

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CRISTIANE DE MOURA

COMPOSTOS BIOATIVOS DE CHÁ ROXO (*Camellia Sinensis* var.
assamica cv. Zijuan): OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, E
AVALIAÇÃO EM MODELO DE BEBIDA

PONTA GROSSA

2024

CRISTIANE DE MOURA

COMPOSTOS BIOATIVOS DE CHÁ ROXO (*Camellia Sinensis* var.
assamica cv. Zijuan): OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, E
AVALIAÇÃO EM MODELO DE BEBIDA

Defesa de Tese apresentada para a obtenção do título
de Doutora em Química na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Concentração: Química
Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

Coorientadora: Profa^a. Dr^a. Romaiana Picada Pereira

PONTA GROSSA

2024

M929 Moura, Cristiane de
Compostos bioativos de chá roxo (*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*): otimização de extração, atividades biológicas, e avaliação em modelo de bebida / Cristiane de Moura. Ponta Grossa, 2024.
137 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

Coorientadora: Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira.

1. *Camellia sinensis*. 2. Métodos de extração. 3. Folhas roxas de chá. 4. Compostos fenólicos. 5. Bioatividades. I. Granato, Daniel. II. Pereira, Romaiana Picada. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTIANE DE MOURA

“COMPOSTOS BIOATIVOS DE CHÁ ROXO (*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan):
OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS, E AVALIAÇÃO EM MODELO DE
BEBIDA”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da
Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca
examinadora:



Prof. Dr. Daniel Granato (Presidente – Orientador)
UEPG/PR

Documento assinado digitalmente
 JOCIANI ASCARI
Data: 23/06/2024 19:37:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jociane Ascari
UTFPR/PR

Documento assinado digitalmente
 RENATA DINNIES SANTOS SALEM
Data: 19/06/2024 09:31:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata Dinnies Santos
Salem/UEPG/PR

Documento assinado digitalmente
 MARINA TOLENTINO MARINHO
Data: 25/06/2024 19:53:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marina Tolentino Marinho
UEPG/PR



Prof. Dr. Fabiana Andrea Hoffmann Sarda
University of Limerick -Irlanda

Ponta Grossa, 14 de junho de 2024.

Dedico este trabalho às minhas filhas Valentina
Guz e Betina Guz. Que tenham como exemplo uma
mãe que não mediu esforços para alcançar os seus
sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, pela força, coragem, proteção e saúde em todos os dias de minha.

Aos meus pais por todo esforço e dedicação empregado em meus estudos. Nos meus maiores desafios, vocês me apoiaram incondicionalmente, e hoje concluo mais uma etapa em minha vida.

Ao meu marido Ricardo Guz, pelo incentivo na realização do doutorado, pelo auxílio nos momentos mais difíceis. Juntos superamos todos os desafios e estamos alcançando todos os nossos objetivos.

Aos meus sogros, Paulo Guz e Mariluci Guz, por toda ajuda e apoio durante todos esses anos.

Ao Professor Dr. Daniel Granato, pela orientação, seu conhecimento, incentivo e compreensão foram essenciais para que eu pudesse concluir esse projeto.

A Professora Dr. Mariza Boscacci Marques, pela disponibilização do Laboratório LAQUA e por todo auxílio e orientações durante a execução deste trabalho.

Aos colegas Jânio, Thiago, Graziela pela ajuda no início e decorrer deste trabalho, as dicas, conselhos e ensinamentos foram importantes para mim.

Aos professores do Programa de Doutorado em Química que contribuíram para ampliação dos meus conhecimentos científicos.

Aos parceiros desse trabalho, Prof^a. Dr^a. Romaiana Picada Pereira (UEPG), Dr. Heitor Daguer (MAPA-SC), Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (UNICAMP), Prof^a. Dr^a. Luciana Azevedo (UNIFAL), Dr^a. Mariana Araújo Vieira do Carmo (UNIFAL), Prof. Dr. Marcelo Franchin (UNIFAL), Prof. Dr. Liang Zhang (Anhui Agricultural University) e Yong-Quan Xu (Chinese Academy of Agricultural Sciences) pelas contribuições prestadas no desenvolvimento do presente estudo.

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

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

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

RESUMO

Com intuito de maximizar a extração de compostos bioativos e atividade antioxidante (AA) do chá verde proveniente de folhas roxas de *Camellia sinensis* (L.) var. *assamica* (Mast.) Kitamura, conduziu-se estudos para avaliar métodos de extração de compostos bioativos, envolvendo o tempo, temperatura, solventes e a proporção de material vegetal no processo de extração, além da investigação da composição química dos diferentes extratos obtidos, atividade antioxidante *in vitro*, estabilidade química dos compostos e bioatividades *in vitro*. No primeiro estudo (Capítulo 2), utilizou-se a otimização simultânea aplicada que resultou na combinação da temperatura de 60 °C, tempo de 15 min e relação massa-solvente de 1 g de folhas roxas desidratadas para 62,3 mL de solvente (solução de etanol/ácido cítrico 80:20 v/v), como condições ideais de extração. Este extrato liofilizado na condição ideal exerceu efeitos citotóxicos e antiproliferativos contra linhagens de células humanas (IMR90, A549 e HCT8), atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, como *Escherichia coli* (IAL 2064), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) e *Staphylococcus epidermidis* e reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CXCL2/MIP-2 e IL-6) em macrófagos RAW 264.7. Posteriormente, foi conduzida a avaliação do solvente de extração (Capítulo 3) no chá verde proveniente de folhas roxas de *C. sinensis*, com o objetivo de estimar o efeito isolado dos solventes, água e etanol, e suas combinações binárias na extração de compostos bioativos. Neste estudo a condição ideal foi obtida na proporção 75% de etanol e 25% de água como solvente de extração. O extrato na condição ideal evidenciou a diversidade de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, não mostrou comportamento hemolítico em eritrócitos submetidos a condições hipotônicas e isotônicas, além de apresentar efeitos citotóxicos *in vitro* por atividades antioxidantes e pró-oxidantes em células cancerígenas e híbridas, respectivamente. Por fim, uma última condição de extração foi estudada (Capítulo 4), utilizando como solvente extrator água acidificada com ácido cítrico. Este extrato apresentou teores de diferentes classes de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, equilíbrio reversível de antocianinas e atividade antioxidante com variação de pH. Ao avaliar a estabilidade química, a fotodegradação foi observada após 24 h de exposição da luminosidade e degradação térmica (> 80 °C). O extrato liofilizado apresentou propriedades antioxidantes como inibição da peroxidação lipídica, proteção do plasma humano contra a oxidação induzida pelo cobre e redução da viabilidade celular, além de exercer efeitos antiproliferativos e citotóxicos em linhagens celulares (A549 HepG2, HCT8 e Eahy926). Nos três estudos realizados com folhas roxas de *C. sinensis* (cv. *Zijuan*), os extratos obtidos por um processo simples, de baixo custo e com utilização de solventes atóxicos, evidenciaram um alto potencial tecnológico, porém ainda carecem de estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade *in vivo*.

Palavras-Chaves: *Camellia sinensis*; Folhas roxas de chá; Métodos de extração; Compostos fenólicos; Bioatividades.

ABSTRACT

In order to maximize the extraction of bioactive compounds and antioxidant activity (AA) from green tea from purple leaves of *Camellia sinensis* (L.) var. *assamica* (Mast.) Kitamura, studies were conducted to evaluate extraction methods for bioactive compounds, involving time, temperature, solvents and the proportion of plant material in the extraction process, in addition to investigating the chemical composition of the different extracts obtained, activity in vitro antioxidant, chemical stability of compounds and in vitro bioactivities. In the first study (Chapter 2), simultaneous optimization was applied, which resulted in the combination of a temperature of 60 °C, a time of 15 min and a mass-solvent ratio of 1 g of dehydrated purple leaves to 62.3 mL of solvent (ethanol/citric acid solution 80:20 v/v), as ideal extraction conditions. This lyophilized extract under ideal conditions exerted cytotoxic and antiproliferative effects against human cell lines (IMR90, A549 and HCT8), antimicrobial activity against some Gram-negative and Gram-positive microorganisms, such as *Escherichia coli* (IAL 2064), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) and *Staphylococcus epidermidis* and reduced the secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , CXCL2/MIP-2 and IL-6) in RAW 264.7 macrophages. Subsequently, the evaluation of the extraction solvent (Chapter 3) was conducted on green tea from purple leaves of *C. sinensis*, with the aim of estimating the isolated effect of the solvents, water and ethanol, and their binary combinations on the extraction of bioactive compounds. In this study, the ideal condition was obtained with a proportion of 75% ethanol and 25% water as extraction solvent. The extract in the ideal condition showed the diversity of phenolic compounds, antioxidant activity *in vitro*, did not show hemolytic behavior in erythrocytes subjected to hypotonic and isotonic conditions, in addition to presenting cytotoxic effects in vitro due to antioxidant and pro-oxidant activities in cancerous and hybrid cells, respectively. Finally, a last extraction condition was studied (Chapter 4), using water acidified with citric acid as the extracting solvent. This extract presented levels of different classes of phenolic compounds, *in vitro* antioxidant activity, reversible anthocyanin balance and antioxidant activity with pH variation. When evaluating chemical stability, photodegradation was observed after 24 h of light exposure and thermal degradation (> 80 °C). The lyophilized extract showed antioxidant properties such as inhibition of lipid peroxidation, protection of human plasma against copper-induced oxidation and reduction of cell viability, in addition to exerting antiproliferative and cytotoxic effects in cell lines (A549 HepG2, HCT8 and Eahy926). In the three studies carried out with purple leaves of *C. sinensis* (cv. *Zijuan*), the extracts obtained by a simple, low-cost process using non-toxic solvents showed high technological potential, but *in vivo* bioavailability and bioaccessibility studies are still lacking.

Keywords: *Camellia sinensis*; Purple tea leaves; Extraction methods; Phenolic compounds; Bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Exemplos de ácidos fenólicos. Ácido hidroxibenzóico (A) e ácido hidroxicinâmico (B).....	27
Figura 1.2 – Estrutura química básica dos flavonoides (A) e subclasses de flavonoides (B-G).....	27
Figura 1.3 – Estruturas de flavanóis predominantes nos chás provenientes da <i>Camellia sinensis</i> . (-)-epicatequina (A), (-)-epicatequina galato (B), (-)-epigallocatequina (C) e (-)-epigallocatequina galato (D).	29
Figura 1.4 – Estrutura química básica da antocianidina e exemplos de grupos substituintes.	30
Figura 1.5 – Antocianinas e fatores que afetam a estabilidade estrutural.	31
Figura 2.1 - Chá verde obtido de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> adquirido no comércio local de Xishuangbanna, China (A) e triturado (B).	37
Figura 2.2 - Efeito do tempo e temperatura de extração no teor de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), antocianinas totais (C), capacidade redutora total (D), inibição de lipoperoxidação (E) e captura do radical livre DPPH (F).....	53
Figura 2.3 - Otimização simultânea para maximizar o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	57
Figura 2.4 - Cromatograma (A) e quantificação (B) da composição fenólica detectada no extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas (EOFR) de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> ($\lambda=278$ nm).....	59
Figura 2.5 - Estabilidade do teor de compostos fenólicos (A) e atividade de inibição do radical DPPH (B) do extrato otimizado de folhas de chá roxo (EOFR) de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> em diferentes pHs.	61
Figura 2.6 - Medição intracelular de espécies reativas de oxigênio em células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) e carcinoma do cólon humano (HCT8) por espectrofluorimetria.	65
Figura 2.7 - Efeitos do extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas (EOFR) de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> (1–1000 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade de macrófagos RAW 264,7 (A), produção de TNF- α (B), produção de CXCL2/MIP-2 (C) e produção de IL-6 (D).	66

Figura 2.8 - Efeitos do extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> na inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase....	68
Figura 3.1 - Extratos de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> , obtidos com diferentes polaridades de solvente extrator.....	85
Figura 3.2 - Extrato ideal de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> (A) e extrato ideal liofilizado (B).	91
Figura 3.3 - Curva de hemólise hipotônica do extrato ideal liofilizado (EIL) de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> (50 μ g/mL) em comparação ao controle (A). Taxa de hemólise em 0,3% de NaCl com dose-dependência do EIL e comparação com quercetina 50 μ g/mL (B).....	95
Figura 3.4 - Resultados da medição intracelular de ERO em células cancerígenas (A549, HepG2 e HCT8) e híbrida (EA.hy) por espectrofluorimetria.	96
Figura 3.5 - Viabilidade celular células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), células de hepatocarcinoma humano (HepG-2), células de carcinoma do cólon humano (HCT8) e híbrido de células endoteliais (EA.hy) em relação a diferentes concentrações do extrato ideal liofilizado de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	97
Figura 4.1 - Efeito do pH na estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> . A: Espectro de absorção dos extratos entre pH 2 a 10, e reversibilidade para pH 1,5 (F: final) com variação de cores dos extratos. (B) Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com variação de pH. (C) Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).	110
Figura 4.2 - Efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> por 420 min. (A) Espectro de absorção dos extratos à 60 °C. (B) Espectro de absorção dos extratos à 80 °C. (C) Espectro de absorção dos extratos à 100 °C.	112
Figura 4.3 - Efeito da luz na estabilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> por 96 horas. (A) Espectro de absorção de extratos no início. (B) Espectro de absorção após 96 h sem exposição à luz (escuro). (C) Espectro de absorção após 96 h de exposição à luz.	114
Figura 4.4 - Efeitos do extrato bruto liofilizado (EBL) de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> na oxidação do plasma humano.....	116

Figura 4.5 - Viabilidade celular células epiteliais de adenocarcinoma do pulmão (A549), células de células de carcinoma de hepatoma humano (HepG2), células de carcinoma do cólon humano (HCT8) e híbrido de células endoteliais (EA.hy926) em relação a diferentes concentrações do extrato bruto liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*.119

Figura 4.6 - Resultados da medição intracelular de ERO em células A549, HepG2, HCT8 e Ea.hy926 por espectrofluorimetria com extrato bruto liofilizado (EBL) a 7,5 – 38 µg AGE/mL de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan.120

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Matriz do Planejamento fatorial <i>Box-Behnken</i> com os níveis reais e codificados.	38
Tabela 2.2 - Quantificação de classes de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> de acordo com o planejamento experimental <i>Box Behnken</i>	52
Tabela 2.3 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura (X_1), tempo (X_2) e razão sólido-líquido (X_3) na composição química e atividade antioxidante das folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>Assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	54
Tabela 2.4 - Valores preditos e experimentais para o extrato otimizado do chá das folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	56
Tabela 2.5 - Atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e otimizado de folhas de chá roxo (EOFR) de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	62
Tabela 2.6 - Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), fibroblasto de pulmão humano (IMR90) e carcinoma do cólon humano (HCT8) após exposição ao extrato otimizado e liofilizado de folhas roxas de <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	64
Tabela 3.1 - Proporções de solventes utilizadas para extração de compostos fenólicos no chá verde de folhas roxas de <i>C. sinensis</i>	72
Tabela 3.2 - Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$	74
Tabela 3.3 - Modelagem da extração de compostos bioativos, atividade antioxidante, clorofilas e cor instrumental de extratos de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> obtidos com diferentes proporções de etanol e água.	82
Tabela 3.4 - Composição fenólica, cor instrumental e atividade antioxidante de extratos de folhas roxas da <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> obtidos com diferentes proporções de etanol e água.	87
Tabela 3.5 - Composição química e atividade antioxidante do extrato ideal liofilizado de folhas roxas de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	92
Tabela 4.1 - Composição fenólica e atividade antioxidante do extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	107

Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas no extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. Zijuan.	111
Tabela 4.3 – Proporção de pigmentos vermelhos, azuis e amarelos no extrato bruto de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i> expostos na luz e protegidos da luz durante um 96h.	112
Tabela 4.4 - Composição fenólica, atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado de <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>	117

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Comprimento de onda
AA	Atividade antioxidante
AAE	Ácido ascórbico equivalente
ACE	Ácido clorogênico equivalente
AGE	Ácido gálico equivalente
ANOVA	Análise de variância
AT	Antocianinas totais
C	(+)-catequina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAF	Cafeína
CE	Catequina equivalente
Chl.A	Clorofila A
Chl.B	Clorofila B
CT	Carotenoides totais
<i>C. sinensis</i>	<i>Camellia sinensis</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CFT	Compostos fenólicos totais
CGE	Cianidina-3-glucosídeo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRT	Capacidade Redutora Total
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-2-picrilhidrazila
EB	Extrato Bruto
EBL	Extrato Bruto Liofilizado
EC	(-)-epicatequina
ECG	(-)-epicatequina galato
EGCG	(-)-epigallocatequina-galato
EGC	(-)-epigallocatequina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EOFR	Extrato otimizado de folhas roxas
EOL	Extrato otimizado e liofilizado
ERO	Espécies reativas de oxigênio

LPS	Lipopolissacarídeos
FT	Flavonoides totais
FRAP	Atividade antioxidante de redução do ferro
GC	(-)-galocatequina
GCG	(-)-galocatequina-galato
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MSR	Metodologia de superfície resposta
PA	Pigmentos amarelos
PBS	Tampão fosfato de sódio
PV	Pigmentos vermelhos
PZ	Pigmentos azuis
QE	Quercetina equivalente
R ²	Coeficiente de regressão linear múltiplo
R ² adj	Coeficiente de determinação ajustado
TBA	Ácido tiobarbitúrico
THB	Teobromina
UV-Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVO GERAL	21
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1 CHÁS.....	22
1.2 <i>CAMELLIA SINENSIS</i>	23
1.2.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) var. <i>assamica</i> (Mast.) Kitamura: cultivar <i>Zijuan</i>	24
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS.....	26
1.3.1 Compostos fenólicos.....	26
1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
1.5 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	34
CAPÍTULO 2 - FOLHAS DE CHÁ ROXO (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>) COMO UM POTENCIAL INGREDIENTE FUNCIONAL: DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ÀS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS¹ ..	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.3.1 Matéria Prima.....	37
2.3.2 Planejamento Experimental e Preparação dos Extratos.....	38
2.3.3 Determinação da Composição Fenólica.....	39
2.3.4 Avaliação da Atividade Antioxidante	40
2.3.4.1 Captura do Radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).....	40
2.3.4.2 Capacidade Redutora Total (CRT).....	40
2.3.4.3 Inibição de Peroxidação Lipídica.....	41
2.3.5 Metodologia de Superfície de Resposta e Otimização	41
2.3.6 Composição Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato Otimizado.....	42
2.3.7 Estabilidade química do Extrato Otimizado	44
2.3.8 Extrato Otimizado e Liofilizado de Folhas roxas (EOL)	44
2.3.8.1 Quantificação do conteúdo fenólico individual por CLAE.....	44
2.3.8.2 Atividade antimicrobiana.....	44
2.3.8.3 Citotoxicidade celular in vitro.....	46

2.3.8.4 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares.....	47
2.3.8.5 Atividade anti-inflamatória.....	47
2.3.8.6 Inibição da α -amilase e α -glicosidase in vitro.....	48
2.3.9 Análise estatística	49
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
2.4.1 Efeitos das Variáveis Independentes na Composição Fenólica e Atividade Antioxidante dos extratos	49
2.4.2 Composição Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato Otimizado	57
2.4.3 Estabilidade do Extrato otimizado	60
2.4.4 Bioatividades <i>in vitro</i> do EOFR Liofilizado	62
2.4.4.1 Atividade Antimicrobiana.....	62
2.4.4.2. Viabilidade Celular e Medição de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular.....	63
2.4.4.3 Atividade Anti-inflamatória.....	65
2.4.4.4 Inibição da α -amilase e α -glicosidase in vitro	67
2.5 CONCLUSÕES.....	69
CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ÁGUA E ETANOL COMO SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS ROXAS DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> VAR. <i>ASSAMICA</i>².....	70
3.1 INTRODUÇÃO.....	70
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.3.1 Preparação dos extratos	71
3.3.2 Caracterização química dos extratos	72
3.3.3 Determinação da Cor Instrumental, Clorofila A e B e Teor de Carotenoides Totais	77
3.3.4 Atividade antioxidante	77
3.3.5 Obtenção do extrato ideal e modelagem da extração	78
3.3.6 Extrato ideal liofilizado (EIL).....	78
3.3.6.1 Caracterização química e atividade antioxidante.....	78
3.3.6.2 Atividade Anti-Hemolítica.....	79
3.3.6.3 Viabilidade celular.....	80
3.3.6.4 Atividade antioxidante celular via geração de ERO.....	81
3.3.7 Análise Estatística.....	81

3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	82
3.4.1	Efeitos da Água e Etanol na Extração de Compostos Bioativos, Cor Instrumental e Atividade Antioxidante	82
3.4.2	Composição Química, Atividade Antioxidante e Cor Instrumental de Extratos de Chá Roxo	85
3.4.3	Caracterização do extrato ideal de chá roxo: composição química e bioatividades	91
3.4.3.1	Composição Fenólica e atividade antioxidante.....	91
3.4.3.2	Atividade Anti-Hemolítica.....	93
3.4.3.3	Geração de EROs intracelular e viabilidade celular.....	95
3.5	CONCLUSÕES.....	97
CAPÍTULO 4 – EXTRATO ANTOCIÂNICO DE FOLHAS ROXAS DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> VAR. <i>ASSAMICA</i>: ESTABILIDADE QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR E PROTEÇÃO DO PLASMA HUMANO³.....		99
4.1	INTRODUÇÃO.....	99
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	100
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	100
4.3.1	PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTOCIÂNICO.....	100
4.3.2	Classes fenólicas por espectrofotometria UV-VIS.....	100
4.3.3	Atividade Antioxidante.....	101
4.3.4	Estudo da Estabilidade das antocianinas do extrato bruto	102
4.3.4.1	Efeito do pH na atividade antioxidante in vitro	102
4.3.4.2	Efeito da Temperatura.....	102
4.3.4.3	Efeito da Luz.....	103
4.3.5	Extrato Bruto Liofilizado	103
4.3.5.1	Classes fenólicas por espectrofotometria UV-VIS.....	103
4.3.5.2	Composição fenólica por UPLC-ESI-MS	103
4.3.5.3	Identificação de compostos de fenólicos e cafeína.....	104
4.3.5.4	Atividade antioxidante.....	105
4.3.5.5	Efeito do EBL na viabilidade celular humana e atividade antioxidante celular.....	105
4.3.5.6	Proteção plasmática contra oxidação.....	106
4.3.6	Análises Estatísticas	106
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	107

4.4.1	Determinação de Polifenóis e Atividade Antioxidante do Extrato Bruto	107
4.4.2	Estudos de estabilidade de antocianinas do extrato bruto.....	108
4.4.2.1	Efeito do pH e atividade antioxidante in vitro.....	108
4.4.2.2	Efeito da temperatura.....	110
4.4.2.3	Efeito da luminosidade.....	112
4.4.3	Extrato Bruto Liofilizado	114
4.4.3.1	Composição fenólica e atividade antioxidante.....	114
4.4.3.2	Viabilidade celular e atividade antioxidante intracelular.....	118
4.5	CONCLUSÕES.....	121
	CONCLUSÕES GERAIS	122
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA	133
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE LIMERICK PARA ANÁLISE DE OXIDAÇÃO DE PLASMA HUMANO.....	136

INTRODUÇÃO

Os chás se tornaram uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, e sem dúvida a *Camellia sinensis* é a fonte vegetal mais utilizada para este propósito (Santos *et al.*, 2018). Os brotos, folhas e caules de *Camellia sinensis* [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] e *Camellia assamica* [*Camellia sinensis* var. *assamica* (Masters) Kitamura], são utilizados para o processamento e obtenção de diferentes chás, classificados como não fermentado (chá verde e branco), semi fermentado (chá *oolong*) e totalmente fermentado (chá preto) (Zhang *et al.*, 2019a; Zhao *et al.*, 2020). A produção de chás para consumo e pesquisa se tornou uma indústria bilionária com uma receita gerada de 7 bilhões de dólares em exportações mundiais em 2019, o que corresponde uma área plantada de 1 milhão de hectares com 5,79 milhões de toneladas de chá (Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021).

Além do consumo de chás na forma tradicional, como a infusão, a aplicação de extratos brutos ou compostos purificados são utilizados em diferentes propósitos, como: preservação de produtos cárneos, substituição de antioxidantes sintéticos, suplemento em produtos lácteos, ocasionando o aumento da vida de prateleira de produtos alimentícios por meio da inibição de microrganismos e/ou processos oxidativos (Santos *et al.*, 2020; Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021).

Diferentes cultivares de *C. sinensis* são encontradas para o consumo e a cultivar *Zijuan*, também conhecida como chá roxo, se destaca entre as cultivares devido sua coloração roxa, oriunda do acúmulo de antocianinas, o que fornece uma rica diversidade de compostos fenólicos, com destaque para flavonoides, especialmente flavan-3-óis, antocianinas e ácidos fenólicos (Zhao *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2021; De Moura *et al.*, 2022). Bioatividades da cultivar *Zijuan* também já foram relatadas na literatura, como efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios e anti-hiperglicêmicos (Kerio *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020; De Moura *et al.*, 2023).

A técnica de extração sólido-líquido é amplamente utilizada para extrair compostos fenólicos devido à sua fácil execução, alta reprodutibilidade e baixo custo (Armstrong *et al.*, 2020; Sayuti *et al.*, 2021; Moura *et al.*, 2022), porém fatores como tempo, temperatura, tipo e volume de solventes devem ser avaliados e otimizados no intuito de maximizar a extração de compostos bioativos, no entanto, a toxicidade do solvente deve ser considerada para possíveis aplicações em alimentos (Schechtel *et*

al., 2019). Para fins alimentícios, solventes como água e etanol são recomendados devido à sua baixa toxicidade, sendo reconhecidos como seguros por órgãos de saúde de diversos países como o Brasil (Resolução RDC nº 466 de 10 de fevereiro de 2021), Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA) e União Europeia (Diretiva 2009/32/EC de 23 de abril de 2009). Levando em consideração os fatores mencionados, os extratos devem fornecer um alto rendimento fenólico, porém devem ser seguros para os consumidores e o meio ambiente.

Neste contexto, o presente estudo foi desenvolvido para otimizar diferentes condições para extração dos compostos bioativos no chá verde proveniente das folhas roxas de *Camellia sinensis* (L.) var. *assamica* (Mast.) Kitamura (cultivar *Zijuan*), em um processo simples, atóxico e de baixo custo, avaliação das propriedades funcionais, caracterização e estabilidade química.

Esta tese de doutorado em química está dividida em 4 capítulos interligados.

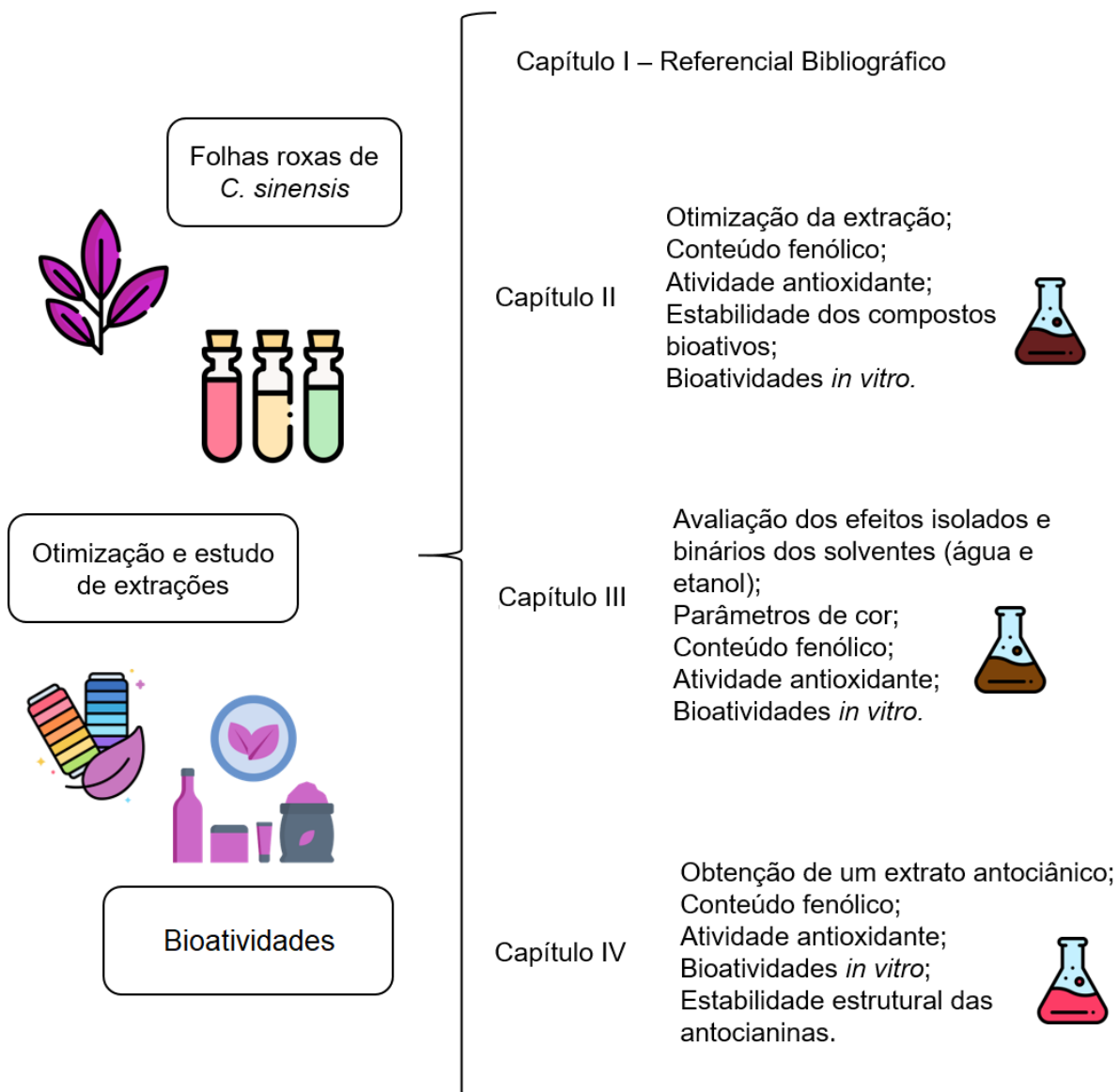
Capítulo 1: apresenta uma revisão bibliográfica sobre chás provenientes da *C. sinensis*, metabólicos secundários, bioatividades e possíveis aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia.

Capítulo 2: aborda o estudo da influência da temperatura, tempo e razão massa solvente no processo de extração, visando maximizar os teores de compostos bioativos extraídos e atividade antioxidante (AA) *in vitro*, utilizando uma abordagem estatística, além de avaliar as propriedades funcionais *in vitro* e a estabilidade dos compostos fenólicos frente a variação de pH.

Capítulo 3: Aborda a avaliação dos efeitos isolados e binários dos solventes extratores, água e etanol em diferentes proporções, visando potencializar os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, bem como a composição química através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) e bioatividades *in vitro*.

Capítulo 4: Compreende o estudo do extrato antociânico obtido com solução aquosa de ácido cítrico, visando avaliar a composição química, bioatividades *in vitro* e estabilidade frente a variação de pH, temperatura e luz.

Figura 1.0 Subdivisão da tese de doutorado em quatro capítulos interligados.



Fonte: Do autor.

OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes condições de extração dos compostos bioativos presentes no chá verde proveniente de folhas roxas de *Camellia sinensis* (L.) var. *assamica* (Masters) Kitamura cv. *Zijuan*, bem como avaliar a composição fenólica, estabilidade química, atividade antioxidante e bioatividades *in vitro* dos extratos obtidos.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CHÁS

Os chás ganharam o mundo devido suas características de aroma e sabor, mas suas propriedades medicinais foram fundamentais para que o chá se tornasse uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Não há indicações de quando os chás começaram a serem consumidos, porém há diversas lendas que contam sobre este acontecimento. A lenda mais conhecida afirma que em 2737 a.C. um imperador chinês teria sido o primeiro a saborear o chá, pois folhas caíram sobre o recipiente com água a ser fervida, curioso ele saboreou a bebida colorida e achou saborosa e revitalizante. Porém, o primeiro registro escrito foi no ano de 200 a.C, em um livro chinês que menciona efeitos desintoxicantes de chás (Elisa; Braibante, 2014)

Na era cristã, os chás foram se difundindo cada vez mais pelo mundo, no século XVII, por exemplo, ocorreu a introdução dos chás na Índia pelos britânicos (Diby *et al.*, 2016) e no Brasil no início do século XIX D. João VI iniciou o plantio de *Camellia Sinensis* para assegurar o consumo pela corte portuguesa (Lima, 1997) e com o passar o tempo, as infusões caseiras começaram a ganhar cada vez mais visibilidade. As propriedades medicinais juntamente com a cultura popular foram fortalecendo esse consumo.

Além dos chás serem uma excelente fonte de compostos bioativos é um setor que contribui para o desenvolvimento socioeconômico, visto que representa uma importante fonte de emprego e renda para milhões de famílias. Atualmente a China é maior produtor de chá e corresponde a 47% da produção global, com 3,1 milhões de toneladas em 2021, já a Índia com 1,33 milhões de toneladas é o segundo maior produtor. Estima-se que até 2030, a produção mundial de chás deverá aumentar anualmente 2,1% (Fao, 2022).

Em 2022, por meio da legislação sanitária federal disposta na Resolução RDC ANVISA nº 716, de 01 de julho de 2022, a ANVISA estabeleceu a identidade e as características mínimas de qualidade dos chás e definiu como “o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado

de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor” (Brasil, 2022). Os teores de compostos fenólicos e voláteis também são utilizados para garantir da qualidade de um chá, além dos parâmetros regulatórios vigentes, visto que tais compostos estão relacionados com as suas características sensoriais (Qian *et al.*, 2018).

Os chás podem ser oriundos de diferentes ervas, como o chá mate produzido a partir de folhas e caules de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., uma planta nativa da América do Sul, o chá rooibos que é fabricado a partir *Aspalathus linearis*, um arbusto de origem indígena e endêmico da África do Sul e os chás branco, verde, amarelo e preto produzidos a partir da *Camellia sinensis*, sendo esta a fonte vegetal mais consumida para fabricação de chás em todo o mundo (Santos, *et al.*, 2018a; Zhang *et al.*, 2019a).

1.2 CAMELLIA SINENSIS

A *Camellia sinensis* é a espécie mais utilizada em todo o mundo para a produção de chás. Pertencente à família *Theaceae*, o cultivo da *Camellia Sinensis* concentra-se na China e Índia, totalizando aproximadamente 60% da produção mundial (Zhang *et al.*, 2019a). Duas diferentes variedades são cultivadas, a *sinensis* ([*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) e *assamica* [*Camellia sinensis* var. *assamica* (Mast.) Kitamura]. Em seu habitat natural, a *Camellia sinensis* var. *sinensis* é um arbusto perene, ou seja, seu ciclo de vida é longo, com 1 a 2 metros de altura, folhas grossas e coriáceas (rígidas como o couro), tolerante a alta altitude e baixa temperatura. A *Camellia sinensis* var. *assamica* é uma árvore, podendo ter de 10 a 15 metros de altura, folhas elípticas, com 8 a 20 cm de comprimento e 3,5 a 7,5 cm de largura, com preferência a climas quentes e úmidos. Para ambas a umidade relativa ideal é de 70 a 90% e o pH ideal do solo de 4,5 a 5,5, embora possa se adaptar ao pH entre 3,3 a 6,0 (Diby *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019a).

As folhas de *C. sinensis*, de ambas as variedades, possuem uma composição rica em compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos), alcaloides (metilxantinas) e nutrientes (carboidratos, proteínas e minerais). Os compostos fenólicos se destacam na composição química com 18 a 36%, sendo as catequinas responsáveis por 12 a 24% do total de polifenóis presentes (Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021).

A partir de brotos, folhas jovens, folhas maduras e caules de *C. sinensis* seis tipos de chás podem ser produzidos e são classificados de acordo com seu processamento para desidratação, são eles: verde, amarelo, branco, preto, *oolong* (vermelho) e *pu-erh* (chá escuro) (Granato *et al.*, 2014; Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021). Cada chá apresenta características e composição química distinta devido as etapas do processamento, origem geográfica, clima e variedade da planta (Zhang *et al.*, 2019a; Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021).

Dentre os principais processos envolvidos no processamento, o grau de fermentação (não fermentado, parcialmente fermentado, totalmente fermentado e pós-fermentado) se destacam e fornecem as principais características de cada chá, além das etapas de processamento, como colheita, limpeza, seleção, secagem parcial ou total, rolagem e armazenamento (Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021). O chá verde, por exemplo, é produzido a partir de folhas da *C. sinensis* sendo a fixação a primeira etapa, para desativar as enzimas endógenas (especialmente a enzima polifenol oxidase) que são responsáveis pela fermentação dos outros tipos de chás. Após essa etapa, as folhas de chá são enroladas manualmente ou em máquinas específicas para que ocorra a quebra da estrutura celular e por fim, desidratadas (Zhang *et al.*, 2019a). Os chás considerados não fermentados são o chá branco, verde e amarelo, enquanto o chá *oolong* é considerado um chá de curta fermentação, o chá *pu-erh* um chá pós fermentado e o chá preto um chá com fermentação completa (Kilel *et al.*, 2013; Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021). A fermentação do chá faz com o que as folhas antes ricas em catequinas começam a ser oxidadas por enzimas endógenas ou de origem microbiana, gerando uma mistura complexa de polifenóis, especialmente teaflavinas (Zhang *et al.*, 2019a).

1.2.1 *Camellia sinensis* (L.) var. *assamica* (Mast.) Kitamura: cultivar *Zijuan*

Uma diferente cultivar de *C. Sinensis* tem chamado a atenção devido a coloração de suas folhas, antes eram verdes agora podem-se encontrar folhas roxas. Tal coloração é oriunda do acúmulo de antocianinas, pois a exposição a adversidades, como luz intensa no verão ou baixas temperaturas no outono favorecem o processo de síntese. A cor roxa prevalece mesmo após as condições ambientais favoráveis serem restauradas (Li *et al.*, 2023). Foi cultivada pela primeira vez em 1985 no Instituto de Pesquisa do Chá (Academia de Ciências Agrícolas de Yunnan) na China e a partir

de 2005 é uma planta protegida pela Administração Florestal do Estado da China (Lv *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2018). Conhecida como chá *Zijuan* ou chá roxo normalmente é classificada como chá verde, preto ou *pu-erh*, dependendo do seu processo de fabricação (Kerio *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013; Joshi; Rana; Gulati, 2015).

As cores roxa, vermelha e azul presente em frutas, vegetais, folhas e flores é característica da presença de antocianinas, compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonoides. Em estudos realizados por Lv *et al.* (2015) foram identificadas em extratos metanólicos de chá *Zijuan* os compostos: pelargonidina-3,5-O-diglicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, delfinidina, cianidina, pelargonidina, peonidina e malvidina, sendo a cianidina-3-O-galactosídeo em maior concentração. Em outro estudo, Kerio *et al.* (2012) relataram a presença de 5 das 6 antocianidinas naturais mais comuns, a delfinidina, cianidina, pelargonidina, peonidina e malvidina, em extratos metanólicos em chás verdes e pretos produzidos a partir de folhas roxas de *C. sinensis*, além de duas antocianinas, cianidina-3-O-galactosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo. Neste mesmo estudo catequinas também foram identificadas nos chás derivados de folhas roxas de *C. sinensis*, se destacam a (-)-epigallocatequina, catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina-galato e (-)-epicatequina galato.

Tais compostos estão associados a bioatividades já observadas e relatadas na literatura, como propriedades antioxidantes (Fan *et al.*, 2013; Kerio *et al.*, 2013), inibidor da proliferação de células cancerígenas da mama, colón e fígado (Gao *et al.*, 2018), redução do risco de doenças neurodegenerativas (Wang *et al.*, 2017), efeito anti-hiperglicêmico (Zhao *et al.*, 2020), além da diminuição dos níveis colesterol total, colesterol de baixa densidade e triacilgliceróis plasmáticos (Peng *et al.*, 2013). A presença de catequinas, frequentemente encontradas em chás derivados da *C. sinensis* e antocianinas em um mesmo meio reacional podem favorecer no aumento de bioatividade, visto que são poderosos antioxidantes, além do efeito sinérgico entre catequinas e antocianinas (Rossetto *et al.*, 2002). Grupos hidroxilas adicionais favorecem o aumento da atividade antioxidante, como exemplo, auxiliando em uma maior atividade de eliminação de radicais livres (Joshi; Rana; Gulati, 2015).

1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

As bioatividades relacionadas aos produtos naturais estão associadas aos metabólicos secundários produzidos pelas plantas. Tais compostos não apresentam ação nos processos vitais do vegetal, como a fotossíntese, respiração e produção de substâncias essenciais como os lipídeos, proteínas e carboidratos, porém desempenham na planta funções de proteção contra micro-organismos patogênicos e insetos, diminuem os danos causados por condições ambientes desfavoráveis como temperatura, luz e pH, além de contribuir para a acidez, adstringência, sabor, odor e cor de alimentos à base de plantas (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos, originados a partir de vias metabólicas, em especial a via do ácido chiquímico e a do acetil CoA, são eles: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os terpenos são formados pela união de moléculas de 5 carbonos (C_5H_8)_n, originando cadeias abertas ou fechadas. Os compostos nitrogenados são formados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos. Os compostos fenólicos caracterizado quimicamente pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligada diretamente a um anel aromático, originando mais de 50000 moléculas já identificadas, devido ser estruturalmente heterogêneo, sendo uma importante fonte de estudos e explorada por diversos pesquisadores (Ávila-Román *et al.*, 2021)

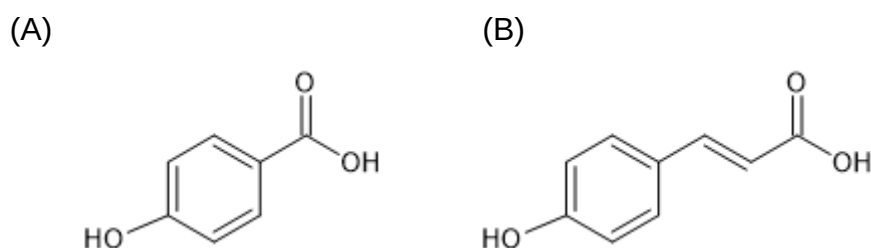
1.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são moléculas orgânicas formadas por um ou mais anéis aromáticos ligados diretamente a um ou mais grupos hidroxilas (-OH) e podem ter substituintes como os grupamentos metil, metoxil, amino, monossacarídeos, entre outros (Alara, Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Tais compostos são derivados da fenilalanina e sintetizados por duas principais vias metabólicas, a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. Nestes processos, ocorre a introdução de um ou mais grupos hidroxila, originando os subgrupos de compostos fenólicos.

Dentre as principais classes de compostos fenólicos, destaca-se os ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos (Alara, Abdurahman; Ukaegbu, 2021; Carmo *et al.*, 2018). Os ácidos fenólicos são caracterizados por apresentar o anel aromático, grupo carboxílico e grupos hidroxilas e/ou metoxila e podem ser divididos

em dois grupos principais, os ácidos benzoicos ou hidroxibenzoicos (Figura 1.1A), formados por uma estrutura de 7 carbonos (C_6-C_1) e como exemplos pode-se citar o ácido gálico, vanílico e o siríngico e os ácidos cinâmicos ou hidroxicinâmicos (Figura 1.1B) que contém em sua estrutura uma cadeia de 9 carbonos (C_6-C_3), como o ácido *p*-cumárico, cafeico e ferúlico.

Figura 1.1 – Exemplos de ácidos fenólicos. Ácido hidroxibenzoico (A) e ácido hidroxicinâmico (B).

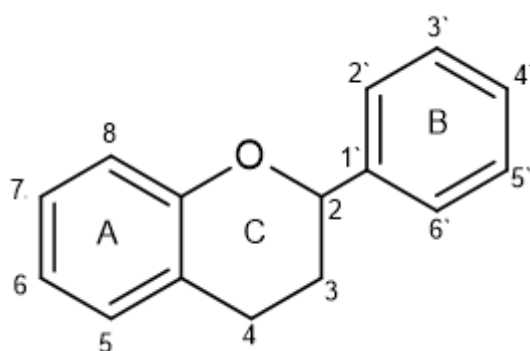


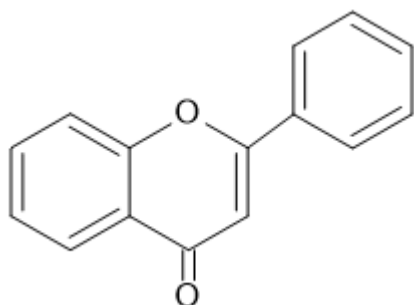
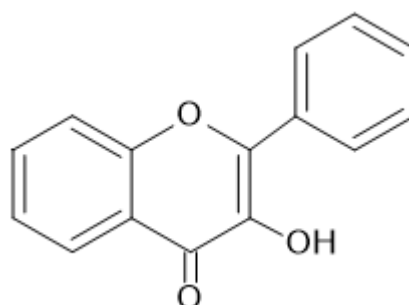
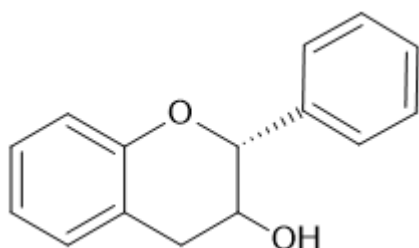
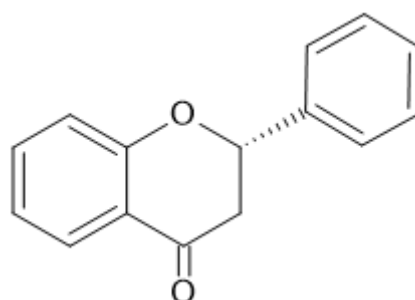
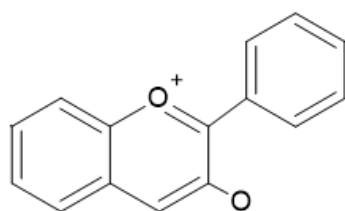
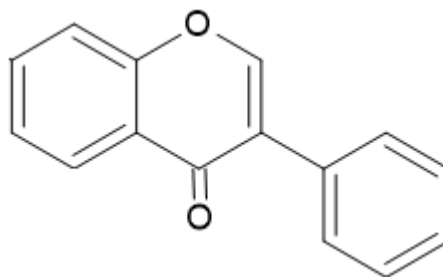
Fonte: O autor.

Os flavonoides têm como estrutura química um esqueleto de carbono comum de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$), composto por dois anéis de benzeno (A e B) unidos por um anel pirano com um heteroátomo de oxigênio (anel C), como demonstrado na Figura 1.2A. Diferenças estruturais no anel C classificam os flavonoides em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavononas, antocianidinas e isoflavonoides (Figura 1.2B – G). As diferenças na estrutura de cada subgrupo são parcialmente atribuídas ao padrão e grau de hidroxilação, glicosilação ou metoxilação (Kumar; Pandey, 2013; Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2021).

Figura 1.2 – Estrutura química básica dos flavonoides (A) e subclasses de flavonoides (B-G)

(A)

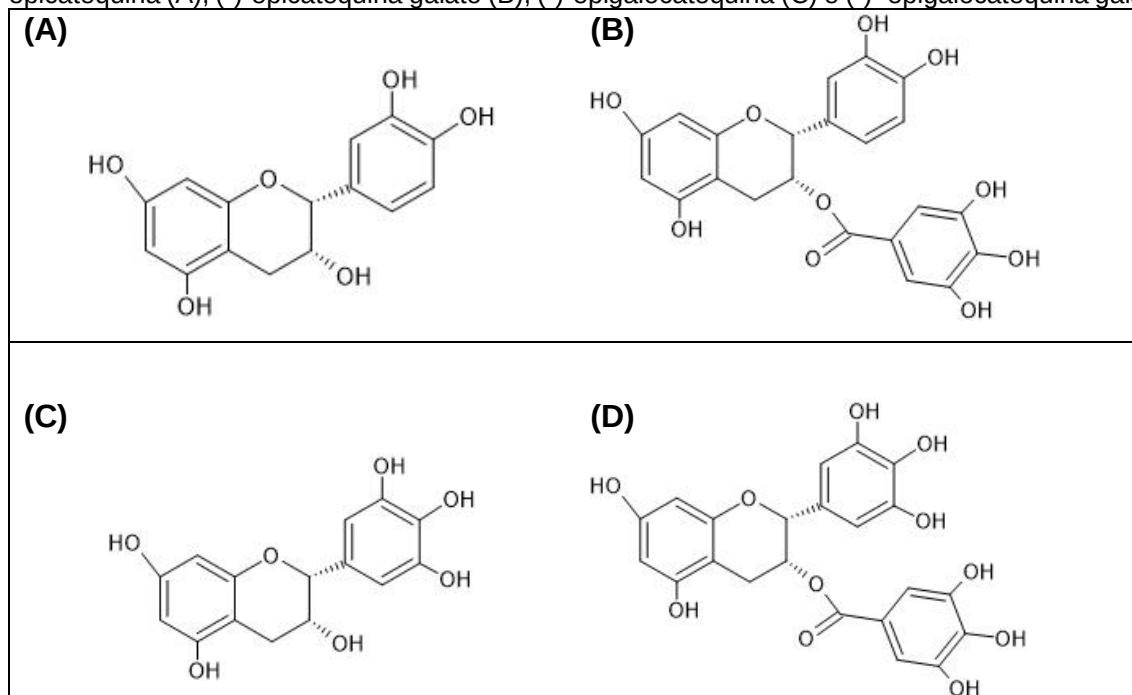


(B) Flavonas**(C) Flavonóis****(D) Flavanóis****(E) Flavanonas****(F) Antocianidinas****(G) Isoflavonas**

Fonte: Adaptado de Kumar e Pande (2013).

Os flavan-3-óis, ou apenas flavanóis, usualmente chamados de catequinas, é a subclasse de flavonoides mais abundante em chás provenientes da *C. sinensis*. A unidade básica contém dois carbonos quirais, C₂ e C₃ no anel B (Figura 1.2A) e normalmente as configurações 2*R* e 3*R* dos flavanóis são predominantes, como (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) e (-)-epigallocatequina galato (EGCG), observadas na Figura 1.3.

Figura 1.3 – Estruturas de flavanóis predominantes nos chás provenientes da *Camellia sinensis*. (-)-epicatequina (A), (-)-epicatequina galato (B), (-)-epigallocatequina (C) e (-)-epigallocatequina galato (D).



Fonte: O autor.

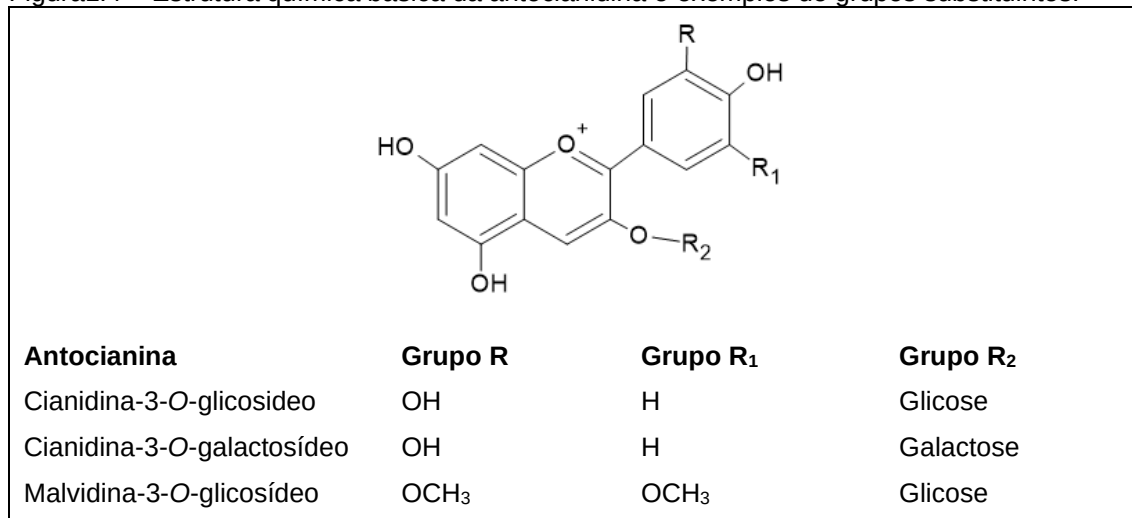
Em comparação a outros flavonoides, os flavanóis apresentam maior capacidade antioxidante, como comprovado por Grzesike *et al.*, 2018 ao avaliar a eliminação do radical ABTS e atividade antioxidante redutora de ferro de flavonoides (hesperidina, morina, naringenina, naringina e rutina) e catequinas (EGCG, ECG, EGC e EC). Tal comportamento está relacionado com a presença de grupos hidroxilas em suas estruturas químicas, exibindo uma maior inibição na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividade de eliminação de radicais livres em comparação a outros compostos ou classes fenólicas (Xu; Gao; Granato, 2021).

As antocianidinas (Figura 1.4), outro subgrupo dos flavonoides, é a classe de compostos que se destacam nas folhas roxas de *C. sinensis*. Tais compostos quando ligadas a glicosídeos (açúcares) são denominadas de antocianinas e responsáveis pelas colorações vermelha, azul, roxa e laranja de vegetais, frutas, folhas e flores. Dentre os principais açúcares, a glicose, ramnose, xilose, galactose e arabinose são frequentemente ligadas a antocianidina. As antocianinas diferem-se nos grupamentos ligados aos anéis, que podem ser de hidrogênio, hidroxilas ou metoxilas, como observado alguns exemplos na Figura 1.4, além dos diferentes açúcares.

Mais de 500 antocianinas e 27 antocianidinas já são conhecidas e identificadas na natureza, porém apenas 6 antocianidinas representam 90% da

classe, são elas: cianidina, pelargonidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina (Wallace; Giusti, 2015).

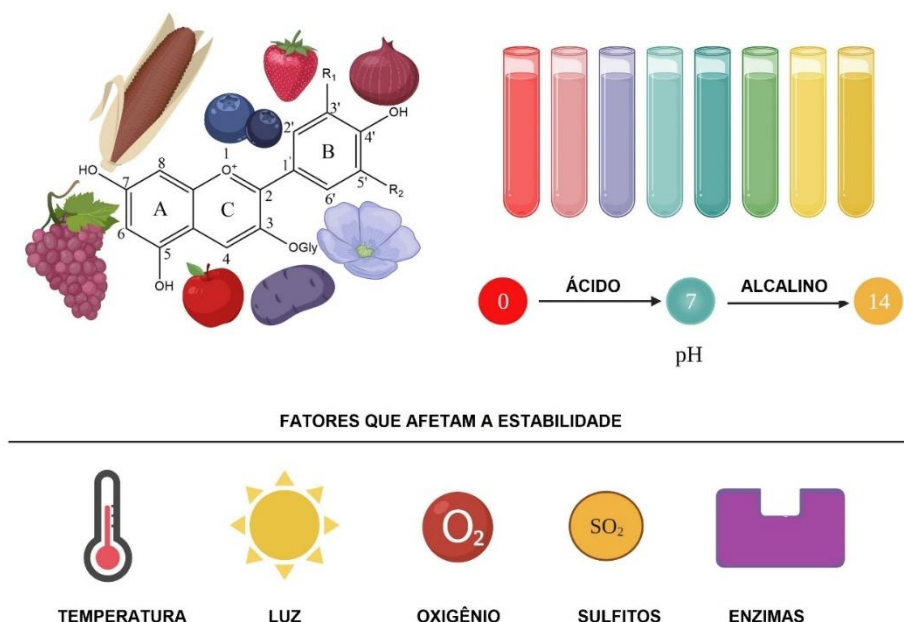
Figura1.4 – Estrutura química básica da antocianidina e exemplos de grupos substituintes.



Fonte: Adaptado de WALLACE E GIUSTI, 2015.

O uso de extratos de antocianinas como pigmentos naturais é utilizada pela indústria, devido suas diferentes cores, porém são instáveis e suscetíveis a degradações (Figura 1.5) influenciada por fatores como pH, luminosidade, temperatura, solventes, gás oxigênio, íons metálicos e enzimas (Alappat; Alappat, 2020). Com a alteração do pH podem ocorrer quatro estruturas químicas principais em equilíbrio com o meio, o cátion flavílico, a base quinoidal, o carbinol pseudobase e a chalcona, sendo o cátion flavílico (pH 1-2) a forma mais estável e de coloração vermelha (Granato *et al.*, 2016).

Figura 1.5 – Antocianinas e fatores que afetam a estabilidade estrutural.



Fonte: Adaptada de ENARU *et al.* (2021).

Os taninos, classe dos compostos fenólicos com estrutura complexa, podem ser divididos em taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados, são formados pela ligação de dois ou mais monômeros de flavanóis, possuem estrutura complexa, resistente à hidrólise e de alto peso molecular. Os taninos condensados também são chamados de proantocianidinas devido ao fato de que, quando aquecidos em uma solução ácida de álcool, podem ser degradados em antocianidinas por meio de um processo de oxidação catalisada por ácido (Alara, Abdurahman; Ukaegbu, 2021). Já os taninos hidrolisáveis são formados por poliésteres de ácido gálico e diferentes carboidratos e são facilmente hidrolisados em condições ácidas e básicas.

Essas substâncias fenólicas, sozinhas ou combinadas, com sinergismo entre os compostos, são parcialmente responsáveis pelas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* dos chás de *C. sinensis*.

1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidantes são substâncias que em baixa concentração comparado ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou prevenir significativamente a oxidação deste substrato. Substâncias com

núcleo fenólico atuam como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), por mecanismos de transferência de elétrons, transferência de átomos de hidrogênio e quelante de metais de transição como zinco, cobre e ferro (Granato *et al.*, 2018a).

As EROs, podem atacar e danificar praticamente qualquer molécula do organismo, tais radicais atacam doando um elétron desemparelhado ou capturando um elétron de outra molécula, ficando estáveis, porém a molécula atacada transforma-se em um radical, desencadeando uma reação em cadeia consequentemente destruindo o tecido. São exemplos de EROs: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre, é capaz de causar danos ao DNA ao atravessar a membrana nuclear (Brewer, 2011).

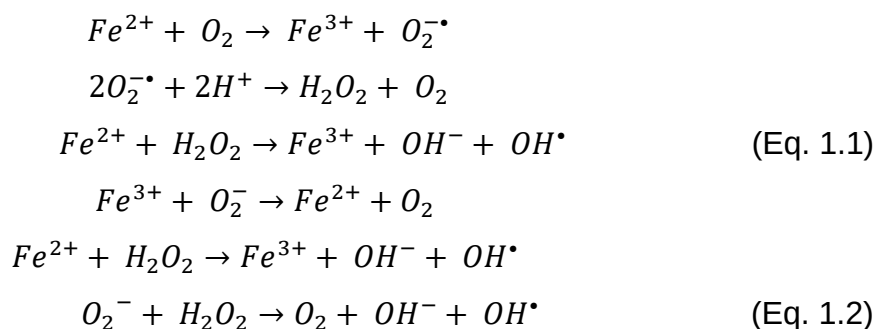
Os extratos obtidos de plantas apresentam crescente interesse científico devido seus efeitos benéficos à saúde, principalmente pela atividade antioxidante exercida pelos compostos fenólicos presentes nos extratos. Procedimentos padrões de medida da atividade antioxidante são utilizados através da avaliação dos variados mecanismos de ação, e devem seguir uma série de condições, como exemplificado por Granato e Nunes (2016), são eles:

1. Avaliar reações de transferência de elétrons e átomos de hidrogênio;
2. Especificar o substrato de oxidação;
3. Medir reações químicas que de fato ocorram em reações principais;
4. Ser simples e possuir um mecanismo definido;
5. Ter instrumentação que seja disponível;
6. Ter boa reprodutibilidade;
7. Medir antioxidante lipofílicos e hidrofílicos;
8. Utilizar diferentes fontes de radicais;
9. Ser utilizado em larga escala.

Todas essas características são fundamentais, porém em apenas uma análise é impossível reunir todas, assim a combinação de procedimentos padrões são utilizados para traçar um perfil de bioatividade de uma determinada amostra (Granato; Nunes, 2016).

Os mecanismos de ação de substâncias antioxidantes podem ocorrer principalmente por três mecanismos, além da combinação destes. O mecanismo de ação via transferência de hidrogênio (HAT) mensura a capacidade de um antioxidante

(AH) em neutralizar os radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio, enquanto o mecanismo de transferência de elétrons (ET) mede a capacidade dos compostos em transferir um elétron para a molécula antioxidante. Ambos os ensaios produzem uma espécie neutra não reativa, um íon fenolato estável, uma espécie catiônica e uma espécie reduzida e energeticamente estável, espécies sem poder de ataque devido estabilização de elétrons do anel aromático. Por fim, o terceiro mecanismo de ação é a capacidade de quelar metais de transição, como íons de cobre e ferro que estão ativamente ligados a produção de espécies reativas, como as de oxigênio, decorrentes a reações de Fenton (Eq. 1.1) e de Haber-Weiss (Eq. 1.2), como exemplificado nas equações abaixo (Granato *et al.*, 2018a).



As análises frequentemente utilizadas para avaliação antioxidante, como a capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade redutora do reagente fenol de Folin-Ciocalteu e a capacidade redutora do íon cúprico (CUPRAC) são exemplos de análises que utilizam o método ET, enquanto a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e o ensaio que avalia o branqueamento do β -caroteno são ensaios com mecanismo HAT. Ensaio de atividade captadora de radicais livres, como DPPH e ABTS, utilizam ambos os mecanismos. Vale ressaltar que o mecanismo ET depende do pH do meio e simulados por meio de um agente oxidante (Granato; Nunes, 2016).

As análises *in vitro* fornecem uma ampla avaliação sobre o perfil antioxidante de extratos naturais e/ou compostos isolados, porém a avaliação da eficácia de compostos antioxidantes em humanos dependem da biodisponibilidade *in vivo*, biotransformação e bioacessibilidade, visto que as condições fisiológicas do indivíduo, perfil da microbiota intestinal, características químicas intrínsecas dos compostos, são alguns exemplos de fatores que influenciam a atividade antioxidante *in vivo* (Granato; Nunes, 2016). O uso de análises *in vitro* com células isoladas, incluindo hemácias

humanas e células tumorais, auxiliam e fornecem uma avaliação mais próxima ao *in vivo*. Com os modelos *in vitro* baseados em células, é possível avaliar a seletividade dos extratos analisando a viabilidade das células após exposição a diferentes concentrações do extrato e os efeitos de um agente oxidante (por exemplo, H₂O₂) na capacidade antioxidante, através da diminuição da produção de EROs e produtos de oxidação (Cruz *et al.*, 2021; Moura *et al.*, 2023).

1.5 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A procura por alimentos nutricionalmente balanceados pelos consumidores fez com que a indústria alimentícia buscasse alternativas para substituição de aditivos químicos sintéticos por extratos naturais de plantas e/ou frutas, não apenas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, mas também pelos aspectos sensoriais que conferem aos produtos (Granato *et al.*, 2018b). O uso de extrato bruto ou compostos isolados pela indústria alimentícia como aditivos possibilita o desenvolvimento de produtos inovadores, saudáveis, nutritivos e de longa vida útil (Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021).

O aumento da vida de prateleira de produtos alimentícios por meio da inibição de microrganismos e processos oxidativos são fundamentais para obtenção de um produto de qualidade, além dos aspectos sensoriais que o extrato agrega ao produto (Lorenzo; Munekata, 2016).

A técnica de extração sólido-líquido é amplamente utilizada para extração de compostos fenólicos de interesse devido sua fácil execução, confiabilidade e baixo custo (Sayuti *et al.*, 2021), porém diferentes variáveis podem interferir no processo de extração de compostos bioativos de interesse, como o tempo, temperatura, tipo e volume de solventes (Lorenzo; Munekata, 2016; Moura *et al.*, 2022). Tais fatores são fundamentais para a eficácia da extração de compostos fenólicos, influenciando na permeabilidade do solvente para o interior da matriz vegetal e consequentemente na difusão do soluto para o solvente, favorecendo o aumento da concentração de compostos fenólicos (Cacace; Mazza, 2003). Porém é importante ressaltar que os compostos fenólicos, especialmente as antocianinas, podem ser degradados com temperaturas acima de 60 °C, quando expostos a luz por tempo prolongado e com a variação intensa de pH, resultando em baixas concentrações e redução dos potenciais benefícios a saúde (Escher *et al.*, 2018; Howard *et al.*, 2012).

Os solventes utilizados para a extração também devem ser cuidadosamente escolhidos, visto que podem favorecer o aumento no teor dos compostos extraídos, além da extração seletiva desses compostos (Pedro *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2021). Na literatura, é possível encontrar solventes como a água, etanol, acetona, metanol, acetato de etila, éter de petróleo e diclorometano, utilizados com o propósito de extrair compostos fenólicos (Guo *et al.*, 2018; Armstrong *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2020; Fidelis *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2021). O uso de uma mistura de solventes ou acidificação da solução para maximizar essa extração também são reportadas (Almeida *et al.*, 2017; Fidelis *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2021), porém é importante ressaltar que a toxicidade do solvente deve ser avaliada (Schechtel *et al.*, 2019). Para fins alimentícios, solventes como água e etanol são recomendados pela baixa toxicidade e reconhecidos como seguros pela legislação brasileira (Resolução RDC Nº 466, de 10 de fevereiro de 2021), pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos e também pela Comissão e Parlamento europeu através da Diretiva 2009/32/EC de 23 de Abril de 2009, que estabelece os solventes de extração autorizados e que podem ser utilizados na produção de alimentos e ingredientes alimentícios na união europeia ou aqueles importados.

Levando em consideração todos os fatores mencionados anteriormente, o processo de extração deve fornecer um alto rendimento fenólico, e deve usar solventes que sejam seguros para os consumidores e o meio ambiente (Moura *et al.*, 2023). O uso de modelos matemáticos obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) descrevem o efeito de variáveis de interesse na composição química e bioatividade dos extratos (Armstrong *et al.*, 2020; Escher *et al.*, 2020) e auxiliam na escolha dos parâmetros ideais para a extração (Moura *et al.*, 2022).

CAPÍTULO 2 - FOLHAS DE CHÁ ROXO (*CAMELLIA SINENSIS* var. *ASSAMICA* CV. *ZIJUAN*) COMO UM POTENCIAL INGREDIENTE FUNCIONAL: DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ÀS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E BIOLÓGICAS¹

2.1 INTRODUÇÃO

Em forma de chá, a *C. sinensis* é a fonte vegetal mais consumida em todo o mundo, além do sabor agradável é considerada saudável, devido ao alto teor fenólico (Zhang *et al.*, 2019a). Conhecido como chá *Zijuan*, folhas roxas de *C. sinensis* tem se destacado entre as variedades da planta devido sua composição fenólica diversificada, incluindo compostos como flavan-3-óis, ácidos fenólicos e antocianinas, responsáveis pela coloração das folhas (Kerio *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2020).

Atividades biológicas, principalmente antioxidantes, estão relacionadas aos compostos fenólicos e o uso de extratos naturais como ingredientes funcionais obtidos por processos de extração já é uma tendência (Armstrong *et al.*, 2020). Porém é necessário o estudo das variáveis envolvidas no processo de extração, pois temperaturas elevadas e um tempo prolongado podem degradar os compostos e consequentemente resultar em baixas concentrações e redução dos potenciais benéficos à saúde (Escher *et al.*, 2018). Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos da combinação das variáveis independentes (tempo, temperatura e razão massa:solvente) e assim otimizar a condição para extração dos compostos bioativos no chá verde proveniente das folhas roxas de *C. sinensis* (L.) var. *assamica* (Mast.) Kitamura cv. *Zijuan*, em um processo simples e de baixo custo, além de avaliar a bioatividade do extrato otimizado obtido.

¹Capítulo publicado: MOURA *et al.* Purple tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) leaves as a potential functional ingredient: From extraction of phenolic compounds to cell-based antioxidant/biological activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 159, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112668>

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modelar e otimizar as condições de extração de compostos bioativos utilizando técnicas estatísticas;
- Investigar a composição química por métodos cromatográficos;
- Analisar as bioatividades *in vitro*;
- Avaliar o efeito da variação de pH no teor de compostos bioativos e AA;
- Correlacionar os compostos bioativos e mecanismos de AA.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Matéria Prima

O chá verde proveniente de folhas roxas de *C. sinensis* (L.) var. *assamica* (Masters) Kitamura cv. *Zijuan*, foi adquirido na cidade de Xishuangbanna, Yunnan Province, China em 2017 (Figura 2.1A). O processamento para obtenção do chá verde é produzido através das seguintes operações sequenciais: fixação, obtenção de cachos e desidratação. Na primeira etapa, ocorre a desativação das enzimas endógenas (1,5–2 min a 130 °C) presentes nas folhas frescas. Após a fixação, as folhas de chá são enroladas manualmente ou em máquina para obtenção dos cachos, em seguida, são desidratadas (Zhang *et al.*, 2019a). Com o objetivo de se obter uma maior área superficial a amostra foi triturada (60 Tyler mesh) e armazenada em frascos de polietileno de baixa densidade a -10 °C, sob abrigo de luz para posterior preparo dos extratos (Figura 2.1B).

Figura 2.1 - Chá verde obtido de folhas roxas de *Camellia sinensis* adquirido no comércio local de Xishuangbanna, China (A) e triturado (B).



Fonte: Do Autor.

2.3.2 Planejamento Experimental e Preparação dos Extratos

Utilizou-se um planejamento fatorial do tipo *Box-Behnken* para otimizar as condições de extração dos compostos bioativos e atividade antioxidante (AA) presentes nas folhas roxas desidratadas de *C. sinensis*. Avaliou-se o efeito da combinação de três variáveis independentes (temperatura, tempo e a relação massa-solvente). As temperaturas utilizadas foram 20, 40 e 60 °C, o tempo de extração foi de 5, 10 e 15 minutos, e a relação mássica de material vegetal pelo volume de solvente foi de 1:35, 1:50 e 1:65 (g/mL), distribuídos conforme a Tabela 2.1. Realizou-se cinco repetições no ponto central para estimar o erro e avaliar a falta de ajuste dos modelos propostos. Como solvente utilizou-se uma solução de etanol anidro e ácido cítrico (1 mol/L), em uma proporção 80% etanol anidro e 20% ácido cítrico (pH 3,5). A extração foi realizada em uma cuba extratora com 50 mL de solvente extrator, protegida da luz e sob constante agitação. Após esta etapa, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo e o resíduo lavado com o solvente extrator até completar o volume para padronização do volume final. Os extratos foram armazenados sob refrigeração (8 °C) em frascos de polietileno protegidos da luz até o momento das análises.

Tabela 2.1 - Matriz do Planejamento fatorial *Box-Behnken* com os níveis reais e codificados.

Ensaios	Temperatura (°C)	Tempo (min)	1:X (mL)
E1	20 (-1)	10 (0)	1:65 (+1)
E2	20 (-1)	5 (-1)	1:50 (0)
E3	20 (-1)	15 (+1)	1:50 (0)
E4	20 (-1)	10 (0)	1:35 (-1)
E5	40 (0)	15 (+1)	1:35 (-1)
E6	40 (0)	5 (-1)	1:35 (-1)
E7	40 (0)	15 (+1)	1:65 (+1)
E8	40 (0)	5 (-1)	1:65 (+1)
E9	60 (+1)	10 (0)	1:35 (-1)
E10	60 (+1)	10 (0)	1:65 (+1)
E11	60 (+1)	15 (+1)	1:50 (0)
E12	60 (+1)	5 (-1)	1:50 (0)
E13 (C)	40 (0)	10 (0)	1:50 (0)
E14 (C)	40 (0)	10 (0)	1:50 (0)
E15 (C)	40 (0)	10 (0)	1:50 (0)
E16 (C)	40 (0)	10 (0)	1:50 (0)
E17 (C)	40 (0)	10 (0)	1:50 (0)

Nota: (C) = pontos centrais; 1:X = 1 g de material vegetal para X mL de solvente

2.3.3 Determinação da Composição Fenólica

O método Azul de Prússia (Price; Butler, 1977; Margraf *et al.*, 2016) foi utilizado para quantificação dos teores de compostos fenólicos totais (CFT). O procedimento inicia-se ao adicionar 100 µL de solução de cloreto férrico hexahidratado (0,5 mmol/L) e 100 µL dos extratos diluídos (E1 a E17) em água ultrapura (1:75 v/v), em microplacas de 96 poços. Após 2 minutos, 100 µL da solução de ferricianeto de potássio (0,5 mmol/L) são adicionados a microplaca e agitada por 20 segundos. Após 15 minutos registrou-se a absorbância ($\lambda=725$ nm) em leitor de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). O mesmo procedimento foi adotado para a construção da curva analítica ($y=24,366x-0,630$; $R^2=0,995$), utilizando-se ácido gálico com concentrações de 2,5 a 20 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg AGE/100 g).

Os teores de flavonoides totais (FT) e antocianinas totais (AT) foram determinados pelo método proposto por Lees e Francis (1972). Em um balão de 5 mL, os extratos (E1 a E17) foram diluídos em uma solução tampão de cloreto de potássio (0,025 mol/L; pH 1), a fim de se obter absorbâncias menores que 1, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. As absorbâncias foram registradas utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japão), nos comprimentos de onda de 374 nm e 535 nm. Utilizou-se os coeficientes de extinção da quercetina (76,6) e da cianidina-3-O-glucosídeo (98,2) nas equações 2.1 e 2.2, respectivamente, para obter a quantificação dos compostos analisados.

$$FT \text{ (mg quercetina equivalente/100 g)} = \frac{Abs \times \text{Fator de diluição}}{76,6} \quad (2.1)$$

$$AT \left(\text{mg cianidina} - 3 - \text{glucosídeo} \frac{\text{equivalente}}{100} \text{ g} \right) = \frac{Abs \times \text{Fator de diluição}}{98,2} \quad (2.2)$$

Para o cálculo do fator de diluição (FD), o volume total do extrato (VTE) e o volume utilizado de extrato (VE) para a análise foram utilizados (equação 2.3).

$$FD = \frac{VTE \times 5}{VE} \quad (2.3)$$

Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glucosídeo equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg CGE/100g) para as antocianinas totais e mg de quercetina equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg QE/100 g) para os flavonoides totais.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e a linha base do equipamento foi registrada utilizando-se das mesmas proporções dos reagentes, substituindo a amostra pelo solvente específico utilizado na diluição.

2.3.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

2.3.4.1 Captura do Radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)

A capacidade antioxidante frente ao radical DPPH foi avaliada de acordo com Staško *et al.* (2007). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 40 µL dos extratos (E1 a E17) e 260 µL de uma solução de DPPH a 0,10 mmol/L solubilizada em etanol e solução tampão fosfato de sódio monobásico a 50 mmol/L (pH 6,0) na proporção 1:1 e deixadas reagir no escuro por 30 min. A diminuição da absorbância foi medida em espectrofotômetro de microplacas ($\lambda=525$ nm) e a solução de DPPH sem amostra foi utilizada para controle do ensaio. Realizou-se a curva analítica ($y=0,6677x-1,0582$; $R^2=0,998$) com concentrações de 7 a 56 mg/L de ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg AAE/100 g).

2.3.4.2 Capacidade Redutora Total (CRT)

O método proposto por Berker *et al.* (2013) foi utilizado para avaliação da capacidade redutora total dos extratos. Inicialmente o reagente de Folin-Ciocalteu foi diluído com isobutanol (1:2 v/v) e 75 µL dessa solução foram misturados com 50 µL dos extratos diluídos (E1 a E17) em acetona (1:20 v/v). Após 2 min, 875 µL de uma solução de NaOH (0,1 mol/L) e 1000 µL de água ultrapura foram adicionados ao tubo de ensaio, deixando reagir por 20 min. Após o período de reação, uma alíquota de 250 µL foi transferida para uma microplaca e a absorbância ($\lambda=665$ nm) foi registrada. A curva analítica ($y=1949x-57,595$; $R^2=0,992$) foi construída utilizando a quercetina como padrão (50 a 450 mg/L) e os resultados foram expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg QE/100 g).

2.3.4.3 Inibição de Peroxidação Lipídica

A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica de fosfolipídios e triacilgliceróis contidos na gema de ovo de galinha, induzida por Fe^{2+} e em um sistema tamponado (pH 7,4) foi realizada pela metodologia utilizada por Margraf *et al.* (2016). Para obtenção do homogenato de gema, 6,25 g de gema peneirada de ovo branco foram adicionados em 250 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 7,4). Em seguida, 500 μL do homogenato e 50 μL dos extratos (E1 a E17) diluídos em tampão fosfato de sódio (1:10 v/v) foram incubados por 5 min e 50 μL de FeSO_4 (4 mmol/L) foram adicionados a mistura, agitada em vortex e incubada por mais 45 min a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Para finalizar a reação, foram adicionados 500 μL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1000 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA; 46 mmol/L), incubado em banho de glicerina ($95 \pm 5^\circ\text{C}$). Após 30 min, os tubos foram resfriados em banho de gelo, centrifugados a 6000 $\times g$, por 15 min a 25°C . Utilizou-se uma microplaca de 96 poços para leitura espectrofotométrica ($\lambda=532\text{ nm}$) com adição de 300 μL do sobrenadante de cada tubo. A quercetina (100 mg/L) foi utilizada como controle positivo, e água ultrapura para o controle negativo, ambos em substituição da amostra. A taxa de inibição de peroxidação lipídica (%inibição) foi calculada pela equação 2.4.

$$\%_{\text{inibição}} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad (2.4)$$

Onde, A_{controle} é a absorbância obtida pela mistura sem adição do antioxidante e A_{amostra} é a absorbância obtida pela mistura com adição do antioxidante (extratos e quercetina).

2.3.5 Metodologia de Superfície de Resposta e Otimização

A fim de avaliar a influência da temperatura, tempo e a relação massa-solvente, utilizou-se a metodologia de superfície resposta (MSR), por meio da análise de regressão linear múltipla, visando a avaliação dos efeitos lineares, quadráticos e as interações entre as variáveis nos teores de compostos fenólicos e AA dos extratos. A partir dos resultados, os dados foram modelados utilizando a equação 2.5.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} X_i X_j \quad (2.5)$$

onde, Y é a variável dependente; X_i e X_j são as variáveis independentes, β_0 é o intercepto; β_i , β_{ii} e β_{ij} representam os coeficientes linear, quadrático e interação entre

as variáveis independentes, respectivamente; e k é o número de variáveis dependentes ($k = 3$). A análise de regressão baseada no método dos mínimos quadráticos foi utilizada para avaliar as variáveis e interações significativas no processo de extração. Os modelos foram avaliados pela porcentagem de variabilidade do coeficiente de regressão linear múltiplo (R^2), pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), significância estatística do modelo ($p \leq 0,05$) e ausência da falta de ajuste do modelo ($p_{lack\ of\ fit} > 0,05$). O modelo matemático proposto apresentou apenas os coeficientes de regressão que apresentaram significância estatística ($p \leq 0,05$).

Para avaliar a melhor condição para extração de compostos fenólicos e AA, utilizou-se a metodologia de otimização proposta por Derringer e Suich, (1980). Foram consideradas setenta iterações com o objetivo de extrair a concentração máxima de CFT, AT e AA pelos métodos: CRT, inibição da peroxidação lipídica e captura do radical livre DPPH. A elaboração do extrato nas condições otimizadas, seguiu o procedimento descrito no item 2.3.2 e as análises reconduzidas a fim de avaliar o erro de predição do modelo de regressão.

2.3.6 Composição Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato Otimizado

Com relação à composição química e atividade antioxidante do extrato otimizado de folhas roxas (EOFR), além daqueles relatadas na seção 2.3.3 e 2.3.4, os teores de flavonóis totais, taninos condensados e *orto*-difenois foram quantificados e a atividade antioxidante avaliada pelos métodos de capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP) e capacidade quelante de Fe^{2+} .

Para estimar o teor de flavonóis totais a metodologia utilizada por Santos *et al.* (2016) foi realizada. Brevemente, uma alíquota de 80 μ L do EOFR diluído (1:10 v/v) em água ultrapura foi inserido na microplaca, juntamente com 80 μ L de solução alcoólica de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (82,84 mmol/L) e 120 μ L de acetado de sódio (0,6 mol/L). Após 60 min de incubação da microplaca, a absorbância foi registrada ($\lambda = 440$ nm) em leitor de microplaca. A curva padrão ($y = 66,115x - 0,242$; $R^2 = 0,999$) utilizada para a quantificação do teor de flavonóis totais foi realizada em substituição da amostra por quercetina (5 a 60 mg/L) e os resultados foram expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg QE/100 g).

O teor de taninos condensados presentes no EOFR foi determinado através da metodologia descrita por Horszwald e Andlauer (2011). Para isso, 25 µL do EOFR diluído (1:10 v/v) em metanol, 150 µL de solução de vanilina (0,260 mol/L) e 75 µL de ácido sulfúrico (0,323 mol/L) foram adicionados a microplaca e incubada por 15 min, à temperatura ambiente. Por fim, a absorbância foi registrada ($\lambda=500$ nm) em leitor de microplacas. Concentrações de catequina (60 a 700 mg/L) foram utilizados para obtenção da curva de calibração ($y=741,97x+26,577$; $R^2=0,998$) e o resultado foi expresso em mg de catequina equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg CE/100 g).

O conteúdo de *orto*-difenóis foi estimado pela metodologia utilizada por Duran *et al.* (1991) com modificações para microplacas. A análise consiste na adição de 50 µL do EOFR diluído (1:25 v/v) em água ultrapura, 200 µL de solução alcoólica de molibdato de sódio bihidratado (0,204 mol/L) em uma microplaca de 96 poços e após 25 min de reação a absorbância é então registrada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 370 nm. A curva analítica ($y=162,27x-6,746$; $R^2 = 0,991$) foi realizada com ácido clorogênico na faixa de concentração de 20 a 140 mg/L e o resultado foi expresso em mg de ácido clorogênico equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg ACE/100 g).

A avaliação da capacidade quelante frente a Fe^{2+} foi realizada seguindo a metodologia proposta por Santos, Alvarenga Brizola e Granato (2017). A análise foi realizada com a adição de 50 µL do EOFR diluído (1:40 v/v) em água ultrapura, 160 µL de água ultrapura e 20 µL de solução de $FeSO_4$ (0,3 mmol/L) em uma microplaca de 96 poços. Após 5 min, 30 µL de solução de ferrozina (0,80 mmol/L) são adicionados a mistura e com 15 min de reação, a absorbância foi registrada ($\lambda=562$ nm) em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em mg de EDTA equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg EDTAE/100 g), a partir da curva de calibração ($y=-0,550x+61,15$; $R^2=0,997$) obtida com substituição da amostra por EDTA nas concentrações 10 a 60 mg/l.

Para avaliação da capacidade antioxidante de redução do ferro (III) (FRAP), 280 µL de mistura composta por 10 mL de solução de TPTZ (10 mmol/L, diluído em HCl 40 mmol/L), 10 mL de $FeCl_3$ (20 mmol/L) e 100 mL de tampão acetado (300 mmol/L, pH 3,6) foram adicionados a uma microplaca de 96 poços juntamente com 20 µL do EOFR diluído (1:150 v/v), incubado por 30 min e a absorbância medida em $\lambda = 593$ nm, conforme proposto por Granato *et al.* (2014a) A curva de calibração

($y=57,92x-3,435$; $R^2=0,991$) foi feita utilizando concentrações de 10 a 80 mg/L de ácido ascórbico e o resultado expresso em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de folhas roxas desidratadas (mg AAE/100 g).

2.3.7 Estabilidade química do Extrato Otimizado

O efeito do pH em relação a estabilidade dos compostos fenólicos presentes no EOFR foi realizado de acordo com Pedro, Granato e Rosso (2016), com algumas modificações. Primeiramente, 50 mL do EOFR foi diluído com 25 mL de solução de ácido clorídrico (HCl; 0,1 mol/L), para obter absorbância próximo de 1, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. Em uma cuba extratora, protegida da luz e sob agitação constante, pequenas alíquotas de hidróxido de potássio (KOH; 5 mol/L) foram adicionadas no extrato diluído para acompanhar a variação de pH. Amostras do extrato em pH 2, 4, 7, 9 e 13 foram retiradas para posterior análise. Após atingir o pH final (pH 13), realizou-se uma titulação reserva com HCl (5 mol/L) até atingir o pH inicial da solução (pH 2). Alíquotas do extrato nos diferentes pHs foram analisadas pela quantificação de CFT (descrita na seção 2.3.3) e a AA foi avaliada pelo método de inibição do radical DPPH (descrito na seção 2.3.4.1).

2.3.8 Extrato Otimizado e Liofilizado de Folhas roxas (EOL)

O EOFR foi rotaevaporado, congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizado sob vácuo de 830 $\mu\text{mL Hg}$ (Liotop, modelo L202, Brasil) para posterior identificação dos compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliação da bioatividade *in vitro*.

2.3.8.1 Quantificação do conteúdo fenólico individual por CLAE

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos individuais presentes no EOL foram realizados conforme proposto por Guo *et al.* (2018), utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; Agilent Technologies, Califórnia, EUA), equipado com uma bomba binária, desgaseificador a vácuo integrado, amostrador automático, compartimento de coluna termostaticada e detector de matriz de diodos (DAD). Primeiramente, 3,6 mg do EOL foi dissolvido em 1 mL de

água ultrapura e 5 µL foram injetados. Utilizou-se uma coluna de fase reversa com fase estacionária C₁₈ (Agilent; 250 mm×4,6 mm; 5 µm de tamanho da partícula) e coluna de guarda (10 mm×4,6 mm, 5 µm de tamanho da partícula; Phenomenex, California, EUA), temperatura mantida em 30 °C, fluxo de 1,0 mL/min e o comprimento de onda de detecção em 278 nm. A fase móvel foi composta por metanol (fase móvel A) e água ultrapura acidificada com 0,2% de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente de eluição seguiu as seguintes condições: 0–5 min, 5–20% B; 5–18 min, 20–25% B; 18–25 min, 25–42% B; 25–32 min, 42% B; 32–40 min, 42–100% B; 40–42 min, 100%–5% B e 42–55 min, 5%B. A quantificação dos compostos ácido gálico (AG), (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epigallocatequina galato (EGCG), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-galocatequina (GC), (-)-galocatequina galato (GCG), teobromina (THB) e cafeína (CAF), foram realizados por calibração externa.

2.3.8.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do EOL foi realizada frente microrganismos Gram-negativos [*Escherichia coli* (IAL 2064), *Salmonella* Typhimurium (IAL 2431), *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1853), *Salmonella* Enteritidis (S 2887)] e Gram-positivos [*Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12288), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Bacillus cereus* (ATCC 14579)]. Os micro-organismos foram cultivados em caldo nutriente por 24 horas, exceto para *Listeria monocytogenes* que foram cultivados em Caldo Triptona de Soja adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura. As suspensões microbianas foram padronizadas pela escala 0,5 Mac Farland utilizando turbidímetro (modelo Mac Farland, MS Tecnopon Instrumentação) e inoculadas por *pour-plate* em Ágar Nutriente, com exceção *L. monocytogenes* inoculado em Ágar Triptona de Soja adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura.

A atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com protocolo descrito por Cleeland e Squires (1991) que descreve o método de difusão em ágar placa-cavidade. As suspensões padronizadas foram adicionadas aos meios de cultivo descritos anteriormente a fim de se obter uma concentração final de 10⁶ UFC/mL para cada micro-organismo testado. Após o plaqueamento, cavidades de 0,6 cm foram realizadas e EOL dissolvido até uma concentração final de 20% em solução aquosa

de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado, e incubado a 37 °C por 24 h para *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e para *B. cereus*, *S. aureus* e *S. epidermidis* a 30 °C por 24h. DMSO foi usado como um controle negativo e Imipenem (10 µg) utilizado como controle positivo. Os halos de inibição foram medidos usando um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil) e expressa em mm de inibição. Os experimentos foram repetidos em dois dias diferentes e realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão do diâmetro (mm) do halo de inibição.

Para a concentração inibitória mínima (CIM) do EOL utilizou-se o método descrito por Siddiqi *et al.* (2011). Primeiramente, o EOL foi diluído em DMSO, tendo uma concentração (solução estoque) de 1000 µg/mL e diluições em série (500 a 15,625 µg/mL) foram realizadas em caldo nutriente e adicionados em microplacas de cultura estéril juntamente com cada suspensão padronizada. As placas foram incubadas de acordo com a temperatura de crescimento de cada micro-organismo no período de 24h. Para controle apenas o caldo e a suspensão padronizada foram incubados pelo mesmo período e temperatura. A CIM foi considerada como a menor concentração de EOL que inibiu o crescimento. As análises foram realizadas em triplicata em dois dias diferentes para assegurar a repetibilidade/reprodutibilidade.

2.3.8.3 Citotoxicidade celular in vitro

O efeito citotóxico *in vitro* do EOFR liofilizado foi analisado em relação as seguintes linhas celulares: IMR90 (fibroblasto de pulmão humano), A549 (células epiteliais de adenocarcinoma do pulmão) e HCT8 (carcinoma do cólon humano) pelo teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Inicialmente as células foram plaqueadas (100 µL/poço) em placas de 96 poços a uma densidade de 8×10^3 células/poços para IMR90 e 1×10^4 células/poços para A549 e HCT8. Após a adesão, as células foram tratadas com concentrações seriadas de extrato (100 a 2000 µg/mL). Após 48 h, 10 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em água ultrapura) foram adicionados a cada poço e incubado por mais 4h a 37 °C. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados durante a incubação dissolvidos em DMSO. A absorbância foi registrada em 570 nm, utilizando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek). Três parâmetros diferentes de viabilidade celular foram analisados, conforme recomendado por Ramirez-Mares, Kobayashi e

Mejia (2016): concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50% (IC₅₀), concentração do agente que inibe o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas (GI₅₀) e concentração que resulta na morte de 50% das células em relação ao número de células no início do tratamento (LC₅₀).

2.3.8.4 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares

A geração de espécies reativas de oxigênio intracelular foi analisada utilizando a técnica de fluorescência conforme descrito por Escher *et al.* (2018). As células A549 e HCT8 (6×10^4 por poço) foram tratadas com EOL (100, 500 e 1000 µg/mL) previamente diluído em diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA; 25 mmol/L). Para controle negativo e positivo, as células foram tratadas com PBS e H₂O₂ (22,5 µmol/L), respectivamente. Um pós-tratamento com H₂O₂ (22,5 µmol/L) foi realizado para todos os poços. 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. Os resultados foram expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência.

2.3.8.5 Atividade anti-inflamatória

Com o intuito de avaliar a atividade anti-inflamatória do EOL, o teste de viabilidade MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi realizado com macrófagos 264.7, cultivados inicialmente em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina e 2 mM de glutamina a 37 ° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ / 95%. Em seguida os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) e passado o período de adesão, as células foram tratadas com EOL (diluído em soro fisiológico) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido, e RPMI (1 mg/mL) adicionado a placa e incubada por 3h. Posterior, o sobrenadante foi removido novamente e as células foram ressuspensas em 200 µL de DMSO. A absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular (Sardi *et al.*, 2017).

A quantificação de citocinas como TNF- α (fator alfa de necrose tumoral), CXCL2/MIP-2 (ligante 2 de quimiocina/proteína 2 inflamatória de macrófagos) e IL-6 (interleucina-6) foram realizadas com macrófagos cultivados em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) por 24 horas, a 37 ° C com 5% de CO₂. Passado o período de adesão, as células foram tratadas com o EOL na concentração de 100 μ g/mL por 30 minutos e posterior, estimuladas com LPS (10 ng/mL). As citocinas foram quantificadas pelo método ELISA (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima) e os resultados foram expressos em pg/mL (Novilla *et al.*, 2017).

2.3.8.6 Inibição da α -amilase e α -glicosidase *in vitro*

O efeito de inibição *in vitro* do EOL contra as enzimas α -amilase (2 a 3 mg/mL) e α -glicosidase (25 a 200 μ g/mL) foram avaliadas usando a metodologia descrita por Guo *et al.* (2018). O ensaio para a enzima α -amilase foi realizado com adição em tubos de ensaio de 500 μ L do EOL em diferentes concentrações (2 a 3 mg/mL), já para controle positivo utilizou-se 1 mmol acarbose (500 μ L). Em seguida, 500 μ L de 13 U/mL de solução de α -amilase (tipo VI-B do pâncreas suíno em PBS a 0,02 mol e pH 6,9) foram adicionados ao tubo de ensaio e incubada por 10 min a 25 °C. Posteriormente, 500 μ L de solução de amido solúvel a 1% (dissolvida em PBS e fervida por 15 min) foi adicionada e a mistura foi incubada por mais 25 min. Por fim, adicionou-se 1 mL de ácido dinitrosalicílico e os tubos foram aquecidos a 100 °C durante 5 minutos e a mistura foi diluída com 100 mL de água ultrapura. A absorbância foi registrada no comprimento de onda de 520 nm.

Para a avaliação da inibição da enzima α -glicosidase, o ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com adição de 50 μ L do EOL (25 a 200 μ g/mL) ou acarbose (1 mmol) para controle positivo e 100 μ L de uma solução de α -glicosidase (tipo I de *Saccharomyces cerevisiae*) 1 U/mL (em PBS a 0,1 mol, pH 6,9) e incubado por 10 min. Em seguida, 50 μ L de uma solução de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (PNPG, 5 mmol em PBS 0,1 mol e pH de 6,9,) foi adicionada a cada poço e incubada a 25 °C por 5 min. Por fim, a absorbância foi medida a 405 nm.

Para ambas as análises, os resultados foram expressos como porcentagem de inibição e o valor IC₅₀ foi calculado por análise de regressão usando o software TIBCO Statistica v.13.3 (TIBCO Software Ltd, Califórnia, EUA).

2.3.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média e desvio padrão. Inicialmente, avaliou-se a homogeneidade das variâncias (teste de *Brown-Forsythe*) e as diferenças entre os valores médios foram subsequentemente avaliadas usando a análise de variância unifatorial (ANOVA), seguida do teste de *Fisher's* de diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$). Para a avaliação anti-inflamatória, o teste *t* de *Student* não pareado ($p \leq 0,05$) foi empregado para comparar o controle (grupo tratado com LPS) e o grupo tratado com LPS + EOL (Granato; Araújo Calado; Jarvis, 2014). O software *TIBCO Statistica* v. 13.3 (TIBCO Software Ltd, Palo Alto, CA, EUA) foi utilizado nas análises.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Efeitos das Variáveis Independentes na Composição Fenólica e Atividade Antioxidante dos extratos

Os valores médios para os teores de CFT, FT, AT e AA, estão descritos na Tabela 2.2 e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada em todas as respostas. Na tabela 2.3 é possível verificar os efeitos significativos para a maximização das respostas, além da variabilidade dos dados, ausência da falta de ajuste e a normalidade dos resíduos.

O conteúdo de CFT variou de 4286 a 1107 mg AGE/100 g (Tabela 2.2) e observou-se que o maior teor de CFT foi obtido com a temperatura de 60 °C, 10 min de extração e razão massa-solvente de 1:65. Na Tabela 2.3, verifica-se que o modelo de MSR explicou 97% da variabilidade dos dados ($R^2_{adj} = 0,969$), não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$) e os resíduos seguiram a distribuição normal. A tendência dos resultados pode ser observada na Fig. 2.2A, onde a temperatura e tempo de extração causaram o aumento no teor CFT. A interação linear entre a temperatura e razão massa-solvente aumentou a concentração de CFT, constatando a importância de se estudar diferentes variáveis e possíveis interações.

Um comportamento semelhante foi observado para FT e AT. Os teores de FT variaram de 1009 a 249 mg QE/100 g, enquanto o teor de AT variou de 305 a 49 mg

CGE/100 g (Tabela 2.2). Para ambas as respostas, a extração realizada a 60 °C, 10 min e razão massa-solvente de 1:65 favoreceu uma melhor eficiência na extração. Os modelos de MSR (Tabela 2.3) explicaram 95% da variabilidade dos dados (FT - $R^2_{adj}=0,946$; e AT - $R^2_{adj}=0,951$), não apresentaram falta de ajuste ($p>0,05$) e os resíduos seguiram a distribuição normal. O efeito linear da temperatura e do tempo (Fig. 2.2B-C) ocasionaram um aumento dos teores de FT e AT, enquanto o efeito quadrático da temperatura tendeu a diminuir a eficácia da extração de antocianinas (Tabela 2.3). A razão massa-solvente não apresentou efeito significativo ($p>0,05$), não interferindo nos teores de tais compostos.

Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, no qual maiores temperaturas e tempos favorecem o aumento da extração de compostos bioativos, Armstrong *et al.* (2020) observaram que a temperatura linear e o tempo de extração também aumentaram o teor de CFT do chá *pu-erh*. A temperatura de 85,4 °C e 3 min foram necessários para a máxima extração do extrato aquoso nas condições estudadas, totalizando 1935 mg AGE/100 g. Em outro relato, Zielinski *et al.* (2014) estudaram a influência do tempo, temperatura e concentração de etanol na extração de compostos fenólicos em extratos de chá branco (*Camellia sinensis* L. Kuntze) e obtiveram como condições ideais para a máxima extração fenólica o tempo de 10 min, temperatura de 66 °C e solução de etanol a 30% como solvente extrator.

Fatores como temperatura, tempo e área superficial são fundamentais para a eficácia da extração de compostos fenólicos, influenciando na permeabilidade do solvente para o interior da matriz vegetal e consequentemente na difusão do soluto para o solvente, favorecendo o aumento da concentração de compostos fenólicos (Cacace; Mazza, 2003). Porém é importante ressaltar que os compostos fenólicos, especialmente as antocianinas, podem ser degradados com temperaturas acima de 60 °C, quando expostos a luz por tempo prolongado e até com a variação intensa de pH, resultando em baixas concentrações e redução dos potenciais benéficos a saúde (Howard *et al.*, 2012; Escher *et al.*, 2018).

Os resultados da AA dos extratos demonstraram que a temperatura e o tempo afetaram diretamente a AA *in vitro* dos extratos hidroalcóolicos acidificados (Tabela 2.3). Os modelos foram significativos, não apresentaram falta de ajuste ($p>0,05$) e os resíduos seguiram a distribuição normal. A CRT variou de 6939 a 26514 mg QE/100 g (Tabela 2.2), sendo que o extrato obtido a 60 °C por 15 min e razão massa-solvente 1:50, apresentou a maior capacidade antioxidante. O modelo de regressão explicou

90% da variabilidade dos dados ($R^2_{Adj}=0,901$; Tabela 2.3) e de acordo com a Fig. 2.2D é possível verificar que a temperatura e o tempo nos maiores níveis estudados influenciaram no aumento da AA ao passo que a razão massa-solvente não apresentou efeito significativo para o aumento da CRT.

A porcentagem de inibição da lipoperoxidação induzida em homogenato de gema de ovo variou de 32 a 72% (Tabela 2.2). O extrato obtido a temperatura de 60 °C, 15 min e razão massa-solvente 1:50, inibiu 72% da oxidação lipídica em meio fisiológico. O modelo de regressão (Tabela 2.3) proposto foi capaz de explicar 97% da variabilidade dos dados ($R^2_{Adj}=0,967$). Os efeitos lineares e quadráticos, bem como as interações entre as variáveis, apresentaram efeito significativo ao inibir a lipoperoxidação, exceto a razão massa-solvente linear que não apresentou efeito significativo sobre a resposta analisada. A tendência dos resultados também pode ser observada da Fig. 2.2E, onde o aumento da temperatura e tempo colaborou para uma maior inibição da lipoperoxidação induzida.

Já para a avaliação da captura do radical livre DPPH, observou-se a variação de 25758 a 55719 mg AGE/100 g (Tabela 2.2). O maior valor de DPPH foi observado quando a extração foi realizada nas condições de 60 °C, 10 min e relação massa-solvente de 1:65. O modelo proposto (Tabela 2.3) explicou 84% da variabilidade dos dados ($R^2_{Adj}=0,839$) e o efeito linear da temperatura, tempo, razão massa-solvente e interação entre a temperatura e razão massa-solvente aumentaram significativamente os valores obtidos na análise (Fig. 2.2F).

Tabela 2.2 - Quantificação de classes de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* de acordo com o planejamento experimental *Box Behnken*.

Ensaio	Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)	Antocianinas (mg CGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Capacidade Redutora Total (mg QE/100 g)	Lipoperoxidação (% inibição)	DPPH (mg AAE/100 g)
1	1393 ± 36 ^l	65 ± 1 ⁱ	316 ± 2 ⁿ	9190 ± 186 ⁱ	32 ± 1 ^j	29261 ± 649 ^f
2	1107 ± 5 ^m	49 ± 1 ^j	249 ± 2 ^o	6739 ± 96 ^j	32 ± 1 ^j	25758 ± 1744 ^g
3	2081 ± 20 ^j	89 ± 1 ^h	423 ± 7 ^l	11954 ± 231 ^h	35 ± 0 ^j	36760 ± 796 ^e
4	1887 ± 23 ^k	88 ± 1 ^h	386 ± 1 ^m	11380 ± 39 ^h	40 ± 1 ⁱ	26205 ± 876 ^g
5	3075 ± 22 ^e	157 ± <1 ^d	691 ± 14 ^e	17212 ± 343 ^e	46 ± 1 ^{gh}	37468 ± 508 ^e
6	2113 ± 16 ^j	121 ± <1 ^g	544 ± 7 ⁱ	14164 ± 361 ^g	55 ± 1 ^{ef}	31308 ± 529 ^f
7	2882 ± 37 ^f	130 ± 4 ^f	638 ± 13 ^f	15378 ± 1084 ^f	48 ± 2 ^g	45566 ± 309 ^c
8	2210 ± 34 ⁱ	103 ± 1 ^h	476 ± 6 ^k	11570 ± 856 ^h	44 ± 1 ^h	31360 ± 1535 ^f
9	3166 ± 54 ^d	291 ± 5 ^b	894 ± 23 ^c	23315 ± 755 ^b	62 ± 1 ^c	36504 ± 327 ^e
10	4286 ± 31 ^a	305 ± 8 ^a	1009 ± 11 ^a	23225 ± 291 ^b	68 ± <1 ^b	55719 ± 1111 ^a
11	4175 ± 108 ^b	294 ± 7 ^b	980 ± 6 ^b	26514 ± 1675 ^a	72 ± <1 ^a	48244 ± 2848 ^b
12	3263 ± 56 ^c	214 ± <1 ^c	796 ± 1 ^d	20524 ± 822 ^c	52 ± 2 ^f	44330 ± 1536 ^c
13 (C)	2680 ± 71 ^g	130 ± 6 ^f	620 ± 18 ^g	19363 ± 877 ^d	58 ± 2 ^{de}	37346 ± 2420 ^e
14 (C)	3158 ± 40 ^d	147 ± 1 ^e	618 ± 0 ^g	21334 ± 724 ^c	56 ± 3 ^{de}	36976 ± 540 ^e
15 (C)	2325 ± 31 ^h	120 ± <1 ^g	513 ± 0 ^j	15118 ± 295 ^{fg}	56 ± 3 ^{de}	41857 ± 940 ^d
16 (C)	2728 ± 18 ^g	142 ± <1 ^e	599 ± 1 ^h	18308 ± 334 ^{de}	59 ± 3 ^{cd}	42057 ± 961 ^d
17 (C)	2717 ± 68 ^g	130 ± 1 ^f	553 ± <1 ⁱ	15863 ± 281 ^f	58 ± 2 ^{de}	40975 ± 990 ^d
EOFR	5016 ± 66	269 ± 6	831 ± 31	16995 ± 356	75 ± <1	50957 ± 835
<i>p</i> -Valor ¹	0,860	0,828	0,471	0,587	0,907	0,814
<i>p</i> -Valor ²	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: (C) pontos centrais. AGE = ácido gálico equivalente; QE = quercetina equivalente; CGE = cianidina-3-glucosídeo equivalente; AAE = ácido ascórbico equivalente. ¹ Teste *Brown-Forsythe* (homoscedasticidade); ² Análise de variância unifatorial (ANOVA). Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de *Fisher*. EOFR = extrato otimizado de folhas roxas de *C. sinensis*.

Figura 2.2 - Efeito do tempo e temperatura de extração no teor de compostos fenólicos totais (A), flavonoides totais (B), antocianinas totais (C), capacidade redutora total (D), inibição de lipoperoxidação (E) e captura do radical livre DPPH (F).

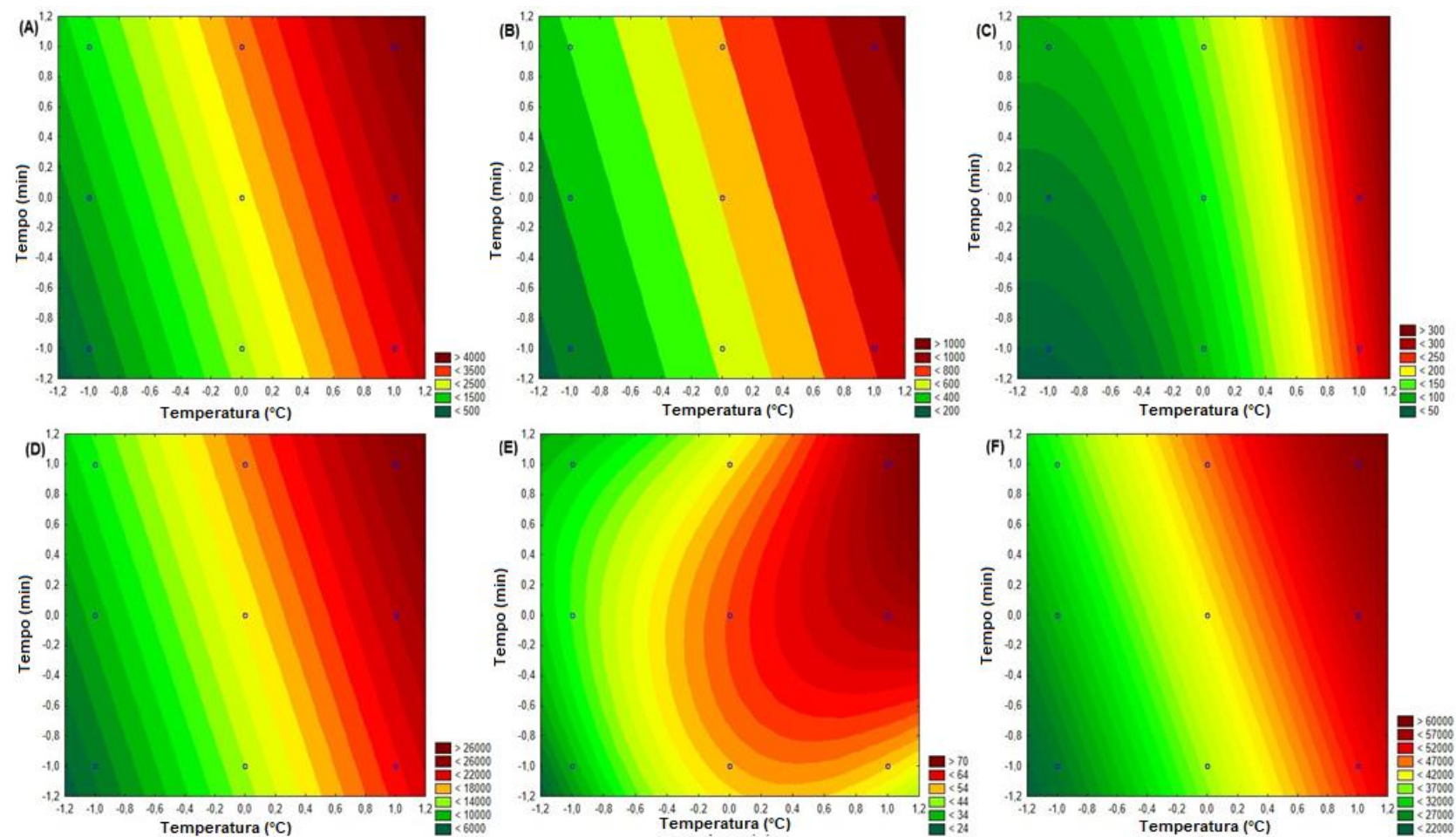


Tabela 2.3 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta para modelar os efeitos da temperatura (X_1), tempo (X_2) e razão sólido-líquido (X_3) na composição química e atividade antioxidante das folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *Assamica* cv. *Zijuan*

Parâmetros	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	- 95% Confiança	95% Confiança	t-Valor	p-Valor
<i>Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)</i>						
Constante	2634	48	2481	2787	54	<0,001
X_1	1057	68	841	1273	15	<0,001
X_2	446	68	230	663	6	0,007
X_1X_3	404	96	98	71	4	0,025
R^2	0,975					
R^2 ajustado	0,9695					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,865					
<i>Antocianinas totais (mg CGE/100 g)</i>						
Constante	159	2	151	16	67	<0,001
X_1	101	3	91	111	31	<0,001
X_1^2	-22	2	-29	-15	-9	0,002
X_2	22	3	1	32		0,006
R^2	0,961					
R^2 ajustado	0,951					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,568					
<i>Flavonoides (mg QE/100 g)</i>						
Constante	605	11	567	644	50	<0,001
X_1	288	16	234	342	17	<0,001
X_2	83	1	29	137	4	0,016
R^2	0,953					
R^2 ajustado	0,946					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,345					
<i>Capacidade total de redução (mg QE/100 g)</i>						
Constante	16239	500	14646	17831	32	<0,001
X_1	6789	707	4537	9041	9	0,002
X_2	2257	707	5	4509	3	0,050
R^2	0,914					
R^2 ajustado	0,901					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,824					

<i>Lipoperoxidação (% inibição)</i>						
Constante	49	<1	47	50	111	<0,001
x ₁	14	<1	12	15	26	<0,001
x ₁ ²	1,9	<1	0,7	3,1	5	0,015
x ₂	3,4	<1	1,5	5,2	5,9	0,010
x ₂ ²	3,1	<1	1,8	4,2	8	0,004
x ₃ ²	1,7	<1	0,5	2,9	4	0,020
x ₁ x ₂	4,3	<1	1,9	6,8	5	0,011
x ₁ ² x ₂	-3,6	<1	-5,3	-1,9	6,7	0,007
x ₁ x ₃	3,5	<1	1	5,9	4	0,020
x ₂ x ₃	3,3	<1	0,8	5,7	4	0,023
R ²	0,987					
R ² ajustado	0,967					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,246					
<i>DPPH (mg AAE/100 g)</i>						
Constante	38170	548	36425	39914	69	<0,001
x ₁	8351	775	5884	10818	10	0,002
x ₂	4410	775	1943	6877	5	0,011
x ₃	3802	775	1335	6269	4	0,016
x ₁ x ₃	4039	1096	550	7528	3	0,035
R ²	0,881					
R ² ajustado	0,839					
p-Valor (normalidade dos resíduos)	0,702					

A partir dos dados de AA e composição fenólica determinada por espectrofotometria, observou-se que a análise de correlação entre os métodos foi positiva e significativa ($p < 0,05$). As maiores correlações foram observadas entre a CRT e os teores de CFT ($r = 0,939$) e AT ($r = 0,908$). A análise de captura do radical DPPH obteve a maior correlação com o teor de CFT ($r = 0,866$), seguida do teor de AT ($r = 0,734$) e FT ($r = 0,668$). Por fim, a inibição da lipoperoxidação induzida correlacionou-se com o teor de CFT ($r = 0,841$), AT ($r = 0,810$) e FT ($r = 0,740$). Estudos com as folhas roxas de *C. sinensis* corroboram com os dados obtido neste estudo, Kerio *et al.* (2013) ao avaliarem a composição fenólica e AA de extrato metanólico de folhas roxas de *C. sinensis* (chá preto e verde) verificaram que a AA avaliada pela captura do radical livre DPPH é influenciada pelo teor de antocianinas ($r = 0,789$) e

catequinas ($r=0,818$). Os autores ainda afirmam que a cianidina-3-O-glucosídeo foi a antocianina que melhor se correlacionou com a AA ($r=0,843$).

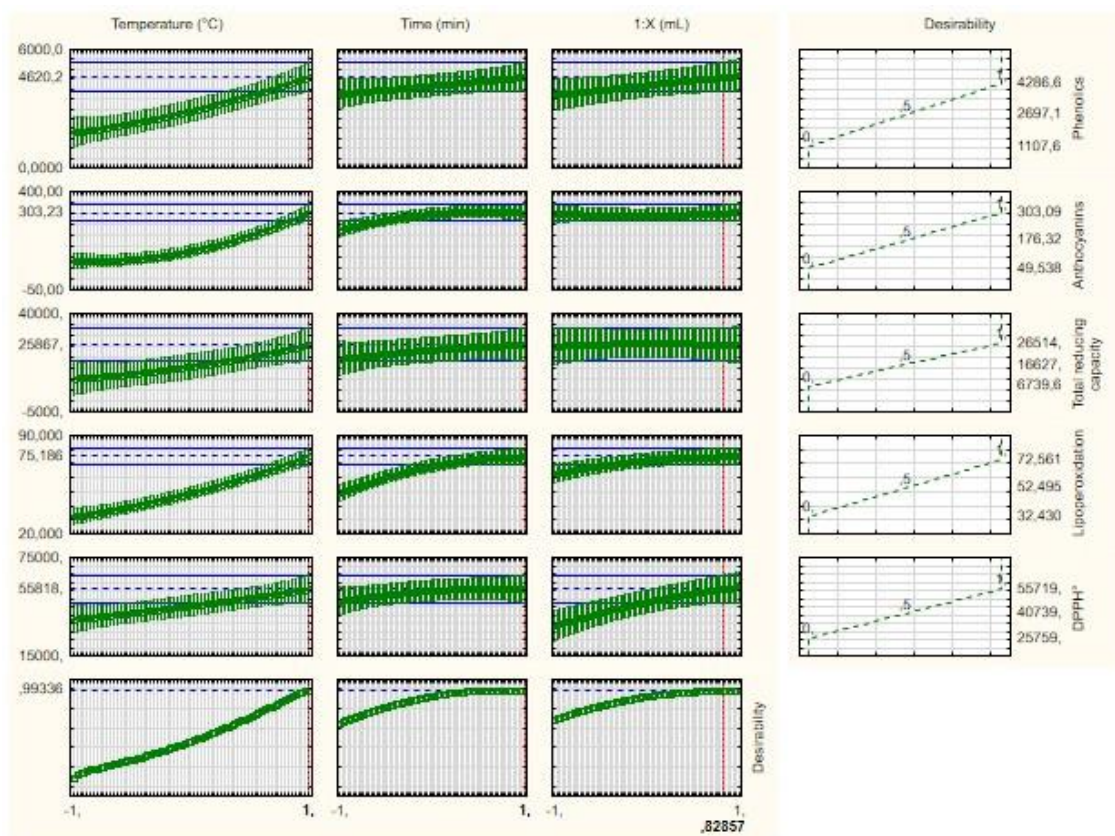
Utilizou-se a otimização simultânea, baseada na função desejabilidade, para obter a melhor condição experimental com um alto teor fenólico e AA (Figura 2.3). Com uma função de desejabilidade (valor d) de 0,993, a seguinte condição experimental foi proposta: 15 minutos de extração a 60 °C e razão massa-solvente de 1 g de folhas roxas desidratadas para 62,3 mL de solvente extrator. Os valores preditos pelos modelos de regressão juntamente com os valores experimentais e a porcentagem do erro absoluto estão apresentados na Tabela 2.4. Verificou-se que os dados experimentais do EOFR estão dentro dos intervalos de predição, comprovando que os modelos são adequados e capazes de prever a composição fenólica e a AA de extratos etanólicos acidificados de chá verde proveniente de folhas roxas de *C. sinensis*.

Tabela 2.4 - Valores preditos e experimentais para o extrato otimizado do chá das folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*.

Respostas	Valores médios previstos	-95% predição	+95% predição	Valor experimental	Erro relativo absoluto (%)
Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)	4524	3759	5290	5016 ± 66	11
Antocianinas totais (mg CGE/100 g)	277	241	313	269 ± 6	3
Flavonoides totais (mg QE/100 g)	1007	817	1198	831 ± 31	17
Capacidade redutora total (mg QE/100 g)	25029	17061	32996	16995 ± 356	32
Lipoperoxidação (% inibição)	70	63	75	75 ± <1	9
DPPH (mg AAE/100 g)	57363	48634	66091	50957 ± 835	11

Note: Erro relativo absoluto (%) = [(valor médio experimental - valor médio predito) / valor médio predito] × 100. AGE = ácido gálico equivalente; QE = quercetina equivalente; CGE = cianidina-3-O-glucosídeo equivalente; AAE = ácido ascórbico equivalente.

Figura 2.3 - Otimização simultânea para maximizar o conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*.



2.4.2 Composição Fenólica e Atividade Antioxidante do Extrato Otimizado

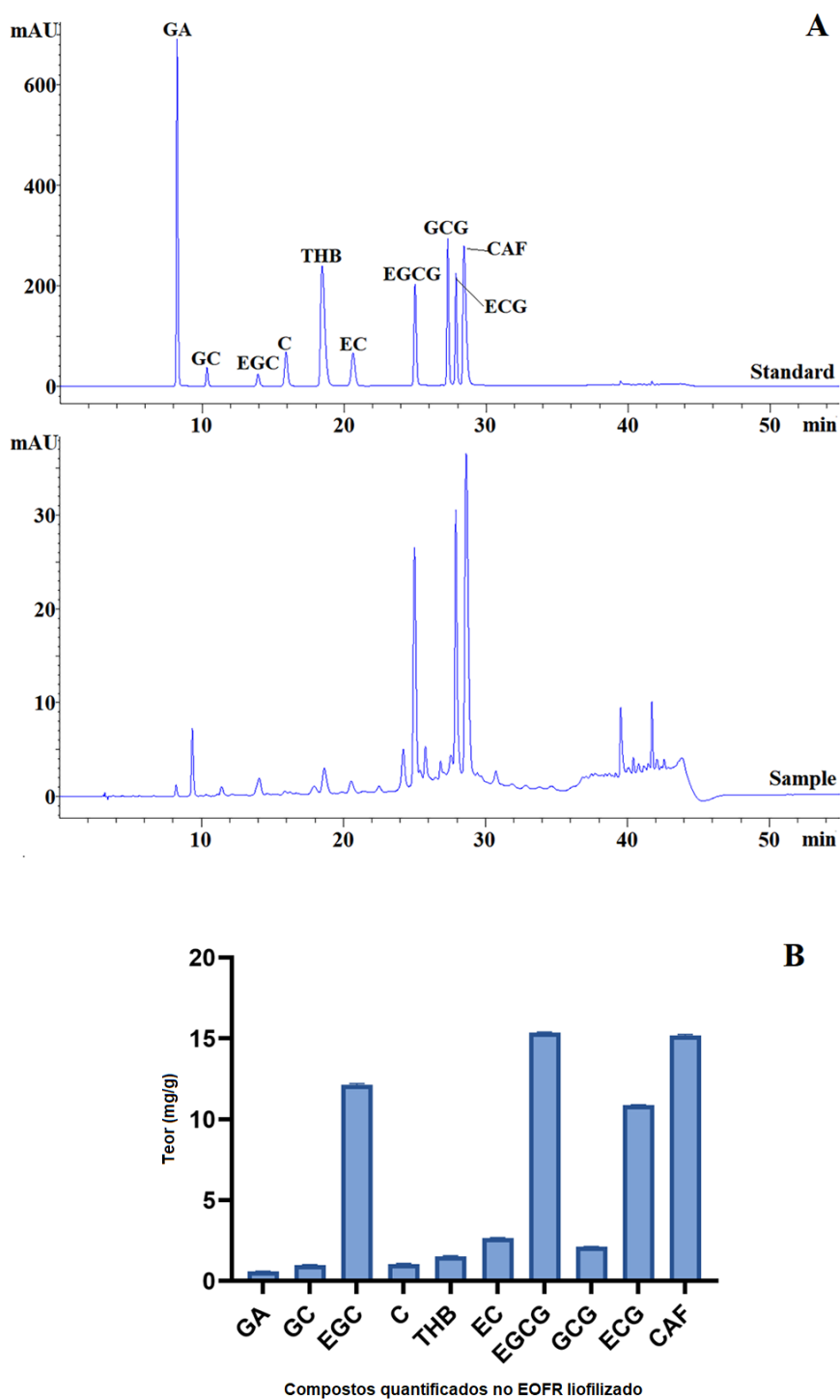
Em relação à composição química do EOFR além dos relatados na Tabela 2.2, o teor de flavonóis, taninos condensados e *orto*-difenóis foram 476 ± 8 mg QE/100 g, 14815 ± 587 mg CE/100 g e 5377 ± 193 mg ACE/100 g, respectivamente. Os taninos condensados (flavan-3-óis), formados a partir de duas ou três moléculas de catequinas, é a subclasse mais abundante de flavonoides presentes nos chás provenientes da *C. sinensis* como relatado por Santos *et al.* (2018), corroborando com o teor observado neste estudo. Tais compostos também podem favorecer no elevado teor de *orto*-difenóis, já que compostos EGC, C, EC, EGCG, e ECG contém inúmeros grupos hidroxilas na posição *orto* em sua estrutura química, além de ácidos fenólicos e outros compostos de baixo peso molecular, frequentemente relatados em pesquisas com chás provenientes da *C. sinensis*. Por fim, o teor de flavonóis representados pelos compostos kaempferol, quercetina e miricetina, são relatados em estudos

provenientes da *C. sinensis*, porém em menores concentrações, como notado neste estudo (Granato *et al.*, 2014).

Sete catequinas incluindo GC, GCG, EGC, C, EC, EGCG e ECG foram detectadas no EOFR liofilizado (Figura 2.4). Dentre eles, os teores de EGCG, EGC e ECG (10,87–12,13 mg/g de extrato liofilizado), foram observados em maiores concentrações. Além disso, alcaloides purínicos teobromina (THB) e cafeína (CAF), foram quantificados e seus teores foram de 15,17 e 1,53 mg/g, respectivamente. Esses resultados corroboram os achados de Fan *et al.* (2013), Shi *et al.* (2021) e Zhao *et al.* (2020), mostraram altos níveis de EGCG, ECG, EGC, EC e CAF em amostras de *C. sinensis* de diferentes cultivares. Shi *et al.* (2021) relataram o teor total de catequinas de 220-330 mg/g para extratos metanólicos de folhas roxas, e EGCG ocupou a maior fração (92,4 mg/g a 165,4 mg/g) em 9 cultivares de chás com folhas roxas de *C. sinensis*.

Análises complementares para avaliação da AA foram realizadas visando abranger os diferentes mecanismos de ação. O EOFR apresentou capacidade redutora testada pelo ensaio FRAP (27042 ± 113 mg AAE/ 100 g) e capacidade quelante de ferro (7149 ± 275 mg EDTAE/100 g). Estudos na literatura apontam que extratos obtidos de *C. sinensis* são reconhecidos pela capacidade de doação de elétrons além da capacidade de quelar metais de transição, como cobre e ferro (Granato *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2020). O elevado teor de compostos como flavan-3-óis e taninos condensados presentes no EOFR promoveram os altos níveis de atividade antioxidante apresentados nos resultados deste estudo. De fato, esta magnitude da atividade antioxidante do EOFR também é apontada adiante nos testes de cultura de células onde este extrato diminui a produção de EROs intracelular.

Figura 2.4 - Cromatograma (A) e quantificação (B) da composição fenólica detectada no extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas (EOFR) de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* ($\lambda=278$ nm).



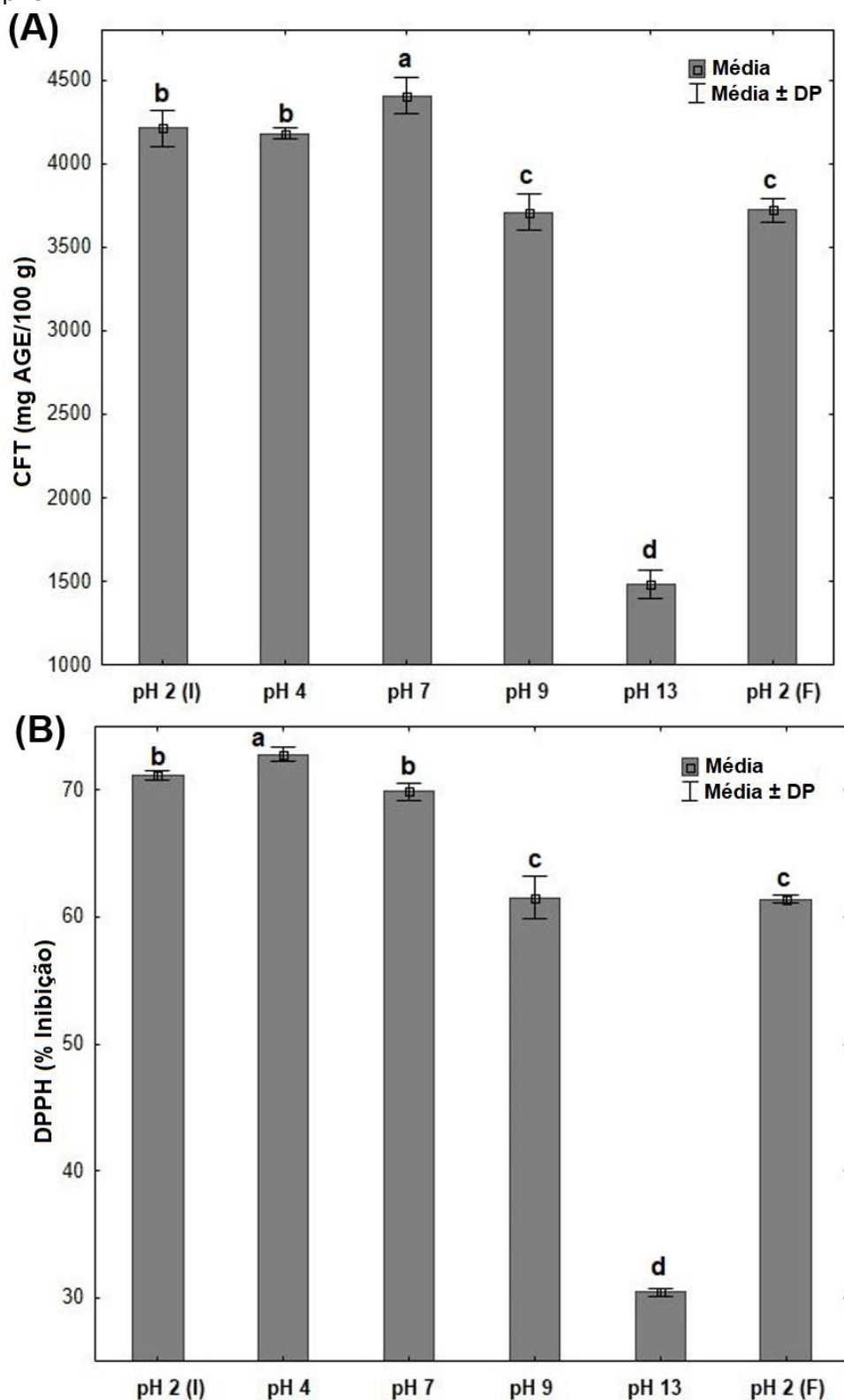
Nota: GA: ácido gálico; GC: (-)-galocatequina; EGC: (-)-epigalocatequina; C: (+)-catequina; THB: teobromina EC: (-)-epicatequina; EGCG: (-)-epigalocatequina galato; GCG: (-)-galocatequina galato; ECG: (-)-epicatequina galato; CAF: cafeína.

2.4.3 Estabilidade do Extrato otimizado

A estabilidade de compostos bioativos é influenciada muitas vezes por variações de pH, temperaturas elevadas e luminosidade. As antocianinas, como exemplo, são degradadas quando expostas a temperaturas elevadas, luz em excesso, e sua cor pode ser influenciada pela variação de pH, devido o deslocamento da estrutura de equilíbrio reversível ou irreversível desses compostos (escher *et al.*, 2018). Neste intuito, avaliação dos teores de CFT e AA (DPPH) foi realizada para o EOFR em meio ácido (pH 2 e 4), neutro (pH 7) e alcalino (pH 9 e 13) a fim de verificar a estabilidade e reversibilidade dos compostos. Os resultados obtidos tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) no teor de CFT (Figura 2.5A) e AA avaliada pelo método de captura do radical DPPH (Figura 2.5B). Verificou-se que os teores de CFT variaram de 1481 a 4407 mg AGE/100 g e o maior teor observado foi em pH 7 enquanto em pH 13 resultou no menor teor de CFT. Um comportamento semelhante foi observado para a AA, a menor porcentagem de inibição do radical DPPH foi em pH 13 (30% de inibição) e as maiores porcentagens foram observadas entre os pH 2 a 7, com variação de 69 a 72% de inibição do radical DPPH. Ambas as análises demonstraram reversibilidade parcial dos compostos presentes dos extratos no deslocamento de equilíbrio, com uma recuperação de 85% para o teor de CFT e uma porcentagem de AA de 61%.

De acordo com Lee e Kader (2000) os baixos teores de CFT e AA em pH extremamente alcalino é esperado devido a possível oxidação desses compostos, como observado em pH 13 neste estudo. Ao avaliar a AA de extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea*, Escher *et al.* (2018) obtiveram a menor porcentagem de inibição do radical DPPH em pH 10,20, enquanto em pH próximo a 7 obteve 64% de inibição do radical, e em pH entre 3 e 5, a porcentagem de inibição foi de aproximadamente 60%. Este estudo corrobora com os dados obtidos para o EOFR, com porcentagens de AA acima de 60%, entre os pH 2 a 7.

Figura 2.5 - Estabilidade do teor de compostos fenólicos (A) e atividade de inibição do radical DPPH (B) do extrato otimizado de folhas de chá roxo (EOFR) de *Camellia sinensis* var. *assamica* em diferentes pHs.



Observar a estabilidade dos compostos em diferentes faixas de pH é relevante devido a possível absorção desses compostos em um processo digestivo, onde o pH

pode variar de 1,5 a 2 no estômago, pH 7 no intestino delgado e pH 8 no duodeno, além da possível aplicação tecnológica, visto que a adição de extratos ricos em compostos fenólicos em produtos alimentícios pode favorecer no aumento da vida útil do produto, diminuir processos oxidativos, substituir corantes e conservantes sintéticos, fornecendo ao consumidor um produto de qualidade e potencialmente funcional (Gonçalves Bortolini *et al.*, 2021). O EOFR apresentou elevados teores de CFT e AA em uma faixa ampla de acidez (pH 2 a 7), semelhante do processo digestivo, porém estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade em modelos *in vivo* são necessários.

2.4.4 Bioatividades *in vitro* do EOFR Liofilizado

2.4.4.1 Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos para o método de difusão em ágar placa-cavidade, estão demonstrados Tabela 2.5, sendo os mesmos referentes ao halo de inibição obtido pela atividade antimicrobiana do EOFR liofilizado. É possível verificar que EOFR apresentou inibição do crescimento para todos os micro-organismos testados, exceto *Bacillus cereus*. Os menores halos de inibição foram de 1,5 mm para o *Salmonella* Typhimurium (IAL 2431) e 1,8 mm para *Salmonella enteritidis* (S 2887), e com maiores halos destaca-se a *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12288), com halos de 4,0, 4,1 e 5,0 mm, respectivamente. Para a concentração inibitória mínima, o extrato não inibiu o crescimento dos microrganismos nas concentrações de utilizadas (15,625 a 250 µg/mL).

Tabela 2.4 - Atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e otimizado de folhas de chá roxo (EOFR) de *Camellia sinensis* var. *assamica*.

Micro-organismos	Halo de inibição (mm)	
	EOFR liofilizado (mm)	Controle positivo (mm)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	4,0 ± 0,3	31,8 ± 1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IAL 1853)	2,0 ± 0,7	17,3 ± 3,8
<i>Salmonella typhimurium</i> (IAL 2431)	1,5 ± 0,3	21,8 ± 1,7
<i>Salmonella enteritidis</i> (S2887)	1,8 ± 0,6	16,3 ± 8,3
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	ND	20,0 ± 1,8
<i>Escherichia coli</i> (IAL 2064)	2,6 ± 1,6	30,0 ± 1,2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13565)	4,1 ± 0,1	37,8 ± 8,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12288)	5,0 ± 0,4	6,5 ± 0,6

Nota: Controle positivo: Imipenem (10 µg/mL). ND = Não detectado (extrato não inibiu o crescimento).

De acordo com Almajano *et al.* (2008) a atividade antimicrobiana está relacionada com compostos fenólicos presentes no EOFR, tais como flavan-3-óis e flavonóis, e interações sinérgicas podem atuar em um maior potencial antimicrobiano. Estudos da atividade antimicrobiana utilizando os chás provenientes da *C. sinensis* são frequentemente observados na literatura (Armstrong *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2018; Reygaert, 2014), porém não foram encontrados relatos de atividade antimicrobiana com a utilização de folhas roxas de *C. sinensis*. A ausência de estudos comparativos enfatiza a importância de se estudar essa variedade de chá, visto que tem potencial antimicrobiano frente a micro-organismos importantes para a ocorrência de doenças de origem alimentar e quadros clínicos.

2.4.4.2 Viabilidade Celular e Medição de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular

O efeito citotóxico do EOFR foi avaliado nas linhagens celulares IMR90, A549 e HCT8 e os resultados apresentados na Tabela 2.6. O EOFR liofilizado apresentou viabilidade para todas as linhagens celulares testadas (IC_{50} de 804,2 a 1161 $\mu g/mL$), com maior sensibilidade em relação ao A549 (IC_{50} de 804,2 $\mu g/mL$). O EOFR liofilizado demonstrou um baixo efeito citotóxico contra a linhagem celular de câncer HCT8 ($LC_{50}=1778 \mu g/mL$) e pareceu não tóxico para A549 e células normais ($LC_{50}>2000 \mu g/mL$) cuja LC_{50} não foi determinada, sugerindo relativa segurança para essas células em baixas concentrações. Em geral, o EOFR liofilizado apresentou atividade antiproliferativa para todas as linhagens celulares: IMR90 ($GI_{50}=85,72 \mu g/mL$), A549 ($GI_{50}=595,4 \mu g/mL$) e HCT8 ($GI_{50}=564,4 \mu g/mL$). Comportamento semelhante foi observado em um estudo com extrato de chá *Zijuan* (Gao *et al.*, 2018), que também exibiu efeito antiproliferativo em relação às linhagens celulares cancerosas HCT-116, HepG2 e MDA-MB-231 (IC_{50} de 224,09 a 380,47 $\mu g/mL$). O EOFR liofilizado contém notável conteúdo fenólico total, incluindo catequinas e antocianinas, que foram os principais responsáveis pela atividade antiproliferativa do extrato otimizado de chá verde proveniente de folhas roxas de *C. sinensis*.

Das linhagens celulares de câncer investigadas, as células A549 mostraram-se mais resistentes ao extrato, exibindo um alto valor de GI_{50} e indicando que seriam necessárias concentrações muito altas para inibir a proliferação celular. Por outro

lado, as células IMR90 apresentaram maior sensibilidade, pois apresentaram baixo valor de GI_{50} , refletindo citotoxicidade substancial para essa linhagem celular normal.

Tabela 2.5 - Viabilidade celular de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), fibroblasto de pulmão humano (IMR90) e carcinoma do cólon humano (HCT8) após exposição ao extrato otimizado e liofilizado de folhas roxas de *C. sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*.

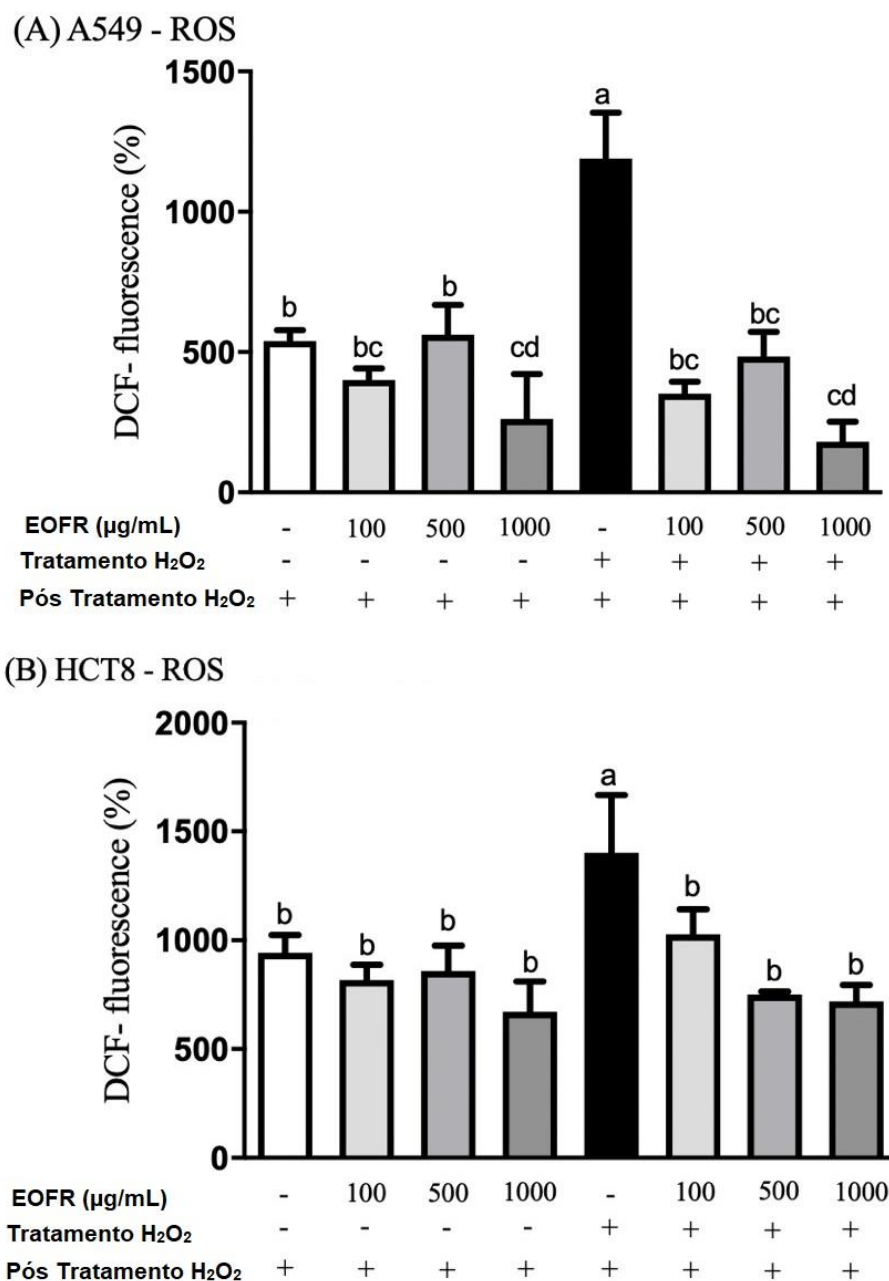
Parâmetro	Linhagem Celular		
	IMR90	A549	HCT8
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	1089	804,2	1161
GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	85,72	595,4	564,4
LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	>2000	>2000	1778

Nota: IC_{50} : a concentração do agente que inibe o crescimento em 50%; GI_{50} : a concentração do agente que inibe o crescimento em 50%; LC_{50} : a concentração do agente que resulta na morte de 50% das células em relação ao número no início do tratamento.

Considerando o fato de que as antocianinas presentes no EOFR liofilizado atuaram como agente antioxidante em estudos anteriores (Lv *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2017), realizou-se a avaliação da geração de EROs intracelular em linhagens celulares expostas a várias concentrações (100–1000 $\mu\text{g/mL}$) do EOFR liofilizado (Figura 2.6). Os níveis de EROs induzidos por H_2O_2 foram maiores que os do controle. O extrato apresentou efeitos antioxidantes, e as três concentrações exibiram uma diminuição adequada na produção de EROs em relação às células A549 e HCT8 ao mesmo nível da geração espontânea. Esse resultado está associado à presença de antocianinas e catequinas, que podem remover de forma eficiente os radicais livres e induzir forte atividade antioxidante nas células por conterem numerosos grupos hidroxila (Joshi *et al.*, 2017; Neill *et al.*, 2002). A particularidade da molécula de antocianina como antioxidante também pode ser atribuída à sua capacidade de deslocar elétrons e formar estruturas ressonantes (Bagchi *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos, como os presentes no EOFR liofilizado, pode prevenir danos celulares em células normais e células cancerosas por inibir a geração de EROs intracelular induzida por H_2O_2 (Fan *et al.*, 2020). Uma redução nos níveis de EROs pode prejudicar a sinalização pró-tumorigênica e, consequentemente, a proliferação celular e progressão tumoral (Carmo, Granato; Azevedo, 2021). De fato, esse efeito pode ser observado pelo leve efeito de citotoxicidade em relação à linhagem celular HCT8 ($LC_{50} = 1778 \mu\text{g/mL}$).

Figura 2.6 - Medição intracelular de espécies reativas de oxigênio em células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) e carcinoma do cólon humano (HCT8) por espectrofluorimetria.

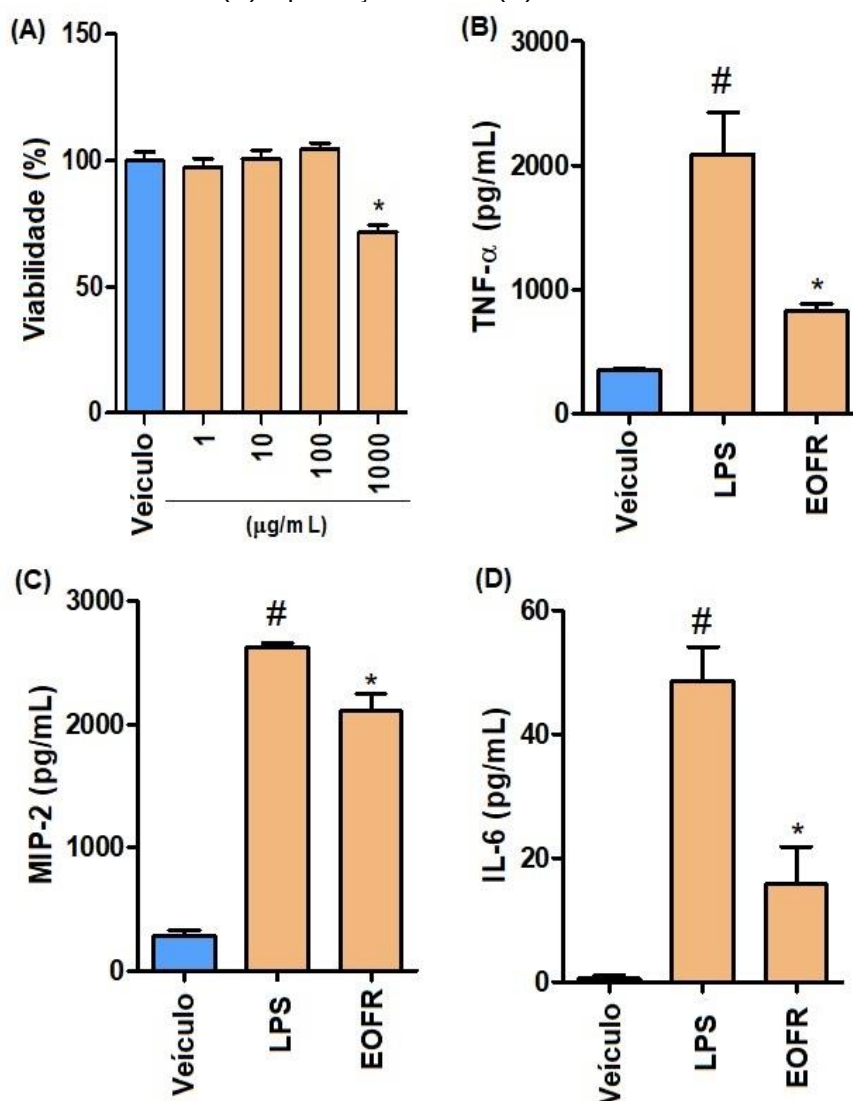


Nota: Tratamento realizado com o extrato otimizado e liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* a 100-1000 µg/mL. Dados quantitativos são a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$).

2.4.4.3 Atividade Anti-inflamatória

Os resultados referentes a viabilidade celular em relação a macrófagos 264.7 e quantificação das citocinas (TNF- α , CXCL2/MIP-2 e IL-6), estão apresentados na Figura 2.7.

Figura 2.7 - Efeitos do extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas (EOFR) de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* (1–1000 µg/mL) na viabilidade de macrófagos RAW 264,7 (A), produção de TNF-α (B), produção de CXCL2/MIP-2 (C) e produção de IL-6 (D).



Nota: O símbolo (#) indica diferença estatística em relação ao veículo e o símbolo (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado apenas com lipopolissacarídeos (LPS).

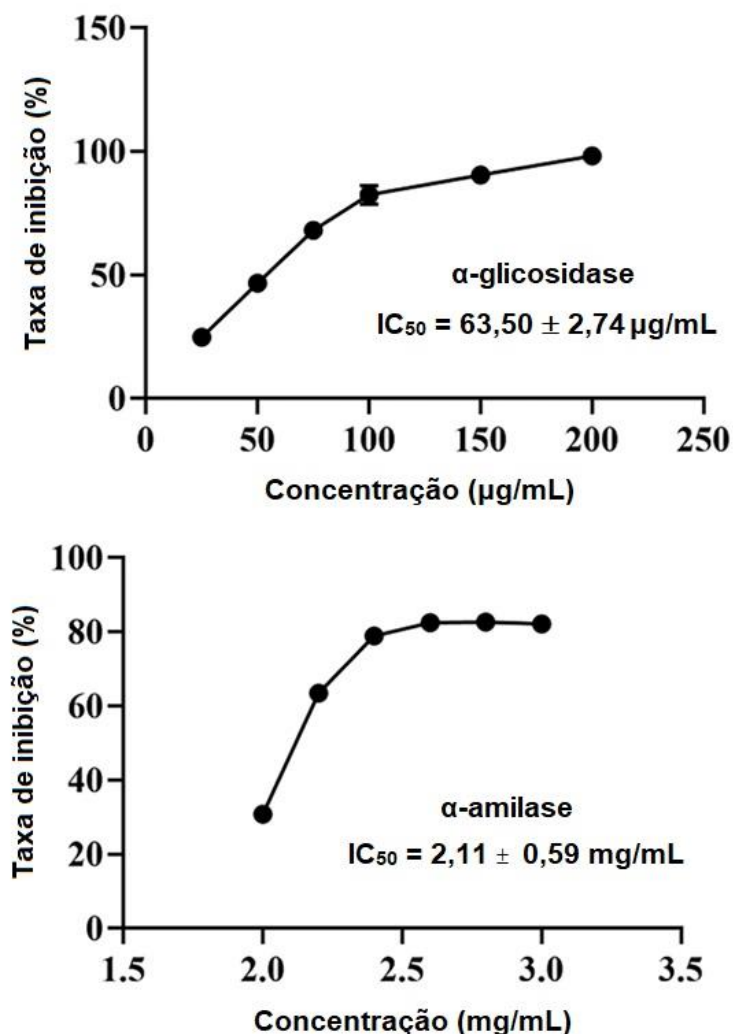
O EOFR apresentou citotoxicidade na concentração de 1000 µg/mL (Figura 2.7A), já em concentrações menores (1, 10, 100 µg/mL) o EOFR promoveu a manutenção da viabilidade celular. Com base nesses resultados, a concentração de 100 µg/mL do EOFR liofilizado foi utilizada para avaliação da liberação de citocinas inflamatórias em macrófagos estimulados por LPS. Conforme observado na Figura 2.7C-D, o pré-tratamento das células com EOFR a 100 µg/mL reduziu a liberação das citocinas pró-inflamatórias ($p \leq 0,05$). Similarmente, Novilla *et al.* (2017) avaliaram as propriedades anti-inflamatórias do extrato etanólico de chá *oolong* (*Camellia sinensis*)

e observaram a capacidade de reduzir os níveis de óxido nítrico (NO), interleucinas (IL-6, IL-1 β), ciclooxygenase-2 (COX-2) e TNF- α em macrófagos ativos. Tal comportamento pode estar associado ao elevado teor de compostos fenólicos presentes nos produtos obtidos a partir da *C. sinensis*, o EOFR contém especialmente compostos como flavan-3-óis e antocianinas, que podem auxiliar na atividade anti-inflamatória por meio de sua capacidade de eliminar radicais livres como NO, peroxinitrito e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Novilla *et al.*, 2017), além de inibir a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios e diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Bastos; Rogero; Arêas, 2009).

2.4.4.4 Inibição da α -amilase e α -glicosidase *in vitro*

A inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase está representada Figura 2.8. Pode-se observar que o EOFR liofilizado apresentou atividade inibitória contra as enzimas α -glicosidase e α -amilase. Com apenas 63,50 μ g/mL, o EOFR liofilizado inibiu 50% da atividade da enzima α -glicosidase (IC_{50} = 63,50 μ g/mL), enquanto para a enzima α -amilase foi necessária uma concentração de 2,11 mg/mL para inibir 50 % de atividade enzimática (IC_{50} = 2,11 mg/mL). O aumento da concentração de EOFR liofilizado mostrou um efeito dose-dependente: para a enzima α -glicosidase, a maior concentração de EOFR liofilizada testada (200 μ g/mL) inibiu 100% da atividade enzimática, enquanto para a enzima α -amilase, a concentração máxima testada de EOFR liofilizado (3 mg/mL) inibiu aproximadamente 80% da atividade enzimática.

Figura 2.8 - Efeitos do extrato liofilizado e otimizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* na inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase.



Estudos anteriores mostraram que compostos fenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, inibem enzimas digestivas e, assim, ajudam a controlar doenças associadas à hiperglicemia, além de reduzir a taxa de glicose e absorção no intestino delgado (Hanhineva *et al.*, 2010). Esses dados corroboram os resultados obtidos por Armstrong *et al.* (2020), que ao avaliarem a capacidade inibitória do extrato aquoso *pu-erh* contra a α -glicosidase, obtiveram o valor de IC_{50} de $47,30 \mu\text{g/mL}$, já em relação à α -amilase, o extrato otimizado apresentou 30% de inibição na maior concentração testada ($30,0 \text{ mg/mL}$). Santos *et al.* (2020) obtiveram valores de IC_{50} de $113,5 \mu\text{g/mL}$ e $19,0 \text{ mg/mL}$ para α -glicosidase e α -amilase, respectivamente, ao avaliar extratos aquosos de chá branco.

2.5 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a eficácia da aplicação da metodologia de superfície de resposta para modelar a extração de compostos bioativos presentes no chá verde proveniente de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*. A temperatura de 60 °C, tempo de 15 min e relação massa-solvente de 1 g de folhas roxas desidratadas para 62,3 mL de solução de etanol/ácido cítrico, maximizaram as respostas de CFT e AA. O EOFR apresentou elevado teor de CFT, AA, estabilidade dos compostos em faixas de pH relevantes ao processo digestivo, além de apresentar efeitos antimicrobiano, antiproliferativos e citotóxicos *in vitro* contra células, inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase e mostrou efeitos anti-inflamatórios usando um modelo *in vitro* baseado em macrófagos. Os resultados obtidos sugerem que o extrato otimizado de folhas roxas de *C. sinensis* pode ser utilizado como ingrediente em aplicações tecnológicas, visando elevar a vida útil do produto, diminuir danos oxidativos, melhorar aspectos sensoriais, além de ser potencialmente funcional, porém estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade em modelos *in vivo* ainda são necessários.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ÁGUA E ETANOL COMO SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS ROXAS DE *CAMELLIA SINENSIS* var. *ASSAMICA*²

3.1 INTRODUÇÃO

Como visto no Capítulo II deste trabalho, o chá verde de folhas roxas provenientes de *C. sinensis* var. *assamica* é um potencial ingrediente funcional, com alto teor fenólico e diferentes atividades biológicas, e fatores como temperatura, tempo, razão massa solvente foram fundamentais para se obter tais resultados. Estudos evidenciam que os solventes utilizados na extração podem favorecer o aumento no teor dos compostos extraídos e algumas características podem ser avaliadas para auxiliar nesta escolha, como: capacidade de solubilizar o soluto desejado, apresentar alta especificidade com a molécula de interesse, ser quimicamente inerte e de fácil remoção (Pedro; Granato; Rosso, 2016; Alcântara *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021).

Relatos na literatura mostram diversos solventes utilizados para extração de compostos fenólicos, como: água, etanol, acetona, metanol e acetato de etila (Santos, *et al.*, 2018a; Armstrong *et al.*, 2020; Fidelis *et al.*, 2020). O uso de uma mistura de solventes ou acidificação da solução, para maximizar essa extração também são reportadas (Almeida *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2021), porém é importante ressaltar que a toxicidade do solvente deve ser avaliada (Schechtel *et al.*, 2019). Para fins alimentícios, solventes como água e etanol são recomendados pela baixa toxicidade e reconhecidos como seguros pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, pela Comissão europeia (Diretiva 2009/32/EC) e também pela Legislação Brasileira por meio da Resolução RDC Nº 466, de 10 de fevereiro de 2021, que estabelece os solventes de extração e procedimentos autorizados, para uso na produção de alimentos e ingredientes (Brasil, 2021). Sendo assim, o objetivo desse capítulo foi avaliar diferentes proporções de água (H₂O) e etanol (EtOH), de forma a maximizar o teor de compostos extraídos bem como suas atividades biológicas.

²Capítulo publicado: MOURA *et al.* Sustainable and effective approach to recover antioxidant compounds from purple tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan) leaves. **Food Research International**, v. 164, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112402>.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos isolados e binários dos solventes, água e etanol, na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante (AA).
- Investigar o perfil cromatográfico dos extratos obtidos;
- Avaliar as propriedades funcionais *in vitro* do extrato liofilizado obtido na proporção de solvente ideal para maiores teores de compostos bioativos e AA.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Preparação dos extratos

Folhas roxas da *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan foram adquiridas em Xishuangbanna, Yunnan Province, China, após o procedimento padrão de fixação, enrolamento e secagem de folhas e brotos para obtenção do chá verde (chá não fermentado). Para alcançar uma maior área superficial durante a extração, a amostra foi triturada (60 Tyler mesh) e utilizada para o preparo dos extratos.

Um delineamento inteiramente casualizado foi utilizado para avaliar o efeito isolado da água (H₂O) e do etanol (EtOH) e suas combinações binárias na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante do chá verde obtido a partir de folhas roxas de *C. sinensis*. Os extratos foram preparados em triplicata nas condições otimizadas descritas por Moura *et al.* (2022), na proporção 1 g de material vegetal e 62,3 mL do solvente extrator, 60 °C por 15 min, em uma cuba extratora sob constante agitação. Proporções dos solventes utilizados estão descritas na tabela 3.1. Os extratos foram filtrados (papel filtro qualitativo) e o resíduo lavado com o solvente de extração para padronização do volume. Os extratos foram armazenados sob refrigeração (8 °C) em frascos de polietileno e protegidos da luz até o momento das análises. Análises para determinar o teor de polifenóis, clorofila A e B, parâmetros de cor e AA *in vitro* foram conduzidos.

Tabela 3.1 - Proporções de solventes utilizadas para extração de compostos fenólicos no chá verde de folhas roxas de *C. sinensis*.

Ensaios	Etanol (%)	H ₂ O (%)
Et0	0	100
Et25	25	75
Et50	50	50
Et75	75	25
Et100	100	0

Nota: Proporção de solventes: 100% H₂O (Et0), 75% H₂O + 25% EtOH (Et25), 50% H₂O + 50% EtOH (Et50), 25% H₂O + 75% EtOH (Et75), e 100% EtOH (Et100).

3.3.2 Caracterização química dos extratos

As quantificações dos teores de compostos fenólicos totais (CFT, mg de ácido gálico equivalente por 100 g de folhas roxas, mg AGE/100 g), flavonoides totais (mg de quercetina equivalente por 100 g de folhas roxas, mg QE/100 g), antocianinas totais (mg de cianidina-3-O-glicosídeo equivalente por 100 g de folhas roxas, mg CGE/100 g) e *orto*-difenóis (mg de ácido clorogênico equivalente por 100 g de folhas roxas, mg ACE/100 g) foram realizados em triplicata de acordo com os métodos colorimétricos descritos no capítulo 2 deste trabalho (sessões 2.3.3 e 2.3.6).

A metodologia proposta por Seraglio *et al.* (2016) foi utilizada para a identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos provenientes das folhas roxas de *C. sinensis*. Utilizou-se um cromatógrafo líquido modelo 1290 Infinity (Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Alemanha) acoplado ao espectrômetro de massa modelo 5500 QTRAP (Sciex, Framingham, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). O software *Analyst* 1.6.2 (AB Sciex, Foster City, CA) e *MultiQuant* (AB Sciex, Foster City, CA) foi usado para operação do equipamento e processamento de dados, respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada no modo de fase reversa com uma coluna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (3,5 µm, 3,0 x 100 mm) fabricada pela *Agilent Technologies Inc.*, (Santa Clara, EUA). A temperatura da coluna foi mantida à 40 °C, o volume de injeção de amostra foi de 5 µL e a taxa de fluxo da fase móvel foi de 300 µL/min. A fase móvel A era composta por uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) e a fase móvel B era composta por acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição seguiu as seguintes condições: 98% A (0-3 min), 80% A (3-10 min), 10% A (10-11 min), 98% A (11-13 min), com 4 min para o equilíbrio do sistema.

Cada extrato foi injetado em triplicata, e a quantificação de cada composto foi realizado por calibração de padrão externo (37 compostos) na faixa linear de 25-1000 µg/L, exceto para EGCG, cuja faixa linear foi de 500-1000 µg/L, todos com linearidade (R^2) acima de 0,99. Os limites de quantificação variaram de 0,20 a 12,8 µg/L, e a descrição da validação do método está disponível do estudo realizado por Seraglio *et al.* (2016). Os modos de ionização positivo e negativo foram ajustados para 5500 V e -4500 V, respectivamente. Outros parâmetros do instrumento foram ajustados como: 25 psi (gás de cortina) e 55 psi (gás nebulizador e gás auxiliar) a 400 °C em uma atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros de espectrometria de massa para a análise de cada composto fenólico são mostrados na Tabela 3.2. Os resultados foram expressos em mg de cada composto fenólico por 100 g de folhas roxas (mg/100 g).

Tabela 3.2 - Espectrometria de massas para transições de monitoramento múltiplo de reação para os íons no modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$.

Compostos	[M-H]	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor (Da)	Transição de quantificação (Da)	Transição de confirmação (Da)	PD (V)	PE (V)	CE (V)	PSC (V)
Ácido benzoico $C_7H_6O_2$	+	7.14	122.93	79.00 -	- 51.00	36 36	10 10	17 51	12 24
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico C_7H_7NO	+	4.68	137.95	94.00 -	- 77.00	56 56	10 10	19 29	8 10
Cumarina $C_9H_6O_2$	+	7.68	146.94	90.90 -	- 103.00	126 126	10 10	31 23	10 8
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico $C_7H_6O_4$	+	4.77	155.00	137.00 -	- 136.50	41 41	10 10	19 29	8 52
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico $C_7H_6O_4$	+	4.76	155.00	137.00 -	- 109.00	41 41	10 10	19 29	8 20
Siringaldeído $C_9H_{10}O_4$	+	6.52	183.01	123.10 -	- 77.00	41 41	10 10	17 31	8 10
Ácido ferúlico $C_{10}H_{10}O_4$	+	6.64	194.99	176.90 -	- 89.00	21 21	10 10	11 41	10 10
Ácido siríngico $C_9H_{10}O_5$	+	5.84	199.02	140.00 -	- 155.10	16 16	10 10	21 13	10 10
Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$	+	9.28	257.02	153.00 -	- 76.90	96 96	10 10	33 73	10 10
Galangina $C_{15}H_{10}O_5$	+	9.35	270.97	153.00 -	- 115.10	176 176	10 10	43 59	10 8
Apigenina $C_{15}H_{10}O_5$	+	9.34	270.98	153.00 -	- 90.90	181 181	10 10	41 49	10 14
Luteolina $C_{15}H_{10}O_6$	+	8.11	286.93	153.00 -	- 68.90	111 111	10 10	43 89	10 10
Kaempferol $C_{15}H_{10}O_6$	+	8.12	286.93	153.00 -	- 68.90	111 111	10 10	43 89	10 10
(-)-Epicatequina $C_{15}H_{14}O_6$	+	5.70	291.00	138.90 -	- 123.00	36 36	10 10	21 21	8 8
(+)-Catequina $C_{15}H_{14}O_6$	+	5.34	291.02	139.00 -	- 123.00	16 16	10 10	21 19	10 8

Continua

Continuação Tabela 3.2

Ácido clorogênico C ₁₆ H ₁₈	+	5.24	355.14	163.00	-	46	10	21	10
				-	89.00	46	10	75	14
Hesperidina C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	+	6.41	611.19	303.00	-	51	10	31	16
				-	153.10	51	10	67	10
Ácido salicílico C ₇ H ₆ O ₃	-	7.47	136.94	93.10	-	-15	-10	-22	-5
				-	64.90	-15	-10	-36	-11
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico C ₇ H ₆ O ₄	-	4.76	152.90	109.00	-	-75	-10	-20	-7
				-	90.90	-75	-10	-32	-13
Ácido <i>p</i> -cumárico C ₉ H ₈ O ₃	-	6.44	162.92	119.00	-	-90	-10	-20	-7
				-	93.00	-90	-10	-40	-5
Ácido vanílico C ₈ H ₈ O ₄	-	7.74	166.89	137.00	-	-140	-10	-12	-9
				-	109.10	-140	-10	-16	-7
Ácido gálico C ₇ H ₆ O ₅	-	3.86	168.89	124.90	-	-110	-10	-20	-7
				-	79.00	-110	-10	-30	-11
4-metilumbeliferona C ₁₀ H ₈ O ₃	-	7.13	174.89	133.00	-	-135	-10	-28	-9
				-	119.10	-135	-10	-36	-7
Coniferaldeído C ₁₀ H ₁₀ O ₃	-	7.10	176.98	162.00	-	-30	-10	-20	-11
				-	134.00	-30	-10	-28	-9
Ácido cafeico C ₉ H ₈ O ₄	-	5.80	178.92	135.00	-	-115	-10	-22	-9
				-	107.00	-115	-10	-30	-7
Sinapaldeído C ₁₁ H ₁₂ O ₄	-	7.02	206.94	177.00	-	-20	-10	-26	-11
				-	148.90	-20	-10	-34	-9
Ácido 3,5-dinitrobenzoico C ₇ H ₄ O ₆ N ₂	-	7.74	210.90	167.00	-	-50	-10	-14	-9
				-	136.90	-50	-10	-22	-7
Ácido sinápico C ₁₁ H ₁₂ O ₅	-	6.59	222.95	163.90	-	-120	-10	-20	-9
				-	192.90	-120	-10	-28	-11
Crisina C ₁₅ H ₁₀ O ₄	-	9.22	252.98	142.90	-	-170	-10	-36	-9
				-	209.10	-170	-10	-30	-11
Naringenina C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	-	8.03	270.96	151.00	-	-130	-10	-24	-25
				-	119.00	-130	-10	-34	-11
Pinobanksin C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-	8.03	270.97	150.90	-	-140	-10	-24	-9
				-	119.10	-140	-10	-32	-7
Quercetina C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	7.55	301.00	150.90	-	-50	-10	-28	-9
				-	121.00	-50	-10	-34	-7

Continua

Continuação Tabela 3.2

Isoramnetina	-	8.17	314.95	300.00	-	-225	-10	-28	-15
C ₁₆ H ₁₂ O ₇				-	150.90	-225	-10	-38	-9
(-)-Epigallocatequina galato	-	5.76	456.97	169.00	-	-165	-10	-20	-11
C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁				-	125.00	-165	-10	-52	-9
Isoquercitrina	-	6.19	462.98	300.00	-	-215	-10	-36	-15
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂				-	271.00	-215	-10	-56	-13
Naringina	-	6.36	579.02	271.00	-	-255	-10	-42	-13
C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄				-	151.00	-255	-10	-48	-9
Rutina	-	6.00	609.00	299.90	-	-230	-10	-48	-15
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆				-	270.90	-230	-10	-70	-13

PD: potencial de desagrupamento (V); PE: potencial de entrada (V); EC: energia de colisão (V); PSC: potencial de saída da célula de colisão (V).

3.3.3 Determinação da Cor Instrumental, Clorofila A e B e Teor de Carotenoides Totais

Parâmetros de cor foram determinados através do método proposto por Schechtel *et al.* (2019). Os extratos foram diluídos na proporção 1:3 (v/v) com água ultrapura e a absorção máxima foi registrada em diferentes comprimentos de onda (420, 520 e 620 nm), com uma cubeta de 1 cm. A intensidade de cor (I) e a proporção de amarelos (PA), vermelhos (PV) e azuis (PZ) foram estimados de acordo com as equações 3.1 a 3.4.

$$I = Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620} \quad (3.1)$$

$$\%PA = \frac{Abs_{420}}{I} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\%PV = \frac{Abs_{520}}{I} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\%PZ = \frac{Abs_{620}}{I} \times 100 \quad (3.4)$$

Teores de clorofila A (Chl.A), clorofila B (Chl.B) e carotenoides totais (CT) foram quantificados de acordo com Bursać Kovačević *et al.* (2018), com algumas modificações. Os extratos foram diluídos em etanol P.A. na proporção 1:2 (v/v) e a absorbância foi registrada nos comprimentos de onda 440, 644 e 662 nm. Os teores foram estimados utilizando as equações 3.5 a 3.7 e os resultados foram expressos em mg por 100 g de folhas roxas.

$$Chl.A = (9.784 \times Abs_{662}) - (0.99 \times Abs_{644}) \quad (3.5)$$

$$Chl.B = (21.426 \times Abs_{644}) - (4.65 \times Abs_{662}) \quad (3.6)$$

$$TC = (4.695 \times Abs_{440}) - 0.369(Chl.A + Chl.B) \quad (3.7)$$

3.3.4 Atividade antioxidante

A capacidade redutora total (CRT) dos extratos foi avaliada baseado no método de Folin-Ciocalteu modificado e os resultados expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de folhas roxas (mg QE/100 g). A atividade sequestrante do radical livre DPPH e atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP) também foram avaliados e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de folhas roxas (mg AAE/100 g). Para capacidade quelante frente aos íons Fe^{2+} , os resultados foram expressos em mg de EDTA equivalente por 100 g de folhas roxas

(mg EDTAE/100 g). As análises foram realizadas em triplicata e de acordo com os métodos apresentados no capítulo 2 deste trabalho (seções 2.3.4 e 2.3.6).

3.3.5 Obtenção do extrato ideal e modelagem da extração

A homocedasticidade das variáveis de respostas foram avaliadas pelo teste de Brown-Forsythe ($p > 0,05$) e a diferença entre as médias por meio de análise de variância unidirecional (ANOVA). O teste de Fisher de diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$) foi realizado para identificação do extrato com maior potencial funcional, obtido pelos teores resultantes da composição química e AA *in vitro* e este escolhido como extrato ideal, para sequência das análises.

Para avaliar os efeitos isolados e binários da água e etanol na extração de compostos bioativos, clorofilas A e B, AA *in vitro* e cor instrumental, a análise de regressão linear múltipla foi conduzida. Os coeficientes de regressão foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ e os coeficientes de determinação (R^2) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}) foram utilizados para avaliar os modelos obtidos. O software TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Software Ltd, Palo Alto, CA, USA) foi utilizado para a análise.

3.3.6 Extrato ideal liofilizado (EIL)

A liofilização ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1200 μmHg ; modelo Terroni LD 1500A) do extrato ideal de folhas roxas de *C. sinensis* (Et75; 75% EtOH + 25% H₂O) foi realizada para posterior avaliação da composição química, atividade antioxidante e biológica *in vitro*.

3.3.6.1 Caracterização química e atividade antioxidante

Os teores de CFT (mg AGE/100 g de EIL), flavonoides totais (mg QE/100 g de EIL), taninos condensados (mg CE/100 g de EIL), flavonóis totais (mg QE/100 g de EIL) e *orto*-difenóis (mg ACE/100 g de EIL) foram realizadas seguindo as metodologias propostas por Moura *et al.* (2022) e descritas no capítulo II (seções 2.3.3 e 2.3.6) deste trabalho.

A amostra para a quantificação de catequinas, ácido gálico e cafeína foi preparada com 0,2 g do EIL dissolvidos em 2 mL de solução aquosa de metanol (70%

v/v), filtrada em filtro Millipore de 0,22 μm (Shanghai) e injetado no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Xu *et al.*, 2018). O volume de injeção foi de 10 μL , temperatura da coluna (Diamonsil™ C18 column; 250×4.6 mm I.D., 5 μm) de 30 °C e fluxo de injeção de 1mL/min. A fase móvel foi composta por água acidificada com 2% de ácido acético (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente de eluição inicialmente foi de 6,5% da fase móvel B, aumentada linearmente para 15% em 16 min e para 25% em 25 min, em seguida reduzida para 6,5% em 30 min e mantida até 35 min de injeção. O detector ultravioleta Shimadzu SPD (Shimadzu Corporation) foi usado para a detecção de EC, EGC, ECG, EGCG, C, GC, CG, GCG, ácido gálico e cafeína, a 280 nm. Os resultados foram expressos em mg/g de EIL.

Para avaliação da AA do EIL as seguintes análises foram realizadas: FRAP (mg AAE/g de EIL), atividade sequestrante de radical livre DPPH (mg AAE/g de EIL) e atividade quelante frente aos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} (mg EDTAE/g de EIL), seguindo os procedimentos adotados por Santos; Alvarenga Brizola; Granato (2017) e descritas nas seções 2.3.4 e 2.3.6 (Capítulo 2). A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} de fosfolipídios e triacilgliceróis contidos na gema de ovo de galinha, em um sistema tamponado pH 7.4 (seção 2.3.4.3, Capítulo 2) foi avaliado em diferentes concentrações de EIL (250, 500 e 750 mg/L) e a concentração necessária de EIL para inibição de 50% da peroxidação lipídica (IC_{50}) foi calculada.

3.3.6.2 Atividade Anti-Hemolítica

Para avaliação da proteção dos eritrócitos submetidos ao estresse osmótico, o EIL foi adicionado aos eritrócitos oriundos de amostras de tipagem sanguínea O^+ , com procedimentos aprovados no comitê de ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE 94830318.1.0000.0105 – ANEXO I). Para obtenção dos eritrócitos, foram realizadas lavagens sucessivas em PBS (*Phosphate Saline Buffer*; 5 mmol/L, pH 7,4, NaCl 154 mmol/L), centrifugados a 700 xg durante 10 min e o sobrenadante descartado. Tal procedimento foi repetido por 3 vezes, para obtenção do sobrenadante incolor. Por fim, os eritrócitos foram ressuspensos (12,5 % v/v) em PBS e utilizados para a análise, conforme metodologia proposta por Zhang *et al.* (2019b), utilizando hematócrito final de 0,8% (v/v). Inicialmente adicionou-se 60 μL da suspensão de eritrócitos (12,5%) e 840 μL de extrato (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) diluído em PBS ($[\text{NaCl}] = 0,1\text{-}0,9\%$

m/v; pH 7,4) em microtubos e incubados por 10 min. A hemólise total (HT) foi obtida com a adição de 840 µL de água ultrapura e 60 µL de eritrócitos, já a curva controle foi realizada com substituição do extrato por PBS em todas as concentrações de NaCl (0,1 a 0,9%). Os microtubos após o período de incubação, foram centrifugados (900 xg) por 10 min, e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços e a absorbância registrada em 540 nm. Para avaliação do efeito dose-dependência a mesma metodologia foi utilizada com concentração do EIL de 25, 50 e 75 µL com 0,3% de NaCl. A taxa de hemólise (%_{hemólise}) foi calculada pela equação 3.8, onde A_{exp} é a absorbância obtida com a adição do extrato e A_{HT} a absorção referente a HT.

$$\%_{hemólise} = \left(\frac{A_{exp}}{A_{HT}} \right) \times 100 \quad (3.8)$$

3.3.6.3 Viabilidade celular

A citotoxicidade *in vitro* do EIL foi avaliada em relação às linhagens celulares A549 (células epiteliais de adenocarcinoma do pulmão), HepG2 (células de carcinoma de hepatoma humano), HCT8 (carcinoma de cólon humano) e EA.hy926 (híbrido de células endoteliais) através do teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]; kit para crescimento celular). As células a uma densidade de 1×10^4 célula/poço foram adicionadas nas microplacas de 96 poços e após 24 horas, as células foram tratadas com o EIL nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg QE/mL durante 48 horas. Em seguida, a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e após 4 horas à 37 °C, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. A absorbância (570 nm) foi medida usando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek) e a análise de dose-resposta foi determinada por regressão não linear (ajuste de curva). Os parâmetros avaliados foram: IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50%), GI₅₀ (concentração do agente que inibe o crescimento em 50% em comparação com células não tratadas) e LC₅₀ (concentração que resulta na morte de 50% das células em relação ao número de células no início do tratamento).

3.3.6.4 Atividade antioxidante celular via geração de ERO

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é usada para monitorar a oxidação em sistemas biológicos. As quantidades intracelulares de ERO foram medidas por um ensaio fluorométrico com diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que detecta e quantifica a produção intracelular de radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (Othmène *et al.*, 2021). Todas as linhagens celulares foram semeadas a 6×10^4 /poço e foram tratadas por 1 h a 37 °C com EIL diluído em solução de DCFH-DA (25 mmol/L) nas concentrações de 10, 50 e 100 µg QE/mL. As células foram tratadas com 15 µmol/L H₂O₂ para o controle positivo e para o controle negativo apenas com meio de cultura. Após a incubação, a produção intracelular de ERO foi medida pela intensidade da fluorescência em um fluorímetro (Synergy™ H1, Biotek) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 538 nm (Granato *et al.*, 2022). A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de ROS formada intracelularmente e os resultados expressos em porcentagem da intensidade de fluorescência.

3.3.7 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão. Quando necessária a comparação entre resultados, o teste Brown-Forsythe foi empregado para avaliação da homocedasticidade e análise de variância unidirecional (ANOVA) utilizada para investigar a diferença entre as médias, seguido do teste de Fisher de diferença mínima significativa ($p \leq 0,05$). Matrizes de correlação de Pearson foram utilizadas para correlacionar estatisticamente a composição química e AA *in vitro*. Os testes foram realizados com o auxílio do software TIBCO Statistica v. 13.3.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Efeitos da Água e Etanol na Extração de Compostos Bioativos, Cor Instrumental e Atividade Antioxidante

Os modelos obtidos pela análise de regressão linear múltipla foram satisfatórios, com R^2 e R^2_{adj} maiores que 0,720 (Tabela 3.3) para todos os parâmetros avaliados (caracterização química, AA e cor instrumental). Os resultados referentes aos coeficientes de regressão obtidos, é possível observar que a água foi o solvente com maior influência para CFT, *orto*-difenois, CRT, DPPH e FRAP, já para o etanol as análises com maior influência do solvente foi o teor de antocianinas totais, Chl.A, TC e pigmentos amarelos. O efeito sinérgico entre os solventes foi significativo em todas as análises, exceto para a intensidade de cor. Este efeito sinérgico obteve maior relevância para as análises antioxidantes FRAP, DPPH e CRT, porém quantitativamente menores que o efeito dos solventes puros (água e etanol). O efeito ternário para todas as análises foi pequeno, porém não foi significativo apenas para a capacidade quelante de Fe^{2+} . Tais resultados permitem observar a importância em estudar diferentes condições de polaridade do solvente extrator, além de utilizá-los para prever o conteúdo fenólico, AA, parâmetros de cor, carotenoides totais e clorofila A e B de extratos hidroalcóolicos de folhas roxas de *C. sinensis* cv. Zijuan.

Tabela 3.3 - Modelagem da extração de compostos bioativos, atividade antioxidante, clorofilas e cor instrumental de extratos de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* obtidos com diferentes proporções de etanol e água.

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)						
(A) EtOH	30,419	2,450	12,415	<0,001	25,027	35,812
(B) H ₂ O	50,331	2,450	20,542	<0,001	44,938	55,724
AB	1,246	0,106	11,809	<0,001	1,014	1,479
AB(A-B)	0,005	0,002	2,462	<0,001	0,001	0,010
R ²	0,939					
R ² ajustado	0,923					
Flavonoides totais (mg QE/100 g)						
(A) EtOH	1,850	0,233	7,933	<0,001	1,336	2,363
(B) H ₂ O	2,501	0,233	10,725	<0,001	1,987	3,014
AB	0,064	0,010	6,346	<0,001	0,042	0,086
AB(A-B)	0,001	<0,001	7,157	<0,001	0,001	0,002
R ²	0,895					

R ² ajustado	0,866					
Antocianinas totais (mg CGE/100 g)						
(A) EtOH	0,675	0,112	6,012	<0,001	0,428	0,922
(B) H ₂ O	0,507	0,112	4,519	<0,001	0,260	0,754
AB	0,024	0,005	5,037	<0,001	0,014	0,035
AB(A-B)	<0,001	<0,001	6,054	<0,001	<0,001	0,001
R ²	0,879					
R ² ajustado	0,846					
orto-difenóis (mg ACE/100 g)						
(A) EtOH	6,949	2,395	2,902	<0,001	1,679	12,220
(B) H ₂ O	23,785	2,395	9,932	<0,001	18,514	29,056
AB	1,401	0,103	13,582	<0,001	1,174	1,628
AB(A-B)	0,011	0,002	5,381	<0,001	0,006	0,015
R ²	0,953					
R ² ajustado	0,940					
Flavonóis totais (mg QE/100 g)						
(A) EtOH	2,457	0,363	6,769	<0,001	1,658	3,256
(B) H ₂ O	2,367	0,363	6,522	<0,001	1,568	3,166
AB	0,075	0,016	4,828	<0,001	0,041	0,110
AB(A-B)	0,001	<0,001	4,057	<0,001	0,001	0,002
R ²	0,803					
R ² ajustado	0,748					
Capacidade Redutora Total (mg QE/100 g)						
(A) EtOH	22,997	10,291	2,235	0,047	0,347	45,647
(B) H ₂ O	126,943	10,291	12,335	<0,001	104,293	149,594
AB	5,875	0,443	13,254	<0,001	4,899	6,850
AB(A-B)	0,034	0,009	3,915	0,002	0,015	0,053
R ²	0,954					
R ² ajustado	0,941					
DPPH (mg AAE/100 g)						
(A) EtOH	127,611	9,062	14,082	<0,001	107,666	147,555
(B) H ₂ O	272,843	9,062	30,110	<0,001	252,899	292,788
AB	7,356	0,390	18,846	<0,001	6,497	8,215
AB(A-B)	0,069	0,008	8,947	<0,001	0,052	0,086
R ²	0,979					
R ² ajustado	0,973					
FRAP (mg AAE/100 g)						
(A) EtOH	57,631	3,449	16,710	<0,001	50,040	65,222
(B) H ₂ O	125,270	3,449	36,321	<0,001	117,679	132,861
AB	5,256	0,149	35,380	<0,001	4,929	5,583
AB(A-B)	0,071	0,003	24,107	<0,001	0,064	0,077
R ²	0,994					
R ² ajustado	0,993					
Capacidade Quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/100 g)						
(A) EtOH	7,040	0,355	19,832	<0,001	6,258	7,821

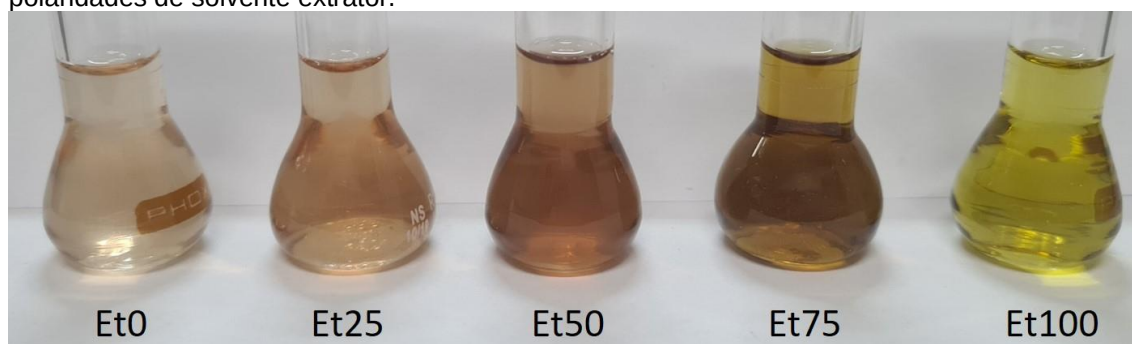
(B) H ₂ O	8,797	0,355	24,783	<0,001	8,016	9,579
AB	0,156	0,015	10,221	<0,001	0,123	0,190
R ²	0,917					
R ² ajustado	0,894					
Clorofila A (mg/100 g)						
(A) EtOH	0,702	0,081	8,630	<0,001	0,523	0,881
(B) H ₂ O	0,283	0,081	3,478	0,005	0,104	0,462
AB(A-B)	<0,001	<0,001	5,029	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,861					
R ² ajustado	0,823					
Clorofila B (mg/100 g)						
(A) EtOH	0,120	0,016	7,630	<0,001	0,085	0,155
(B) H ₂ O	0,451	0,016	28,698	<0,001	0,417	0,486
AB	-0,002	0,001	-3,082	0,010	-0,004	-0,001
AB(A-B)	<0,001	<0,001	10,045	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,956					
R ² ajustado	0,945					
Carotenoides totais (mg/100 g)						
(A) EtOH	0,250	0,043	5,796	<0,001	0,155	0,344
(B) H ₂ O	0,115	0,043	2,673	0,022	0,020	0,210
AB	0,007	0,002	3,517	0,005	0,002	0,011
AB(A-B)	<0,001	<0,001	3,356	0,006	<0,001	<0,001
R ²	0,787					
R ² ajustado	0,729					
Intensidade de cor						
(A) EtOH	0,025	0,004	6,495	<0,001	0,016	0,033
(B) H ₂ O	0,018	0,004	4,859	0,001	0,010	0,027
AB(A-B)	<0,001	<0,001	4,905	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,786					
R ² ajustado	0,728					
Pigmentos vermelhos (%)						
(A) EtOH	0,099	0,006	15,546	<0,001	0,085	0,113
(B) H ₂ O	0,252	0,006	39,424	<0,001	0,237	0,266
AB	0,003	<0,001	11,216	<0,001	0,002	0,004
AB(A-B)	<0,001	<0,001	6,545	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,973					
R ² ajustado	0,966					
Pigmentos amarelos (%)						
(A) EtOH	0,833	0,011	75,154	<0,001	0,809	0,858
(B) H ₂ O	0,599	0,011	54,019	<0,001	0,575	0,623
AB	-0,004	<0,001	-8,480	<0,001	-0,005	-0,003
AB(A-B)	<0,001	<0,001	-6,390	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,964					
R ² ajustado	0,954					
Pigmentos azuis (%)						
(A) EtOH	0,067	0,005	13,985	<0,001	0,057	0,078

(B) H ₂ O	0,153	0,005	31,878	<0,001	0,143	0,164
AB	0,001	<0,001	4,398	<0,001	<0,001	0,001
AB(A-B)	<0,001	<0,001	6,358	<0,001	<0,001	<0,001
R ²	0,941					
R ² ajustado	0,926					

3.4.2 Composição Química, Atividade Antioxidante e Cor Instrumental de Extratos de Chá Roxo

Os extratos provenientes das extrações com diferentes proporções de etanol e água podem ser observados na Figura 3.1. Os resultados referentes a composição fenólica, cor instrumental e AA *in vitro* quando extraídos em condições distintas de polaridade do solvente extrator, estão apresentados na Tabela 3.4. A diferença significativa foi observada através da análise de variância unidirecional (ANOVA), exceto para o ácido cafeico quantificado via LC-MS/MS ($p=0,09$).

Figura 3.1 - Extratos de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*, obtidos com diferentes polaridades de solvente extrator.



Nota: 100% H₂O (Et0), 75% H₂O + 25% EtOH (Et25), 50% H₂O + 50% EtOH (Et50), 25% H₂O + 75% EtOH (Et75), e 100% EtOH (Et100).

O teor médio de CFT variou de 2948 a 6769 mg AGE/100 g de folhas roxas (Tabela 3.4), não diferindo significativamente os extratos obtidos nas concentrações de 25% a 75% de EtOH. O extrato Et100 apresentou o menor teor médio de CFT. Estudos relatam o aumento do rendimento na extração de compostos fenólicos quando o solvente é uma mistura, como água e etanol, devido a alteração da polaridade do meio (Schechtel *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021). Corroborando com a análise espectrofotométrica, tais extratos (Et25, Et50 e Et75) apresentaram também os maiores teores médios dos compostos identificados via LC-MS/MS (total identificado: 6321 a 7102 mg/100 g), enquanto o extrato Et100 (2847 mg/100 g) e Et0

(4606 mg/100 g) obtiveram os menores valores médios. O conteúdo de flavonoides totais variou de 176 a 491 mg QE/100 g de folhas roxas (Tabela 3.4). O extrato Et75 apresentou o maior teor médio no teor de flavonoides totais e também os maiores teores obtidos de flavonoides quantificados via LC-MS/MS, como a quercetina (23,7 mg/100 g), rutina (97 mg/100 g), e as catequinas EC (400 mg/100 g), C (124 mg/100 g) e EGCG (5652 mg/100 g). Os menores teores médios de tais compostos foram obtidos com o Et100, juntamente com o teor médio de flavonoides totais (176 mg QE/100 g).

Os teores médios de antocianinas totais variaram de 46 a 181 mg CGE/100 g de folhas roxas, destacando o Et75 com o maior teor médio (Tabela 3.4). Apesar da condição do meio não ser favorável para extração e estabilidade das antocianinas presentes nas folhas roxas de *C. sinensis*, o extrato Et75 foi superior aos demais, enquanto o extrato aquoso (Et0) apresentou os menores teores de antocianinas totais. As antocianinas são altamente instáveis e suscetíveis a degradação, soluções ácidas normalmente trazem maior estabilidade para a estrutura, na forma de cátion flavílico. No estudo realizado por Moura *et al.* (2022) os autores quantificaram o teor médio de 305 mg CGE/100 g de folhas roxas no extrato hidroalcólico acidificado com ácido cítrico, valor superior ao deste estudo, devido a acidificação do solvente extrator, favorecendo na estabilidade das antocianinas.

Tabela 3.4 - Composição fenólica, cor instrumental e atividade antioxidante de extratos de folhas roxas da *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* obtidos com diferentes proporções de etanol e água.

Análises	Extratos de folhas da <i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> cv. <i>Zijuan</i>					<i>p</i> -Valor ¹	<i>p</i> -Valor ²
	Et0*	Et25*	Et50*	Et75*	Et100*		
Composição química							
Fenólicos totais (mg AGE/100 g)	4939 ± 52 ^b	6769 ± 122 ^a	6588 ± 181 ^a	6734 ± 140 ^a	2948 ± 39 ^c	0,719	<0,001
Flavonoides totais (mg QE/100 g)	241 ± 4 ^d	257 ± 3 ^c	321 ± 1 ^b	491 ± 6 ^a	176 ± 2 ^e	0,771	<0,001
Antocianinas totais (mg CGE/100 g)	46 ± 2 ^d	64 ± 1 ^c	93 ± 1 ^b	181 ± 2 ^a	63 ± 1 ^c	0,613	<0,001
Orto-difenóis (mg ACE/100 g)	2328 ± 188 ^c	3761 ± 484 ^b	4735 ± 385 ^a	4971 ± 520 ^a	644 ± 11 ^d	0,453	<0,001
Clorofila A (mg/100 g)	25 ± 0,8 ^d	19 ± 0,4 ^e	30 ± 0,3 ^c	105 ± 0,4 ^a	67 ± 0,5 ^b	0,716	<0,001
Clorofila B (mg/100 g)	45 ± 1,7 ^a	18 ± 0,1 ^c	26 ± 0,1 ^b	26 ± 1,5 ^b	12 ± 0,7 ^d	0,165	<0,001
Carotenoides totais (mg/100 g)	9,7 ± 0,5 ^e	22 ± 0,1 ^d	24 ± 0,1 ^b	52 ± 0,2 ^a	23 ± 0,3 ^c	0,369	<0,001
Cor instrumental							
Cor instrumental (u.a.)	1,7 ± 0,1 ^d	1,6 ± 0,1 ^e	1,8 ± 0,1 ^c	4,9 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,1 ^b	0,950	<0,001
Pigmentos vermelhos (%)	24,9 ± 0,3 ^a	24,8 ± 0,2 ^a	23,7 ± 0,1 ^b	23,8 ± 0,2 ^b	9,7 ± 0,1 ^c	0,813	<0,001
Pigmentos amarelos (%)	60,3 ± 0,1 ^e	62,2 ± 0,1 ^d	64,1 ± 0,1 ^b	62,4 ± 0,1 ^c	83,7 ± 0,1 ^a	1,00	<0,001
Pigmentos azuis (%)	15,1 ± 0,1 ^a	13,2 ± 0,2 ^c	12,2 ± 0,1 ^d	13,8 ± 0,1 ^b	6,5 ± 0,1 ^e	0,99	<0,001
Atividade antioxidante							
CRT (mg QE/100 g)	12291 ± 243 ^c	19518 ± 507 ^b	19762 ± 372 ^b	20736 ± 372 ^a	1895 ± 140 ^d	0,913	<0,001
DPPH (mg AAE/100 g)	26939 ± 465 ^d	32369 ± 275 ^c	36341 ± 501 ^b	38019 ± 794 ^a	12416 ± 276 ^e	0,438	<0,001
FRAP (mg AAE/100 g)	12653 ± 219 ^c	13564 ± 72 ^b	23043 ± 381 ^a	23423 ± 318 ^a	5890 ± 109 ^d	0641	<0,001
Capacidade quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/100 g)	866 ± 5 ^c	1193 ± 23 ^a	1105 ± 20 ^b	1079 ± 45 ^b	691 ± 25 ^d	0,493	<0,001
Composição química via LC-MS/MS (mg/ 100 g)							
Ácido benzoico	0,6 ± 0,2 ^d	1,2 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,3 ^c	0,9 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,3 ^c	0,986	<0,001
Ácido siríngico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
(-)-Epicatequina	394 ± 13 ^a	414 ± 36 ^a	413 ± 15 ^a	400 ± 25 ^a	206 ± 5 ^b	0,451	<0,001
(+)-Catequina	110 ± 8 ^b	116 ± 6 ^{ab}	112 ± 3 ^b	124 ± 5 ^a	61 ± 1 ^c	0,648	<0,001
Ácido clorogênico	215 ± 15 ^b	236 ± 12 ^a	212 ± 4 ^b	210 ± 10 ^b	61 ± 1 ^c	0,712	<0,001
Hesperidina	138 ± 9 ^d	227 ± 5 ^c	274 ± 2 ^b	319 ± 11 ^a	82 ± 3 ^e	0,454	<0,001
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	23 ± 1 ^b	26 ± 1 ^a	23 ± 1 ^b	22 ± 2 ^b	19 ± 1 ^c	0,667	<0,001
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	18,6 ± 0,7 ^{ab}	19,2 ± 0,3 ^a	17,8 ± 0,3 ^c	18,9 ± 0,6 ^a	17,9 ± 0,2 ^{bc}	0,795	<0,001
Luteolina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
Ácido salicílico	0,8 ± 0,00 ^c	1,3 ± 0,01 ^b	1,5 ± 0,00 ^a	1,5 ± 0,01 ^a	0,3 ± 0,01 ^d	0,861	<0,001
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	19 ± 0,2 ^a	19 ± 0,1 ^a	19 ± 0,1 ^a	19 ± 0,1 ^a	18 ± 0,1 ^b	0,781	<0,001

Ácido <i>p</i> -cumárico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
Ácido gálico	84 ± 2 ^a	85 ± 2 ^a	80 ± 1 ^c	75 ± 1 ^d	51 ± 1 ^e	0,879	<0,001
Ácido cafeico	21 ± 0,2	21 ± 0,1	21 ± 0,3	21 ± 0,1	21 ± 0,3	0,655	0,09
Sinapaldeído	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
Ácido sinápico	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	--
Quercetina	23,0 ± 0,02 ^c	23,5 ± 0,09 ^b	23,6 ± 0,05 ^b	23,7 ± 0,05 ^a	23,0 ± 0,02 ^c	0,749	<0,001
Isorhamnetina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-
(-)-Epigallocatequina galato	3990 ± 10 ^d	4939 ± 65 ^c	5047 ± 45 ^b	5652 ± 46 ^a	2185 ± 71 ^e	0,594	<0,001
Isoquercitrina	95 ± 1 ^c	109 ± 2 ^b	110 ± 1 ^b	118 ± 1 ^a	55 ± 1 ^d	0,351	<0,001
Naringina	0,26 ± 0,02 ^d	0,37 ± 0,01 ^{ab}	0,37 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,01 ^c	0,405	<0,001
Rutina	74 ± 2 ^d	84 ± 1 ^c	92 ± 2 ^b	97 ± 1 ^a	46 ± 1 ^e	0,955	<0,001
Total identificado	4606	6321	6446	7102	2847	-	-

Nota: *média ± desvio padrão (n=3). Et0: 100% H₂O; Et25: 75% H₂O + 25% EtOH; Et50: 50% H₂O + 50% EtOH; Et75: 25% H₂O + 75% EtOH; Et100: 100% EtOH. AGE = ácido gálico equivalente; QE=quercetina equivalente; CGE = cianidina-3-O-glicosídeo equivalente; ACE=ácido clorogênico equivalente. AAE =ácido ascórbico equivalente. EDTAE: ácido etilenodiaminotetracético equivalente; FRAP: Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (III); ¹Valores de probabilidade obtidos com o teste de Brown-Forsythe para homogeneidade de variâncias; ²Valores de probabilidade obtidos por *one-way* ANOVA; Letras diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Fisher.

O teor de *orto*-difenóis nos extratos variaram de 644 a 4971 mg ACE/100 g de folhas roxas, sendo que o Et50 e Et75 não diferiram significativamente entre si e apresentaram os melhores teores médios (Tabela 3.4). A mistura de solventes favoreceu o rendimento da extração dessa classe de compostos, visto que Et0 e Et100 obtidos com solventes puros apresentaram os menores teores, 2328 e 644 mg ACE/100 g, respectivamente. A *C. sinensis* é uma planta rica em compostos pertencentes ao subgrupo dos flavan-3-óis, também conhecidos por catequinas (Santos *et al.*, 2020) tais compostos apresentam em sua estrutura diversos grupos hidroxilas (OH) ligada na posição *orto*, o que explica a alta concentração dessa classe quando comparada com o teor de CFT (6734 mg AGE/100 g) no Et75, sugerindo que aproximadamente 75% dos compostos presentes quantificados, são compostos pertencentes ao subgrupo flavan-3-óis. O mesmo comportamento foi observado ao avaliar os teores desta classe de compostos via LC-MS/MS, os compostos como EC (206 a 414 mg/100 g), EGCG (2185 a 5652 mg/100 g) e C (61 a 124 mg/100 g) apresentaram elevadas concentrações, além do ácido clorogênico com concentrações de 61 a 236 mg/100 g.

Relatos na literatura apontam as catequinas como os principais compostos identificados em extratos provenientes da *C. sinensis*. Gao *et al.* (2018) identificaram as catequinas GC, EGC, C, EGCG, EC, GCG, ECG e CG em extratos aquoso e hidroalcolico (30% v/v) de chá *Zijuan* (seco ao sol), porém estudos também comprovam a diversidade de compostos presentes, como Shi *et al.* (2021) que identificaram um total de 226 metabólitos (193 flavonoides e 33 taninos) no extrato metanólico de folhas roxas de *C. sinensis*, como quercetina, isoquercitrina, ácido gálico, luteolina, compostos estes também identificados no presente estudo. Tais resultados enfatizam a importância de se estudar diferentes grupos de compostos bioativos presentes nos produtos derivados da *C. sinensis*, buscando sempre uma avaliação abrangente da matriz a ser estudada.

Ao avaliar os resultados de AA (Tabela 3.4), o Et75 exibiu os melhores índices de AA, exceto para a capacidade quelante de Fe^{2+} , onde o Et25 apresentou superioridade aos demais. É possível observar a amplitude entre os teores médios para as análises de CRT (1895 a 20736 mg QE/100 g), avaliação da eliminação do radical livre DPPH (12416 a 38018 mg AAE/100 g), FRAP (5890 a 23423 mg AAE/100 g) e capacidade quelante de Fe^{2+} (691 a 1193 mg EDTAE/100 g). Tais resultados estão relacionados a presença de compostos bioativos presentes, visto que há uma

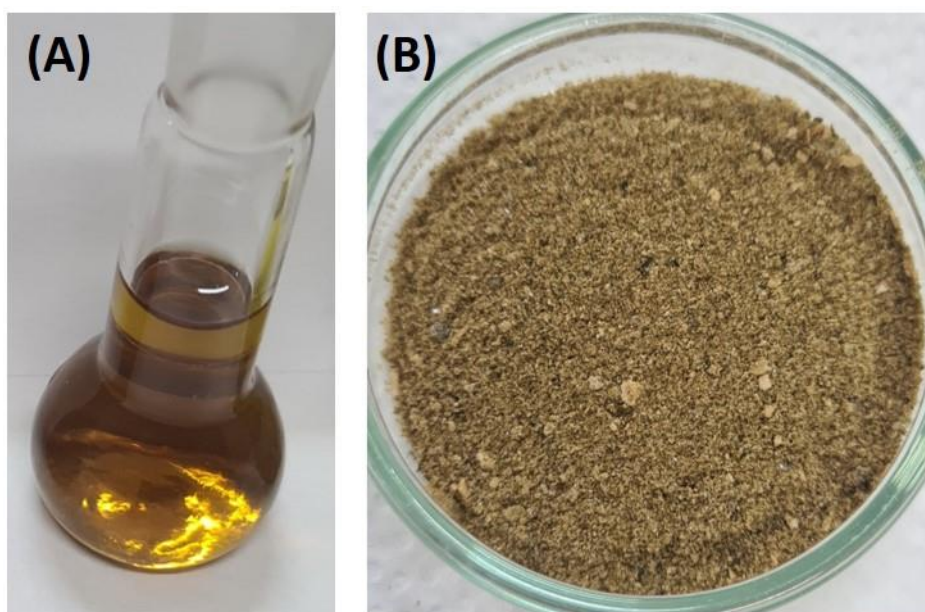
associação positiva ao avaliar a correlação entre os teores de compostos bioativos e a AA *in vitro*. A CRT mostrou-se correlacionada positivamente com CFT ($r=0,997$), *orto*-difenois ($r=0,969$) e com os teores de EC (0,930), C (0,946) e isoquercitrina (0,988). Para a captura do radical livre DPPH as maiores correlações positivas observadas foram para CFT ($r=0,971$), *orto*-difenois ($r=0,982$), C (0,946), hesperidina (0,941) e isoquercitrina (0,988). Já para o FRAP a correlação foi maior com o teor de *orto*-difenois (0,952) e a hesperidina (0,944). Por fim, a capacidade quelante de Fe^{2+} mostrou-se correlacionar com maior intensidade com a análise de CFT (0,974) e isoquercitrina (0,906). Tais resultados intensificam a necessidade em estudar a extração dos compostos bioativos com diferentes proporções de solventes, visando obter o melhor rendimento e consequentemente uma maior AA.

Os teores de clorofilas, CT e cor instrumental também são influenciados pela alteração de polaridade do solvente extrator (Tabela 3.4). A utilização da mistura de solventes na proporção 75% EtOH e 25% água ocasionaram o aumento da solubilidade dos compostos não polares, como a Chl. A (105 mg/100 g) e CT (52 mg/100 g). Em relação a Chl. B, o extrato Et0 exibiu maiores teores (45 mg/100 g), seguido do extrato Et75 e Et50 com teor médio de 26 mg/100 g para ambos os extratos. A maior intensidade de cor (Tabela 3.4) foi observado no Et75 (IC = 4.9 u.a.), que pode ser explicado pelo elevado teor de clorofilas, principalmente Chl. A, CT, além de apresentar os maiores teores de CFT, flavonoides totais, antocianinas totais, *orto*-difenois e total identificado via LC-MS/MS. Em relação a proporção de pigmentos amarelos, azuis e vermelhos nos extratos (Tabela 3.4), a proporção de pigmentos amarelos foi superior em todos os extratos (60 – 84%), seguido da proporção de pigmentos vermelhos (9,7 a 24,9%) e com as menores proporções os pigmentos azuis (6,5 a 15,1%). O Et100 obteve 83,7% de pigmentos amarelos em seu extrato, enquanto o Et0 apresentou a maior proporção de pigmentos vermelhos (24,9). Tais resultados estão relacionados com a presença de compostos bioativos, como a quercetina e carotenoides que fornecem essa elevada proporção de pigmentos amarelos, além das antocianinas responsáveis pelas cores vermelha, azul, roxa ou laranja presentes em vegetais, frutas, flores e folhas (Rashid *et al.*, 2014).

3.4.3 Caracterização do extrato ideal de chá roxo: composição química e bioatividades

As análises de caracterização química e AA *in vitro* indicaram através de testes estatísticos que o extrato Et75 (solvente composto por 75% EtOH e 25% H₂O; Figura 3.2A) apresentou os melhores resultados em relação aos demais extratos. Portanto este extrato foi liofilizado (Figura 3.2B) e as análises de composição fenólica, atividade antioxidante e biológicas *in vitro* do extrato ideal liofilizado (EIL) de folhas roxas *Zijuan* foram realizadas a fim de complementar os ensaios químicos já realizados.

Figura 3.2 - Extrato ideal de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* (A) e extrato ideal liofilizado (B).



3.4.3.1 Composição Fenólica e atividade antioxidante

Os teores médios das análises de caracterização química e AA *in vitro* do EIL estão apresentados na Tabela 3.5. Os resultados evidenciam os elevados teores de CFT, taninos condensados e *orto*-difenois, além da AA apresentada pelos métodos propostos, estabelecendo um perfil antioxidante do EIL com mecanismos distintos de ação, como a transferência de elétrons, transferência de átomos de hidrogênio e a capacidade de quelar metais de transição.

Tabela 3.5 - Composição química e atividade antioxidante do extrato ideal liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*.

Análises	Teores
Composição química (análises colorimétricas – UV-VIS)	
Compostos fenólicos totais	435 ± 3 mg AGE/g
Flavonoides totais	129 ± 4 mg QE/g
Taninos condensados	327 ± 5 mg CE/g
Orto-difenóis	113 ± 8 mg ACE/g
Atividade Antioxidante	
FRAP	672 ± 14 mg AAE/g
Captura do radical livre DPPH	792 ± 20 mg AAE/g
Capacidade quelante de Fe ²⁺	28 ± 1 mg EDTAE/ g
Capacidade quelante de Cu ²⁺	127 ± 2 mg EDTAE/g
Lipoperoxidação (IC ₅₀)	455 ± 4 mg/L
Composição química - CLAE (mg/g)	
Ácido gálico	12,3 ± 0,1
(-)-Galocatequina	3,9 ± 0,0
(-)-Epigalocatequina	39,2 ± 0,0
(+)-Catequina	2,5 ± 0,4
Cafeína	55,8 ± 0,7
(-)-Epigalocatequina galato	153,9 ± 2
(-)-Epicatequina	4,1 ± 0,0
(-)-Galocatequina galato	4,3 ± 0,1
(-)-Epicatequina galato	79,4 ± 0,3
Total identificado	355,4

Note: AGE=ácido gálico equivalente; QE=quercetina equivalente; CAE=ácido clorogênico equivalente. AAE = ácido ascórbico equivalente. EDTAE: ácido etilenodiaminotetracético equivalente; FRAP: Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (III); IC₅₀: concentração necessária para inibição de 50% da peroxidação lipídica.

A atividade quelante do EIL frente a íons Fe²⁺ e Cu²⁺ foram avaliadas para verificar a capacidade dos compostos fenólicos presentes no extrato em se ligar aos metais, apresentando teores médios de 28 e 127 mg EDTAE/g de EIL frente aos íons Fe²⁺ e Cu²⁺ (Tabela 3.5), respectivamente. Para ambos os metais o extrato apresentou elevada eficiência, competindo com os ligantes ferrozina e violeta de pirocatecol, diminuindo a concentração de íons livres em solução. Tais metais são essenciais para a saúde, porém em excesso podem gerar espécies reativas de oxigênio, já que são altamente reativos em meio aquoso e assim prejudiciais para as células se presentes como íons livres. A capacidade em quelar os metais de extratos obtidos a partir da *C. sinensis* já foram reportados na literatura, como no estudo realizado por Granato *et al.* (2014), que os autores correlacionaram a partir do coeficiente de Pearson a atividade quelante frente ao íon Fe²⁺ com o conteúdo de flavan-3-óis (r=0,747) e CFT (r=0,724) dos extratos aquosos de chás obtidos da *C. sinensis*.

Concentrações de EIL foram utilizados com intuito de avaliar a proteção de fosfolipídios, triacilgliceróis e proteínas contidas na gema de ovo e propensos a oxidação não enzimática causada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas

a partir de reações com o íon ferro. O EIL obteve porcentagens de inibição lipídica de $42 \pm 1\%$ (250 mg/L), $49 \pm 3\%$ (500 mg/L) e $65 \pm 1\%$ (750 mg/L). O aumento da concentração de EIL ocasionou a diminuição da peroxidação lipídica, sendo necessária a concentração de 455 mg/L de EIL para a inibição de 50%. A quercetina (100 mg/L) foi utilizada como controle positivo, com porcentagem de inibição de $62 \pm 1\%$ e não apresentou diferença significativa do EIL na concentração de 750 mg/L. Fica notório o potencial antioxidante do extrato em meio biológico, compostos presentes como as catequinas, pertencente ao grupo dos flavan-3-óis, tem por característica a atividade antioxidante tanto pela atividade redutora de metais como a captura de radicais livre. No estudo realizado por Santos *et al.* (2018) resultado semelhante ao atual trabalho foi relatado, com 70% de inibição lipídica para o extrato aquoso obtido com 66,6% de chá branco + 16,7% chá mate + 16,7% chá de rooibos.

O perfil de catequinas, cafeína e ácido gálico foram analisados para o EIL, utilizando o sistema de CLAE e os resultados estão apresentados na Tabela 3.5. É possível verificar maiores níveis de EGCG, ECG e EGC e cafeína no EIL, corroborando com os achados de Kerio *et al.* (2012), Gao *et al.* (2018), Zhao *et al.* (2020) e Moura *et al.* (2022). No estudo realizado por Gao *et al.* (2018) os níveis de EGCG, ECG e EGC foram os mais abundantes no extrato aquoso de chá *Zijuan*, com teores de 35 a 104 mg/g extrato liofilizado, inferior ao atual estudo (39,2 a 153,9 mg/g), enfatizando a importância do estudo da polaridade e características do solvente extrator.

3.4.3.2 Atividade Anti-Hemolítica

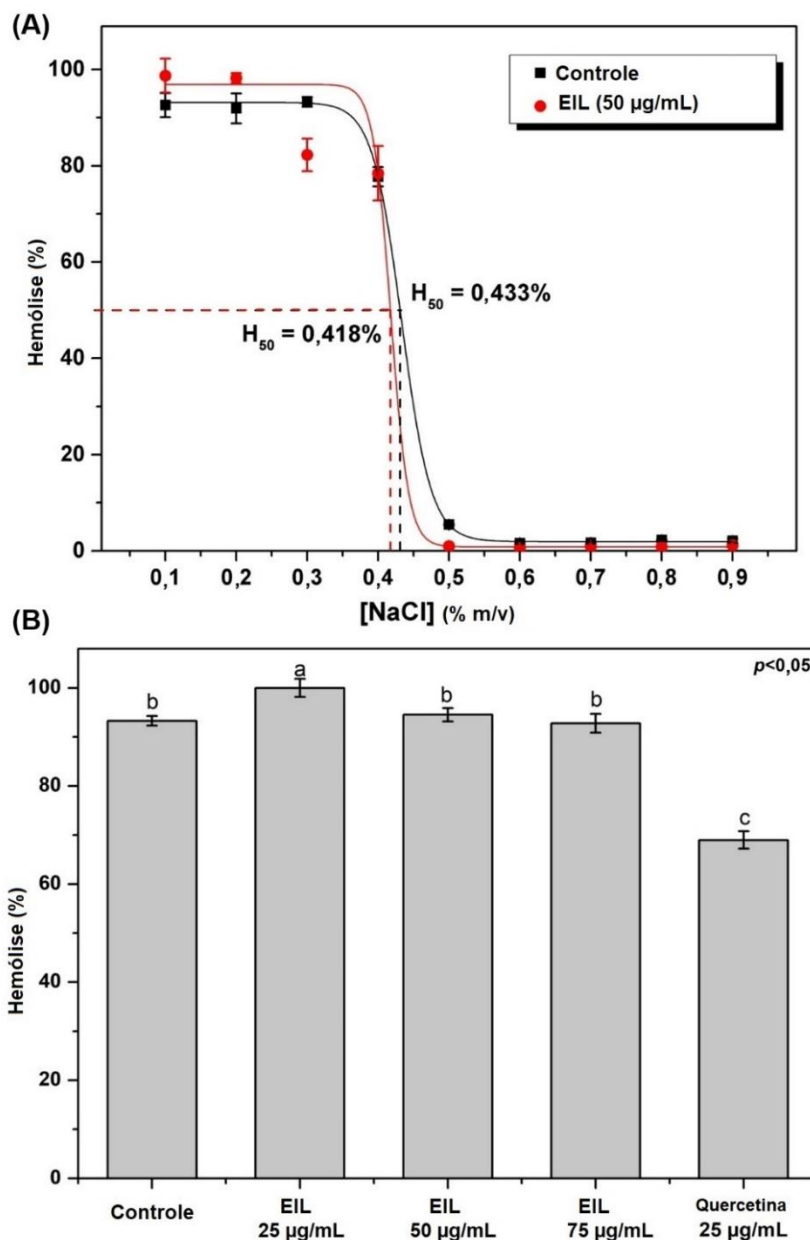
A atividade anti-hemolítica *in vitro* do EIL (50 µg/mL) foi avaliada em diferentes condições de osmolaridade ([NaCl] = 0,1 a 0,9%) e os resultados estão mostrados na Figura 3.3A. É possível verificar que o EIL apresentou porcentagem de hemólise inferior ou não diferente do controle (ausência de extrato) em todas as concentrações de NaCl, demonstrando um efeito protetor sobre os eritrócitos quando submetidos a condições hipotônicas e isotônicas, além de não demonstrar um comportamento hemolítico na concentração testada. A diminuição de NaCl em solução, provoca a absorção de água pelo eritrócito, provocando inchaço da célula e consequentemente o extravasamento do conteúdo intracelular. A presença de compostos fenólicos auxilia na redução do parâmetro de fluidez da membrana eritrocitária, por meio de ligações

de hidrogênio entre fosfolipídios da membrana (cabeças polares) e os compostos fenólicos (Zhang *et al.*, 2019b; Cruz *et al.*, 2021).

A concentração de NaCl necessária para hemólise de 50% dos eritrócitos (H_{50}) é uma forma de avaliar a capacidade do extrato na proteção à hemólise. No presente estudo, o EIL (50 $\mu\text{g/mL}$) obteve H_{50} de $0,418 \pm 0,02\%$, enquanto o controle (ausência de extrato) obteve H_{50} de $0,433 \pm 0,003\%$. Os resultados apresentaram homocedasticidade ($p=0,198$; teste de Brown-Forsythe), porém não exibiram diferença significativa ($p=0,204$; *one-way* ANOVA), o que demonstra que o EIL não interferiu significativamente na hemólise dos eritrócitos ao avaliar a concentração de NaCl na qual ocorre 50% de hemólise. No estudo realizado por Zhang *et al.* (2019b) ao avaliar extratos aquosos de diferentes chás pretos (*C. sinensis* var. *assamica*) foi obtida eficiência na proteção de eritrócitos submetidos à alteração da pressão osmótica, com H_{50} de 0,311 a 0,337% de NaCl. Até o momento estudos comparativos com folhas roxas provenientes da *C. sinensis* cv. *Zijuan*, não foram relatados na literatura, enfatizando a importância na avaliação e correlação entre ensaios químicos e biológicos. Os resultados aqui obtidos reforçam a ausência de toxicidade *in vitro* destas folhas frente a eritrócitos, apesar de não apresentar efeito protetor significativo.

O efeito dose-dependência foi avaliado em concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ de EIL e apresentado na Figura 3.3B. Os resultados não mostraram um efeito dose-dependência nas concentrações testadas, concentrações de EIL de 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ e o controle negativo (ausência de extrato) não apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), com porcentagens de hemólise de aproximadamente 93%. A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um aumento da porcentagem de hemólise (99%), enquanto a quercetina (controle positivo; 25 $\mu\text{g/mL}$) apresentou 69% de hemólise total. Assim, novos estudos do EIL (*C. sinensis* cv. *Zijuan*) com concentrações acima de 75 $\mu\text{g/mL}$ são necessários para avaliação da hemoproteção dos eritrócitos em meio hipotônico.

Figura 3.3 - Curva de hemólise hipotônica do extrato ideal liofilizado (EIL) de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* (50 µg/mL) em comparação ao controle (A). Taxa de hemólise em 0,3% de NaCl com dose-dependência do EIL e comparação com quercetina 50 µg/mL (B).



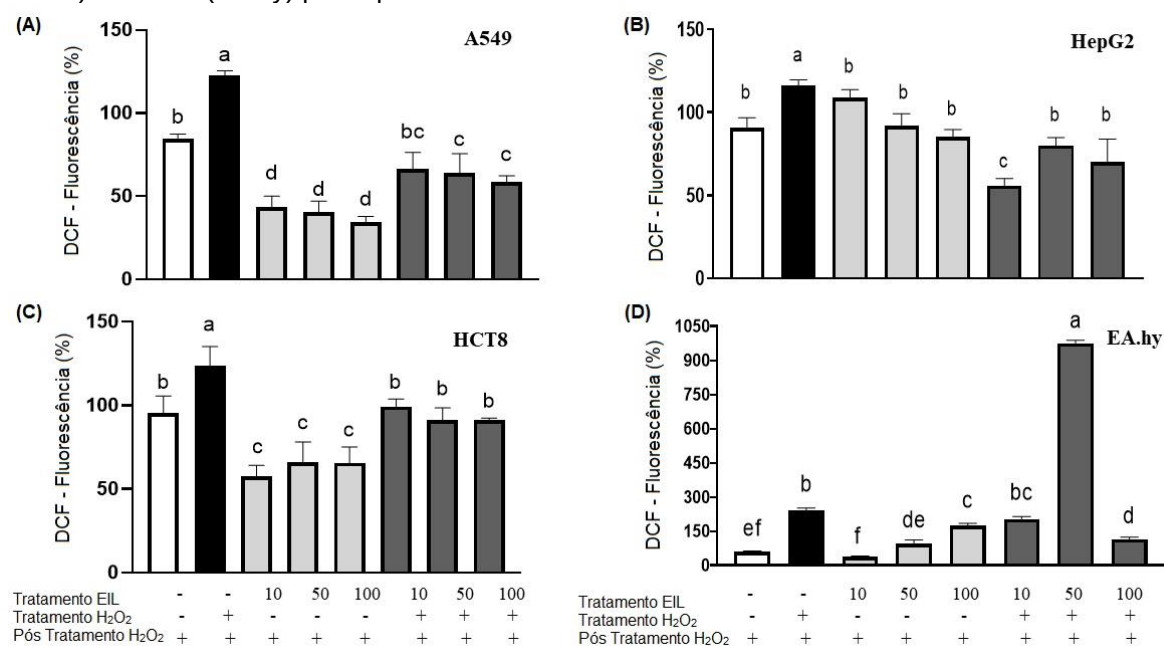
Nota: Diferentes letras representam valores com diferença significativa ($p \leq 0,05$).

3.4.3.3 Geração de EROs intracelular e viabilidade celular

Compostos fenólicos com alta capacidade antioxidante neutralizam os radicais livres produzidos pelas células cancerígenas e podem atuar na redução do crescimento e viabilidade celular (Raphaelli *et al.*, 2021). No presente estudo, o EIL não induziu a produção de ERO em linhagens de células cancerígenas (A549, HCT8, HepG2) e, além disso, exibiu efeito protetor contra a geração de ERO induzida por

H₂O₂ em todas as concentrações avaliadas (10 a 100 µg QE/mL), exibindo atividade antioxidante (Figura 3.4). A homeostase de ERO intracelular é essencial para a sinalização pró-tumorigênica e a sobrevivência das células cancerígenas (Carmo *et al.*, 2018), e aqui, o efeito antioxidante do EIL pode alterar esse equilíbrio reduzindo a viabilidade das células cancerígenas (Figura 3.5). O EIL é rico em (-)-epigallocatequina galato (153,9 mg/g), flavonoide reconhecido por sua atividade antiproliferativa (Harati *et al.*, 2017; Moradzadeh *et al.*, 2017; Tepedelen *et al.*, 2017) e atividade antioxidante/pró-oxidante (León-González *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2021; Mostafa-Hedeab *et al.*, 2022).

Figura 3.4 - Resultados da medição intracelular de ERO em células cancerígenas (A549, HepG2 e HCT8) e híbrida (EA.hy) por espectrofluorimetria.

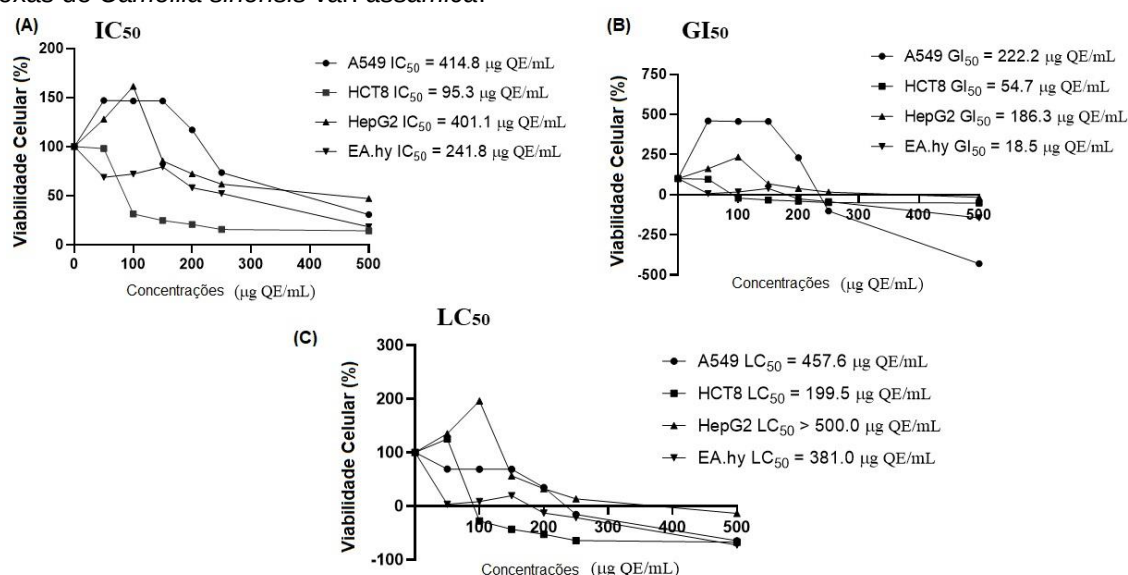


Nota: Tratamento EIL = extrato ideal liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* (10-100 µg QE/mL). Dados quantitativos são a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ($p \leq 0,05$).

O EIL reduziu a viabilidade celular (Figura 3.5) contra todas as linhas de células cancerosas testadas (A549, HCT8, HepG2), incluindo a célula híbrida endotelial EA.hy926 (IC₅₀: 95,3 a 414,8 µg QE/mL). Além disso, EIL apresentou efeitos citotóxicos (LC₅₀: 199,5 a > 500 µg QE/mL) e antiproliferativos (valores GI₅₀ de 18,5 a 222,2 µg QE/mL) tanto para células cancerígenas como para as células híbridas. Em geral, a célula cancerígena HCT8 é mais sensível ao EIL, uma vez que apresenta a menor concentração letal (LC₅₀ = 199,5 µg QE/mL) quando comparada com outras linhas celulares. Apesar dos polifenóis serem amplamente conhecidos pela sua

elevada capacidade antioxidante, são capazes de exercer efeitos antiproliferativos atuando como pró-oxidantes (Carmo *et al.*, 2018). Para a célula híbrida EA.hy926, o EIL induziu a geração de ERO de uma forma dose-dependente, o que pode explicar o seu efeito na viabilidade celular ($IC_{50} = 241,8 \mu\text{g QE/mL}$; $GI_{50} = 18,5 \mu\text{g QE/mL}$; $LC_{50} = 381,0 \mu\text{g QE/mL}$). Em contraste, na presença de H_2O_2 , o EIL mostrou atividade antioxidante na concentração mais elevada ($100 \mu\text{g QE/mL}$) para a célula EA.hy926.

Figura 3.5 - Viabilidade celular células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), células de hepatocarcinoma humano (HepG-2), células de carcinoma do cólon humano (HCT8) e híbrido de células endoteliais (EA.hy) em relação a diferentes concentrações do extrato ideal liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*.



Assim, no estudo atual, a citotoxicidade do EIL pode estar relacionada com o desequilíbrio redox intracelular, uma vez que o EIL exerce um comportamento "bifacetado", exibindo atividades antioxidantes (células cancerosas) e pró-oxidantes (EA.hy926), que podem ser atribuídas ao teor de compostos fenólicos (435 mg AGE/g).

3.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, o conteúdo de compostos bioativos foi maximizado ao utilizar 75% de etanol e 25% de água como solvente de extração, sendo seguro para a saúde e o para o ambiente, atingindo os requisitos da química verde. As análises espectrofotométricas e a identificação de compostos fenólicos através de LC-MS/MS permitiram uma ampla análise das propriedades biológicas e prova da diversidade dos compostos fenólicos em extratos de *Camellia sinensis* cv. *Zijuan*. O extrato ideal

liofilizado não mostrou comportamento hemolítico em eritrócitos submetidos a condições hipotônicas e isotônicas, mostrou efeito dose-dependência ao avaliar a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica utilizando gema de ovo de galinha, e apresentou efeitos citotóxicos *in vitro* por atividades antioxidantes e pró-oxidantes em células cancerígenas e híbridas, respectivamente. Tais resultados demonstram um elevado potencial funcional para aplicação tecnológica na indústria farmacêutica-alimentar. Contudo, são necessários estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade em modelos *in vivo*.

CAPÍTULO 4 – EXTRATO ANTOCIÂNICO DE FOLHAS ROXAS DE *CAMELLIA SINENSIS* var. *ASSAMICA*: ESTABILIDADE QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CELULAR E PROTEÇÃO DO PLASMA HUMANO³

4.1 INTRODUÇÃO

Relatos na literatura apontam que os chás provenientes da *C. sinensis* são ricos em flavan-3-óis, taninos condensados e ácidos fenólicos, porém a presença de compostos como as antocianinas trazem um diferencial ao avaliar as folhas roxas de *C. sinensis* (Kerio *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2020), agregando na maior diversidade de compostos bioativos e benéficos a saúde. Compostos como as catequinas e antocianinas em um mesmo meio reacional podem trazer um efeito sinérgico na atividade antioxidante, removendo de forma eficiente os radicais livres, através da capacidade de deslocar elétrons e formar estruturas ressonantes (Bagchi *et al.*, 2003; Rossetto *et al.*, 2002). Porém a estabilidade das antocianinas depende de alguns fatores, pois quando isoladas são suscetíveis a degradação por fatores como pH, temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, enzimas, proteínas e íons metálicos (Migliorini *et al.*, 2019; Pedro; Granato; Rosso, 2016). Não há registro da obtenção de extrato proveniente de chá roxo rico em antocianinas, avaliação de sua estabilidade química e potencial antioxidante em diferentes meios biológicos. Neste contexto, o presente estudo visa obter um extrato de folhas roxas de *C. sinensis* (Chá Zijuan) rico em antocianinas, obtido com solventes atóxicos e de padrão alimentar, avaliar sua estabilidade química e suas propriedades antioxidantes *in vitro* em termos químicos e biológicos.

³Capítulo publicado: Anthocyanin-rich extract from purple tea: Chemical stability, cellular antioxidant activity, and protection of human plasma. **Current Research in Food Science**, v. 8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100701>

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição fenólica maioritária e avaliar a atividade antioxidante por métodos espectrofotométricos;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato antociânico em diferentes pHs (ácido, básico e neutro);
- Avaliar o efeito da temperatura e luminosidade na estabilidade das antocianinas;
- Analisar as propriedades funcionais *in vitro* do extrato liofilizado.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTOCIÂNICO

Folhas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* foram adquiridas após o processo de fabricação do chá verde (fixação, enrolamento e secagem de folhas e brotos) na cidade de Xishuangbanna, Yunnan Province, China. Para obtenção do extrato bruto (EB), a amostra adquirida de *C. sinensis* foi triturada (60 *Tyler mesh*) e realizou-se uma extração sólido líquido com solução aquosa de ácido cítrico (0,2 mol/L; pH 1,8), em cuba extratora, protegida da luz e sob constante agitação, seguindo as condições otimizadas (1:62.3mL m/v, 60 °C por 15 min) propostas por Moura *et al.* (2022). O extrato foi filtrado (papel filtro qualitativo) e dividido em duas porções, a primeira porção (EB) foi armazenada sob refrigeração e protegida da luz para análises espectrofotométricas e avaliação da estabilidade química dos compostos bioativos, já a segunda porção (EBL; extrato bruto liofilizado) foi congelada a – 80 °C e submetida ao processo de liofilização sob vácuo de 1200 µmL Hg (Terroni, model LD 1500A, São Paulo, Brasil) para realização de análises biológicas e químicas.

4.3.2 Classes fenólicas por espectrofotometria UV-VIS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método colorimétrico Azul de Prússia de acordo com Margraf *et al.* (2016) e o resultado expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE/100 g). Os teores de flavonoides totais (TF) e antocianinas totais (TA) foram quantificados pela metodologia

descrita por Lees e Francis (1972) e os resultados expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra (mg QE/100 g) e mg cianidina-3-O-glicosídeo equivalente por 100 g de amostra (mg CGE/100 g), respectivamente. Os teores de flavonóis totais e *orto*-difenóis foram estimados pelos métodos propostos por Santos *et al.* (2018) e os resultados expressos em mg de quercetina equivalente por 100 g de amostra (mg CE/100 g DW) e mg de ácido clorogênico equivalente por 100 g de amostra (mg ACE/100 g), respectivamente. Tais metodologias estão descritas no Capítulo II.

4.3.3 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante (AA) foi medida por quatro diferentes testes colorimétricos e seus protocolos descritos no Capítulo II, exceto para atividade de eliminação de radicais hidroxila. A captura do radical livre DPPH (mg AAE/100 g) e capacidade quelante de Fe^{2+} (mg EDTAE/100 g) foram avaliados pelos métodos propostos por Santos *et al.* (2017). A capacidade total de redução de compostos hidrofílicos e lipofílicos (mg QE/100 g) foi avaliado pelo método utilizado por Margraf *et al.* (2016). Por fim, a atividade de eliminação de radicais hidroxila (mg AAE/100 g) foi realizada pelo método descrito por Mu *et al.* (2012). Para a análise de atividade de eliminação de radicais hidroxila o seguinte procedimento foi adotado: 1500 μL da amostra previamente diluída foi adicionada à 250 μL da solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mmol/L) e 63 μL de H_2O_2 (5 mmol/L). A mistura permaneceu em repouso por 5 min e após esse período uma alíquota de 1500 μL de 1,10-fenantrolina (1 mmol/L) foi adicionado a mistura. Após 10 min, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 536 nm. Realizou-se a curva analítica ($y=4,1407-63,46$; $R^2=0,9908$) com concentrações de 40 a 300 mg/L de ácido ascórbico.

4.3.4 Estudo da Estabilidade das antocianinas do extrato bruto

4.3.4.1 Efeito do pH na atividade antioxidante *in vitro*

O estudo da estabilidade das antocianinas em diferentes pHs foi realizado de acordo com o método proposto por Pedro, Granato e Rosso, (2016) com adaptações. O EB foi diluído com água ultrapura (1:1 v/v) para obtenção de uma absorbância próximo a 1.00 ($\lambda_{\text{máx}} = 525 \text{ nm}$) e acondicionada em uma cuba extratora (25 °C), protegida da luz e sob constante agitação. Alíquotas de NaOH (5 mol/L) foram adicionados ao EB diluído e o pH foi monitorado com pHmetro (Micronal B-474). Após atingir o pH básico, a titulação reversa foi realizada com alíquotas de ácido clorídrico (HCl; 1,0 mol/L). As absorbâncias foram registradas ($\lambda_{\text{máx}} = 525 \text{ nm}$) em diferentes pHs (ácido, básico e neutro) no decorrer da titulação e o efeito do pH na atividade antioxidante foi avaliada pelo método captura do radical livre DPPH proposto por Santos *et al.* (2017).

4.3.4.2 Efeito da Temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura (60, 80 e 100 °C) sobre o EB, o método proposto por Escher *et al.* (2020) foi utilizado com pequenas modificações. Para obtenção da absorbância próximo a 1.00 ($\lambda_{\text{máx}} = 525 \text{ nm}$), o EB foi diluído (1:1 v/v) em solução tampão com citrato de sódio e ácido cítrico 0,05 mol/L (pH 3,6) e distribuída em tubos de ensaio, lacrados e imersos em banho termostatizado (60 e 80 °C) e banho de glicerina (100°C), protegidos da luz. Os perfis espectrais nas diferentes temperaturas foram registrados em intervalos de 30 min durante um período de 8 h. A partir das absorbâncias obtidas no comprimento de onda de 525 nm, a porcentagem de retenção de cor (%R), constante de velocidade de degradação das antocianinas (k) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foram calculadas com as equações (4.1) – (4.3), respectivamente.

$$\%R = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\ln \frac{A_t}{A_0} = -k \times t \quad (4.2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4.3)$$

onde, A_t = absorbância no tempo t; A_0 = absorbância inicial; t = tempos determinados (min).

4.3.4.3 Efeito da Luz

O efeito da luz na estabilidade das antocianinas presentes no EB, foi avaliado de acordo com o método proposto por Escher *et al.* (2020). O EB diluído (1:1 v/v) em solução tampão com citrato de sódio e ácido cítrico 0,05 mol/L (pH 3,6), foi distribuído em tubos de ensaios devidamente lacrados e expostos a luz direta à conjunto de seis lâmpadas fluorescentes brancas (20 W), acondicionados em uma câmara de madeira fechada com temperatura interna de 32 ± 2 °C. Para controle, tubos foram armazenados sob abrigo da luz dentro da mesma caixa. A absorbância máxima e os perfis espectrais foram obtidos em intervalos de 12 h, durante 4 dias (96 h). A avaliação da estabilidade foi realizada através da absorbância obtida no comprimento de onda máximo ($\lambda = 525$ nm), proporção de pigmentos amarelos (PA), vermelhos (PV) e azuis (PZ), calculados conforme as equações (4.4) – (4.7), respectivamente.

$$\% PA = \left(\frac{Abs_{420\text{ nm}}}{CI} \right) \times 100 \quad (4.4)$$

$$\% PV = \left(\frac{Abs_{520\text{ nm}}}{CI} \right) \times 100 \quad (4.5)$$

$$\% PZ = \left(\frac{Abs_{620\text{ nm}}}{CI} \right) \times 100 \quad (4.6)$$

4.3.5 Extrato Bruto Liofilizado

4.3.5.1 Classes fenólicas por espectrofotometria UV-VIS

Os métodos utilizados para estimar o teor de compostos fenólicos totais (mg AGE/g de EBL), flavonoides totais (mg QE/g de EBL) e antocianinas totais (mg CGE/g de EBL) foram realizados de acordo com os métodos citados na sessão 4.3.2.

4.3.5.2 Composição fenólica por UPLC-ESI-MS

Os compostos fenólicos presentes no EBL foram identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (UPLC-ESI-MS/MS), de acordo com Shi *et al.* (2021). 50 mg do EBL foram solubilizados em 1 mL de solução aquosa de metanol (70% v/v), filtrado em filtro de membrana (0,22 µm, Ampel) e 2 µL injetado no sistema UPLC-ESI-MS/MS (UPLC, *ExionLC™*; MS, *Biosystems 6500 Triple Quadrupole*). As

seguintes condições para o UPLC foram adotadas: coluna C₁₈ (1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm, *WatersACQUITY BEH*); sistema solvente contendo água acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol acidificado (0,1% ácido fórmico) com programa de eluição por gradiente, sendo 95:5 (v/v) em 0 min, 50:50 (v/v) em 6 min, 5:95 (v/v) em 12 min, mantendo por 2 min, 95:5 (v/v) v) aos 14 minutos com 2 minutos fixos, fluxo de 0,35 mL/min e temperatura, 40°C.

As varreduras de armadilha de íons linear (LIT) e triplo quadrupolo (QQQ) foram adquiridas em um espectrômetro de massa de armadilha de íons linear triplo quadrupolo (*QTRAP® 6500+ LC-MS/MS System*), equipado com uma interface ionização por electrospray (ESI), operando em modo íon positivo e controlado pelo software *Analyst 1.6.3* (Sciex). Os parâmetros de operação da fonte ESI foram os seguintes: temperatura da fonte 550 °C; tensão de pulverização iônica (*IS*) 5500 V; gás de cortina (*CUR*) foi ajustado em 35 psi. As antocianinas foram analisadas usando monitoramento programado de reações múltiplas (MRM). As aquisições de dados foram realizadas utilizando o software *Analyst 1.6.3* (Sciex). O software *Multiquant 3.0.3* (Sciex) foi utilizado para quantificar todos os metabólitos. Os parâmetros do espectrômetro de massa, incluindo os potenciais de desagrupamento (DP) e energias de colisão (CE) para transições MRM individuais, foram feitos com otimização adicional de DP e CE. Um conjunto específico de transições de MRM foi monitorado para cada período de acordo com os metabólitos eluídos nesse período. Os resultados foram expressos em mg de cada composto fenólico por g de extrato bruto liofilizado (mg/g de EBL).

4.3.5.3 Identificação de compostos de fenólicos e cafeína

Flavan-3-óis, ácido gálico e cafeína foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu LC-2010A; Kyoto, Japão) seguindo os procedimentos adotados por Xu *et al.* (2018). EBL (200 mg) foram dissolvidos em 2 mL de solução aquosa de metanol (70% v/v) e filtrado através de uma membrana de nylon de 0,22 µm. A separação cromatográfica ocorreu com volume de injeção 10 µL, coluna *Diamonsil™ C₁₈* (250×4,6 mm, 5 µm), temperatura de 30 °C e vazão de injeção de 1 mL/min. A fase móvel A foi composta por uma solução aquosa de ácido acético 2% e fase móvel B de acetonitrila 100%. O gradiente de eluição foi inicialmente de 6,5% da fase móvel B, que foi aumentado linearmente

para 15% em 16 min e 25% em 25 min, depois reduzido para 6,5% em 30 min e mantido até 35 min da injeção. O detector ultravioleta *Shimadzu SPD* (Shimadzu Corporation) foi utilizado para a detecção de compostos a 280 nm. Os resultados foram expressos em mg por g de EBL (mg/g de EBL).

4.3.5.4 Atividade antioxidante

O EBL foi avaliado frente aos seguintes métodos antioxidantes: FRAP (mg AAE/g), captura do radical livre DPPH (mg AAE/g), capacidade quelante de Fe^{2+} (mg EDTAE/g) e porcentagem de inibição da peroxidação lipídica de fosfolípidios e triacilgliceróis contidos na gema de ovo de galinha, induzida por Fe^{2+} , em um sistema tamponado (pH 7,4) com concentração de EBL de 400 a 2000 mg/L. Os resultados foram expressos em concentração necessária de EBL para 50% de inibição da peroxidação lipídica (IC_{50}). Os procedimentos adotados para cada análise estão descritos no Capítulo II.

4.3.5.5 Efeito do EBL na viabilidade celular humana e atividade antioxidante celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT após 48 h de tratamentos com o EBL (15; 38; 76; 152; 228 e 380 $\mu\text{g AGE/mL}$) em células epiteliais de adenocarcinoma do pulmão (A549), carcinoma do cólon humano (HCT8), células de carcinoma de hepatoma humano (HepG2) e híbrido de células endoteliais (EA.hy926). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço. 24 horas depois, eles foram tratados por mais 48 horas com EBL em concentrações na faixa de 0 a 380 $\mu\text{g AGE/mL}$. Ao final das 48 horas de tratamento, 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado e incubado a 37 °C por 4 horas. Após este tempo, adicionou-se DMSO para dissolver o produto formazan produzido e mediu-se a absorbância a 570 nm. Os parâmetros IC_{50} , GI_{50} e LC_{50} foram realizados de acordo com método descrito por Carmo *et al.* (2018).

Para o ensaio de atividade antioxidante celular, o DCFH-DA (diacetato de diclorofluoresceína) foi utilizado para detectar produtos oxidativos das linhagens celulares. Células A549, HCT8, HepG2 e EA.hy926 foram semeadas ($6 \times 10^4/\text{poço}$) e tratadas por 1 h a 37 °C com EBL diluído nas concentrações 7,5; 15,0 e 38,0 $\mu\text{g AGE/mL}$ em solução de DCFH-DA (25 mmol/L). As células foram tratadas com 15

$\mu\text{mol/L}$ de H_2O_2 para o controle positivo e para o controle negativo, apenas com o meio de cultura. Após a incubação, os níveis de EROs foram medidos por detecção fluorométrica utilizando um espectrofotômetro (excitação 485 nm; emissão 538 nm). A intensidade de fluorescência foi proporcional à geração intracelular de EROs (Granato *et al.*, 2022).

4.3.5.6 Proteção plasmática contra oxidação

O plasma humano foi obtido de um voluntário saudável (homem, 39 anos, índice de massa corporal $< 25 \text{ kg/m}^2$, tipo sanguíneo O^+) após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Limerick, Irlanda (ANEXO II). O ensaio seguiu a configuração experimental e as condições estabelecidas por Corrigan *et al.* (2023). Para esta análise, o EBL foi diluído 100 vezes e o plasma diluído 40 vezes, para ambos, utilizou-se uma solução tampão fosfato salina (5 mmol/L, NaCl a 150 mmol/L, pH 7,35). Plasma (50 μL) e o EBL diluído (50 μL) foram misturados em uma placa de 96 poços. Após 15 min de incubação a 37°C , a peroxidação lipídica foi iniciada com adição de 100 μL de CuCl_2 (150 $\mu\text{mol/L}$). A produção de dienos conjugados foi monitorada a 245 nm por 120 min em intervalos de 5 min. A atividade antioxidante foi comparada a uma curva padrão de ácido ascórbico (12 – 120 mg/L; $R^2=0,9923$). A cinética durou 120 min e os experimentos foram repetidos cinco vezes.

4.3.6 Análises Estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com resultados expressos em média e desvio padrão. Os testes de Brown-Forsythe foram empregados para avaliar a homocedasticidade e a análise de variância unidirecional (ANOVA) foi utilizada para investigar a diferença entre as médias, seguida do teste de diferença menos significativa de Fisher ($p \leq 0,05$). O software *TIBCO Statistica* v. 13.3 (TIBCO Software Ltd, Palo Alto, CA, EUA) foi utilizado.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Determinação de Polifenóis e Atividade Antioxidante do Extrato Bruto

Os resultados referentes as análises espectrométricas de composição química e atividade antioxidante do EB estão apresentadas na Tabela 4.1. O EB apresentou composição química diversificada, com destaque para o teor de *orto*-difenóis (4169 ± 175 AGE/100 g), seguido dos teores de flavonoides totais (285 ± 5 mg QE/100 g), antocianinas totais (121 ± 1 mg CGE/100 g) e flavonóis totais (88 ± 4 mg QE/100 g). O teor de fenólicos totais no EB é 4439 ± 69 mg AGE/100 g, valor este inferior ao relatado nos estudos de Gao *et al.* (2018) ao avaliaram o conteúdo fenólico do extrato aquoso do chá *Zijuan* ($422,59 \pm 12,09$ mg AGE/g de extrato). Estudos com o chá roxo proveniente da *C. sinensis* ainda são escassos, e devido a diversidade das formas de expor os resultados dificultam a comparação entre os resultados. Kilel *et al.* (2013), como exemplo, obtiveram seus resultados em porcentagem de polifenóis totais, com maior valor médio de 25,9 % entre as amostras analisadas. Kerio *et al.* (2013) também avaliaram suas amostras de chá roxo em porcentagem de conteúdo fenólico total (%) e obtiveram em média 22% de polifenóis em amostras de folhas roxas de chá. Apesar das diferentes formas de apresentação dos resultados, é possível observar os extratos obtidos de folhas roxas de *C. sinensis* são uma fonte importante na extração dos compostos fenólicos.

Tabela 4.1 - Composição fenólica e atividade antioxidante do extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*

Analises	Conteúdo
Composição Química	
Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)	4439 ± 69
Flavonoides totais (mg QE/100 g)	285 ± 5
Antocianinas totais (mg CGE/100 g)	121 ± 1
<i>Orto</i> -difenóis (mg AGE/100 g)	4169 ± 175
Flavonóis totais (mg QE/100 g)	88 ± 4
Atividade antioxidante	
Captura do radical livre DPPH (mg AAE/100 g)	45402 ± 1019
Capacidade quelante de Fe^{2+} (mg EDTAE/100 g)	2973 ± 173
Atividade de eliminação de radicais hidroxila (mg AAE/100 g)	250204 ± 2635
Capacidade total de redução (mg QE/100 g)	15201 ± 334

O EB apresentou potencial antioxidante em todos os métodos testados, como observado na Tabela 4.1, a presença de diferentes compostos fenólicos conferem ao extrato propriedades antioxidantes como observado, seja pela doação de prótons, de elétrons ou da capacidade de quelar metais de transição como o ferro. No estudo realizado por Moura *et al.* (2022) o extrato etanólico acidificado foi avaliado pelos autores, e obtiveram teores de 50957 ± 835 mg AAE/100 g de chá *Zijuan* para a avaliação da captura do radical livre DPPH e 16995 ± 356 para capacidade redutora total respectivamente. Os valores foram superiores ao presente estudo, tal comportamento pode ser explicado pelo aumento da polaridade do solvente extrator, e consequentemente um maior teor de compostos bioativos extraídos (5016 ± 66 mg de AGE/100 g; compostos fenólicos totais) enquanto no presente trabalho o teor de compostos fenólicos totais foi de 4439 ± 69 mg AGE/100 g.

Em comparação a outros chás provenientes da *C. sinensis*, o EB apresentou superioridade nos índices antioxidantes, como no estudo realizado por Armstrong *et al.* (2020) que obtiveram os seguintes teores médios de AA para o extrato aquoso de chá *pu-erh*, 2493 ± 69 mg AAE/100 g e 1771 ± 77 mg AAE/100 g para as análises captura do radical livre DPPH e FRAP, respectivamente. Neste mesmo estudo, os autores relatam a atividade antioxidante do chá mate (2882 ± 1630 mg AAE/100 g), chá preto (2810 ± 94 mg AAE/100 g) e do chá verde (7613 ± 110 mg AAE/100 g) para a captura do radical livre DPPH; valores esses inferiores ao observado para o EB proveniente de folhas roxas da *C. sinensis*, demonstrando o alto potencial antioxidante do extrato frente ao método testado.

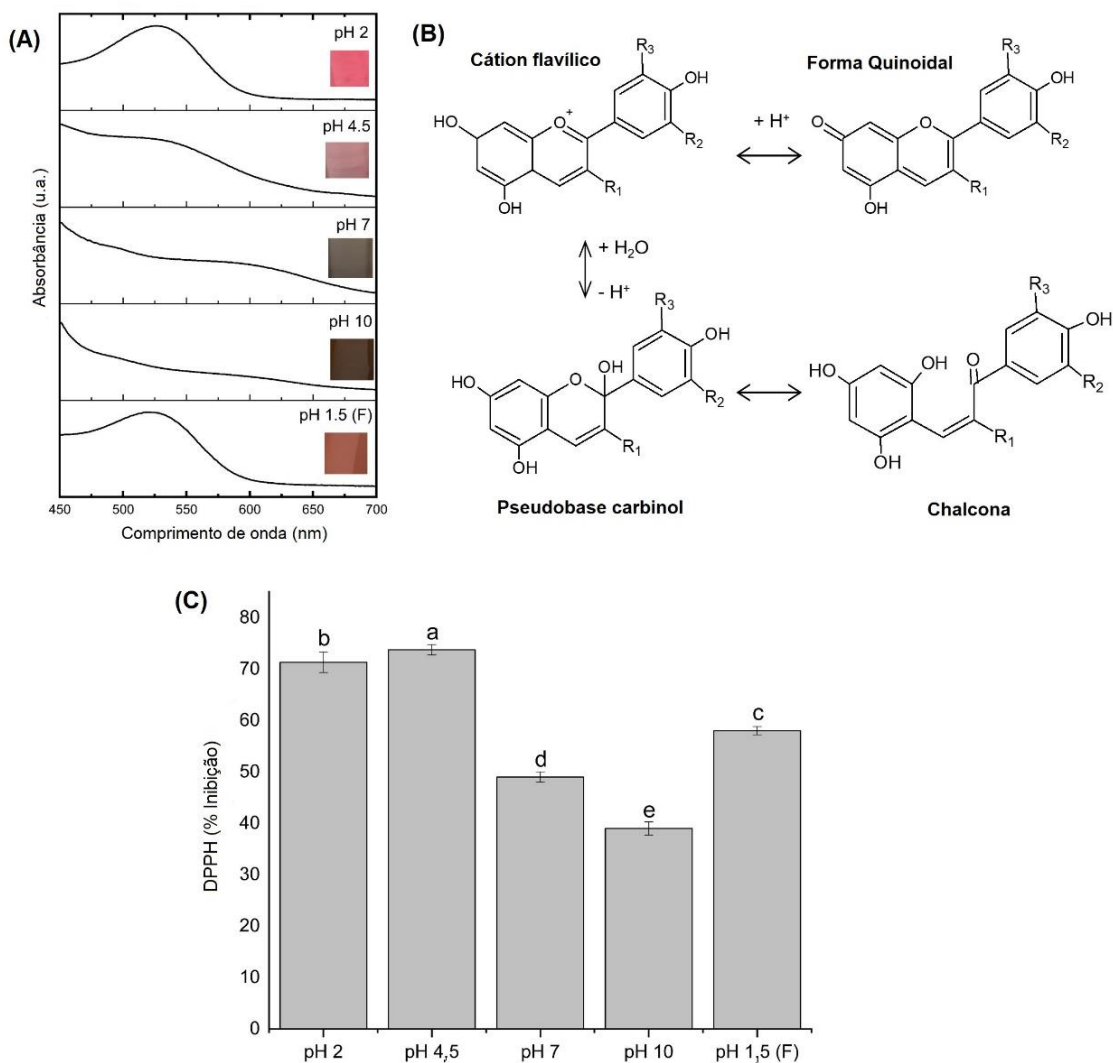
4.4.2 Estudos de estabilidade de antocianinas do extrato bruto

4.4.2.1 Efeito do pH e atividade antioxidante *in vitro*

O efeito da variação do pH e atividade antioxidante *in vitro* do EB pode ser observado na Figura 4.1. O perfil espectral no EB com pH de 2; 4,5; 7; 10 e 1,5 (pH final (F); obtido pela titulação reserva) estão apresentados na Figura 4.1 (A) juntamente com as cores obtidas do extrato em cada pH, sendo elas: rosa (pH 2), rosa claro (pH 4,5), cinza (pH 7), marrom (pH 10) e novamente rosa (pH 1,5 F). É possível observar a diminuição progressiva da absorbância obtida no comprimento de onda de

525 nm, além da diminuição do pico característico nos pHs 7 e 10. As antocianinas (Figure 4.1B) em meio ácido existem na forma de cátion flavílico (AH^+), e apresentam coloração vermelha, com o aumento do pH ocorre o processo de desprotonação e formação da forma quinoidal neutra, composto este instável e suscetível a ataques nucleofílico por moléculas de água resultando no desenvolvimento de pseudobase carbinol e chalcona, sendo esse um processo reversível com a mudança de pH (Pedro *et al.*, 2016; Escher *et al.*, 2020). A degradação química das antocianinas causa a perda irreversível quando ocorre a ruptura do anel heterocíclico, ao realizar a titulação reversa verifica-se que as antocianinas presentes no extrato apresentaram reversibilidade no deslocamento da estrutura de equilíbrio, com recuperação de 80% da absorção inicial. A AA avaliada pelo método da captura do radical livre DPPH está apresentada na Figura 4.1 (C) e expressa em % de inibição. Todas as respostas tiveram inibição frente ao radical DPPH e apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$). O EB apresentou maior porcentagem de inibição em pH 4,5 (73% de inibição), seguido do EB no pH 2,0 (71% de inibição) e pH 1,5 (F) com 58% de inibição. Os menores percentuais de inibição foram observados em pH 10 (39% de inibição) e pH 7 (49% de inibição). Com a mudança do pH, o processo de desprotonação da estrutura química pode influenciar a capacidade do extrato em capturar os radicais livres presentes na reação corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Escher *et al.* (2020) ao avaliarem a estabilidade das antocianinas presentes no extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea*, obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, com um leve aumento da AA em pH próximo a 4 (53 a 59% entre os pH 2,25 a 5,25) e diminuição para 43% em pH 10.

Figura 4.1 - Efeito do pH na estabilidade e reversibilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan. A: Espectro de absorção dos extratos entre pH 2 a 10, e reversibilidade para pH 1,5 (F: final) com variação de cores dos extratos. (B) Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com variação de pH. (C) Efeito do pH na atividade antioxidante das antocianinas presentes no extrato. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).



4.4.2.2 Efeito da temperatura

A estabilidade das antocianinas presentes no EB foram avaliadas nas temperaturas de 60, 80 e 100 °C durante 420 min e os parâmetros cinéticos (porcentagem de retenção de cor; constante de velocidade de degradação das antocianinas e tempo de meia-vida) estão apresentados na Tabela 4.2. A absorbância foi registrada em 525 nm e o perfil espectral (400 a 650 nm) pode ser observado na Figura 4.2. Ao avaliar os dados expostos na Tabela 4.2, é possível observar que a temperatura de 60 °C ($k = 1,9 \times 10^{-4}$) degradou apenas 8% das antocianinas presentes

no EB demonstrando alta estabilidade nesta temperatura, sendo necessário 3600 min (60 h) para degradação de 50% das antocianinas, já quando exposto a 80 °C ($k = 5,8 \times 10^{-4}$), com diminuição de 20% e tempo de meia vida de 1260 min (21 h). A temperatura de 100 °C ($k = 3,3 \times 10^{-3}$) foi extremamente prejudicial a estabilidade das antocianinas, pois apenas 7% da retenção de cor foi preservada e tempo de meia vida de 8 min.

Estudos na literatura demonstram que extratos naturais ricos em antocianinas apresentam instabilidade e degradação dos compostos em temperaturas superiores a 60 °C. Migliorini *et al.* (2019) ao expor o extrato de antocianinas de chicória vermelha (*Cichorium intybus* L.) à 60 °C obteve tempo de meia vida de 74,23 h, enquanto que as temperaturas de 80 e 100 °C diminuíram o tempo de meia vida para 9,55 h e 2,25 h, respectivamente. Pedro *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade das antocianinas de manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.) e obtiveram tempo de meia vida de 53,82 h, 27,56 h e 12,62 h ao expor o extrato nas temperaturas de 60, 80 e 90 °C, respectivamente. O EB apresentou comportamento semelhantes aos extratos de chicória e manjerição roxo na exposição do extrato a temperatura de 60 °C, porém mostrou-se mais sensível à degradação em temperatura elevadas (próximo a 100 °C).

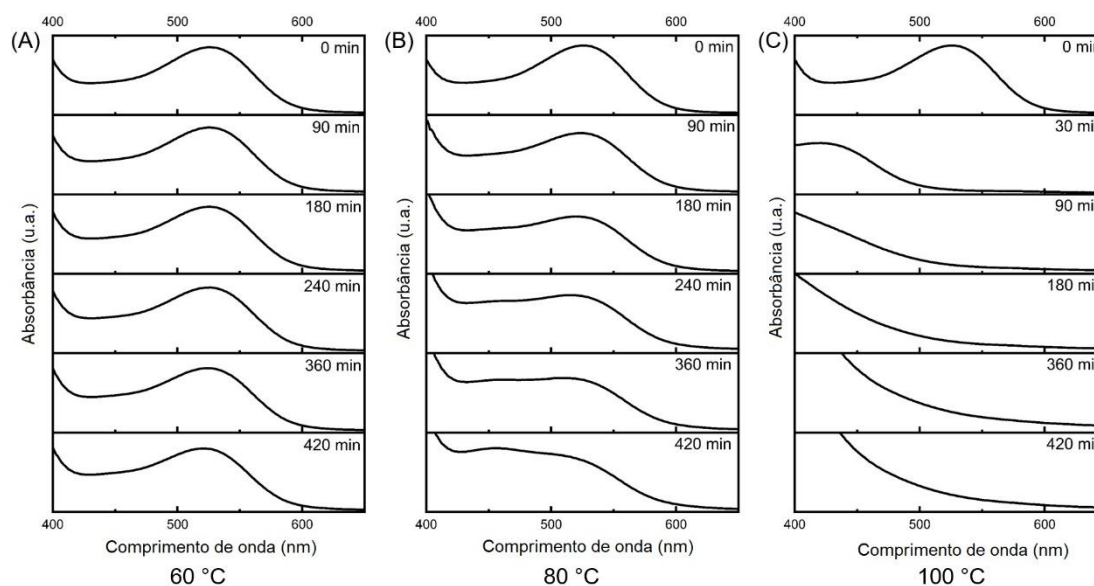
Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas no extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan.

Parâmetros cinéticos	Temperatura		
	60 °C	80 °C	100 °C
Retenção de cor (%)	92	80	7
k	$1,9 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-3}$
$t_{1/2}$ (min)	3600	1260	8

k: constante de velocidade de degradação das antocianinas; $t_{1/2}$ tempo de meia-vida.

Os perfis espectrais do extrato em diferentes temperaturas (Figura 4.2) corroboram com os dados cinéticos obtidos, a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 525 nm pode ser observado em todas as temperaturas, com maior intensidade para as temperaturas de 80 (Figura 4.2B) e 100 °C (Figura 4.2C). Os resultados referentes a estabilidade de antocianinas são fundamentais para preservação da estrutura e propriedades funcionais desejadas dos compostos, visando a aplicação do extrato em matrizes alimentares ou na indústria farmacêutica, que possam passar por processamentos térmicos para preparação e/ou conservação.

Figura 4.2 - Efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* por 420 min. (A) Espectro de absorção dos extratos à 60 °C. (B) Espectro de absorção dos extratos à 80 °C. (C) Espectro de absorção dos extratos à 100 °C.



4.4.2.3 Efeito da luminosidade

A avaliação do efeito da luz em função do tempo na estabilidade de antocianinas presentes no EB foi avaliada em um período de 96 h. A porcentagem de pigmentos amarelos, vermelhos e azuis foram utilizados para avaliação da degradação de antocianinas e estão apresentados na Tabela 4.3. O perfil espectral (400 a 700 nm) para o extrato inicial e final (96 h; em ambiente escuro e claro) estão apresentados na Figura 4.3. Os resultados apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$). A porcentagem de pigmentos vermelhos variou de 53 a 31%, enquanto a porcentagem de pigmentos amarelos apresentou elevação de 38 a 57% em 96 h de exposição à luz. Neste mesmo contexto, é possível verificar que em 12 h de exposição houve um aumento da proporção de pigmentos vermelhos, enquanto os pigmentos amarelos não foram alterados, o que confirma que 12 h de exposição a luz, não são capazes de degradar as antocianinas.

Tabela 4.3 – Proporção de pigmentos vermelhos, azuis e amarelos no extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan* expostos na luz e protegidos da luz durante um 96h.

Tempo	Pigmentos vermelhos (%*)		Pigmentos amarelos (%*)		Pigmentos azuis (%*)	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro

Início (0 min)	53 ± 0,1 ^b	53 ± 0,1 ^c	38 ± 0,4 ^h	38 ± 0,4 ^h	9 ± 0,3 ^{cd}	9 ± 0,3 ^a
12 h	56 ± 0,3 ^a	57 ± 0,1 ^a	38 ± 0,2 ^h	37 ± 0,1 ^g	6 ± 0,1 ^e	6 ± 0,1 ^c
24 h	51 ± 0,5 ^c	54 ± 0,1 ^b	41 ± 0,5 ^g	38 ± 0,1 ^g	8 ± 0,3 ^d	7 ± 0,5 ^b
36 h	46 ± 0,4 ^d	54 ± 0,6 ^b	45 ± 0,4 ^f	39 ± 0,1 ^f	9 ± 0,6 ^{cd}	7 ± 0,5 ^{bc}
48 h	43 ± 0,9 ^e	53 ± 0,6 ^c	47 ± 0,9 ^f	40 ± 0,1 ^e	10 ± 0,5 ^{bc}	7 ± 0,7 ^b
60 h	39 ± 0,7 ^f	51 ± 0,8 ^d	50 ± 0,7 ^d	41 ± 0,2 ^d	11 ± 0,7 ^b	8 ± 0,7 ^{ab}
72 h	38 ± 0,7 ^g	50 ± 0,6 ^d	52 ± 0,8 ^c	42 ± 0,2 ^c	11 ± 0,9 ^b	8 ± 0,7 ^{ab}
84 h	34 ± 0,8 ^h	50 ± 0,7 ^d	55 ± 1,5 ^b	43 ± 0,3 ^b	11 ± 0,9 ^{ab}	7 ± 0,6 ^{bc}
96 h	31 ± 0,4 ⁱ	47 ± 0,7 ^e	57 ± 1,2 ^a	45 ± 0,2 ^a	12 ± 1,1 ^a	8 ± 0,8 ^b
<i>p</i> -Value ¹	0,951	0,964	0,762	0,727	0,871	0,915
<i>p</i> -Value ²	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007

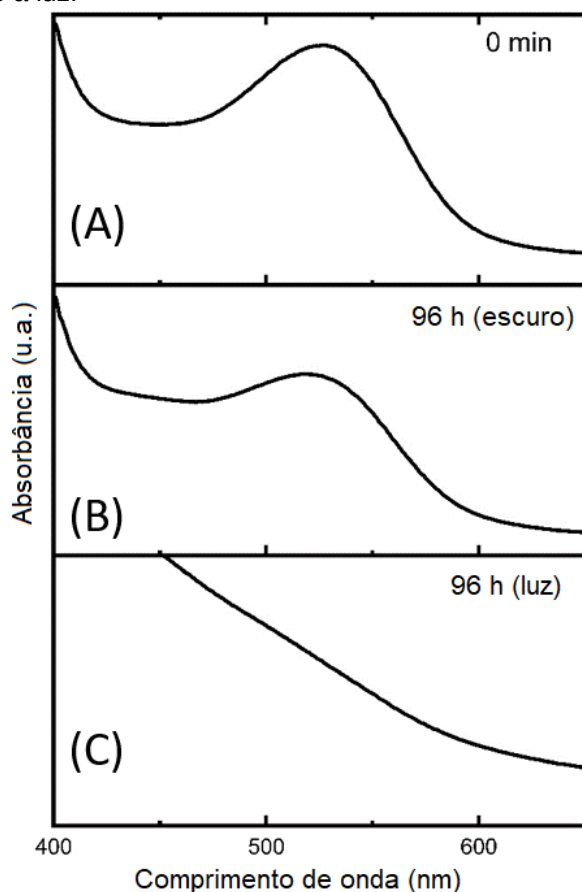
Note: Média ± desvio padrão (n = 3). ¹Valores de probabilidade obtidos com o teste de *Brown-Forsythe* para homogeneidade de variâncias; ²Valores de probabilidade obtidos por ANOVA unidirecional; Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Fisher.

Amostras sem exposição a luz dentro da mesma caixa, foram utilizadas para controle, visando avaliar apenas a influência da luminosidade sobre a degradação das antocianinas, sendo possível observar uma leve alteração na proporção de pigmentos vermelhos (53 a 47%) e amarelos (38 a 45%). A proporção de pigmentos azuis obteve variação de 9 a 12% quando expostos a luz por 96 h. Ao avaliar o perfil espectral das amostras (Figura 4.3) o pico característico no comprimento de onda máximo referente as antocianinas, foi observado no perfil espectral do extrato inicial (Figura 4.3A) e no extrato armazenado no escuro (Figura 4.3B), já para o extrato exposto a luminosidade esse pico característico foi perdido (Figura 4.3C), confirmando a degradação das desta classe de compostos.

Tais resultados evidenciam que a exposição prolongada do EB à luz ocasionou a fotodegradação das antocianinas presentes no meio, gerando compostos amarelos como *cis*-chalcona, através da ruptura do anel heterocíclico, tornando a reação irreversível para algumas antocianinas. Escher *et al.* (2020) ao avaliarem a estabilidade das antocianinas do extrato aquoso de pétalas azuis de *Clitoria ternatea* (pH 3,6), notaram a degradação de 56% das antocianinas ao avaliar a porcentagem de retenção de cor durante 13920 min. Contreras-Lopez *et al.* (2014) estudaram o impacto da luz na estabilidade de antocianinas presentes em extrato etanólico de Blackberry (*Rubus fruticosus*) e demonstraram que a exposição à luz aceleram a destruição dos pigmentos de antocianina, com diminuição de 76% da concentração de antocianinas monoméricas.

Assim, os resultados reforçam o cuidado na manipulação de alimentos enriquecidos com extratos de antocianinas, além de embalagens adequadas, que possam bloquear a luz do espectro visível e principalmente do campo ultravioleta do espectro, para armazenar os produtos e garantir a qualidade e manutenção da estrutura química das antocianinas (Enaru *et al.*, 2021).

Figura 4.3 - Efeito da luz na estabilidade das antocianinas presentes no extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan por 96 horas. (A) Espectro de absorção de extratos no início. (B) Espectro de absorção após 96 h sem exposição à luz (escuro). (C) Espectro de absorção após 96 h de exposição à luz.



4.4.3 Extrato Bruto Liofilizado

4.4.3.1 Composição fenólica e atividade antioxidante

A composição fenólica e atividade antioxidante do EBL por ensaios químicos, biológicos e cromatográficos foram avaliados e expressos na Tabela 4.4. Para uma maior abrangência de compostos químicos identificados dois métodos cromatográficos foram utilizados; ao todo 30 compostos foram identificados e quantificados. Em maiores concentrações destaca-se a procianidina B2 (324 ± 15

$\mu\text{g/g}$), rutina ($323 \pm 37 \mu\text{g/g}$), quercetina-3-*O*-glucosídeo ($244 \pm 10 \mu\text{g/g}$) e delphinidina-3-*O*-galactosídeo ($107 \pm 6 \mu\text{g/g}$) nos resultados obtidos por UPLC-ESI-MS/MS. Já ao avaliar as principais catequinas presentes no EBL por CLAE, destaca-se a (-)-epigallocatequina galato ($15323 \pm 1 \mu\text{g/g}$), (-)-epicatequina galato ($8031 \pm 25 \mu\text{g/g}$) e (-)-epigallocatequina ($4978 \pm 18 \mu\text{g/g}$), confirmando a (-)-epigallocatequina galato o polifenol predominante em chá não fermentado de *C. sinensis*, corroborando com os resultados obtidos por Granato *et al.* (2014), Xu *et al.* (2018) e Zhang *et al.* (2019a).

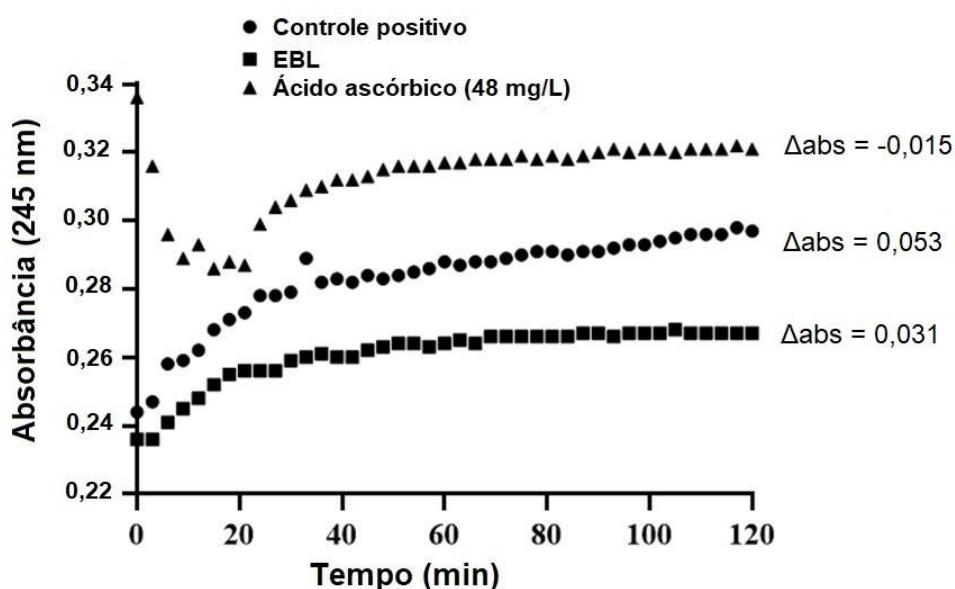
As folhas roxas de *C. sinensis* conferem ao chá uma mistura complexa de compostos fenólicos como evidenciado nesse estudo, as antocianinas que fornecem as folhas tal coloração foram identificadas, como a delphinidina-3-*O*-galactosídeo ($107 \pm 6 \mu\text{g/g}$), cianidina-3-(6-*O*-*p*-cafeoil)-glicosídeo ($1,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) e pelargonidina-3-*O*-galactosídeo ($27 \pm 5 \mu\text{g/g}$). Lv *et al.* (2015) ao identificarem antocianinas em infusões de chá Zijuan, detectaram em maior concentração a cianidina-3-*O*-galactosídeo ($76,3 \mu\text{g/mL}$) e antocianidinas como delphinina ($4,31 \mu\text{g/mL}$), cianidina ($18,5 \mu\text{g/mL}$), pelargonidina ($14,9 \mu\text{g/mL}$), peonidina ($23,8 \mu\text{g/mL}$) e malvidina ($11,1 \mu\text{g/mL}$). Shi *et al.* (2021) identificaram um total de trinta e três antocianinas em seu estudo, sendo delphinidina-3-*O*-galactosídeo e cianidina-3-*O*-galactosídeo as mais abundantes, e destacou que as antocianidinas cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina foram encontrados nas formas 3-*O* ligadas glicosidicamente e desempenham um papel fundamental na coloração roxa das folhas de chá, além de serem estruturalmente estáveis em comparação às antocianidinas.

A atividade antioxidante do EBL foi avaliada e obteve propriedades antioxidantes frente a diferentes mecanismos de ação através dos métodos captura do radical livre DPPH, FRAP, capacidade quelante de Fe^{2+} e lipoperoxidação (Tabela 4.2). Concentrações de 400 a 2000 mg/L do EBL foram utilizados para avaliar a proteção de fosfolípidios, triacilgliceróis e proteínas contidas na gema de ovo e propensos a oxidação não enzimática causada pelas espécies reativas de oxigênio induzidos através de reações de Fenton. O EBL demonstrou inibição lipídica com porcentagens de $19 \pm 2\%$ (400 mg/L), $24 \pm 3\%$ (800 mg/L), $46 \pm 1\%$ (1600 mg/L) e $58 \pm 3\%$ (2000 mg/L) e IC_{50} de $1731 \pm 15 \text{ mg/L}$.

Corroborando com os resultados obtidos nos ensaios químicos, o EBL apresentou potencial antioxidante utilizando o ensaio biológico de oxidação plasmática, com valor médio de $635 \pm 30 \text{ mg AAE/g}$ o EBL apresentou proteção de plasma humano contra oxidação induzida (Figura 4.4). Comparado ao controle

positivo (produção máxima de dienos conjugados), é possível observar que o EBL diluído 100 vezes apresentou Δ_{abs} menor (0,031) em comparação ao controle positivo ($\Delta_{abs} = 0,053$), mas maior que o ácido ascórbico na dose de 48 mg/L ($\Delta_{abs} = -0,015$). Estes valores corroboram os resultados de ensaios químicos antioxidantes (isto é, inibição da peroxidação lipídica da gema do ovo), destacando a eficácia do EBL na doação de átomos de hidrogênio aos radicais livres.

Figura 4.4 - Efeitos do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan na oxidação do plasma humano.



De acordo com Corrigan *et al.* (2023) a capacidade dos compostos fenólicos em eliminar radicais livres e reduzir os metais pró-oxidantes, pode explicar a proteção da oxidação de plasma humano e evidenciar o potencial antioxidante dos compostos fenólicos em uma matriz complexa. Em seus estudos, Corrigan *et al.* (2023) obtiveram proteção plasmática contra a oxidação induzida ao avaliar o chá de camomila (227 mg AAE/L) e bebida de chá de camomila suplementada com *t*-resveratrol e quercetina (379 mg AAE/L). Tais resultados demonstram que os extratos provenientes de plantas, como o EBL, são uma alternativa viável para a indústria na substituição de antioxidantes e corantes sintéticos, porém são necessários estudos da biodisponibilidade abrangendo processos de digestão e absorção, além de estudos *in vivo*, afim de avaliar a funcionalidade do extrato.

Tabela 4.4 - Composição fenólica, atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. *Zijuan*

Analises	Conteúdo
Composição química	
Compostos fenólicos totais (mg AGE/100 g)	38 ± 2
Flavonoides totais (mg QE/100 g)	1,5 ± 0,01
Antocianinas totais (mg CGE/100 g)	0,5 ± 0,01
Orto-difenóis (mg ACE/100 g)	15 ± 1,5
Atividade antioxidante	
Captura do radical livre DPPH (mg AAE/g)	110 ± 4
FRAP (mg AAE/g)	76 ± 1
Capacidade quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/g)	8 ± 0.5
Lipoperoxidação (IC ₅₀ ; mg/L)	1731 ± 15
Proteção contra oxidação induzida de plasma humano (mg AAE/g)	635 ± 30
Composição Química (µg/g)	
(-)-Epigallocatequina galato	15323 ± 1
(-)-Epicatequina galato	8031 ± 25
Caféina	6532 ± 1
(-)-Epigallocatequina	4978 ± 18
Ácido gálico	1709 ± 36
(-)-Galocatequina	561 ± 24
(-)-Catequina galato	542 ± 55
(-)-Epicatequina	520 ± 6
(+)-Catequina	398 ± 60
Procianidina B2	324 ± 15
Rutina	323 ± 37
Quercetina-3-O-glicosídeo	244 ± 10
(-)-Galocatequina galato	177 ± 23
Procianidina B3	146 ± 13
Delfinidina-3-O-galactosídeo	107 ± 6
Procianidina C1	77 ± 4
Kaempferol-3-O-rutinoside	51 ± 9
Procianidina B1	40 ± 0.1
Pelargonidina-3-O-galactosídeo	27 ± 5
Delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> - cumaroil)-glicosídeo	25 ± 3
Delfinidina-3-O-5-O-(6-O- cumaroil)-diglicosídeo	10 ± 0.5
Delfinidina-3,5-O-diglicosídeo	8 ± 0.5
Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> - cumaroil)- glicosídeo	7 ± 1
Dihidromiricetina	6,5 ± 0,3

Peonidina-3-O-galactosídeo	3,3 ± 0,5
Naringenina-7-O-glicosídeo	2,2 ± 0,1
Petunidina-3-O-arabinosídeo	1,8 ± 0,3
Cianidina-3-(6-O- <i>p</i> -cafeoil)-glicosídeo	1,8 ± 0,3
Cianidina-3-O-glicosídeo	1,6 ± 0,1
Cianidina-3,5-O-diglicosídeo	1,1 ± 0,1
Total identificado	40178

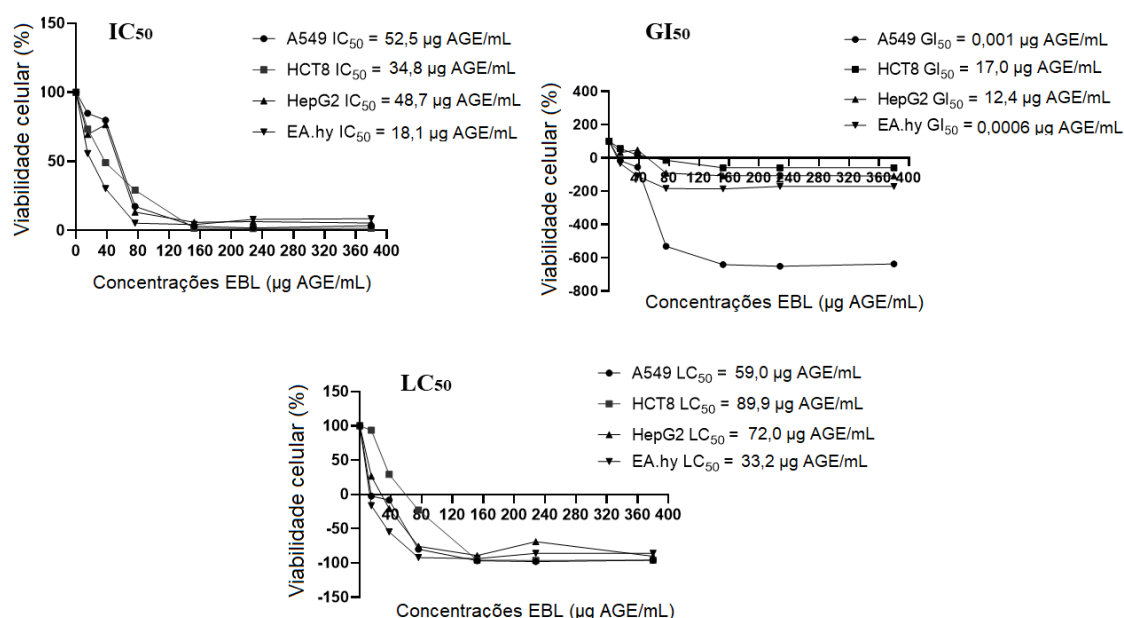
Nota: IC₅₀ - concentração mínima necessária de extrato bruto liofilizado para inibir 50% da lipoperoxidação.

4.4.3.2 Viabilidade celular e atividade antioxidante intracelular

O ensaio de proliferação celular MTT testa a taxa de proliferação celular e, inversamente, a redução da viabilidade celular quando eventos metabólicos levam à apoptose ou necrose (Suganya *et al.*, 2022). O tratamento com baixas concentrações de EBL (Figura 4.5) revelou redução da viabilidade celular (IC₅₀ de 18,1 a 52,5 µL AGE/mL), proliferação (GI₅₀ de 0,0006 a 17,0 µg AGE/mL) e citotoxicidade (CL₅₀ de 33,2 a 89,9 µg AGE/mL) em uma maneira dependente da dose em células cancerígenas e normais. EBL apresenta uma grande quantidade de uma variedade de flavonoides (por exemplo, (-)-epicatequina galato; (-)-epigallocatequina galato; (-)-epigallocatequina), compostos fenólicos, que podem exercer efeitos citotóxicos pela supressão de várias enzimas metabolizadoras de fase I, como o citocromo P450, que ativam metabolicamente numerosos pró-carcinógenos e causam carcinogênese e pela inibição de enzimas como xantina oxidase, COX (cicloxigenase) e LOX (lipoxigenase), que estão associadas a doenças inflamatórias e cancerígenas (Rajasekar *et al.*, 2023). Curiosamente, a célula não cancerígena EAhy926 pareceu ser mais sensível aos efeitos do extrato (Figura 4.5), uma vez que apresentou os menores valores de IC₅₀ (18,1 µg AGE/mL), GI₅₀ (0,0006 µg AGE/mL) e LC₅₀ (33,2 µg AGE/mL) em comparação com células cancerígenas. Apesar desta maior sensibilidade em células não cancerígenas, são necessárias análises adicionais para garantir a segurança toxicológica do produto no desenvolvimento de novos ingredientes alimentares. Essas etapas incluem, por exemplo, a compreensão de outras propriedades do EB/EBL, como solubilidade e estabilidade; tecnologias envolvidas na fabricação dos alimentos, experimentos *in vitro* com extratos digeridos, experimentos em animais e validação da eficácia de alimentos funcionais em estudos

de intervenção humana com protocolos científicos padrão (Azevedo *et al.*, 2023). Na verdade, os compostos fenólicos podem ser degradados durante a digestão gastrointestinal devido ao pH do ambiente intestinal, às enzimas digestivas, aos ácidos biliares e às características da matriz alimentar, que podem modificar as estruturas químicas, resultando em novos compostos com diferentes biodisponibilidades e atividades biológicas (Tomas *et al.*, 2024). Em outras palavras, o processo digestivo e a interação com a microbiota intestinal podem alterar a biodisponibilidade dos compostos e afetar significativamente o perfil de bioatividade e citotoxicidade dos extratos ricos em bioativos.

Figura 4.5 - Viabilidade celular células epiteliais de adenocarcinoma do pulmão (A549), células de células de carcinoma de hepatoma humano (HepG2), células de carcinoma do cólon humano (HCT8) e híbrido de células endoteliais (EA.hy926) em relação a diferentes concentrações do extrato bruto liofilizado de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica*.

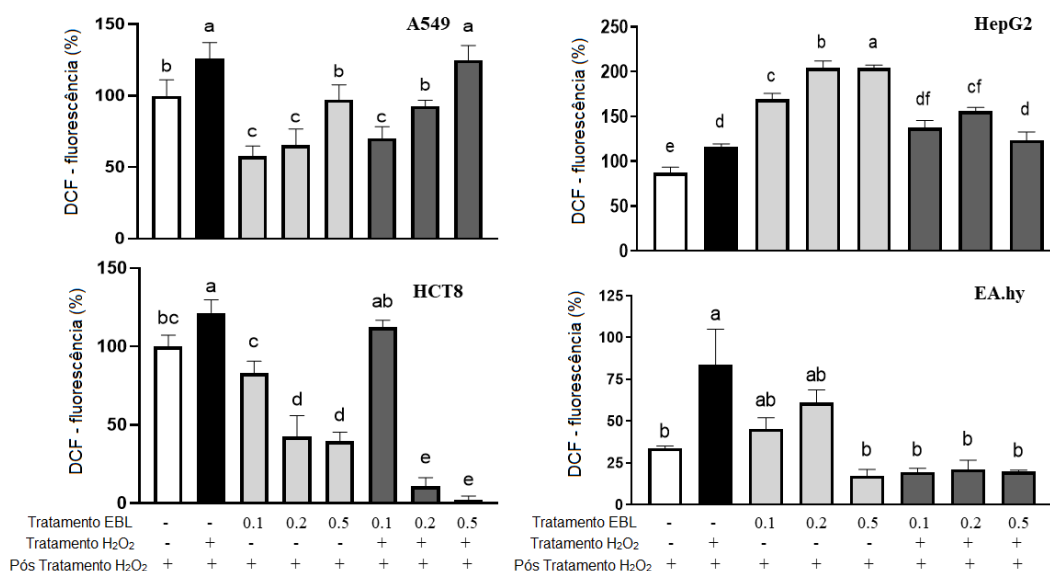


Nota: (A) IC₅₀: concentração do agente que inibe o crescimento celular em 50%; (B) GI₅₀: concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas; (C) LC₅₀: concentração do agente que resulta em perda líquida de 50% de células, em relação ao número no início do tratamento.

Nesse sentido, concentrações intracelulares ótimas de ERO permitem um ambiente oxidativo permissivo para a proliferação (Carmo; Granato; Azevedo, 2021). Para células normais EA.hy926 e células cancerosas, HCT8 (15,0 e 38,0 μg AGE/mL) e A549 (7,5 e 15,0 μg AGE/mL), o EBL exerceu atividade antioxidante intracelular

reduzindo o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 (Figura 4.6). Li *et al.* (2021) observaram que a procianidina B2 e a rutina, compostos fenólicos encontrados no EBL ($323,6 \pm 15,1 \mu\text{g/g}$ e $322,6 \pm 36,9 \mu\text{g/g}$, respectivamente), aumentaram a expressão de Nrf2, que é o principal regulador da resposta antioxidante que protege células de danos induzidos por ERO e sinalização Erk1/2 ativada, que promove proteção mediada por Nrf2. Níveis de H_2O_2 abaixo dessa faixa podem resultar em uma interrupção da sinalização intracelular, ocasionando perda da homeostase com consequente redução da viabilidade celular. Em contraste, os compostos fenólicos podem atuar como agentes pró-oxidantes e níveis muito elevados de H_2O_2 também podem reduzir a viabilidade celular, estimulando vias de apoptose que levam à morte celular (Carmo; Granato; Azevedo, 2021). Neste estudo, o EBL induziu a geração de ERO em células cancerígenas HepG2 e não as protegeu contra o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 . Portanto, no presente estudo, o comportamento antioxidante e pró-oxidante do EBL pode explicar os efeitos citotóxicos observados no ensaio de viabilidade celular, e levantamos a hipótese de que esta propriedade pode ser atribuída ao conteúdo de compostos fenólicos, em especial às quantidades de flavonoides.

Figura 4.6 - Resultados da medição intracelular de ERO em células A549, HepG2, HCT8 e Ea.hy926 por espectrofluorimetria com extrato bruto liofilizado (EBL) a 7,5 – 38 $\mu\text{g AGE/mL}$ de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan.



Nota: Os dados quantitativos são a média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

4.5 CONCLUSÕES

O extrato bruto de *C. sinensis* cv. *Zijuan* obtido a partir de um método simples, de baixo custo e atóxico, apresentou teores quantificados em diferentes classes de compostos fenólicos, além das antocianinas extraídas em meio ácido, atividade antioxidante *in vitro*, equilíbrio reversível de antocianinas e atividade antioxidante com variação de pH. A fotodegradação das antocianinas foi observada após 96 h de exposição a luz e a degradação térmica foi constatada ao expor o extrato a temperatura superior a 80 °C. O extrato bruto liofilizado apresentou uma diversificada composição fenólica, propriedades antioxidantes como inibição da peroxidação lipídica e proteção do plasma humano contra a oxidação induzida pelo cobre. As análises celulares *in vitro* revelaram que o comportamento de dupla face, antioxidante e pró-oxidante, do EBL interferindo na viabilidade celular e exercendo efeitos citotóxicos. Os demais resultados evidenciam o alto potencial tecnológico do extrato obtido, visando a aplicação de produtos alimentícios e farmacêuticos, na substituição de corantes e antioxidantes sintéticos, agregando valor nutricional e impulsionando as vendas desses alimentos, porém o armazenamento e manipulação devem ser cuidadosamente verificados, afim de não haver degradação dos compostos pela exposição prolongada a luz e altas temperaturas. Sugere-se que estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade *in vivo* sejam realizados.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos de otimização da extração realizados com o chá verde proveniente de folhas roxas de *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan, demonstraram ser eficazes na extração dos compostos bioativos, visando um extrato potencialmente funcional. Variáveis como tempo e temperatura foram significativas na extração, fortalecendo a importância do estudo das condições, visando a eficiência do processo. O solvente extrator, outro fator fundamental para solubilidade dos compostos de interesse, obteve interferência nos teores quantificados ao estudar diferentes condições de polaridade. A mistura etanol e água (75% v/v) utilizada como solvente extrator nos estudos apresentados no Capítulo III, apresentou maior eficiência da extração comparada aos demais extratos relatados nos capítulos II e IV. Apesar das diferentes quantificações nas análises realizadas, é importante ressaltar que todos os extratos produzidos a partir de uma extração sólido-líquido, simples, de baixo custo e atóxica, apresentaram atividade antioxidante e biológicas *in vitro*, demonstrando o potencial uso dos extratos como ingrediente em aplicações tecnológicas. Sugere-se que estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade em modelos *in vivo* sejam realizados.

REFERÊNCIAS

- ALAPAT, B.; ALAPPAT, J. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. **Molecules**, v. 25, n. 23, 2020.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200–214, 2021.
- ALCÂNTARA, M. A.; LIMA BRITO POLARI, I. DE; ALBUQUERQUE MEIRELES, B. R. L. DE; LIMA, A. E. A. DE; SILVA JUNIOR, J. C. DA; ANDRADE VIEIRA, É. DE; SANTOS, N. A. DOS; MAGALHÃES CORDEIRO, A. M. T. DE. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. **Food Chemistry**, v. 275, p. 489–496, 2019.
- ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, J. A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 55–63, 2008.
- ALMEIDA, J. DE F.; REIS, A. S. DOS; HELDT, L. F. S.; PEREIRA, D.; BIANCHIN, M.; MOURA, C. DE; PLATA-OVIEDO, M. V.; HAMINIUK, C. W. I.; RIBEIRO, I. S.; LUZ, C. F. P. DA; CARPES, S. T. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 299–305, 2017.
- ARMSTRONG, L.; ARAÚJO VIEIRA DO CARMO, M.; WU, Y.; ANTÔNIO ESMERINO, L.; AZEVEDO, L.; ZHANG, L.; GRANATO, D. Optimizing the extraction of bioactive compounds from pu-erh tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and evaluation of antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, antihemolytic, and inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities. **Food Research International**, v. 137, 2020.
- ÁVILA-ROMÁN, J.; SOLIZ-RUEDA, J. R.; BRAVO, F. I.; ARAGONÈS, G.; SUÁREZ, M.; AROLA-ARNAL, A.; MULERO, M.; SALVADÓ, M. J.; AROLA, L.; TORRES-FUENTES, C.; MUGUERZA, B. Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead? **Trends in Food Science and Technology**, v. 113, p. 77–85, 2021.
- AZEVEDO, L.; GRANATO, D.; MALTAROLLO, V. G.; GONÇALVES, J. E. A mosaic-structured framework applied in the healthy food design: insights from integrated in silico and in vitro approaches. **Current Opinion in Food Science**, v. 52, p. 101047, 2023.
- BAGCHI, D.; SEN, C. K.; RAY, S. D.; DAS, D. K.; BAGCHI, M.; PREUSS, H. G.; VINSON, J. A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Mutation Research**, v. 523–524, n. 1, p. 87–97, 2003.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, p. 646 - 656, 2009.
- BERKER, K. I.; OZDEMIR OLGUN, F. A.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783–4791, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 716 de 01 de julho de 2022. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 466, de 10 de fevereiro de 2021. Coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso na produção de alimentos e ingredientes na função de solventes de extração e processamento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 fev. 2021.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BURSAĆ KOVAČEVIĆ, D.; BARBA, F. J.; GRANATO, D.; GALANAKIS, C. M.; HERCEG, Z.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; PUTNIK, P. Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, v. 254, p. 150–157, 2018.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. **JFS: Food Engineering and Physical Properties Optimization**, vol. 68, 2003.

CARMO, M. A. V. DO; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 98, p. 253-280, 2021.

CARMO, M. A. V. DO; 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.

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, v. 3, 1991, p. 739-787.

CORRIGAN, H.; DUNNE, A.; PURCELL, N.; GUO, Y.; WANG, K.; XUAN, H.; GRANATO, D. Conceptual functional-by-design optimisation of the antioxidant capacity of trans-resveratrol, quercetin, and chlorogenic acid: Application in a functional tea. **Food Chemistry**, v. 428, p. 136764, 2023.

CONTRERAS-LOPEZ, E.; CASTAÑEDA-OVANDO, A.; GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G.; AÑORVE-MORGA, J.; JAIMEZ-ORDAZ, J. Effect of Light on Stability of Anthocyanins in Ethanolic Extracts of *Rubus fruticosus*. **Food and Nutrition Sciences**, v. 05, p. 488–494, 2014.

CRUZ, T. M.; SANTOS, J. S.; CARMO, M. A. V. DO; HELLSTRÖM, J.; PIHLAVA, J. M.; AZEVEDO, L.; GRANATO, D.; MARQUES, M. B. Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their *in vitro* antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, 2021.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DIBY, L.; KAHIA, J.; KOUAMÉ, C.; AYNEKULU, E. Tea, Coffee, and Cocoa. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v. 3, p. 420–425, 2016.

DURAN, M.; PADILLA, R. B.; MARTÍN, A. M.; URSINOS, J. F. R.; MENDOZA, A. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas Y Aceites**, v. 42, p. 271–276, 1991.

ELISA, M.; BRAIBANTE, F. A Química dos Chás. **Quím. nova esc.**, 2014.

ENARU, B.; DREȚCANU, G.; POP, T. D.; STĂNILĂ, A.; DIACONEASA, Z. Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, 2021.

ESCHER, G. B.; SANTOS, J. S.; ROSSO, N. D.; MARQUES, M. B.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M. A. V.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DO PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A. S.; DA 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.

ESCHER, G. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Phenolic composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria ternatea* L. (butterfly pea) blue petals. **Food Chemistry**, v. 331, p. 127341, 2020.

FAN, J. P.; FAN, C.; DONG, W. M.; GAO, B.; YUAN, W.; GONG, J. S. Free radical scavenging and anti-oxidative activities of an ethanol-soluble pigment extract prepared from fermented Zijuan Pu-erh tea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 527–533, 2013.

FAN, Z.; WANG, Y.; YANG, M.; CAO, J.; KHAN, A.; CHENG, G. UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis on phenolic compositions of different E Se tea extracts and their antioxidant and cytoprotective activities. **Food Chemistry**, v. 318, 2020.

FAO Statistical. World food and agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome**, 2022.

FIDELIS, M.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; MYODA, T.; SANT'ANA, A. S.; FURTADO, M. M.; WEN, M.; ZHANG, L.; ROSSO, N. D.; GENOVESE, M. I.; OH, W. Y.; SHAHIDI, F.; PAP, N.; GRANATO, D. Response surface optimization of phenolic compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. **Food and Chemical Toxicology**, v. 142, 2020.

GAO, X.; HO, C. T.; LI, X.; LIN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Z.; LI, B. Phytochemicals, Anti-Inflammatory, Antiproliferative, and Methylglyoxal Trapping Properties of Zijuan Tea. **Journal of Food Science**, v. 83, p. 517–524, 2018.

GONÇALVES BORTOLINI, D.; WINDSON ISIDORO HAMINIUK, C.; CRISTINA PEDRO, A.; ANDRADE ARRUDA FERNANDES, I. DE; MARIA MACIEL, G.

Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview. **Food Chemistry**: X, v. 12, 2021.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D., HIDALGO, F. J.; ... ELMORE, S. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods?. **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018a.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; SALEM, R. D.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 1–7, 2018b.

GRANATO, D.; NUNES, D. S. Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas - Uma abordagem teórico-prática, 1 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016, 538 p.

GRANATO, D.; ARAÚJO CALADO, V. M. DE; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A. A. F.; NUNES, D. S.; RUTH, S. M. VAN. 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, 22 out. 2014a.

GRANATO, D.; RESHAMWALA, D.; KORPINEN, R.; AZEVEDO, L.; VIEIRA DO CARMO, M. A.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; MARJOMÄKI, V.; KILPELÄINEN, P. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, 2022.

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. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266–279, 2016.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A. A. F.; NUNES, D. S.; RUTH, S. M. VAN. 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, p. 10283–10296, 2014.

GRZESIK, M.; NAPARLO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480–492, 2018.

GUO, X.; LONG, P.; MENG, Q.; HO, C. T.; ZHANG, L. An emerging strategy for evaluating the grades of Keemun black tea by combinatory liquid chromatography-

Orbitrap mass spectrometry-based untargeted metabolomics and inhibition effects on α -glucosidase and α -amylase. **Food Chemistry**, v. 246, fanp. 74–81, 2018.

HANHINEVA, K.; TÖRRÖNEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365–1402, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Oxford University Press**, v. 4, 888 p, 2007.

HARATI, K.; BEHR, B.; WALLNER, C.; DAIGELER, A.; HIRSCH, T.; JACOBSEN, F.; RENNER, M.; HARATI, A.; LEHNHARDT, M.; BECERIKLI, M. Anti-proliferative activity of epigallocatechin-3-gallate and silibinin on soft tissue sarcoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 1, p. 103–110, 2017.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, p. 189–199, 2011.

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**, vol. 60, p. 6678–6693, 2012.

JOSHI, R.; RANA, A.; GULATI, A. Studies on quality of orthodox teas made from anthocyanin-rich tea clones growing in Kangra valley, India. **Food Chemistry**, v. 176, p. 357–366, 2015.

JOSHI, R.; RANA, A.; KUMAR, V.; KUMAR, D.; PADWAD, Y. S.; YADAV, S. K.; GULATI, A. Anthocyanins enriched purple tea exhibits antioxidant, immunostimulatory and anticancer activities. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 1953–1963, 2017.

KERIO, L. C.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; ROTICH, M. K. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. **Food Chemistry**, v. 131, p. 31–38, 2012.

KERIO, L. C.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; ROTICH, M. K. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1405–1413, 2013.

KILEL, E. C.; FARAJ, A. K.; WANYOKO, J. K.; WACHIRA, F. N.; MWINGIRWA, V. Green tea from purple leaf coloured tea clones in Kenya-their quality characteristics. **Food Chemistry**, v. 141, p. 769–775, 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview Shashank. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207–220, 2000.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Hortscience** 7, v. 1, p. 83–84, 1972.

LEÓN-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 371–380, 2015.

LI, M.; SHEN, Y.; LING, T.; HO, C. T.; LI, D.; GUO, H.; XIE, Z. Analysis of differentiated chemical components between zijuan purple tea and yunkang green tea by UHPLC-orbitrap-MS/MS combined with chemometrics. **Foods**, v. 10, n. 5, 2021.

LI, X.-X.; LI, Z.-Y.; ZHU, W.; WANG, Y. Q.; LIANG, Y. R.; WANG, K. R.; YE, J. H.; LU, J. L.; ZHENG, X. Q. Anthocyanin metabolism and its differential regulation in purple tea (*Camellia sinensis*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 201, 2023.

LIMA, T.A. Chá e simpatia: Uma estratégia de gênero no Rio de Janeiro oitocentista. **Anais do Museu Paulista**, v.5, p.93-127, 1997.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, p. 709–719, 2016.

LV, H. P.; DAI, W. D.; TAN, J. F.; GUO, L.; ZHU, Y.; LIN, Z. Identification of the anthocyanins from the purple leaf coloured tea cultivar Zijuan (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and characterization of their antioxidant activities. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 449–458, 2015.

MARGRAF, T.; SANTOS, É. N. T.; ANDRADE, E. F. DE; RUTH, S. M. VAN; GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145–155, 2016.

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, n. 5, p. 990–1001, 2019.

MOURA, C. DE; KABBAS JUNIOR, T.; PEDREIRA, F. R. O.; AZEVEDO, L.; FURTADO, M. M.; SANT'ANA, A. S.; FRANCHIN, M.; GONZAGA, V. R.; CUI, Y.; WEN, M.; ZHANG, L.; PEREIRA, R. P.; GRANATO, D. Purple tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) leaves as a potential functional ingredient: From extraction of phenolic compounds to cell-based antioxidant/biological activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 159, 2022.

MOURA, C. DE; KABBAS JUNIOR, T.; MENDANHA CRUZ, T.; BOSCACCI MARQUES, M.; ARAÚJO VIEIRA DO CARMO, M.; TURNES PASINI DEOLINDO, C.; DAGUER, H.; AZEVEDO, L.; XU, Y. Q.; GRANATO, D. Sustainable and effective approach to recover antioxidant compounds from purple tea (*Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Zijuan) leaves. **Food Research International**, v. 164, 2023.

MORADZADEH, M.; HOSSEINI, A.; ERFANIAN, S.; REZAEI, H. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 924–928, 2017.

MOSTAFA-HEDEAB, G.; EWAISS HASSAN, M.; F. HALAWA, T.; AHMED WANI, F. Epigallocatechin gallate ameliorates tetrahydrochloride-induced liver toxicity in rats via inhibition of TGF β / p-ERK/p-Smad1/2 signaling, antioxidant, anti-inflammatory activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 30, n. 9, 2022.

MU, H.; ZHANG, A.; ZHANG, W.; CUI, G.; WANG, S.; DUAN, J. Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 9194–9206, 2012.

NEILL, S. O.; GOULD, K. S.; KILMARTIN, P. A.; MITCHELL, K. A.; MARKHAM, & K. R. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 539–547, 2002.

NOVILLA, A.; DJAMHURI, D. S.; NURHAYATI, B.; RIHIBIHA, D. D.; AFIFAH, E.; WIDOWATI, W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 11, p. 1005–1009, 2017.

OTHMÈNE, Y. BEN; SALEM, I. BEN; HAMDY, H.; ANNABI, E.; ABID-ESSEFI, S. Tebuconazole induced cytotoxic and genotoxic effects in HCT116 cells through ROS generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 174, 2021.

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.

PEDRO, A. C.; MOREIRA, F.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Extraction of bioactive compounds and free radical scavenging activity of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaf extracts as affected by temperature and time. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, n. 2, p. 1055–1068, 2016.

PENG, C. X.; WANG, Q. P.; LIU, H. R.; GAO, B.; SHENG, J.; GONG, J. Effects of Zijuan pu-erh tea theabrownin on metabolites in hyperlipidemic rat feces by Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 226–233, 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.

QIAN, Y.; Zhang, S.; YAO, S.; XIA, J.; LI, Y.; DAI, X.; WANG, W.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, M.; GAO, L.; XIA, T. Effects of vitro sucrose on quality components of tea plants (*Camellia sinensis*) based on transcriptomic and metabolic analysis. **BMC Plant Biology**, v. 18, p. 1–20, 2018.

RAJASEKAR, M.; BHUVANESH, P.; VARADA, P.; SELVAM, M. Results in Chemistry Review on anticancer activity of flavonoid derivatives: Recent developments and future perspectives. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101059, 2023.

RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H.; MEJIA, E. G. DE. 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.

RAPHAELLI, C. DE O. AZEVEDO, J. G.; PEREIRA, E. S.; VINHOLES, J. R.; CAMARGO, T. M.; HOFFMANN, J. F.; RIBEIRO, J. A.; VIZZOTTO, M.; ROMBALDI, C. V.; WINK, M. R.; BRAGANHOL, E.; NORA, L. Phenolic-rich apple extracts have photoprotective and anti-cancer effect in dermal cells. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, 2021.

RASHID, K.; WACHIRA, F. N.; NYABUGA, J. N.; WANYONYI, B.; MURILLA, G.; ISAAC, A. O. Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 178–185, 2014.

REIS, A. S. DOS; DIEDRICH, C.; MOURA, C. DE; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. DE F.; SILVA, L. D. DA; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; TAVARES, R. A. W.; CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at -15°C . **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 306–313, 2017.

REYGAERT, W. C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

ROSSETTO, M.; VANZANI, P.; MATTIVI, F.; LUNELLI, M.; SCARPA, M.; RIGO, A. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408, p. 239–245, 2002.

SANTOS, J. S. ESCHER, G. B.; CARMO, M. A. V. DO, AZEVEDO, L.; MARQUES, M. B.; DAGUER, H.; MOLOGNONID, L.; GENOVESEE, M. W.; ZHANG, L.; OH, W. Y.; SHAHIDI, F.; GRANATO, D. A new analytical concept based on chemistry and toxicology for herbal extracts analysis: From phenolic composition to bioactivity. **Food Research International**, v. 132, p. 109090, 2020.

SANTOS, J. S.; ALVARENGA BRIZOLA, V. R.; 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.

SANTOS, JÂNIO S.; DEOLINDO, C. T. P.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C.; PRADO-SILVA, L. DO; SANT'ANA, A. S.; AZEVEDO, L.; CARMO, M. A. V. DO; 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, 2018a.

SARDI, J. DE C. O.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; INFANTE, J.; ALENCAR, S. M. DE; ROSALEN, P. L. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 2017.

SAYUTI, N. H.; KAMARUDIN, A. A.; SAAD, N.; RAZAK, N. A. A.; ESA, N. M. Optimized Green Extraction Conditions of Matcha Green Tea (*Camellia sinensis*) Using Central Composite Design for Maximal Polyphenol and Antioxidant Contents. **BioResources**, v. 16, p. 3255-3271, 2021.

SCHECHTEL, S. L.; DE MATOS, V. C. R.; SANTOS, J. S.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, W.; ZHANG, L.; MIRANDA, M.; SANT'ANA, A. S.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, J. C. B.; GRANATO, D. Flaxleaf Fleabane Leaves (*Conyza bonariensis*), A New Functional Nonconventional Edible Plant? **Journal of Food Science**, v. 84, p. 3473–3482, 2019.

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.

SHI, J.; SIMAL-GANDARA, J.; MEI, J.; MA, W.; PENG, Q.; SHI, Y.; XU, Q.; LIN, Z.; LV, H. Insight into the pigmented anthocyanins and the major potential co-pigmented flavonoids in purple-coloured leaf teas. **Food Chemistry**, v. 363, 2021.

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 and Technology**, v. 46, n. 2, p. 250–256, 2011.

STAŠKO, A.; BREZOVÁ, V.; BISKUPIČ, S.; MIŠÍK, V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. **Free Radical Research**, v. 41, n. 4, p. 379–390, 2007.

SUGANYA, K.; POORNIMA, A.; SUMATHI, S.; CHIGURUPATI, S.; ALYAMANI, N. M.; GHAZI FELEMBAN, S.; BHATIA, S.; AL-HARRASI, A.; SAYED MOAWAD, A. Rutin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human triple-negative breast carcinoma MDA-MB-231 cells – In vitro and in silico docking studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 104021, 2022.

TEPEDELEN, B. E.; SOYA, E.; KORKMAZ, M. Epigallocatechin-3-gallate reduces the proliferation of benign prostatic hyperplasia cells via regulation of focal adhesions. **Life Sciences**, v. 191, n. October, p. 74–81, 2017.

TOMAS, M.; GARCIA-PEREZ, P.; RIVERA-PEREZ, A.; PATRONE, V.; GIUBERTI, G.; LUCINI, L.; CAPANOGLU, E. The addition of polysaccharide gums to *Aronia melanocarpa* purees modulates the bioaccessibility of phenolic compounds and gut microbiota: A multiomics data fusion approach following in vitro digestion and fermentation. **Food Chemistry**, v. 439, p. 138231, 2024.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins. **American Society for Nutrition**, n. 8, p. 620–622, 2015.

WANG, Y.; REN, N.; RANKIN, G. O.; LI, B.; ROJANASAKUL, Y.; TU, Y.; CHEN, Y. C. Anti-proliferative effect and cell cycle arrest induced by saponins extracted from tea (*Camellia sinensis*) flower in human ovarian cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 310–321, 2017.

XU, Y. Q.; GAO, Y.; GRANATO, D. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. **Food Chemistry**, v. 339, 2021.

XU, Y. Q.; ZHANG, Y. N.; CHEN, J. X.; WANG, F.; DU, Q. Z.; YIN, J. F. Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea. **Food Chemistry**, v. 258, p. 16–24, 2018.

ZHANG, L.; HO, C. T.; ZHOU, J.; SANTOS, J. S.; ARMSTRONG, L.; GRANATO, D. Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 18, p. 1474 - 1495, 2019a.

ZHANG, L.; SANTOS, J. S.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; CARMO, M. A. V. DO; AZEVEDO, L.; WANG, Y.; GRANATO, D. Multivariate effects of Chinese keemun black tea grades (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) on the phenolic composition, antioxidant, antihemolytic and cytotoxic/cytoprotection activities. **Food Research International**, v. 125, 2019b.

ZHAO, Y.; LAI, W.; XU, A.; JIN, J.; WANG, Y.; XU, P. Characterizing relationships among chemicals, sensory attributes and in vitro bioactivities of black tea made from an anthocyanins-enriched tea cultivar. **LWT**, v. 132, 2020.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246–254, 2014.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA

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 Boscacci 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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Utilizar eritrócitos humanos como modelo biológico para testes da atividade antioxidante de extratos naturais de diferentes origens botânicas.

Objetivo Secundário:

Isolar eritrócitos humanos de amostras de sangue de doadores anônimos fornecidas pelo Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais –

HURCG; Analisar as atividades dos extratos naturais em condições isotônicas e hipotônicas; Avaliar a estabilidade da hemoglobina em presença dos diferentes extratos, sob ataque oxidativo com Peróxido de hidrogênio; Quantificar a concentração de glutatona residual sob condições isotônicas, hipotônicas e sob ataque oxidativo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As amostras sanguíneas serão fornecidas pela Agência Transfusional do Hospital Universitário

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900

UF: PR **Município:** PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 2.896.929

Regional dos Campos Gerais (HURCG) e todas as manipulações serão conduzidas com luvas descartáveis. Em caso de acidente com manipulação de sangue, o indivíduo será imediatamente conduzido ao HURCG para tratamento adequado.

Benefícios:

Os resultados obtidos neste trabalho se constituem em material de divulgação científica, além de fornecerem informações sobre atividades de extratos de diferentes matérias primas que são utilizados na medicina popular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa experimental será realizada no laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa - PR. Esta pesquisa utilizará extratos obtidos de diferentes matérias primas como a *Tipuana tipu*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Calendula L.*, *Aspalatus linearis*, *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Centaurea cyanus L.*, *Clitoria ternatea L.*, *Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria dúbia*, *Oryza sativa*, *Chicorium intybus*, *Psidium guajava*, *Rubus fruticosus L.* e a própolis vermelha. Os extratos serão elaborados com diferentes solventes, tempos e temperaturas de extração conforme um planejamento experimental e estatístico pré-definidos. As amostras de sangue serão fornecidas de doadores anônimos pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais de Ponta Grossa. O sangue será padronizado para a utilização como modelo biológico nos testes de atividade antioxidante dos extratos conforme metodologia específica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012

Recomendações:

Enviar o relatório final após o término do projeto por notificação via plataforma Brasil para evitar pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado este projeto

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG**



Continuação do Parecer: 2.896.929

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)**

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE LIMERICK PARA ANÁLISE DE OXIDAÇÃO DE PLASMA HUMANO.



Ollscoil Luimnigh
University of Limerick

Dr John Mulvihill,
Chair of S&E Ethics Committee,
Faculty of Science & Engineering,
University of Limerick,
Limerick, Ireland, V94 T9PX

4th September 2023

Re: Confirmation of Ethical Approval: Reference Number: 2023_02_01_S&E

Dear Prof Granato,

This letter is to confirm that Prof. Daniel Granato, School of Engineering in the University of Limerick, has completed all applicable procedures regarding the University of Limerick, Science and Engineering Research Ethics Committee for the project entitled "*Antioxidant, antihemolytic, and antiplatelet activities of bioactive-rich extracts.*"

All ethical procedures and aspects of the study were reviewed and approved by the Science & Engineering Ethics Committee in the September 2023 board. Each application is thoroughly reviewed by two separate committee members and is opened for discussion to all members during the committee meeting. The committee, and in particular the reviewers, are satisfied that this project will be conducted according to best practice in accordance with ethical standards in research.

This research will take place between September 2023 to September 2025, with a view for an extension by Chair Decisions prior to the end date. I am free to discuss any queries on any further ethical concerns by emailing John.Mulvihill@ul.ie

Yours sincerely,

John Mulvihill PhD
Principal Investigator
Course Director
Chair of Research Ethics

Biomedical Engineering
Biomedical Engineering, BEng & MEng
Faculty of Science & Engineering,

School of Engineering,
Faculty of Science and Engineering, UL
Bernal Institute and Health Research Institute
T +353 (0) 61 237719 bernalinstitute.com



**Bernal
Institute**

University of Limerick,
Limerick, V94 T9PX,
Ireland.
Ollscoil Luimnigh,
Luimneach,
V94 T9PX, Éire.
+353 (0) 61 202020

ul.ie

Science and Engineering Research Ethics Committee Aim:

The aim of our committee is to ensure that research is conducted according to best practice and in accordance with ethical standards in research. Our priority is to safeguard the health, welfare, dignity and rights of human participants and the researchers undertaking the work to minimize risk to these parties as well as the University of Limerick itself and the investigators named in this letter.

Our committee is under the remit of the University of Limerick Research Ethics Group (ULREG) which is ratified quarterly by the sitting external chair Prof. Paul Reynolds.