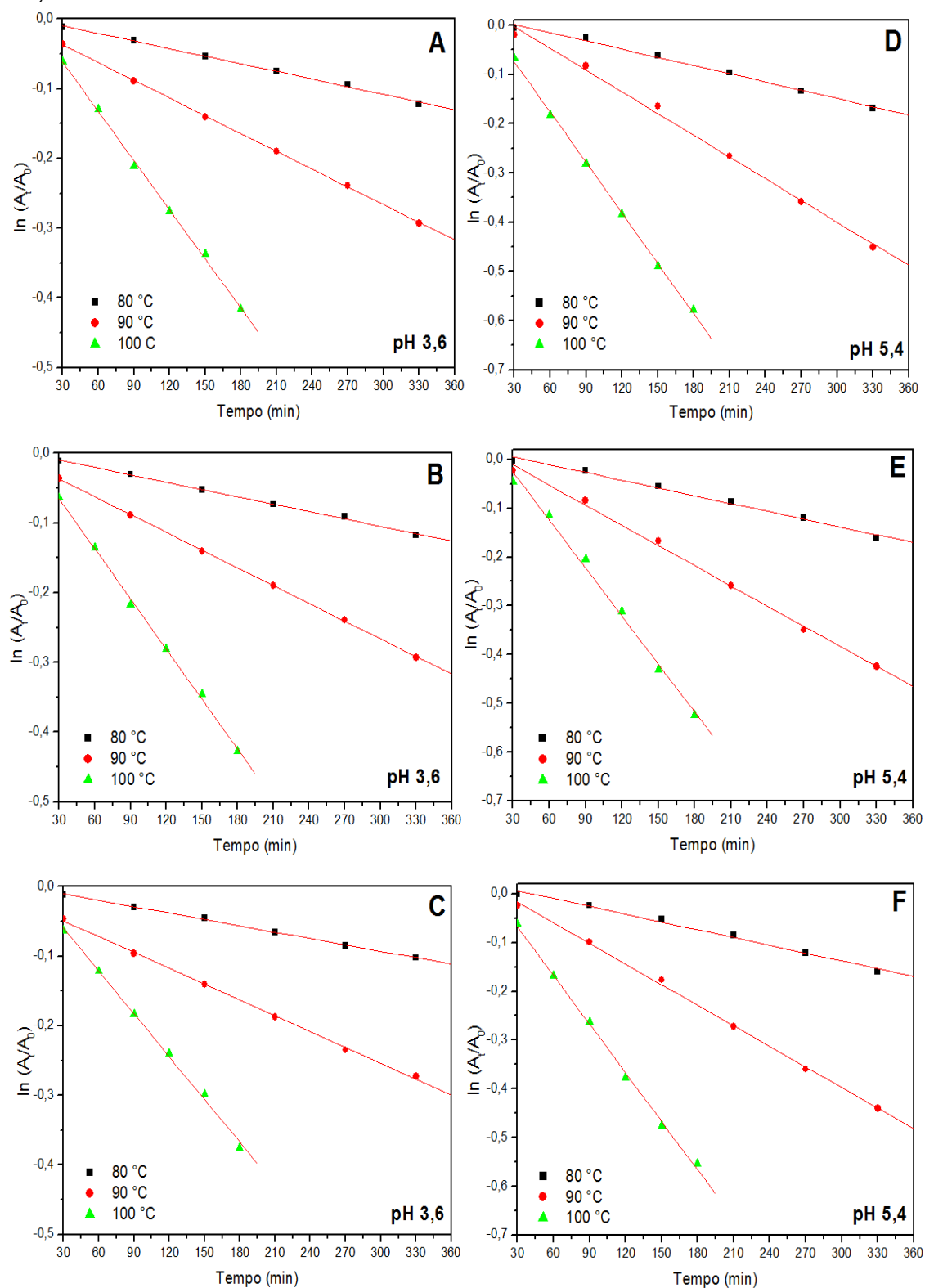
vida das antocianinas dos extratos em pH 3,6 e 5,4 com o aumento da temperatura de 80 a 100 °C. O aumento no valor da constante de velocidade provoca a redução do tempo de meia vida. Observou-se uma relação linear entre a absorbância e o tempo, para os extratos em pH 3,6 e 5,4, na reação de degradação das antocianinas, isso indica que a reação seguiu uma cinética de primeira ordem, Figura 4.5. A reação de degradação das antocianinas nos extratos em pH 3,6 e 5,4 aumentou com a elevação da temperatura em função do tempo. Os resultados estão de acordo com estudos realizados, com diferentes extratos, para a reação de degradação de antocianinas que seguiram uma cinética de primeira ordem (KIRCA; ÖZKAN; CEMEROĞLU, 2007; HOU et al., 2013; JIE et al., 2013; PEDRO; GRANATO; ROSSO, 2016; MACIEL et al., 2018; MIGLIORINI et al., 2019).

**Tabela 4.2** - Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura em função do tempo na estabilidade do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* (pH 3,6 e 5,4 em presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos.

Temperatura (°C)	%R	$k$ (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	p-Valor	$t_{1/2}$ (h)	E <sub>A</sub> (kJ/mol)	R <sup>2</sup>
<b>pH 3,6</b>							
<b>3,5 g FOS/100 mL</b>							
80	88,9 ± 0,8	3,63 x 10 <sup>-4</sup>	0,998	<0,0001	31,9	102,1	0,999
90	74,6 ± 2,2	8,83 x 10 <sup>-4</sup>	0,999	<0,0001	13,1		
100	65,3 ± 1,6	2,35 x 10 <sup>-3</sup>	0,999	<0,0001	4,8		
<b>1,75 g FOS/100 mL</b>							
80	90,5 ± 1,3	3,01 x 10 <sup>-4</sup>	0,999	<0,0001	38,8	104,3	0,999
90	76,5 ± 1,7	7,35 x 10 <sup>-4</sup>	0,999	<0,0001	15,8		
100	69,9 ± 3,3	2,03 x 10 <sup>-3</sup>	0,999	<0,0001	5,8		
<b>Ausência FOS</b>							
80	90,0 ± 0,5	3,06 x 10 <sup>-4</sup>	0,999	<0,0001	37,8	104,0	0,999
90	76,1 ± 1,7	7,98 x 10 <sup>-4</sup>	0,999	<0,0001	15,3		
100	70,2 ± 2,6	2,05 x 10 <sup>-3</sup>	0,997	<0,0001	5,7		
<b>pH 5,4</b>							
<b>3,5 g FOS/100 mL</b>							
80	86,1 ± 2,9	5,57 x 10 <sup>-4</sup>	0,997	<0,0001	20,8	99,3	0,999
90	64,9 ± 2,1	1,47 x 10 <sup>-3</sup>	0,998	<0,0001	7,9		
100	55,2 ± 2,4	3,41 x 10 <sup>-3</sup>	0,998	<0,0001	3,4		
<b>1,75 g FOS/100 mL</b>							
80	85,6 ± 0,8	5,32 x 10 <sup>-4</sup>	0,996	<0,0001	21,7	99,5	0,999
90	65,8 ± 1,2	1,38 x 10 <sup>-3</sup>	0,998	<0,0001	8,4		
100	58,1 ± 4,4	3,28 x 10 <sup>-3</sup>	0,995	<0,0001	3,5		
<b>Ausência FOS</b>							
80	85,2 ± 1,3	5,33 x 10 <sup>-4</sup>	0,996	<0,0001	21,7	100,3	0,999
90	64,5 ± 1,9	1,41 x 10 <sup>-3</sup>	0,999	<0,0001	8,2		
100	57,5 ± 1,7	3,32 x 10 <sup>-3</sup>	0,999	<0,0001	3,5		

Nota: %R = porcentagem de retenção de cor;  $k$  = constante de velocidade de degradação das antocianinas; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; p-Valor = nível descritivo (significância);  $t_{1/2}$  = tempo de meia vida; E<sub>A</sub> = energia de ativação; FOS = Frutooligossacarídeos.

**Figura 4.5** – Cinética da reação de degradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* em pH 3,6 e 5,4 em presença de 3,5 g FOS/100 mL (A, D), 1,75 g FOS/100 mL (B, E), e ausência de FOS (C, F) nas temperaturas de 80, 90 e 100 °C.



As constantes de velocidade, em ambos os valores de pH estudados 3,6 e 5,4, para os extratos em presença de 1,75 g FOS/100 mL e em ausência do FOS foram semelhantes. Para o extrato com 3,5 g FOS/100 mL apresentou valores superiores nas constantes de velocidade, em ambos os valores de pH, e em todas as temperaturas estudadas. Observou-se que com o aumento da temperatura ocorreu uma elevação na constante de velocidade e um decréscimo no tempo de meia vida. A presença de FOS nos extratos de pétalas azuis de *C. ternatea* em ambos os valores de pH 3,6 e 5,4 não influenciaram na estabilidade das antocianinas.

Migliorini et al. (2019) verificaram que as antocianinas presentes no extrato de chicória vermelha, em pH 3, apresentaram elevada estabilidade à 60 °C,  $t_{1/2} = 74,23$  h. Enquanto, a elevação da temperatura para 70, 80, 90 e 100 °C ocasionou um decréscimo no tempo de meia vida para 17,25, 9,55, 5,24 e 2,25 h, respectivamente. Maciel et al. (2018) observaram que o extrato de *Hibiscus sabdariffa* copigmentado em presença de ácido clorogênico, em pH 3, apresentou tempo de meia vida de 6,7, 2,6 e 1,6 h nas temperaturas de 80, 90 e 100 °C, respectivamente. Sagdic et al. (2013) verificaram que as antocianinas presentes no extrato de pétalas da *Tulipa gesneriana* 'Negrita', em pH 3,5, apresentaram tempo de meia vida de 7,18, 2,34 e 1,76 h nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente. Kirca, Özkan e Cemeroğlu (2007) reportaram que as antocianinas presentes no extrato de cenoura preta apresentaram tempo de meia vida de 25,1 h para a temperatura de 70 °C, 10,0 h para a temperatura de 80 °C, e 6,3 h para a temperatura de 90 °C em pH 3 e pH 4.

Jie et al. (2013) relataram que o tempo de meia vida das antocianinas do extrato aquoso de polpa de batata doce roxa em pH 5, expostas nas temperaturas de 80, 90 e 100 °C foram de 25,9, 12,9 e 7,7 h, respectivamente. Hou et al. (2013) observaram que a principal antocianina presente no arroz preto, cianidina-3-glucosídeo, apresentou um tempo de meia vida de 2,51 h para a temperatura de 80 °C, 1,89 h para a temperatura de 90 °C, e 1,43 h para a temperatura de 100 °C em solução tampão citrato-fosfato pH 5. Os autores afirmaram que a estabilidade das antocianinas depende da temperatura e pH associado a estrutura química e copigmentação. Kirca, Özkan e Cemeroğlu (2007) verificaram que as antocianinas do extrato de cenoura preta em solução tampão citrato-fosfato pH 5, apresentaram um tempo de meia vida de 16,7, 10,0 e 5,6 h nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C, respectivamente.

Observou-se que para o extrato em pH 3,6 os valores de  $k$  foram menores e maior tempo de meia vida em relação ao extrato em pH 5,4. Sui, Dong e Zhou (2014) observaram que a elevação da temperatura exibiu um impacto maior na estabilidade das antocianinas do que o aumento do pH 2-6. Hou et al. (2013) relacionaram a aceleração na reação de degradação de antocianinas do extrato de arroz preto em função do aumento do pH 1-6, as diferentes formas estruturais das antocianinas entre as espécies em equilíbrio.

A energia de ativação ( $E_A$ ) é a energia necessária para uma determinada espécie atingir o estado ativado em uma reação química (QIU et al., 2018). Valores elevados de  $E_A$  sugerem que os compostos presentes no extrato mostraram elevada estabilidade frente à temperatura. Quanto maior  $E_A$  mais lenta será a velocidade da reação de degradação das antocianinas (MIGLIORINI et al., 2018). A partir dos dados da Tabela 4.2 observa-se que, para a reação de degradação das antocianinas presentes nos extratos de pétalas azuis de *C. ternatea*, são levemente superiores para o extrato em pH 3,6 em presença e ausência de FOS em comparação ao extrato com pH 5,4. Em pH 3,6, o extrato com 1,75 g FOS/100 mL apresentou valores semelhantes de  $E_A$ , 104,3 kJ/mol, em relação ao extrato em ausência de FOS,  $E_A=104,0$  kJ/mol. Enquanto no extrato com 3,5 g FOS/100 mL o valor da energia de ativação foi de 102,1 kJ/mol. Em pH 5,4, os valores de  $E_A$  foram semelhantes para os extratos em ausência e em presença de FOS.

Migliorini et al. (2019) verificaram que a  $E_A$  para a reação de degradação das antocianinas presentes no extrato de chicória vermelha, em pH 3, foi de 84,88 kJ/mol. Maciel et al. (2018) observaram uma  $E_A$  de 94,4 kJ/mol para o extrato de *Hibiscus sabdariffa* copigmentado com ácido clorogênico em solução tampão citrato pH 3. Hou et al. (2013) determinaram valores de  $E_A$  da cianidina-3-glucosídeo, presente no arroz preto, de 67,39 e 30,97 kJ/mol em solução tampão citrato-fosfato pH 3 e 5, respectivamente. Jie et al. (2013) verificaram o valor de energia de ativação de 66,56 kJ/mol no extrato aquoso de polpa de batata doce roxa em pH 5.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo constatou-se que a presença de FOS não influenciou nos valores de  $E_A$  bem como não aumentou a estabilidade das antocianinas presentes no extrato. No entanto, pode-se evidenciar que as antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* apresentaram elevada estabilidade nas temperaturas estudadas em ambos os valores de pH 3,6 e 5,4. Esse resultado associado as variações de pH, com um

amplo espectro de cores, bem como a reversibilidade próxima de 100% na reação de desprotonação e protonação mostra o potencial, como corante natural, das antocianinas presentes nesse extrato.

#### 4.3.3 Efeito da Luz

A luz é um dos fatores que acelera a reação de degradação das antocianinas influenciando na sua estabilidade. A Tabela 4.3 apresenta os resultados do efeito da luz em função do tempo na estabilidade das antocianinas presentes no extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 3,6 e 5,4, em presença (1,75 g e 3,5 g FOS/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos.

Os extratos em pH 3,6 expostos a luz,  $32 \pm 2$  °C, por 13920 min apresentaram porcentagens de retenção de cor de 35,5 %R para o extrato com 3,5 g FOS/100 mL, 34,6 %R para o extrato com 1,75 g FOS/100 mL, e de 34,4 %R para o extrato em ausência de FOS. Enquanto os extratos protegidos da luz apresentaram porcentagens de retenção de cor superiores comparados aos extratos expostos a luz, 90,5 %R para o extrato com 3,5 g FOS/100 mL, e 90,1 %R para o extrato com 1,75 g FOS/100 mL e em ausência de FOS.

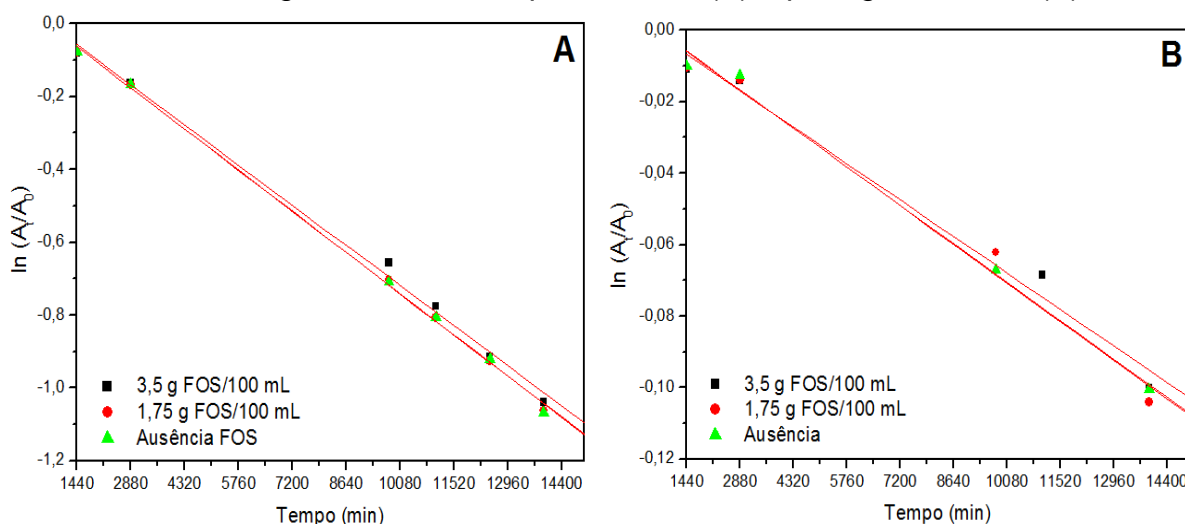
A presença de 3,5 g e 1,75 g FOS/100 mL nos extratos em pH 3,6, expostos e protegidos da luz, resultaram em um aumento do tempo de meia vida e uma redução nos valores das constantes de velocidade de degradação das antocianinas. O tempo de meia vida e a constante de velocidade, para o extrato em ausência de FOS exposto a luz foram de 147,1 h e  $7,86 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ , e para o extrato protegido da luz foram de 1639,9 h e  $7,06 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. Já o extrato com 3,5 g FOS/100 mL exposto a luz apresentou um tempo de meia vida de 151,9 h e  $k = 7,63 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ , e no extrato protegido da luz o tempo de meia vida foi de 1709,4 h e  $k = 6,82 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ . O tempo de meia vida aumentou em 69,5 h no extrato com 3,5 g FOS/100 mL em relação ao extrato em ausência de FOS, ambos protegidos da luz. A Figura 4.6 mostra a cinética de fotodegradação das antocianinas presentes no extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 3,6 na presença e ausência de FOS, e expostos e protegidos da luz.

**Tabela 4.3** - Efeito da luz em função do tempo na estabilidade do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* (pH 3,6 e 5,4) em presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos

Amostras	%R	$t_{1/2}$ (h)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$p$ -Valor
<b>pH 3,6</b>					
<b>Extratos expostos a luz</b>					
3,5 g FOS	35,5 ± 3,0	151,9	7,63 × 10 <sup>-5</sup>	0,998	<0,01
1,75 g FOS	34,6 ± 0,3	147,4	7,84 × 10 <sup>-5</sup>	0,999	<0,01
Ausência FOS	34,4 ± 0,7	147,1	7,86 × 10 <sup>-5</sup>	0,999	<0,01
<b>Extratos protegidos da luz</b>					
3,5 g FOS	90,5 ± 0,1	1709,4	6,82 × 10 <sup>-6</sup>	0,989	<0,01
1,75 g FOS	90,1 ± 0,6	1693,0	6,99 × 10 <sup>-6</sup>	0,982	<0,01
Ausência FOS	90,1 ± 0,9	1639,9	7,06 × 10 <sup>-6</sup>	0,977	<0,01
<b>pH 5,4</b>					
<b>Extratos expostos a luz</b>					
3,5 g FOS	67,5 ± 0,1	484,8	2,34 × 10 <sup>-5</sup>	0,998	<0,01
1,75 g FOS	48,6 ± 0,1	278,1	3,98 × 10 <sup>-5</sup>	0,930	<0,01
Ausência FOS	48,3 ± 0,1	264,3	4,41 × 10 <sup>-5</sup>	0,963	<0,01
<b>Extratos protegidos da luz</b>					
3,5 g FOS	97,6 ± 0,7	-	-	-	-
1,75 g FOS	93,4 ± 0,4	-	-	-	-
Ausência FOS	94,6 ± 1,9	-	-	-	-

Nota: %R = porcentagem de retenção de cor;  $t_{1/2}$  = tempo de meia vida;  $k$  = constante de velocidade de degradação das antocianinas;  $R^2$  = coeficiente de determinação;  $p$ -Valor = nível descritivo (significância); FOS = Frutooligossacarídeos.

**Figura 4.6** – Cinética de fotodegradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* em pH 3,6 com a presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligossacarídeos expostos a luz (A) e protegidos da luz (B)



Pedro, Granato e Rosso (2016) estudaram a estabilidade das antocianinas presentes no extrato de arroz preto, em pH 3,6, copigmentado com glicose, ácido fítico e ácido gálico na presença de luz. Os autores observaram um aumento no tempo de meia vida de 14,06 h, controle, para 15,58, 15,72 e 16,50 h com a presença da glicose, ácido fítico e ácido gálico, respectivamente. Observaram que a

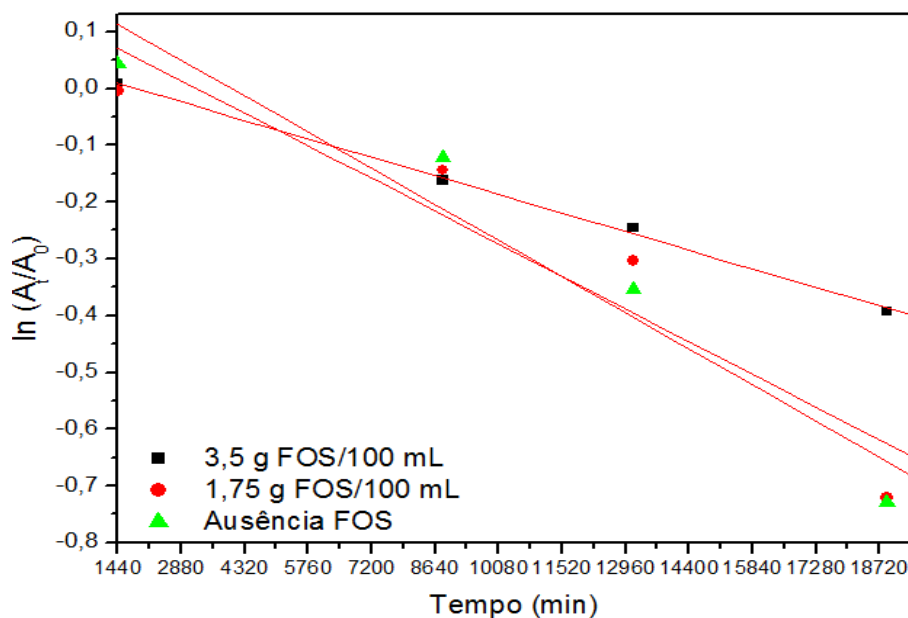
presença dos copigmentos originou uma redução nos valores das constantes de velocidade de degradação das antocianinas do extrato de arroz preto. Askar et al. (2015) verificaram que as antocianinas do extrato de pétalas de rosella, em pH 4, apresentaram um tempo de meia devida de 1,16 h e  $k = 0,010 \text{ min}^{-1}$  sob a luz solar com temperatura entre 25 a 60 °C.

Os extratos de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 5,4 apresentaram porcentagens de retenção de cor de 67,5 %R para o extrato com 3,5 g FOS/100 mL, 48,6 %R para o extrato com 1,75 g FOS/100 mL, e de 48,3 %R para o extrato com ausência de FOS após a exposição à luz por 18900 min, Tabela 4.3. Enquanto, os extratos protegidos da luz apresentaram porcentagens de retenção de cor superiores, 97,6, 93,4 e 94,6 %R para os extratos com 3,5 g FOS/100 mL, 1,75 g FOS/100 mL e em ausência de FOS, respectivamente. A presença do FOS nos extratos em pH 5,4, expostos à luz, proporcionaram um aumento do tempo de meia vida e a redução das constantes de velocidade de degradação das antocianinas. O maior tempo de meia vida,  $t_{1/2} = 484,8 \text{ h}$ , foi observado no extrato com 3,5 g FOS/100 mL exposto a luz associado a menor constante de velocidade,  $k = 2,34 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ . O extrato em ausência de FOS, exposto a luz, apresentou um tempo de meia vida de 264,3 h e  $k = 4,41 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ . Os extratos protegidos da luz apresentaram uma elevada estabilidade, a absorvância do extrato se manteve praticamente constante durante o período de estudo. Assim, impossibilitou o cálculo da constante de velocidade de degradação das antocianinas e o tempo de meia vida. A Figura 4.7 mostra a cinética de fotodegradação das antocianinas presentes no extrato de pétalas azuis de *C. ternatea* em pH 5,4, na presença e ausência de FOS, exposto a luz.

Esses resultados evidenciaram que a exposição à luz ocasionou um aumento na reação de fotodegradação das antocianinas presentes no extrato de pétalas azuis de *C. ternatea*. Sendo que a presença de FOS proporcionou um efeito protetor frente a fotodegradação das antocianinas ternatinas em pH 3,6 e 5,4, no qual o extrato em pH 5,4 exibiu um maior tempo de meia vida associado a menor constante de velocidade de degradação. Os extratos protegidos da luz apresentaram valores muito superiores de retenção de cor. Essa informação sugere a importância da utilização de embalagens escuras pelas indústrias de alimentos para a manutenção da cor das antocianinas ao serem utilizadas como corantes naturais. Não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando o FOS como copigmento para

antocianinas, portanto novos estudos são necessários para avaliar o efeito protetor frente a fotodegradação.

**Figura 4.7** – Cinética de fotodegradação das antocianinas do extrato de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* em pH 5,4 com a presença (1,75 g e 3,5 g/100 mL) e ausência de frutooligosacarídeos expostos a luz.



#### 4.4 CONCLUSÕES

Os compostos tentativamente identificados por UHPLC-Q-TOF-MS/MS em ambos os extratos, bruto liofilizado e parcialmente purificado, foram as ternatinas B2 ou B3, ternatina B4, ternatina D2, derivados de delphinidina ( $m/z$  830,21 e  $m/z$  903,22), miricetina-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), epigalocatequina-3-galato, quercetina-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), kaempferol-3-(2<sup>G</sup>-rutinosídeo-ramnosil), kaempferol-3-neohesperidosídeo, e kaempferol-3-O-(2''-O- $\alpha$ -rhamnosil-6''-O-malonil)- $\beta$ -glicosídeo. Esse é o primeiro trabalho que identifica a presença do epigalocatequina-3-galato em extrato aquoso bruto liofilizado e parcialmente purificado de pétalas azuis de *C. ternatea*.

A titulação espectrofotométrica direta/reversa mostrou que as antocianinas apresentaram alterações estruturais com mudanças na cor com a variação do pH, e reversibilidade estrutural com a preservação da atividade antioxidante. Os extratos aquosos em pH 3,6 e 5,4, em presença e ausência de FOS, exibiram uma alta



estabilidade térmica em 60 e 70 °C e uma elevação na taxa de degradação entre 80 a 100 °C. A energia de ativação foi elevada para ambos os extratos. A adição de FOS nos extratos em pH 3,6 e 5,4 expostos a luz proporcionou um efeito protetor contra a fotodegradação das antocianinas ternatinas. Esses resultados evidenciam que as antocianinas ternatinas e derivados de delphinidina presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *C. ternatea* apresentaram alta estabilidade frente ao pH, temperatura e luz. As conclusões associadas à estrutura química das ternatinas evidenciam que as cadeias laterais, favorecem ao empilhamento intramolecular com a porção do cromóforo, protegendo-o do ataque nucleofílico pela água.

As antocianinas ternatinas têm grande potencial para serem usadas como corantes naturais pela indústria de alimentos. Estudos com diferentes extratos antociânicos são necessários para avaliar o efeito protetor do FOS frente a exposição à luz.

## REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World J Dairy Food Sci**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.
- ABDULLAH, R.; LEE, P. M.; LEE, K. H. Multiple color and pH stability of floral anthocyanin extract: *Clitoria ternatea*. In: **Science and Social Research (CSSR), 2010 International Conference on**. IEEE, p. 254-258, 2010.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 2, p. 73–90, 2012.
- AKERELE, O. Natures medicinal bounty: dont throw it away. **World Health Forum**, v. 14, p. 390-395, 1993.
- AKTER, K.; BARNES, E. C.; LOA-KUM-CHEUNG, W. L.; YIN, P.; KICHU, M.; BROPHY, J. J.; BARROW, R. A.; IMCHEN, I.; VEMULPAD, S. R.; JAMIE, J. F. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 171-181, 2016.
- AKTUMSEK, A.; ZENGIN, G.; GULER, G.O.; CAKMAK, Y.S.; DURAN, A. Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2914-2920, 2011.
- ALBAYRAK, S.; ATASAGUN, B.; AKSOY, A. Comparison of phenolic components and biological activities of two *Centaurea* sp. obtained by three extraction techniques. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 6, p. 599-606, 2017.
- AL-SNAFI, A. E. The pharmacological importance of *Centaurea cyanus*-A review. **International Journal of Pharmacy Review & Research**, v. 5, n. 4, p. 379-384, 2015.
- ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V.; SKIBSTED, L.H. pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 25-32, 2016.
- AMBIGAIPALAN, P.; AL-KHALIFA, A.S.; SHAHIDI, F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1125-1137, 2015.
- AMBIGAIPALAN, P.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of date (*Phoenix dactylifera* L.) seed protein hydrolysates and carnosine in food and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 864-871, 2015.

AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 985-991, 2007.

ANAM, E. M. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from the aerial parts of *Abrus precatorius* (Fabaceae). **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 24-27, 2001.

ANTHIKA, B.; KUSUMOCAHYO, S.P.; SUTANTO, H. Ultrasonic approach in *Clitoria ternatea* (butterfly pea) extraction in water and extract sterilization by ultrafiltration for eye drop active ingredient. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 237-244, 2015.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. In: Neuberger, A.; Tatum, E.L. (Eds.). **Frontiers of Biology**. North-Holland: Amsterdam, v. 21, 1971.

ANVARI, D.; JAMEI, R. A Comparative Study Between the Leaf and Flowers of Some Asteraceae Plants With Respect to Their Antioxidant Activity Compounds. **Current Nutrition & Food Science**, v. 12, n. 4, p. 296-303, 2016.

ARICI, M.; KARASU, S.; BASLAR, M.; TOKER, O. S.; SAGDIC, O.; KARAAGACLI, M. Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 215-222, 2016.

ARIF, R.; KÜPELI, E.; ERGUN, F. The biological activity of *Centaurea* L. species. **Gazi University Journal of Science**, v. 17, n. 4, p. 149-164, 2004.

ARMITAGE, A.M. **Armitage's manual of annuals, biennials, and half-hardy perennials**. Portland, Oregon: Timber Press, 2001.

ARTHANARI, S. K.; VANITHA, J.; GANESH, M.; VENKATESHWARAN, K.; CLERCQ, D. Evaluation of antiviral and cytotoxic activities of methanolic extract of *S. grandiflora* (Fabaceae) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 855-858, 2012.

ARUMUGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. In vitro propagation and antibacterial activity of *Clitoria ternatea* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S870-S875, 2012.

ASADBEIGI, M.; MOHAMMADI, T, RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SAKI, K.; BAHMANI, M.; DELFAN, M. Traditional effects of medicinal plants in the treatment of respiratory diseases and disorders: an ethnobotanical study in the Urmia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 364-368, 2014.

ASEN, S.; HOROWITZ, R.M. Apigenin 4'-O- $\beta$ -D-glucoside 7-O- $\beta$ -D- glucuronide: The copigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1219-1223, 1974.

ASEN, S.; JURD, L. The constitution of a crystalline, blue cornflower pigment. **Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 577-584, 1967.

ASHOK, B.T.; ALI, R. The aging paradox: free radical theory of aging. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 3, p. 293-303, 1999.

ASKAR, K. A.; ALSAWAD, Z. H.; KHALAF, M. N. Evaluation of the pH and thermal stabilities of rosella anthocyanin extracts under solar light. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 262-268, 2015.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre, Brazil: Bookman, 2011.

AVALOS, J. F. V.; CÁRDENAS, J. A. B.; CEJA, J. V. R.; GUERRERO, J. J. B. Agrotechnics and use of *Clitoria ternatea* in beef and milk production systems. **Técnica Pecuaria en México**, v. 42, p. 79-96, 2004.

AZIMA, A.S.; NORIHAM, A.; MANSHOOR, N. Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. elliptica, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 232-241, 2017.

AZIZ, M. A.; KHAN, A. H.; ADNAN, M.; IZATULLAH, I. Traditional uses of medicinal plants reported by the indigenous communities and local herbal practitioners of Bajaur Agency, Federally Administrated Tribal Areas, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 268-281, 2017.

BALICK, M.J.; COX, P.A. **Plants, people, and culture**: The science of ethnobotany. New York: Scientific American Library, 1996.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences**: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, v. 19, n. 4, p. 358, 2014.

BAYER, E.; EGETER, H.; FINK, A.; NETHER, K.; WEGMANN, K. Komplexbildung und blütenfarben. **Angewandte Chemie**, v. 78, n. 18-19, p. 834-841, 1966.

BAYER, E., NETHER, K., EGETER, H. Natürliche und synthetische Anthocyan Komplexe, III. Synthese der blauen, im Kornblumenfarbstoff enthaltenen Chelate. **Chemische Berichte**, vol. 93, p. 2871-2879, 1960.

BAYER, E. Über den blauen Farbstoff der Kornblume, I. Natürliche und synthetische Anthocyan-Metallkomplexe. **Chemische Berichte**, vol. 91, p. 1115-1122, 1958.

BAYTOP, T. **Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi**. Istanbul: Nobel Tip Kitabevleri, 1999.

BELWAL, T.; BHATT, I.D.; RAWAL, R.S.; PANDE, V. Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 393-403, 2017.

BELWAL, T.; DHYANI, P.; BHATT, I. D.; RAWAL, R. S.; PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (MSR). **Food Chemistry**, v. 207, p. 115-124, 2016.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S. Plant diversity from Brazilian Cerrado and Atlantic Forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**. 133 ed. Oxford: Elsevier, 2010.

BONARSKA-KUJAWA, D.; PRUCHNIK, H.; KLESZCZYŃSKA, H. Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 17, n. 2, p. 289-308, 2012.

BORKOWSKI, T.; SZYMUSIAK, H.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; RIETJENS, I. M.; TYRAKOWSKA, B. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5526-5534, 2005.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 2015.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, 396-402, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 540, de 27 de Outubro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/portaria-no-540-de-27-de-outubro-de-1997.pdf/view>. Acesso em: 25 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 44, de 25 de Novembro de 1977**. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO\\_CNNPA\\_44\\_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446). Acesso em: 25 out. 2019.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, p. 103-109, 1997.

BRITTON, G., KHACHIK, F. Carotenoids in Food. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Editor). **Carotenoids**. Nutrition and Health. Birkhäuser Basel, v.5, p. 45-66, 2009.

BROUILLARD, R.; DELAPORTE, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 26, p. 8461-8468, 1977.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris and New York, Tec-Doc Lavoisier, pp. 310–311, 1995.

BUBENCHIKOVA, V. N. Coumarins of plants of the genus *Centaurea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 26, n. 6, p. 709-709, 1990.

BUSSELEN, P. **Campo de *Centaureas cyanus* em Kortrijk**. KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Bélgica. Disponível em: [https://kulak.kuleuven.be/kulakbiocampus/images/buitenkulak/lage\\_planten/Centaurea a%20cyanus%20-%20Korenbloem/index.htm](https://kulak.kuleuven.be/kulakbiocampus/images/buitenkulak/lage_planten/Centaurea%20cyanus%20-%20Korenbloem/index.htm). Acesso em: 14 mar. 2017.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379-389, 2003.

CALLAWAY, R. M.; ASCHEHOUG, E. T. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 521-523, 2000.

CAMPANINI, E. **Dizionario di fitoterapia e piante medicinali**. Milan, Italy: Edizioni Tecniche Nuove, 1998.

CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 26–35, 2018.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284–295, 2015.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 450-458, 1971.

CHAYARATANASIN, P.; BARBIERI, M. A.; SUANPAIRINTR, N.; ADISAKWATTANA, S. Inhibitory effect of *Clitoria ternatea* flower petal extract on fructose-induced protein glycation and oxidation-dependent damages to albumin *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 27, 2015.

CHIRU, T.; CALALB, T.; NISTREANU, A. Morphological and anatomical studies of *Cyani herba*. **Modern Phytomorphology**, p. 65, 2013.

CHOI, E.O.; PARK, C.; HWANG, H.J.; HONG, S.H.; KIM, G.Y.; CHO, E.J.; KIM, W.J.; CHOI, Y.H. Baicalein induces apoptosis via ROS-dependent activation of caspases in human bladder cancer 5637 cells. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 3, p. 1009-1018, 2016.

CHONG, F. C.; GWEE, X. F. Ultrasonic extraction of anthocyanin from *Clitoria ternatea* flowers using response surface methodology. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1485-1487, 2015.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805-817, 2013.

CHUNG, C.; ROJANASASITHARA, T.; MUTILANGI, W.; MCCLEMENTS, D. J. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. **Food Chemistry**, v. 201, p. 14-22, 2016.

CHUSAK, C.; YING, J. A. Y.; ZHIEN, J. L.; PASUKAMONSET, P.; HENRY, C. J.; NGAMUKOTE, S.; ADISAKWATTANA, S. Impact of *Clitoria ternatea* (butterfly pea) flower on *in vitro* starch digestibility, texture and sensory attributes of cooked rice using domestic cooking methods. **Food Chemistry**, v. 295, p. 646-652, 2019.

ÇIMEN, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1-2, p. 1-11, 2008.

CIRIC, A.; KARIOTI, A.; GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, p. 27-34, 2011.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1991.

CORRADINI, M. G. Synthetic Food Colors. In: Varelis, P., Melton, L., Shahidi, F. (Editor). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Elsevier, 2019.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CRINÓ, M.A.; HEENAN, C.N.; NGUYEN, M.H.; STATHOPOULOS, C.E. The stability of natural red/pink food colours in ultrahigh-temperature (UHT) products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2022–2027, 2013.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2 ed. New York: Columbia University Press, 1988.

CUSHMAN, D.W.; CHEUNG, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

DAISY, P.; RAJATHI, M. Hypoglycemic effects of *Clitoria ternatea* Linn.(Fabaceae) in alloxan-induced diabetes in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, 2009.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P.C.; KUPPUSAMY, U.R. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1092-1098, 2008.

DALAR, A.; UZUN, Y.; MUKEMRE, M.; TURKER, M.; KONCZAK, I. *Centaurea karduchorum* Boiss. from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 4, p. 211-216, 2015.

DAMTE, D.; GEBRU, E.; LEE, S. J.; SUH, J. W.; PARK, S. C. Evaluation of anti-quorum sensing activity of 97 indigenous plant extracts from Korea through bioreporter bacterial strains *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, p. 42-6, 2013.

DANGLES, O., SAITO, N., & BROUILLARD, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. **Phytochemistry**, 34(1), 119–124.

D'ANDREA, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.

DA SILVA, J. A. T.; YONEKURA, L.; KAGANDA, J.; MOOKDASANIT, J.; NHUT, D. T.; AFACH, G. Important secondary metabolites and essential oils of species within the Anthemideae (Asteraceae). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 11, n. 1-2, p. 1-46, 2005.

DAWIDOWICZA, A.L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 308-315, 2006.



DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews In Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DEVI, B. P.; BOOMINATHAN, R.; MANDAL, S. C. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Clitoria ternatea* root. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 345-349, 2003.

DE TOLEDO, C. E.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; DE MELLO, J. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420-425, 2011.

DEWAN, S.M.R.; AMIN, M.N.; ADNAN, T.; UDDIN, S.M.U.; SHAHID-UD-DAULA, A.F.M.; SARWAR, G.; HOSSAIN, M.S. Investigation of analgesic potential and *in vitro* antioxidant activity of two plants of Asteraceae family growing in Bangladesh. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 6, p. 599-603, 2013.

DÍAZ-GARCÍA, M. C.; CASTELLAR, M. R.; OBÓN, J. M.; OBÓN, C.; ALCARAZ, F.; RIVERA, D. Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1283-1293, 2015.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

DOS SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; JUNIOR, A. W. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 08, p. 679-684, 2006.

DUBE, P.; MEYER, S.; MARNEWICK, J. L. Antimicrobial and antioxidant activities of different solvent extracts from fermented and green honeybush (*Cyclopia intermedia*) plant material. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 184-193, 2017.

DUEBEUX JUNIOR, J. C. B.; MELLO, A. C. L.; COSTA, L. A. D. S.; SILVA, G. S. **Cunhã: Uma alternativa para o produtor de leite**. Recife-PE: UFRPE, 2009.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EKICI, L.; SIMSEK, Z.; OZTURK, I.; SAGDIC, O.; YETIM, H. Effects of temperature, time, and pH on the stability of anthocyanin extracts: Prediction of total anthocyanin content using nonlinear models. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 1328-1336, 2014.

EMPÓRIO DAS SEMENTES. ***Centaurea cyanus* (Escovinha / Fidalguinhos)**. Disponível em: <http://www.emporioidassementes.com.br/centaurea-cyanus-sortida.html>. Acesso em: 10 Mai. 2017.

ERBAR, C.; LEINS, P. Diversity of styles and mechanisms of secondary pollen presentation in basal Asteraceae—New insights in phylogeny and function. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 217, p. 109-130, 2015.

ESCHER, G. B.; MARQUES, M. B.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; FURTADO, M. M.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, M.C.; GENOVESE, M. I.; WEN, M.; ZHANG, L.; YOUNG, W.; SHAHIDI, F.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. *Clitoria ternatea* petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation. **Food Research International**, 128, 108763, 2020.

ESCHER, G. B.; SANTOS, J. S.; ROSSO, N. D.; MARQUES, M. B.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M. A. V.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A.S.; SILVA, M.C.; GRANATO, D. Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 439-453, 2018.

EREL, S. B.; DEMIR, S.; NALBANTSOY, A.; BALLAR, P.; KHAN, S.; YAVASOGLU, N. U. K.; KARAALP, C. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athena*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 6, p. 775-781, 2014.

ELIZABETSKY, E. New directions in Ethnopharmacology. **Journal of Ethnobiology**, v. 6, n. 1, p. 121-128, 1986.

FAKHFAKH J. A.; DAMAK, M. Sesquiterpene lactones from the flowers of *Centaurea furfuracea* Coss. et Dur.(Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 21, n. 12, p. 1037-1041, 2007.

FANTZ, P. R. Resegregation of *Barbieria* from *Clitoria* (Leguminosae: Phaseoleae: Clitoriinae). **SIDA, Contributions to Botany**, p. 55-68, 1996.

FANTZ, P. R. Revising the Classification of Cultivated *Centrosema* and *Clitoris* in the United States. **HortScience**, v. 28, n. 6, p. 674-676, 1993.

FANTZ, P. R. Ethnobotany of *Clitoria* (Leguminosae). **Economic Botany**, v. 45, n. 4, p. 511-520, 1991.

FANTZ, P. R. *Clitoria* (Leguminosae) Antillarum. **Moscossa**, v. 6, p. 152-166, 1990.

FEDENKO, V.S.; SHEMET, S.A.; LANDI, M. UV–vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: An overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal of Plant Physiology**, v. 212, p. 13-28, 2017.

FEKETE, G.; TSABOURI, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality?. **Food Chemistry**, v. 230, p. 578-588, 2017.

FERNÁNDEZ-OCHOA, Á.; BORRÁS-LINARES, I.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A. Phenolic compounds in rosemary as potential source of bioactive compounds against colorectal cancer: In situ absorption and metabolism study. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 202-210, 2017.

FIDELIS, M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; DO CARMO, M. V.; AZEVEDO, L.; DA SILVA, M. C.; PUTNIK, P.; GRANATO, D. *In vitro* antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* Mcvaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 479-490, 2018.

FORTUNA, A. M.; DE RISCALA, E. C.; CATALAN, C. A. N.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea diffusa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 8, p. 805-808, 2002.

FORTUNA, A. M.; DE RISCALA, E. C.; CATALAN, C. A.; GEDRIS, T. E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 29, n. 9, p. 967-971, 2001.

FLORA DO BRASIL. **Centaurea in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB112125>. Acesso em: 09 Jun. 2017a.

FLORA DO BRASIL. **Clitoria in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22883>. Acesso em: 17 Jun. 2017b.

FLORA DO BRASIL. **Clitoria ternatea in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22894>. Acesso em: 22 Jun. 2017c.

FRANCIS, F. J. Food colorings. In: MacDougall, D. B. (Editor). **Colour in Food**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p. 297-330, 2002.

FRANCIS, F. J.; MARKAKIS, P. C. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

FRAUNFELDER, F. W. Ocular side effects from herbal medicines and nutritional supplements. **American Journal of Ophthalmology**, v. 138, n. 4, p. 639-647, 2004.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; ROBINSON, H. Classification of Compositae. In: **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, p. 171-189, 2009.

GARBACKI, N.; GLOAGUEN, V.; DAMAS, J.; BODART, P.; TITS, M.; ANGENOT, L. Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1, p. 235-241, 1999.

GASCHLER, M.M.; STOCKWELL, B.R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GERARDI, C.; ALBANO, C.; CALABRISO, N.; CARLUCCIO, M. A.; DURANTE, M.; MITA, G.; RENNA, M.; SERIO, F.; BLANDO, F. Techno-functional properties of tomato puree fortified with anthocyanin pigments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1184-1192, 2018.

GERTENBACH, D.D. Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals. In: SHI, J.; MAZZA, G.; MAGUER, M.L. (Eds.). **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC Press, 2002.

GIADA, M. D. L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: **Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants**. InTech, p. 87-112, 2013.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 3, p. 217-225, 2003.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges: 2ème partie mesure, origine et interpretation. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, v. 18, p. 253-71, 1984.

GOMEZ, S.M.; KALAMANI, A. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*): A nutritive multipurpose forage legume for the tropics-an overview. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 6, p. 374-379, 2003.

GOMIG, F.; PIETROVSKI, E.F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E.M.; CALDERARI, M.T.; GUIMARÃES, C.L.; PINHEIRO, R.M.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta Radlk* (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 220-224, 2008.

GOYAL, S.; LAMBERT, C.; CLUZET, S.; MÉRILLON, J. M.; RAMAWAT, K. G. Secondary metabolites and plant defence. In: **Plant Defence: Biological Control**. Dordrecht: Springer, 2012.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 83-90, 2018.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; MACIEL, L. G.; NUNES, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266-279, 2016.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A.A.; NUNES, D.S.; VAN RUTH, S.M. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10283-10296, 2014.

GRANATO, D.; DE CASTRO, I.A.; ELLENDERSEN, L.S.N.; MASSON, M.L. Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. S149-S155, 2010.

GRIN. **Taxon: *Centaurea cyanus* L.** Database USDA-ARS, Germplasm Resources Information Network (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA. Acesso em: <<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=9817>>. Acesso: 05 Mai. 2017a.

GRIN. **Genera of Fabaceae subtribe Clitoriinae.** Database USDA-ARS, Germplasm Resources Information Network (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA. Acesso em: <<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomylist.aspx?category=genera&type=subtribe&value=Fabaceae%20subtribe%20Clitoriinae&id=1511>>. Acesso: 17 jun. 2017b.

GRIN. **Taxon: *Clitoria ternatea* L.** Database USDA-ARS, Germplasm Resources Information Network (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, USA. Acesso em: <<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=10942>>. Acesso: 20 jun. 2017c.

GUÉRAUD, F.; ATALAY, M.; BRESGEN, N.; CIPAK, A.; ECKL, P.M.; HUC, L.; JOUANIN, I.; SIEMS, W.; UCHIDA, K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010.

GUERRERO, L.; CASTILLO, J.; QUIÑONES, M.; GARCIA-VALLVÉ, S.; AROLA, L.; PUJADAS, G.; MUGUERZA, B. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49493, 2012.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, 15, 686–699, 2005.

HAN, F.; YANG, P.; WANG, H.; FERNANDES, I.; MATEUS, N.; LIU, Y. Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 211-224, 2019.

HANSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**, 4. Berlin–Heidelberg: Band.Springer-Verlag, 1992.

HALL, T. J. Adaptation and agronomy of *Clitoria ternatea* L. in northern Australia. **Tropical Grasslands**, v. 19, n. 14, p. 156-163, 1985.

HARBORNE, J. B. Methods in Plant Biochemistry, in **Plant Phenolics**. London: Academic Press, 1989.

HARBONE, J. B. The Flavonoids: recent Advances, in: **Plant Pigments**. London: Academic Press, p. 298-343, 1988.

HAYASHI, K.; SAITO, N.; MITSUI, S. On the Metallic Components in Newly Crystallized Specimen of Bayer's Protocyanin, a Blue Metallo-Anthocyanin from the Cornflower Studies on Anthocyanins. XXXIV. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 37, n. 7, p. 393-397, 1961.

HATAMI, M.; KARIMAN, K.; GHORBANPOUR, M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 275-291, 2016.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R.P.; FERREIRA, I. C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015.

HELLWIG, F. H. *Centaureinae* (Asteraceae) in the Mediterranean—history of ecogeographical radiation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 246, n. 3-4, p. 137-162, 2004.

HERRON-SWEET, C. R.; LITTLEFIELD, J. L.; LEHNHOFF, E. A.; BURKLE, L. A.; MANGOLD, J. M. Native parasitoids associated with the biological control agents of *Centaurea stoebe* in Montana, USA. **Biological Control**, v. 86, p. 20-27, 2015.

HONDA, G.; YESILADA, E.; TABATA, M.; SEZIK, E.; FUJITA, T.; TAKEDA, Y.; TAKAISHI, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kutahya, Denizli, Mugla, Aydin provinces. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 75–87, 1996.

HOU, Z.; QIN, P.; ZHANG, Y.; CUI, S.; REN, G. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 691-697, 2013.

HOU, D. X.; FUJII, M.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M. Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p. 321-325, 2004.

HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 27, p. 6678-6693, 2012.

HRIBAR, U.; ULRIH, N. P. The metabolism of anthocyanins. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2014.

HÜGEL, H.M.; JACKSON, N.; MAY, B.; ZHANG, A.L.; XUE, C.C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220-231, 2016.

IAMSAARD, S.; BURAWAT, J.; KANLA, P.; ARUN, S.; SUKHORUM, W.; SRIPANIDKULCHAI, B.; UABUNDIT, N.; WATTATHORN, J.; HIPKAEAO, W.; FONGMOON, D.; KONDO, H. Antioxidant activity and protective effect of *Clitoria ternatea* flower extract on testicular damage induced by ketoconazole in rats. **Journal of Zhejiang University – SCIENCE B**, v. 15, n. 6, p. 548, 2014.

IONTA, M., FERREIRA-SILVA, G.A., NIERO, E.L., COSTA, É.D.M., MARTENS, A.A., ROSA, W., SOARES, M.G., MACHADO-SANTELLI, G.M., LAGO, J.H.G, SANTOS, M.H. 7-Epiclusianone, a Benzophenone extracted from *Garcinia brasiliensis* (*Clusiaceae*), induces cell cycle arrest in G1/S transition in A549 cells. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12804-12816, 2015.

IRONDI, E. A.; OBOH, G.; AGBOOLA, S. O.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phenolics extract of *Tetrapleura tetraptera* fruit inhibits xanthine oxidase and Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in the kidney, liver, and lungs tissues of rats *in vitro*. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 1, p. 17-23, 2016.

JABEUR, I.; PEREIRA, E.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; SOKOVIĆ, M.; OLIVEIRA, M. B. P.; FERREIRA, I. C. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food Research International**, v. 100, p. 717-723, 2017.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 237-244, 2013.

JAIN, N. N.; OHAL, C. C.; SHROFF, S. K.; BHUTADA, R. H.; SOMANI, R. S.; KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B. *Clitoria ternatea* and the CNS. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 529-536, 2003.

JANG, H. H.; KIM, H. W.; KIM, S. Y.; KIM, S. M.; KIM, J. B.; LEE, Y. M. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of cyanidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside, an anthocyanin isolated from purple-fleshed sweet potato. **Food Chemistry**, v. 272, p. 688-693, 2019.

JIE, L.; XIAO-DING, L.; YUN, Z.; ZHENG-DONG, Z.; ZHI-YA, Q.; MENG, L.; SHAO-HUA, Z.; SHUO, L.; MENG, W.; LU, Q. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1429-1434, 2013.

JOHNSON, M. H.; LUCIUS, A.; MEYER, T.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8923-8930, 2011.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. 3 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2007.

JURD, L.; ASEN, S. The formation of metal and "co-pigment" complexes of cyanidin 3-glucoside. **Phytochemistry**, v. 5, p. 1263-1271, 1966.

KADER, F.; IRMOULI, M.; ZITOUNI, N.; NICOLAS, J. P.; METCHE, M. Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4625-4630, 1999.

KAISOON, O.; SIRIAMORNUN, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; MEESO, N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011.

KAMILLA, L.; MNSOR, S. M.; RAMANATHAN, S.; SASIDHARAN, S. Antimicrobial activity of *Clitoria ternatea* (L.) extracts. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 731-738, 2009.

KAMKAEN, N.; WILKINSON, J. M. The antioxidant activity of *Clitoria ternatea* flower petal extracts and eye gel. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 11, p. 1624-1625, 2009.

KHAN, H.Y.; ZUBAIR, H.; FAHAD, M. U.; AHMAD, A.; MUMTAZ, S. H. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1738-1749, 2012.

KARAMENDERES, C.; KHAN, S.; TEKWANI, B. L.; JACOB, M. R.; KHAN, I. A. Antiprotozoal and Antimicrobial Activities of *Centaurea*. Species Growing in Turkey. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 7, p. 534-539, 2006.

KARIOTI, A.; SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M.; GARCIA, B.; HARVALA, C. Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 1-2, p. 75-80, 2002.

KAVITHA, R.; PREMALAKSHMI, V. Phytochemical analysis of ethanolic extract of leaves of *Clitoria ternatea* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 4, p. 236-242, 2013.



KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 229-237, 2003a.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1133-1139, 2003b.

KENDRICK, A. Natural food and beverage colourings. In: Baines, D., Seal, R. (Editor). **Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p. 25-40, 2012.

KENNY, O.; SMYTH, T. J.; WALSH, D.; KELLEHER, C. T.; HEWAGE, C. M.; BRUNTON, N. P. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, v. 161, p. 79–86, 2014.

KERN, W.; ROTH, H.J.; SCHMID, W.; LIST, P.H.; HORHAMMER, L. **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1972.

KIRCA, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 212-218, 2007.

KLIMAS, R.; RABISKOVI, M.; CIVINSKIENE, G.; BERNATONIENE, J. The diuretic effect of *cornflower* water extract. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 43, n. 3, p. 221-225, 2007.

KOCA, I.; TASCI, B. Garlic as a functional food. **Acta Horticulturae**, 1143, p. 139-146, 2016.

KOCA, U.; SÜNTAR, I. P.; KELES, H.; YESILADA, E.; AKKOL, E. K. *In vivo* anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 551-556, 2009.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 239–240, 2004.

KONDO, T.; UEDA, M.; ISOBE, M.; GOTO, T. A new molecular mechanism of blue color development with protocyanin, a supramolecular pigment from cornflower, *Centaurea cyanus*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 45, p. 8307-8310, 1998.

KONDO, T.; UEDA, M.; TAMURA, H.; YOSHIDA, K.; ISOBE, M.; GOTO, T. Composition of Protocyanin, A Self-Assembled Supramolecular Pigment from the Blue Cornflower, *Centaurea cyanus*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 33, n. 9, p. 978-979, 1994.

KONDO, T.; UEDA, M.; GOTO, T. Structure of ternatin B1, a pentaacylated anthocyanin substituted on the B-ring asymmetrically with two long chains. **Tetrahedron**, v. 46, n. 13-14, p. 4749-4756, 1990.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOUKOULITSA, E.; SKALITSA, H.; KARIOTI, A.; DEMETZOS, C.; DIMAS, K. Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines *in vitro*. **Planta medica**, v. 68, n. 07, p. 649-652, 2002.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, p. 1-17, 2013.

KUMARASAMY, Y.; BYRES, M.; COX, P. J.; JASPARS, M.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 7, p. 615-621, 2007.

KURIAN, A.; SANKAR, A. **Medicinal plants**. Horticulture Science Series. New Delhi: New India publishing, 2007.

KVIECINSKI, M.R.; FELIPE, K.B.; SCHOENFELDER, T.; WIESE, L.P.L.; ROSSI, M.H.; GONÇALVES, E.; FELICIO, J.D.; FILHO, D.W.; PEDROSA, R.C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 69-75, 2008.

LACKEY, J. A. Phaseoleae. In **Advances in Legume Systematics** (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.) Royal Botanic Gardens, Kew, v. 1, p. 301-327, 1981.

LAO, L.; SHEN, J.; TIAN, H.; YAO, Q.; LI, Y.; QIAN, L.; MURRAY, S.S.; WANG, J.C. Secreted phosphoprotein 24 kD inhibits growth of human prostate cancer cells stimulated by BMP-2. **Anticancer Research**, v. 36, n. 11, p. 5773-5780, 2016.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Hortscience** 7, v. 1, p. 83-84, 1972.

LEJEUNE, K. D.; SUDING, K. N.; SEASTEDT, T. R. Nutrient availability does not explain invasion and dominance of a mixed grass prairie by the exotic forb *Centaurea diffusa* Lam. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 1, p. 98-110, 2006.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the world**. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LI, H.; DENG, Z. Structure, Composition and bioactivities of anthocyanins in vegetables and fruits. In: **Handbook of anthocyanins: Food sources, chemical applications and health benefits**. New York: Nova Science Publishers, 2015.

LI, Y.; ZHOU, J.; HUANG, K.; SUN, Y.; ZENG, X. Purification of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1320-1325, 2012.

LITVINENKO, V. I.; BUBENCHIKOVA, V. N. Phytochemical study of *Centaurea cyanus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 24, n. 6, p. 672-674, 1988.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 207-219, 2007.

LITVINENKO, V.I.; BUBENCHIKOVA, V.N. Phytochemical study of *Centaurea cyanus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 24, n. 6, p. 672, 1988.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. Anthocyanins from *Vaccinium* species: potential health effects, bioaccessibility and use in food industry. In: **Handbook of anthocyanins: Food sources, chemical applications and health benefits**. New York: Nova Science Publishers, 2015.

LOIZZO, M. R.; SAID, A.; TUNDIS, R.; RASHED, K.; STATTI, G. A.; HUFNER, A.; MENICHINI, F. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb)(Simaroubaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2007.

LOWRY, J. B.; CHEW, L. On the use of extracted anthocyanin as a food dye. **Economic Botany**, v. 28, n. 1, p. 61-62, 1974.

LUO, J.; ZHANG, C.; LIU, Q.; OU, S.; ZHANG, L.; PENG, X. Combinative effect of sardine peptides and quercetin alleviates hypertension through inhibition of angiotensin I converting enzyme activity and inflammation. **Food Research International**, v. 100, p. 579-585, 2017.

MA, Q.; LIANG, T.; CAO, L.; WANG, L. Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 576-584, 2018.

MACIEL, L. G.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; DAGUER, H., MOLOGNONI, L., ALMEIDA, M. M., GRANATO, D., ROSSO, N. D. *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 187-197, 2018.

MAKASANA, J.; DHOLAKIYA, B. Z.; GAJBHIYE, N. A.; RAJU, S. Extractive determination of bioactive flavonoids from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Linn.). **Research on Chemical Intermediates**, v. 2, n. 43, p. 783-799, 2016.

MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 170-176, 2001.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A.R.; ROSSO, N.D.; GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397-C2403, 2015.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982.

MARTIN, E.; DINC, M.; DURAN, A. Karyomorphological study of eight *Centaurea* L. taxa (Asteraceae) from Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 33, n. 2, p. 97-104, 2009.

MARTYNENKO, A.; CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v. 171, p. 44-51, 2016.

MAZZA, G.; CACACE, J. E.; KAY, C. D. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 1, p. 129-145, 2004.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987.

MEHMOOD, A.; ISHAQ, M.; ZHAO, L.; YAQOUB, S.; SAFDAR, B.; NADEEM, M.; MUNIR, M.; WANG, C. Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 12-19, 2019.

MEIMAN, P. J.; REDENTE, E. F.; PASCHKE, M. W. The role of the native soil community in the invasion ecology of spotted (*Centaurea maculosa* auct. non Lam.) and diffuse (*Centaurea diffusa* Lam.) knapweed. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 2006.

MESCHTER, E. L. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, p. 579-583, 1954.

MIGLIORINI, A. A.; PIROSKI, C. S.; DANIEL, T. G.; CRUZ, T. M.; ESCHER, G. B.; VIEIRA DO CARMO, M. A.; AZEVEDO, L.; MARQUES, M.B.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Red Chicory (*Cichorium intybus*) extract rich in anthocyanins: Chemical stability, Antioxidant Activity, and Antiproliferative Activity *In Vitro*. **Journal of Food Science**, v. 84, p. 990-1001, 2019.

MIRZAIE, A.; ZARE KARIZI, S. Study of chemical composition and characteristics of *Centurea cyanus* extract on colon cancer cell line and analysis of apoptosis gene expression. **Tehran University Medical Journal TUMS Publications**, v. 74, n. 9, p. 626-634, 2016.

MISHRA, K.P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P.K.; SAWHNEY, R.C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 2, p. 94-98, 2008.

MOJICA, L.; BERHOW, M.; DE MEJIA, E. G. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food Chemistry**, v. 229, p. 628-639, 2017.

MOLONEY, M.; ROBBINS, R. J.; COLLINS, T. M.; KONDO, T.; YOSHIDA, K.; DANGLES, O. Red cabbage anthocyanins: The influence of D-glucose acylation by hydroxycinnamic acids on their structural transformations in acidic to mildly alkaline conditions and on the resulting color. **Dyes and Pigments**, v. 158, p. 342-352, 2018.

MOPURI, R.; ISLAM, M. S. Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1442-1452, 2017.

MORRIS, C.; MORRIS, G. A. The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 237-248, 2012.

MSAGATI, T. A. M. **Chemistry of food additives and preservatives**. Wiley-blackwell, 2013.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; KUMAR, N.S.; HEINRICH, M. The Ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* - from traditional use to scientific assessment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 291-301, 2008.

MURRAY, B.A.; FITZGERALD, R.J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 8, p. 773-791, 2007.

MURAV'EVA, D. A.; BUBENCHIKOVA, V. N. Phenolcarboxylic acids of the flowers of *Centaurea cyanus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 22, n. 1, p. 102-102, 1986.

MUTH, N.Z.; PIGLIUCCI, M. Traits of invasives reconsidered: phenotypic comparisons of introduced invasive and introduced noninvasive plant species within two closely related clades. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 188-196, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NAIR, V.; BANG, W. Y.; SCHRECKINGER, E.; ANDARWULAN, N.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 6355-6365, 2015.

NACHAY, K. Color goes natural. **Food Technology**, v. 73, n. 10, 57-71, 2019.

NASCIMENTO, I. A. D.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G. D.; MATHIAS, L.; FONSECA, F. D. A. Flavonolignoids and other compounds isolated from *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2159-2164, 2012.

NEDA, G. D.; RABETA, M. S.; ONG, M. T. Chemical composition and anti-proliferative properties of flowers of *Clitoria ternatea*. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 3, 2013.

NEGRETE, R.; BACKHOUSE, N.; CAJIGAL, I.; DELPORTE, C.; CASSELS, B.K.; BREITMAIER, E.; ECKHARDT, G. Two New Antiinflammatory Elemanolides from *Centaurea chilensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, n. 3, p. 149-153, 1993.

NITHIANANTHAM, K.; PING, K.Y.; LATHA, L.Y.; JOTHY, S.L.; DARAH, I.; CHEN, Y.; CHEW, A.; SASIDHARAN, S. Evaluation of hepatoprotective effect of methanolic extract of *Clitoria ternatea* (Linn.) flower against acetaminophen-induced liver damage. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 4, p. 314-319, 2013.

OJEDA, D.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; HERRERA-ARELLANO, A.; TORTORIELLO, J.; ALVAREZ, L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin-and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 7-10, 2010.

OLAS, B. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 199-204, 2016.

OSAWA, Y. Copigmentation of anthocyanins, In: **Anthocyanins as food colors**, (Markakis, P. (Ed.)). New York: Academic Press, 1982.

OSTAD, S.N.; RAJABI, A.; KHADEMI, R.; FARJADMAND, F.; EFTEKHARI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; KHANAVI, M. Cytotoxic potential of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana*: The MTT assay. **Acta Medica Iranica**, v. 54, n. 9, p. 583-589, 2016.

OZSOY, N.; KULTUR, S.; YILMAZ-OZDEN, T.; OZBEK CELIK, B.; CAN, A.; MELIKOGLU, G. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acetylcholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Activities of Turkish Endemic *Centaurea antiochia* var. *Praealta*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 771-776, 2015.

PAVLOVICH, N. Herbal remedies. The natural approach to combating stress. **Journal of Perianesthesia Nursing**, v. 14, p. 134-138, 1999.

PANERO, J. L.; FREIRE, S. E.; ESPINAR, L. A.; CROZIER, B. S.; BARBOZA, G. E.; CANTERO, J. J. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 80, p. 43-53, 2014.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 757-782, 2008.

PASUKAMONSET, P.; KWON, O.; ADISAKWATTANA, S. Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 772-779, 2016.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.

PEDRO, A.C.; GRANATO, D.; ROSSO, N.D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v. 191, p. 12-20, 2016.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; SANTOS-BUELGA, C.; OSUNA, A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 67-75, 2009.

PETERSSON, E. V.; PUERTA, A.; BERGQUIST, J.; TURNER, C. Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 29, n. 12, p. 2723-2730, 2008.

PHRUEKSANAN, W.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Protection of *Clitoria ternatea* flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 357-363, 2014.

PIERONI, A.; QUAVE, C. L.; VILLANELLI, M. L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOLO, T.; RAMPA, L. G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2, p. 331-344, 2004.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINA, F.; MELO, M. J.; LAIA, C. A.; PAROLA, A. J.; LIMA, J. C. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 2, p. 869-908, 2012.

PIRES, T.C.; DIAS, M.I.; BARROS, L.; CALHELHA, R.C.; ALVES, M.J.; OLIVEIRA, M.B.P.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C. Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. **Food Research International**, v. 105, p. 580-588, 2018a.

PIRES, T.C.; DIAS, M.I.; BARROS, L.; BARREIRA, J.C.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C. Incorporation of natural colorants obtained from edible flowers in yogurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 668-675, 2018b.

PIRVU, L.; BUBUEANU, C.; PANTELI, M.; PETCU, L.; COPREAN, D. *Centaurea cyanus* L. Polysaccharides and Polyphenols Cooperation in Achieving Strong Rat Gastric Ulcer Protection. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, 2015.

PIRVU, L. U. C. I. A.; DRAGOMIR, C.; SCHIOPU, S. T. E. L. I. A. N.; MIHUL, S. C. Vegetal extracts with gastroprotective activity. Part. I. Extracts obtained from *Centaurea cyanus* L. raw material. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 17, n. 2, p. 7169-7176, 2012.

PIRVU, L.; ARMATU, A.; RAU, I.; ŞCHIOPU, S.; COPREAN, D. *Centaurea cyanus* L. herba, chemical composition and therapeutic potential. **Proceeding of the International Symposium**, p. 187-194, 2008.

PLAZA, M.; BATISTA, Â. G.; CAZARIN, C. B. B.; SANDAHL, M.; TURNER, C.; ÖSTMAN, E.; JÚNIOR, M. R. M. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185-197, 2016.

POJER, E., MATTIVI, F., JOHNSON, D., STOCKLEY, C. S. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483-508, 2013.

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

PRIPP, A. H.; ARDÖ, Y. Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 880-888, 2007.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

QASIM, M.; ABIDEEN, Z.; ADNAN, M. Y.; GULZAR, S.; GUL, B.; RASHEED, M.; KHAN, M. A. Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 240-250, 2017.



QIU, G.; WANG, D.; SONG, X.; DENG, Y.; ZHAO, Y. Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. **Food Research International**, v. 105, p. 121-128, 2018.

RADAN, M.; CAREV, I.; TEŠEVIĆ, V.; POLITEO, O.; ČIKEŠ ČULIĆ, V. Qualitative HPLC-DAD-ESI-TOF-MS analysis, cytotoxic and apoptotic effects of Croatian endemic *Centaurea ragusina* L. aqueous extracts. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 9, p. e1700099, 2017.

RAFIEIAN-KOPAEI, M.; ASGARY, S.; ADELNIA, A.; SETORKI, M.; KHAZAEI, M.; KAZEMI, S.; SHAMSI, F. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, p. 2670-2676, 2011.

RAGHU, K. S.; SHAMPRASAD, B. R.; KABEKKODU, S. P.; PALADHI, P.; JOSHI, M. B.; VALIATHAN, M. S.; GURUPRASAD, K. P.; SATYAMOORTHY, K. Age dependent neuroprotective effects of medhya rasayana prepared from *Clitoria ternatea* Linn. in stress induced rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 197, p. 173-183, 2017.

RAHIMI-MADISEH, M.; NAIMI, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Biochemical and Histopathological Changes in Kidney of Diabetic Rats Treated with Hydroalcoholic Extract of *Centaurea cyanus*. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**, v. 26, n. 138, p. 17-25, 2016.

RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; JEYARAM, K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2789-2800, 2017.

RAI, K. S.; MURTHY, K. D.; KARANTHA, K. S.; RAO, M. S. *Clitoria ternatea* (Linn) root extract treatment during growth spurt period enhances learning and memory in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 305-313, 2001.

RAMAN, C. V. The florachromes: their constitution and optical behaviour. **Current Science**, v. 38, p. 451-453, 1969.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N.P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 819-827, 2010.

RAMIREZ-MARES, M.V.; KOBAYASHI, H.; DE MEJIA, E.G. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 269-278, 2016.

RAMOS, L. R.; SANTOS, J. S.; DAGUER, H.; VALESE, A. C.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D. Analytical optimization of a phenolic-rich herbal extract and supplementation in fermented milk containing sweet potato pulp. **Food Chemistry**, v. 221, p. 950-958, 2017.

RANAGANAYAKI, S.; SINGH, A. K. Isolation and identification of pigments of the flowers of *Clitoria ternatea*. **Journal of the Indian Chemical Society**, 1979.

RANILLA, L.G.; KWONB, Y.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4676-4689, 2010.

REDŽIĆ, S. S. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. **Collegium Antropologicum**, v. 31, n. 3, p. 869-890, 2007.

REYES, L.F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Food Chemistry**, v. 100, p. 885-894, 2007.

REYHAN, A. R. İ. F.; KÜPELİ, E.; ERGUN, F. The biological activity of *Centaurea* L. species. **Gazi University Journal of Science**, v. 17, n. 4, p. 149-164, 2004.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010.

RIETJENS, I. M.; BOERSMA, M. G.; VAN DER WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 574, p. 124-138, 2005.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 295-302, 2007.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; NEUGEBAUEROVA, J.; VABKOVA, J. Edible flowers - a new promising source of mineral elements in human nutrition. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6672-6683, 2012.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Universidade Federal da Bahia. Salvador: EDUFBA, 2008.

RÖSCH, M. The history of crops and crop weeds in southwestern Germany from the Neolithic period to modern times, as shown by archaeobotanical evidence. **Veget Hist Archaeobot**, 7:109–125, 1998.

ROSSETTO, M.; VANZANI, P.; LUNELLI, M.; SCARPA, M.; MATTIVI, F.; RIGO, A. Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates. **Free Radical Research**, v. 41, n. 7, p. 854-859, 2007.

SAGDIC, O.; EKICI, L.; OZTURK, I.; TEKINAY, T.; POLAT, B.; TASTEMUR, B.; BAYRAM, O.; SENTURK, B. Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 432-439, 2013.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SAITO, N.; ABE, K.; HONDA, T.; TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Acylated delphinidin glucosides and flavonols from *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1583-1586, 1985.

SAITO, N.; MITSUI, S.; HAYASHI, K. Further analysis of organic and inorganic components in crystalline protocyanin. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 37, n. 8, p. 485-490, 1961.

SALA, A. V. **Indian Medicinal Plants: A Compendium of 500 Species**. Orient Longman, v. 2, 416 p.; 1997.

SANG, J.; SANG, J.; MA, Q.; HOU, X.F.; LI, C.Q. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 218, p. 386-395, 2017.

SANTOS, J.S.; DEOLINDO, C.T.P.; HOFFMANN, J.F.; CHAVES, F.C.; PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A.S.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M.A.V.; GRANATO, D. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348-358, 2018.

SANTOS, J.S.; BRIZOLA, V.R.A.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515-522, 2017.

SANTOS, J.S.; DEOLINDO, C.T.P.; ESMERINO, L.A.; GENOVESE, M.I.; FUJITA, A.; MARQUES, M.B.; ROSSO, N.D.; DAGUER, H.; VALESE, A.C.; GRANATO, D. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). **Food Research International**, v. 89, p. 476-487, 2016.

SARUMATHY, K.; RAJAN, M. S.; VIJAY, T.; JAYAKANTHI, J. Evaluation of phytoconstituents, nephro-protective and antioxidant activities of *Clitoria ternatea*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 164-172, 2011.

ŠAVIKIN, K.; ZDUNIĆ, G.; MENKOVIĆ, N.; ŽIVKOVIĆ, J.; ČUJIĆ, N.; TEREŠČENKO, M.; BIGOVIĆ, D. Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 803-810, 2013.

SEGHIRI, R.; BOUMAZA, O.; MEKKIOU, R.; BENAYACHE, S.; MOSSET, P.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F.; LÉON, F.; BERMEJO, J.; BENAYACHE, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 114-118, 2009.

SELVARAJ, S.; KRISHNASWAMY, S.; DEVASHYA, V.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. **Progress in Lipid Research**, v. 58, p. 1-13, 2015.

SERAGLIO, S.K.T.; VALESE, A.C.; DAGUER, H.; BERGAMO, G.; AZEVEDO, M.S.; GONZAGA, L.V.; FETT, R.; COSTA, A.C.O. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60-67, 2016.

SETFORD, P.C.; JEFFERY, D.W.; GRBIN, P.R.; MUHLACK, R.A. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 106-117, 2017.

SEZIK, E.; YESILADA, E.; HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 95–115, 2001.

SCHWARTZ, S. J.; ELBE, J. H. V.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: Damoradan, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. (Editor). **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

SHAHAT, A. A.; IBRAHIM, A.Y.; ELSAID, M.S. Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian asteraceae plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 545-551, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHARMA, A. K.; MAJUMDER, M. Some observations on the effect of *Clitoria ternatea* Linn on changes in serum sugar level and small intestinal mucosal carbohydrases activities in alloxan diabetes. **Calcutta Medical Journal**, v. 87, n. 11-12, p. 168-171, 1990.

SHAYGANNI, E.; BAHMANI, M.; ASGARY, S.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1119-1126, 2016.

SHIBATA, K.; SHIBATA, Y.; KASIWAGI, I. Studies on anthocyanins: color variation in anthocyanins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 41, n. 2, p. 208-220, 1919.

SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V. G.; WAGNER, H.; VERPOORTE, R.; HEINRICH, M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 481-536, 2014.

SHIONO, M.; MATSUGAKI, N.; TAKEDA, K. Phytochemistry: structure of the blue cornflower pigment. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 791-791, 2005.

SIDDIQI, R.; NAZ, S.; AHMAD, S.; SAYEED, S.A. Antimicrobial activity of the polyphenolic fractions derived from *Grewia asiatica*, *Eugenia jambolana* and *Carissa carandas*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 250-256, 2011.

SILVA, M. J. Filogenia molecular da subtribo Clitoriinae Benth. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae). **62º Congresso Nacional de Botânica Botânica e Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/62CNBot/1828.pdf>. Acesso: 17 Jun. 2017.

SINGH, R.; SRIVASTAVA, S. Exploration of flower based natural dyes—a review. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 4, p. 6-8, 2015.

SINGH, R. H.; NARSIMHAMURTHY, K.; SINGH, G. Neuronutrient impact of Ayurvedic Rasayana therapy in brain aging. **Biogerontology**, v. 9, n. 6, p. 369-374, 2008.

SINGH, N.; RAJINI, P.S. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, n. 2, p. 97-104, 2008.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINOPOLI, A.; CALOGER, G.; BARTOLOTTA, A. Computational aspects of Anthocyanidins and Anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124898, 2019.

SKALTSA, H.; LAZARI, D.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R.; SOKOVIC, M.; CONSTANTINIDIS, T. Sesquiterpene lactones from *Centaurea achaia*, a Greek endemic species: antifungal activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 7-8, p. 534-539, 2000.

SKLIAR, M. I.; TORIBIO, M. S.; ORIANI, D. S. Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 737-739, 2005.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Flavonoids from Berries and Grapes. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Boca Raton: CRC Press, 2002.

SMITH, L.; HAYAT, R.; CRISTOFARO, M.; TRONCI, C.; TOZLU, G.; LECCE, F. Assessment of risk of attack to safflower by *Ceratopion basicorne* (Coleoptera: Apionidae), a prospective biological control agent of *Centaurea solstitialis* (Asteraceae). **Biological Control**, v. 36, n. 3, p. 337-344, 2006.

SOBEH, M.; HASSAN, S.A.; EL RAEY, M.A.; KHALIL, W.A.; HASSAN, M.A.; WINK, M. Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1993, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 2877-2883, 1989.

SRIVASTAVA, B. K.; PANDE, C. S. Anthocyanins from the flowers of *Clitoria ternata*. **Planta Medica**, v. 32, n. 6, p. 138-140, 1977.

STEVENS, L. J.; BURGESS, J. R.; STOCHESKI, M. A.; KUCZEK, T. Amounts of artificial food dyes and added sugars in foods and sweets commonly consumed by children. **Clinical Pediatrics**, v. 54, n. 4, p. 309-321, 2015.

STEVENS, L. J.; BURGESS, J. R.; STOCHESKI, M. A.; KUCZEK, T. Amounts of artificial food colors in commonly consumed beverages and potential behavioral implications for consumption in children. **Clinical Pediatrics**, v. 53, n. 2, p. 133-140, 2014.

STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6172-6181, 2002.

STOCKS, J.; GUTTERIDGE, R. J.; DORMANDY, T. L. S. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science and Molecular Medicine**, 47, 215-222, 1974.

STRACK D, WRAY V. The anthocyanins. In: Harborne JB, editor. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall. p. 1–22, 1993.

SUI, X.; BARY, S.; ZHOU, W. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 516–524, 2016.

SUI, X.; DONG, X.; ZHOU, W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, v. 163, p. 163-170, 2014.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

SUSANNA, A.; GARCÍA-JACAS, N. Tribe Cardueae Cass. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (Eds.) **Kubitzki's the families and genera of vascular plants**. Berlin Heidelberg: Springer, 2007.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 27, p. 6658-6677, 2012.

TAIRA, J.; TSUCHIDA, E.; KATOH, M. C.; UEHARA, M.; OGI, T. Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. **Food Chemistry**, v. 166, p. 531-536, 2015.

TAKASHINA, M.; INOUE, S.; TOMIHARA, K.; TOMITA, K.; HATTORI, K.; ZHAO, Q. L.; SUZUKI, T.; NOGUCHI, M.; OHASHI, W.; HATTORI, Y. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 3, p. 787-797, 2017.

TAMURA, H.; KONDO, T.; KATO, Y.; GOTO, T. Structures of a succinyl anthocyanin and a malonyl flavone, two constituents of the complex blue pigment of cornflower *Centaurea cyanus*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 51, p. 5749-5752, 1983.

TAKEDA, K. Blue metal complex pigments involved in blue flower color. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 82, n. 4, p. 142-154, 2006.

TAKEDA, K.; OSAKABE, A.; SAITO, S.; FURUYAMA, D.; TOMITA, A.; KOJIMA, Y.; SAKUTA, M. Components of protocyanin, a blue pigment from the blue flowers of *Centaurea cyanus*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1607-1613, 2005.

TAKEDA, K.; TOMINAGA, S. The anthocyanin in blue flowers of *Centaurea cyanus*. **Journal of Plant Research**, v. 96, n. 4, p. 359-363, 1983.

TAN, G.; EREL, Ş. B.; DEMİR, S.; AKGÜN, İ.; BEDİR, E.; KARAALP, C. *Centaurea cyanus* L.'Nin sekonder metabolitleri. **Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University**, v. 37, n. 4, p. 285-294, 2008.

TARANALLI, A. D.; CHEERAMKUZHY, T. C. Influence of *Clitoria ternatea* extracts on memory and central cholinergic activity in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 1, p. 51-56, 2000.

TERAHARA, N.; TOKI, K.; SAITO, N.; HONDA, T.; MATSUI, T.; OSAJIMA, Y. Eight New Anthocyanins, Ternatins C1- C5 and D3 and Preternatins A3 and C4 from Young *Clitoria ternatea* Flowers. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1361-1367, 1998.

TERAHARA, N.; ODA, M.; MATSUI, T.; OSAJIMA, Y.; SAITO, N.; TOKI, K.; HONDA, T. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 139-144, 1996.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Acylated anthocyanins of *Clitoria ternatea* flowers and their acyl moieties. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 949-953, 1990a.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Further structural elucidation of the anthocyanin, deacylternatin, from *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3686-3687, 1990b.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Structure of ternatin A1, the largest ternatin in the major blue anthocyanins from *Clitoria ternatea* flowers. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 20, p. 2921-2924, 1990c.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Structure of ternatin A2, one of *Clitoria ternatea* flower anthocyanins having the unsymmetrical side chains. **Heterocycles**, v. 31, n. 10, p. 1773-1776, 1990d.

TERAHARA, N.; SAITO, N.; HONDA, T.; TOKI, K.; OSAJIMA, Y. Structure of ternatin D1, an acylated anthocyanin from *Clitoria ternatea* flowers. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 39, p. 5305-5308, 1989.

TORSKANGERPOLL, K.; ANDERSEN, Ø. M. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, 427-440, 2005.

TOUFEKTSIAN, M. C.; DE LORGERIL, M.; NAGY, N.; SALEN, P.; DONATI, M. B.; GIORDANO, L.; PILU, R. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 4, p. 747-752, 2008.

TRACZ, M.J.; ALAM, J.; NATH, K.A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 414-420, 2007.

TRENTIN, A. P.; SANTOS, A. R.; MIGUEL, O. G.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 5, p. 567-572, 1997.

TROUILLAS, P.; SANCHO-GARCIA, J. C.; DE FREITAS, V.; GIERSCHNER, J.; OTYEPKA, M.; DANGLES, O. Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 4937-4982, 2016.

UYSAL, T., HAMZAOĞLU, E., ERTUĞRUL, K., BOZKURT, M. A new species of *Centaurea* (Asteraceae) from turkey. **Phytotaxa**, v. 275, n. 2, p. 149-158, 2016.



VASISHT, K., DHOBI, M., KHULLAR, S., MANDAL, S. K., KARAN, M. Norneolignans from the roots of *Clitoria ternatea* L. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 16, p. 1758-1762, 2016.

VÁZQUEZ, F. M., SUAREZ, M. A., PÉREZ, A. Medicinal plants used in the Barros Área, Badajoz province (Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 2, p. 81-85, 1997.

VEITCH, N. C. Flavonoid chemistry of the Leguminosae. In: Santos-Buelga, C., Escribano-Baillon, M.T., Lattanzio, V. (Eds.), **Recent Advances in Polyphenol Research**. Wiley-Blackwell, Chichester, v. 2, p. 23–58, 2010.

VERESCHAGIN, V. I.; SOBOLEVSKAYA, K. A.; YAKUBOVA, A. I. **Useful plants of West Siberia**. Moscow-Leningrad: Publishing of Academy of Science of USSR, 1959.

VERMA, P. R.; ITANKAR, P. R.; ARORA, S. K. Evaluation of antidiabetic antihyperlipidemic and pancreatic regeneration, potential of aerial parts of *Clitoria ternatea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 819-829, 2013.

VINHA, A. F.; RODRIGUES, F.; NUNES, M. A.; OLIVEIRA, M. B. P. Natural pigments and colorants in foods and beverages. In: **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**. Sawston: Woodhead Publishing, 2018.

XIE, J.H.; DONG, C.J.; NIE, S.P.; LI, F.; WANG, Z.J.; SHEN, M.Y.; XIE, M.Y. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. **Food Chemistry**, v. 186, p. 97-105, 2015.

XU, Q.; SHEN, Y.; WANG, H.; ZHANG, N.; XU, S.; ZHANG, L. Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from *Fructus sophorae*. **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2122-2129, 2013.

WAGENITZ, G. *Centaurea* in South-West Asia: patterns of distribution and diversity. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences**, v. 89, p. 11-21, 1986.

WANG, B. C.; HE, R.; LI, Z. M. The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 42, 2010.

WARNER, L. M. (Ed.). **Handbook of anthocyanins: Food sources, chemical applications and health benefits**. New York: Nova Science Publishers, 2015.

WEBER, F.; BOCH, K.; SCHIEBER, A. Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 72-77, 2017.

WEGIERA, M.; SMOLARZ, H. D.; JEDRUCH, M.; KORCZAK, M.; KOPROŃ, K. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line-pilot study. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 2, p. 263, 2012.

WHO. **Bulletin of the World Health Organization**. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

WICHTL, M. **Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis (3 ed.)**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

WILLSTÄTTER, R.; MALLISON, H. Untersuchungen über die Anthocyane. X. Über Variationen der Blütenfarben. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 408, n. 1, p. 147-162, 1915.

WILLSTÄTTER, R.; EVEREST, A. E. Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoff der Kornblume. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 401, n. 2, p. 189-232, 1913.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.

WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

WONGS-AREE, C.; GIUSTI, M. M.; SCHWARTZ, S. J. Anthocyanins derived only from delphinidin in the blue petals of *Clitoria ternatea*. In: **IV International Conference on Managing Quality in Chains-The Integrated View on Fruits and Vegetables Quality**. p. 437-442, 2006.

YAHYAPOUR, R.; MOTEVASELI, E.; REZAEYAN, A.; ABDOLLAHI, H.; FARHOOD, B.; CHEKI, M.; REZAPOOR, S.; SHABEEB, D.; MUSA, A.E.; NAJA, M.; VILLA, V. Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 8, p. 975-988, 2018.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 381-406, 2001.

YAZBEK, P. B.; TEZOTO, J.; CASSAS, F.; RODRIGUES, E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 310-331, 2016.

YOLMEH, M.; JAFARI, S. M. Applications of response surface methodology in the food industry processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 3, p. 413-433, 2017.

YONG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; QIN, Y.; LIU, J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 93-104, 2019.

YOSHIDA, K.; TOJO, K.; MORI, M.; YAMASHITA, K.; KITAHARA, S.; NODA, M.; UCHIYAMA, S. Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin. **Tetrahedron**, v. 71, n. 48, p. 9123-9130, 2015.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZATER, H.; HUET, J.; FONTAINE, V.; BENAYACHE, S.; STÉVIGNY, C.; DUEZ, P.; BENAYACHE, F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. algeriensis (Coss. & Dur.) Maire. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 554-561, 2016.

ZHANG, L.; FU, Q.; ZHANG, Y. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1444-1449, 2011.

ZHANG, H. Y.; WANG, L. F. Theoretical elucidation of structure–activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 673, n. 1, p. 199-202, 2004.

ZHONG, S.; LI, L.; SHEN, X.; LI, Q.; XU, W.; WANG, X.; TAO, Y.; YIN, H. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 144, p. 266-278, 2019.

## **ANEXOS**

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY  
REFERENTE AO CAPÍTULO 2.

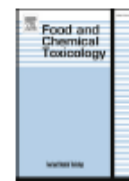
Food and Chemical Toxicology 118 (2018) 439–453



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/  
cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract



Graziela Bragueto Escher<sup>a</sup>, Jânio Sousa Santos<sup>a</sup>, Neiva Deliberali Rosso<sup>a</sup>,  
Mariza Boscacci Marques<sup>b</sup>, Luciana Azevedo<sup>c</sup>, Mariana Araújo Vieira do Carmo<sup>c</sup>, Heitor Dagher<sup>d</sup>,  
Luciano Molognoni<sup>d</sup>, Leonardo do Prado-Silva<sup>e</sup>, Anderson S. Sant'Ana<sup>e</sup>, Marcia Cristina da Silva<sup>f</sup>,  
Daniel Granato<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Food Science and Technology Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemistry, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

<sup>d</sup> Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), National Agricultural Laboratory (SLAV/S/CIANAGRO/RS), Rua João Gramiché, 117, 88102-600, São José, SC, Brazil

<sup>e</sup> Department of Food Sciences, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

<sup>f</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, Department of Food, Rua Senador Furtado, 20270-021, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

**Keywords:**  
LC-ESI-MS/MS  
Phenolic compounds  
Response surface methodology  
Desirability function  
Flavonoids  
Proanthocyanins

ABSTRACT

This study aimed to optimise the experimental conditions of extraction of the phytochemical compounds and functional properties of *Centaurea cyanus* petals. The following parameters were determined: the chemical composition (LC-ESI-MS/MS), the effects of pH on the stability and antioxidant activity of anthocyanins, the inhibition of lipid peroxidation, antioxidant activity, anti-hemolytic activity, antimicrobial, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective effect, and the measurements of intracellular reactive oxygen species. Results showed that the temperature and time influenced ( $p \leq 0.05$ ) the content of flavonoids, anthocyanins, and FRAP. Only the temperature influenced the total phenolic content, non-anthocyanin flavonoids, and antioxidant activity (DPPH·). The statistical approach made it possible to obtain the optimised experimental extraction conditions to increase the level of bioactive compounds. Chlorogenic, caffeic, ferulic, and *p*-coumaric acids, isoquercitrin, and coumarin were identified as the major compounds in the optimised extract. The optimised extract presented anti-hemolytic and anti-hypertensive activity *in vitro*, in addition to showing stability and reversibility of anthocyanins and antioxidant activity with pH variation. The *C. cyanus* petals aqueous extract exhibited high  $IC_{50}$  and  $GL_{50}$  ( $> 900 \mu\text{g/mL}$ ) values for all cell lines, meaning low cytotoxicity. Based on the stress oxidative assay, the extract exhibited pro-oxidant action (10–100  $\mu\text{g/mL}$ ) but did not cause damage or cell death.

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA FOOD RESEARCH INTERNATIONAL REFERENTE AO CAPÍTULO 3.



Food Research International

Available online 31 October 2019, 108763

In Press, Journal Pre-proof



## *Clitoria ternatea* petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit $\alpha$ -amylase and $\alpha$ -glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation

Graziela Bragueto Escher<sup>a</sup>, Mariza Boscacci Marques<sup>b</sup>, Mariana Araújo Vieira do Carmo<sup>c</sup>, Luciana Azevedo<sup>c</sup>, Marianna Miranda Furtado<sup>d</sup>, Anderson S. Sant'Ana<sup>d</sup>, Marcia Cristina da Silva<sup>e</sup>, Maria Inês Genovese<sup>f</sup>, Mingchun Wen<sup>g</sup>, Liang Zhang<sup>g</sup>, Won Young Oh<sup>h</sup>, Fereidoon Shahidi<sup>h</sup>, Neiva Deliberali Rosso<sup>a</sup>, Daniel Granato<sup>a, i</sup>

<sup>a</sup> Food Science and Technology Graduate Program, State University of Ponta Grossa, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemistry, State University of Ponta Grossa, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>c</sup> Deptment of Biological Sciences, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

<sup>d</sup> Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

## ANEXO C – PARECER DA APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
PONTA GROSSA - UEPG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS NATURAIS UTILIZANDO ERITRÓCITOS HUMANO COMO MODELO BIOLÓGICO

**Pesquisador:** Mariza Boscaoci Marques

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 94830318.1.0000.0105

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Ponta Grossa

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.896.929

**Apresentação do Projeto:**

ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS NATURAIS UTILIZANDO ERITRÓCITOS HUMANO COMO MODELO BIOLÓGICO

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1038022.pdf	31/07/2018 16:00:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	31/07/2018 15:57:16	GRAZIELA BRAGUETO ESCHER	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	31/07/2018 15:55:13	GRAZIELA BRAGUETO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PONTA GROSSA, 16 de Setembro de 2018

---

Assinado por:  
**ULISSES COELHO**  
(Coordenador)

ANEXO D – PARECER DA APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 047/2017

Protocolo UEPG – 19184/2017

Título – “Solicita 5 animais de descarte”

Interessado: Daniel Granato ([granatod@gmail.com](mailto:granatod@gmail.com))

Data de Entrada – 26/10/2017

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 17/11/2017 a 17/11/2019

Considerações

Professor Daniel Granato (DEA):

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 5 ratos Wistar isogênicos de descarte.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais  
  
Dra. Dionizia Xavier Scamparini  
Coordenadora