

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Beatriz Paiva Nogueira

**Caracterização e análise do pigmento azul dos arilos de *Ravenala
madagascariensis* para incorporação em produtos de consumo humano.**

Juiz de Fora

2023

Beatriz Paiva Nogueira

Caracterização e análise do pigmento azul dos arilos de *Ravenala madagascariensis* para incorporação em produtos de consumo humano.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Priscila de Faria Pinto

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nogueira, Beatriz Paiva.

Caracterização e análise do pigmento azul dos arilos de *Ravenala madagascariensis* para incorporação em produtos de consumo humano / Beatriz Paiva Nogueira. -- 2023.

70 f. : il.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. *Ravenala madagascariensis*. 2. arilo. 3. pigmento. 4. caracterização proteica. 5. cosméticos. I. Pinto, Priscila de Faria, orient. II. Título.

BEATRZ PAIVA NOGUEIRA

Caracterização e análise do pigmento azul dos arilos de *Ravenala madagascariensis* para incorporação em produtos de consumo humano

Dissertação
apresentada
ao Programa de pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 06 de outubro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Priscila de Faria Pinto - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Juliana Maria Oliveira Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Nayara Braga Emídio

National Institutes of Health

Juiz de Fora, 02/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 18/10/2023, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo de Oliveira Santos, Professor(a)**, em 20/10/2023, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Maria Oliveira Souza Reis, Professor(a)**, em 20/10/2023, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1503921** e o código CRC **538FAD6C**.

¹¹Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês", diz o Senhor, "planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro.

Jeremias 29:11

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu porto seguro. O único que sabe tudo o que senti e desejei durante este tempo. Aquele que nunca me desamparou nos momentos difíceis, de frustração e de insegurança que são inerentes deste caminho árduo. Aquele que foi minha fortaleza quando as perdas pessoais pareciam tirar minhas forças. Sem Deus não há vitória e não há conquistas e à Ele toda glória.

Aos meus pais, meus maiores parceiros. A vocês que sempre foram tão presentes em toda a minha formação, que sempre me incentivaram a querer mais e acreditar que eu seria capaz de ser e fazer o que quisesse. Graças a vocês estou finalizando mais esta etapa e começando uma nova. Eu os amo demais!

A minha orientadora, uma das pessoas mais humanas e empáticas que já tive o prazer de conhecer. Acho que não tenho palavras para agradecer pela confiança depositada em mim e por todos os aprendizados e experiências que foram passados por ela durante nosso tempo juntas. Muito obrigada por me mostrar que é possível me desesperar com calma (risos).

Aos companheiros de laboratório não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigada por deixarem o trabalho difícil mais leve, pelas risadas, choros e desesperos, por compartilharem comigo suas experiências, por ajudarem em cada etapa do desenvolvimento deste projeto e por me permitirem aprender muito durante nossa jornada.

Aos meus amigos e namorado, obrigada por acreditarem em mim, por todo amor, carinho, companheirismo e incentivo. Obrigada por compreenderem minha ausência em alguns momentos, por oferecerem um ombro para descanso e desabafo e por oferecerem a descontração e recarga necessárias para que eu voltasse ao trabalho renovada.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado, aos técnicos e professores da UFJF pelo acompanhamento e auxílio, a Capes, CNPq, FAPEMIG e UFJF pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

“Eu estou sempre fazendo o que ainda não posso fazer, a fim de aprender como fazê-lo.”

Vincent Van Gogh

RESUMO

Ravenala madagascariensis, mais conhecida como árvore dos viajantes, é uma árvore da família Strelitziaceae nativa da ilha de Madagascar no continente africano, porém muito bem adaptada nos trópicos, crescendo bem na América, Ásia e Austrália. Esta espécie apresenta importantes aplicações nos tratamentos para doenças crônicas, como diabetes, pedras nos rins, hipertensão e aplicações estéticas, com patentes mundiais descrevendo sua aplicação em cosméticos. Os dados sobre a utilização desta espécie, entretanto, ainda são escassos e centrados nas partes aéreas da planta. O objetivo desta dissertação se concentra na elucidação da natureza química dos pigmentos dos arilos de *R. madagascariensis* e das suas propriedades biológicas, padronizando sua obtenção para aplicação em produtos de uso humano, como os cosméticos. As amostras utilizadas foram coletadas de espécimes de *R. madagascariensis* da cidade de Juiz de Fora – MG. Os arilos foram removidos manualmente e armazenados em temperatura ambiente. A análise por microscopia de campo claro dos arilos, apresentou estruturas ricas em células parenquimáticas isodiamétricas com espessamento em seus ângulos opostos aos espaços intercelulares e a avaliação desta estrutura por microscopia eletrônica de varredura indicou uma composição de carbono, oxigênio, sódio, alumínio, enxofre e nitrogênio na amostra. A fim de caracterizar a presença de metabólitos secundários foram realizados ensaios fitoquímicos com extratos dos arilos obtidos em Hexano, Etanol e SDS 10%. Os dados obtidos revelaram a ausência de metabólitos secundários que estivessem relacionados com a cor azul nos extratos. Os resultados das análises centesimais detectaram uma composição rica em lipídios (81,45%), carboidratos (7,03%), umidade (3,71%), cinzas (0,78%) e proteínas e peptídeos (7,1%). A cromatografia de camada delgada confirmou a presença de peptídeos/proteínas e de metabólitos com capacidade antioxidante nos extratos, uma atividade biológica importante. Com a separação dos componentes através de eletroforese em SDS-PAGE foi possível observar um perfil proteico com bandas de aproximadamente 14kDa que foram avaliadas por espectrometria de massas. As varreduras em espectrofotômetro do extrato padronizado durante o planejamento fatorial desenvolvido neste trabalho, indicaram picos de absorção significantes em 400nm e 620nm, que podem estar relacionados com a presença de grupos cromóforos nos extratos. Os resultados obtidos indicaram que a substância que confere cor aos arilos de *R. madagascariensis* não é um metabólito secundário. Fato que quando relacionado aos demais resultados sugere que um grupo cromóforo associado a uma proteína é responsável pelas características únicas do extrato, incluindo cor e estabilidade.

Palavras-chave: *Ravenala madagascariensis*; arilo; pigmento; caracterização proteica; cosméticos.

ABSTRACT

Ravenala madagascariensis, known as the travelers' tree, is a tree from the Strelitziaceae family native to the island of Madagascar on the African continent, but very well adapted to the tropics, growing well in America, Asia and Australia. This species has important applications in the treatment of chronic diseases, such as diabetes, kidney stones, hypertension and aesthetic applications, with worldwide patents describing its application in cosmetics. Data on the use of this species, however, is still scarce and focused on the aerial parts of the plant. The objective of this study focuses on elucidating the chemical nature of the aril pigments of *R. madagascariensis* and their biological properties, standardizing their extraction for application in products for human use. The samples used were collected from specimens of *R. madagascariensis* from the city of Juiz de Fora – MG. The arils were manually removed from the seeds and stored at room temperature. The analysis by bright-field microscopy of the arils showed structures rich in isodiametric parenchymatic cells with thickening at their angles opposite to the intercellular spaces and the evaluation of this structure by scanning electron microscopy indicated a composition of carbon, oxygen, sodium, aluminum, sulfur and nitrogen in the sample. In order to characterize the presence of secondary metabolites, phytochemical tests were carried out with aril extracts obtained in Hexane, Ethanol and 10% SDS. The data obtained revealed the absence of secondary metabolites in the extracts. The result of the composition analysis detected a composition rich in lipids (81.45%), carbohydrates (7.03%), humidity (3.71%), ash (0.78%) and proteins and peptides (7.1%). Thin layer chromatography of the extracts confirmed the presence of peptides/proteins and metabolites with antioxidant capacity, an important biological activity, in the extracts. With the separation of the components through electrophoresis in SDS-PAGE, it was possible to observe a protein profile with bands of approximately 14kDa that were evaluated by mass spectrometry. Spectrophotometer scans of the standardized extract during the factorial design developed in this work indicated significant absorption peaks at 400nm and 620nm, which may be related to the presence of chromophore groups in the extracts. The results obtained indicated that the substance that gives color to the arils of *R. madagascariensis* is not a secondary metabolite. The results suggest that a chromophore group associated with a protein is responsible for the unique characteristics of the extract, including its color and stability.

Keywords: *Ravenala madagascariensis*; aryl; pigment; protein characterization; cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos principais corantes na natureza	17
Figura 2: Estrutura básica dos carotenóides e os grupos finais das extremidades da cadeia de polieno	19
Figura 3: Fotografias da árvore, baga e sementes de <i>Ravenala madagascariensis</i> envoltas por arilos azuis... ..	21
Figura 4: Avaliação histológica de cortes transversais dos arilos de <i>Ravenala madagascariensis</i>	39
Figura 5: Fibra de arilo em campo claro e avaliação da emissão de fluorescência dos arilos de <i>R. madagascariensis</i> observados por microscopia óptica	39
Figura 6: Aspectos gerais do extrato das fibras de arilo azul de <i>Ravenala madagascariensis</i> e sua inserção na semente.....	40
Figura 7: Microscopia eletrônica do extrato liofilizado de arilos de <i>R. madagascariensis</i> e gráfico com composição da amostra em %.....	41
Figura 8: Seleção de pH e seleção do comprimento de onda de máxima absorção de luz para extração mais eficiente do pigmento das amostras.....	41
Figura 9: Superfície de resposta obtida através do planejamento fatorial... ..	44
Figura 10: Avaliação da estabilidade de coloração do extrato dos arilos de <i>R. madagascariensis</i> em solução de SDS 10% mantido a temperatura ambiente	45
Figura 11: Cromatoplaça dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% para análise da presença de Cumarinas... ..	48
Figura 12: Cromatoplaça dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% reveladas com DPPH para identificação de atividade antioxidante	48
Figura 13: Cromatoplaça dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% reveladas com Ninidrina para identificação da presença de peptídeos... ..	49
Figura 14: Curva de concentração proteica.....	50
Figura 15: Gel de eletroforese dos extratos de <i>R. madagascariensis</i> e curva de peso molecular da proteína alvo em kDa... ..	51
Figura 16: Dados espectrais Pep 1 (PDFTLDPAYGVDLR).....	52
Figura 17: Dados espectrais Pep 2 (LAGGPYWDVPLGR).....	52
Figura 18: Dados espectrais Pep 3 (SGGDQNLFPLEFVSPTK).....	52
Figura 19: Sequência THU71878.1	53
Figura 20: Alinhamento das sequências de peptídeos identificados com THU71878.1	54

Figura 21: Espectro Raman obtido com 256 varreduras... ..	55
Figura 22: Espectro Raman obtido com 512 varreduras... ..	56
Figura 23: Espectro Raman obtido da amostra extraída com hexano.....	56
Figura 24: Avaliação da citotoxicidade do extrato em SDS 10% de arilos de <i>Ravenala madagascariensis</i> em cultura de células L929.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes químicas dos principais corantes encontrados na natureza	17
Tabela 2: Planejamento fatorial exploratório 2^3 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de <i>R. madagascariensis</i> ...	25
Tabela 3: Planejamento fatorial de modelagem 3^2 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de <i>R. madagascariensis</i> ...	26
Tabela 4: Resultados do planejamento fatorial exploratório 2^3 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de <i>R. madagascariensis</i>	42
Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial de modelagem 3^2 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de <i>R. madagascariensis</i>	43
Tabela 6: Peso e aspecto dos extratos hexânico etanólico e em SDS de <i>R. madgascariensis</i>	46
Tabela 7: Resultados da triagem fitoquímica dos diferentes extratos de <i>R. madagascariensis</i>	46
Tabela 8: Teores de flavonóides e substâncias fenólicas em extratos de <i>R. madagascariensis</i>	47
Tabela 9: Resultados das análises centesimais.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD - Cromatografia em camada delgada

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade óptica

EAT - Ácido tânico

EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ER - Rutina

HCD - do inglês *Higher-energy collisional dissociation*

HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - Teste de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

RF - Fator de Retenção

RPMI - do inglês *Roswell Park Memorial Institute*

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SFB - Soro Fetal Bovino

TCA - Ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoracético

TRIS - tris-hidroximetilaminometano

UV - Ultravioleta

UV-VIS - Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	23
3.1 Material vegetal.....	23
3.2 Análise por microscopia óptica de campo claro e de fluorescência.....	23
3.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura.....	24
3.4 Seleção da faixa de pH e comprimento de onda de máxima absorção da luz UV-VIS do extrato dos arilos em SDS.....	24
3.5 Planejamento fatorial da extração do pigmento azul.....	25
3.6 Preparo das amostras para análise fitoquímica.....	27
3.7 Análise fitoquímica.....	28
3.7.1 Alcalóides.....	28
3.7.2 Triterpenos e Esteróides.....	28
3.7.3 Cumarinas.....	28
3.7.4 Compostos fenólicos.....	29
3.7.5 Flavonóides.....	29
3.7.6 Antraquinonas.....	29
3.8 Determinação do conteúdo de flavonóides.....	29
3.9 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	30
3.10 Cromatografia em camada delgada para análise de fitoconstituintes e da capacidade antioxidante.....	30
3.11 Análises centesimais.....	31
3.11.1 Umidade.....	31
3.11.2 Lipídios.....	32
3.11.3 Proteínas.....	32
3.11.4 Teor de cinzas.....	33

3.11.5 Carboidratos...	34
3.12 Dosagem de proteínas...	34
3.13 Caracterização proteica do pigmento azul por Eletroforese	34
3.14 Caracterização proteica por Espectrometria de Massas...	35
3.15 Espectroscopia Raman dos arilos azuis de <i>Ravenala madagascariensis</i> ...	36
3.16 Atividade biológica <i>in vitro</i> (Citotoxicidade <i>in vitro</i>)	37
3.16.1 Cultura de Células...	37
3.16.2 Avaliação da viabilidade celular pelo Teste de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)...	38
4 RESULTADOS	38
4.1 Microscopia óptica de campo claro e fluorescência	38
4.2 Microscopia eletrônica de varredura	40
4.3 Seleção da faixa de pH e comprimento de onda de máxima absorção da luz UV-VIS do extrato dos arilos em SDS	41
4.4 Planejamento fatorial da extração do pigmento azul	42
4.5 Análise fitoquímica dos extratos dos arilos	46
4.6 Teores de flavonoides e fenóis	47
4.7 Cromatografia em camada delgada para análise de fitoconstituintes, peptídeos e de capacidade antioxidante	47
4.8 Análises centesimais	50
4.9 Dosagem de proteínas dos extratos em SDS 10%	50
4.10 Caracterização proteica do pigmento azul por eletroforese	51
4.11 Caracterização proteica por espectrometria de massa	51
4.12 Espectroscopia Raman dos arilos azuis de <i>Ravenala madagascariensis</i>	55
4.13 atividade biológica <i>in vitro</i> (Citotoxicidade <i>in vitro</i>)	56
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	64
7 REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Corantes sintéticos e naturais têm sido usados há muito tempo pelos seres humanos em diversas áreas, desde o campo alimentício e farmacêutico até áreas têxtil e artística. Eles são atualmente mais utilizados quando em comparação com corantes naturais, por serem menos dispendiosos e mais estáveis, contudo, não são capazes de conferir outras características aos alimentos além da cor, ou seja, são substâncias que não apresentam nenhum valor nutritivo extra e são mais passíveis de trazer prejuízos à saúde e também ao meio ambiente enquanto os naturais apresentam valores nutritivos significantes como a atividade antioxidante, por exemplo (Santos *et al*, 2016; Santos *et al*, 2021).

Com os objetivos principais de restaurar a aparência original ou se aproximar o máximo possível, já que estas características podem ser afetadas durante processos de produção, e para atrair mais os compradores fazendo com que a cor seja associada ao sabor, os corantes são adicionados aos alimentos. A cor de um alimento é fortemente associada à sua qualidade, sabor e segurança. Quando a cor não é satisfatória o consumidor não se sentirá atraído pelo produto, dificilmente irá adquiri-lo e poderá ainda o definir visualmente como impróprio para consumo (Delgado-vargas *et al*, 2000; Constant *et al*, 2002).

De acordo com a Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) nº 44/CNNPA, de 1977, corantes são uma “substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de um alimento (e bebida)”, e são classificados como: Orgânico natural, aquele obtido a partir de vegetal, ou de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado; Orgânico sintético, aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado; Artificial, corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais; Orgânico sintético idêntico ao natural, corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural; Inorgânico, aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento; Caramelo, corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão; Caramelo (processo amônia), corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que

o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200mg/kg (duzentos miligramas por quilo). Sendo assim, os corantes naturais são os pigmentos responsáveis pela origem das cores e podem ser extraídos de diversos organismos, dentre eles frutos, folhas, flores, bactérias, fungos e insetos. As cores que predominam em vegetais, por exemplo, derivam das classes de pigmentos dos tipos clorofila, carotenóide e flavonóide em sua maioria (Schiozer *et al*, 2013).

No Brasil é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o órgão responsável pela regulação do uso dos corantes alimentícios naturais e sintéticos, então sua legislação determina quais corantes e concentrações podem ser usados sem afetar a saúde dos indivíduos. Entretanto, contestações a respeito dos malefícios dos corantes sintéticos perduram. Diversas pesquisas acerca da toxicidade, mutagenicidade e potencial alergênico demonstram que corantes sintéticos como amaranço, eritrosina B e tartrazina, por exemplo, são nocivos e tóxicos quando ingeridos frequentemente (Barros *et al*, 2016; Hamerski *et al*, 2013)

Em contrapartida, corantes de fontes naturais apresentam maior segurança no seu uso e podem possuir propriedades bioativas de efeito benéfico à saúde humana como a atividade antioxidante, antimicrobiana e prevenção de algumas doenças crônicas. Para mais, estes corantes não geram riscos para o meio ambiente, com mínimo impacto ambiental e não são poluentes (Mattioli *et al*, 2020; Rowles III; Erdman, 2020; Marques, 2022). Com a associação entre a capacidade de conferir cor a alimentos e as vantagens biológicas a relevância da utilização de pigmentos naturais se torna notável, tanto para o consumidor final de determinado produto, que adquirirá melhorias em suas funções biológicas, quanto para a indústria, que por sua vez poderá vincular sua marca a produtos vantajosos, naturais e saudáveis (Volp *et al*, 2009).

São três as principais subdivisões de corantes naturais, tendo em vista sua estrutura química. São eles os heterocíclicos com estrutura tetrapirrólica, compostos pelas clorofilas presentes em vegetais, o grupo heme e as bilinas encontradas em animais, compostos heterocíclicos contendo oxigênio encontrados exclusivamente em vegetais como os flavonoides e os compostos de estrutura isoprenóide, os carotenóides, encontrados em animais, vegetais, etc., mas principalmente nos vegetais. Por fim há mais dois grupos de corantes exclusivos de vegetais, os taninos

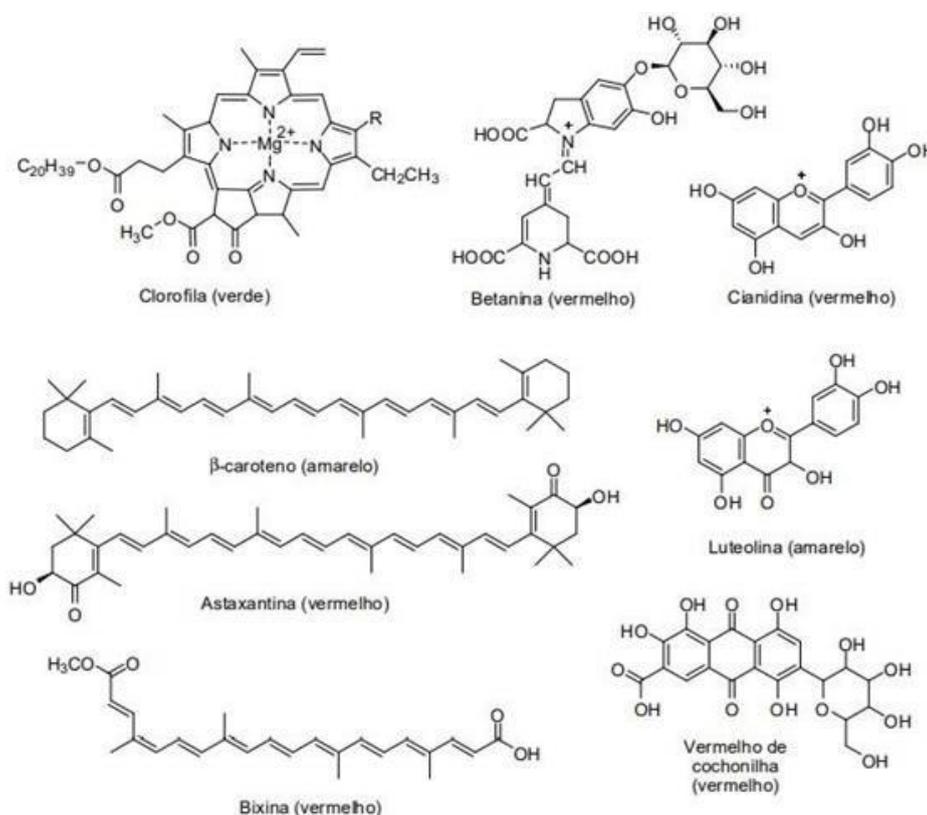
e as betalaínas (Bobbio, 1992). As cinco classes principais de corantes extraídos de animais e vegetais mais encontrados na natureza são: classe dos tetrapirróis, classe dos tetraterpenos ou carotenos, classe dos flavonóides, classe das antraquinonas e classe das betalaínas (**Tabela 1 e Figura 1**).

Tabela 1: Classes químicas dos principais corantes encontrados na natureza

Classe química	Corante/Espécie química responsável pela cor	Cor
Tetrapirrol	Clorofila	Verde
Tetraterpeno	β -caroteno Astaxantina Bixina	Amarelo Vermelho Vermelho
Flavonóide	Luteonina Cianidina	Amarelo Vermelho
Antraquinona	Ácido carmínico	Vermelho
Betalaína	Betanina	Vermelho

Fonte: Mendonça, 2011. Adaptado.

Figura 1: Estruturas químicas dos principais corantes na natureza



Fonte: Mendonça, 2011.

As maiores fontes de corantes naturais são os vegetais. Produzindo corantes através de todas as suas partes, raiz, caule, folhas, frutas e flores, de diversas cores como vermelho, preto, marrom, amarelo, verde e azul (Marques, 2022). Extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas, betalaínas e caroteno natural são os corantes mais utilizados pelas indústrias alimentícias. Os pigmentos derivados do urucum são principalmente cis-bixina e possuem um cromóforo com sistema de duplas ligações conjugadas, ligações estas que conferem a cor. O carmim é considerado excelente corante por ser estável e se encontra na classe das antraquinonas conferindo tons avermelhados em salsichas por exemplo. A curcumina apresenta coloração entre o amarelo e o laranja e pode ser associada a outros corantes, ela também possui características antioxidantes e antimicrobianas (Constant *et al*, 2002; Marques, 2022).

As antocianinas são encontradas naturalmente nos vegetais, são encarregadas de atribuir cores como vermelho, azul, roxo e laranja e compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal, o que permite que sejam inseridas em matrizes alimentícias de base aquosa. Representam um importante subgrupo da classe dos flavonoides e do ponto de vista químico são classificadas como compostos fenólicos. A unidade estrutural básica das antocianinas é o 2-fenil cromenílio que ainda pode ser classificado em outros compostos principais como: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina. Além disso, os açúcares podem se ligar à sua estrutura principal (Lopes *et al*, 2007; Wang *et al*, 2017; Lee *et al*, 2017; Marques, 2022).

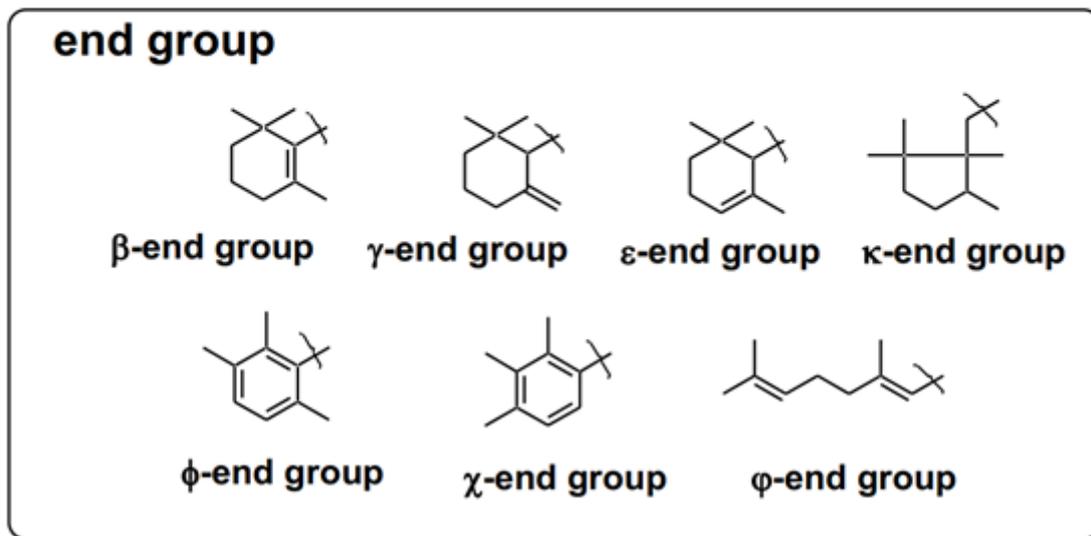
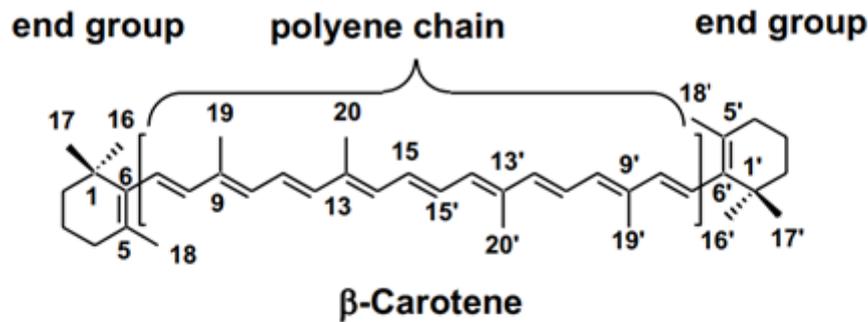
A estabilidade das antocianinas recebe interferência da sua própria estrutura química, conseqüentemente sua ação e cor também podem sofrer alterações. Isso devido à presença dos açúcares acilados, metoxil e grupos hidroxila, então quando a hidroxilação aumenta tons de azul são produzidos e a estabilidade é reduzida, e quando a metoxilação aumenta produz-se mais tons avermelhados e a estabilidade também aumenta. Além da estrutura, a estabilidade da cor das antocianinas também depende de fatores como a presença de oxigênio, variações de pH, temperatura e luz. Devido a propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras, as antocianinas possuem significativos benefícios para a saúde humana, atuando como reguladores da inflamação derivada da obesidade e suas doenças crônicas associadas, assim como proteção contra desordens neurodegenerativas e

cardiovasculares (Delgado-vargas *et al*, 2000; Mattioli *et al*, 2020; Lee *et al*, 2017; Rodriguez-amaya, 2019).

Betalaínas se assemelham às antocianinas e são encontradas exclusivamente em vegetais, sua estrutura fundamental é 1,7 diazoheptamelina. Dentre todas as Betalaínas conhecidas encontramos aquelas que são pigmentos vermelhos, conhecidas como betacianinas e aquelas que são pigmentos amarelos, as betaxantinas (Martins *et al*, 2022; Constant *et al*, 2002). As betalaínas também podem apresentar funções biológicas importantes, atuando como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. São encontradas principalmente na ordem dos vegetais Centrospermae, nesta ordem temos a beterraba como excelente exemplo de fonte de pigmentos. Da mesma forma que as antocianinas, a estabilidade das betalaínas depende do pH, com boa estabilidade entre os pHs 4 e 5. Além disso, a presença de luz e oxigênio também torna o pigmento instável. (Martins *et al*, 2022; Constant *et al*, 2002; Gandia-Herrero *et al*, 2016; Hadipour *et al*, 2020).

Diferente das antocianinas e da betalaínas os carotenóides (**Figura 2**) não são pigmentos exclusivos dos vegetais, além de responsáveis pelas cores laranja, vermelha e amarela de alimentos vegetais, como cenoura e tomate, também são encarregados da cor vermelha de crustáceos, como a lagosta, e peixes, como o salmão. Estão presentes no grupo dos tetraterpenos e sua estrutura geral é composta por uma cadeia de polieno com 9 duplas ligações conjugadas (localizadas no centro da molécula servem como cromóforos e são importantes para diversas funções, entretanto acabam tornando os carotenóides propensos a isomerização e oxidação) e um grupo final em ambas as extremidades da cadeia (Rodriguez-amaya *et al*, 2019; Maoka *et al*, 2020).

Figura 2: Estrutura básica dos carotenóides e os grupos finais das extremidades da cadeia de polieno. Pode ficar em inglês?



Fonte: Maoka, 2020. Adaptado.

Dentre outras funções na natureza as propriedades antioxidantes dos carotenóides se destacam. Ligadas aos grupos cromóforos conjugados de sua molécula desempenham papel crucial no combate aos radicais livres, sendo considerados benéficos para a saúde humana e conseqüentemente importantes comercialmente em indústrias nutracêuticas e em produtos alimentícios e cosméticos (Alvarez *et al*, 2014).

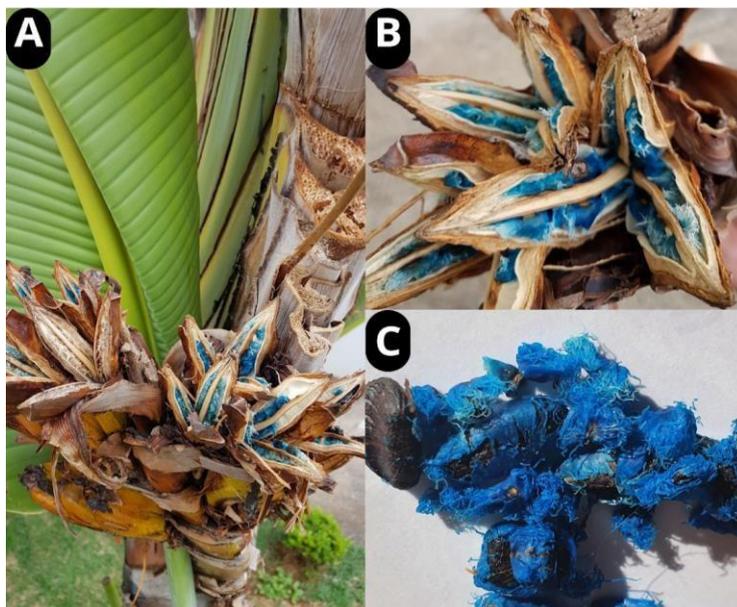
Apesar de os corantes naturais se mostrarem melhores para o consumo, nem todas as cores estão facilmente disponíveis na natureza, fontes naturais do corante azul são exemplos. As antocianinas, responsáveis pelas cores azuis e roxas de frutas e vegetais, são as únicas que apresentam *in natura* a tonalidade azul, mas possuem problemas de estabilidade. Sendo assim, para alcançar a cor e outras cores derivadas dela se torna necessário o uso de corantes azuis sintéticos (Renhe *et al*, 2008).

Ravenala madagascariensis (**Figura 3**), mais conhecida como árvore dos viajantes, é uma árvore da família *Strelitziaceae* nativa da ilha de Madagascar no continente africano, porém muito bem adaptada nos trópicos, crescendo bem na América, Ásia

e Austrália. Ela possui diversas utilidades, como em construções de casas, alimentação, ornamentação, fins medicinais no tratamento de doenças como diabetes, cáries dentárias, dores de estômago, hipertensão, diarreia, pedras renais, retenção de urina, e também fins estéticos, através de propriedades antioxidantes e inibitória de hialuronidase, enzima chave na saúde da pele, por exemplo (Rakotoarivelo *et al*, 2015; Duvalé *et al*, 2020; Suroowan *et al*, 2023; Mohamed *et al*, 2020).

A família na qual a *R. madagascariensis* está incluída possui mais dois gêneros que ocorrem em regiões tropicais: *Strelitzia* e *Phenakospermum*. As características morfológicas dessa família abrangem caule lenhoso; brácteas; coriáceas; e uma estrutura envolvendo as sementes chamada de arilo. A Ravenala por sua vez possui características marcantes que a diferem dos outros gêneros de sua família, como o tronco semelhante ao de uma palmeira, folhas semelhantes àsquelas das bananeiras, entretanto com uma disposição vertical, e suas sementes são envoltas por um arilo de cor azul (Cron *et al*, 2012).

Figura 3: Fotografias da árvore, baga e sementes de *Ravenala madagascariensis* envoltas por arilos azuis.



Legenda: A imagem ilustra a árvore (A), as bagas onde as sementes estão alojadas (B) e as sementes envoltas por arilos azuis (C) de *Ravenala madagascariensis*. **Fonte:** do autor, 2023.

Os arilos são estruturas que revestem a semente e são frequentemente coloridos. Sua função está relacionada com a polinização, através da atração de animais que

vão comer os arilos e dispersar as sementes. Na ilha de Madagascar, por exemplo, os lêmures desempenham o papel de polinizadores, eles são capazes de enxergar a cor azul dos arilos e são atraídos por ela (Melin *et al*, 2012).

Nosso interesse pelos arilos está voltado para o seu uso como fonte de pigmento, principalmente para aplicação em produtos de consumo humano, como formulações cosméticas por exemplo. A literatura relata seu uso como substituto de pigmentos sintéticos e o justifica através de sua origem natural e por exibir uma característica química que não é normalmente vista, a manutenção da coloração azul por muito tempo mesmo depois da morte celular, apresentando uma estabilidade notável (André & Garcia, 2017; Pirone, 2010).

O uso dos integrantes da família *Strelitziaceae* em produtos cosméticos já foi abordado em diversas patentes no mercado mundial. O extrato de partes da árvore *R. madagascariensis* ricas em seiva, particularmente folhas jovens, foi utilizado na invenção de Renimel & André em 2014. Foi produzido pelos inventores um cosmético de *skincare* com o extrato das folhas jovens de *R. madagascariensis* como agente ativo capaz de restaurar, manter e reforçar o estado de hidratação da pele, e também capaz de atuar como produto *anti-ageing*.

Os arilos da família *Strelitziaceae* também já tiveram seu uso relatado em patentes, como o extrato dos arilos da espécie *Strelitzia nicolai*, utilizado como agente ativo em formulações cosméticas para reduzir a pigmentação de olheiras (Gruber & Ludwig, 2013). Assim como, o extrato de arilos de *R. madagascariensis*, aplicado como corante de origem natural em composições cerosas, sólidas ou pastosas relacionadas à maquiagem da pele (André & Garcia, 2017). Entretanto, ainda não é totalmente elucidada a origem química da pigmentação destas estruturas.

Em seu trabalho, Pirone associa a coloração laranja presente nos arilos de *Strelitzia nicolai* com a presença de bilirrubina, um tetrapirrol cíclico onipresente em animais, mas não identificado em plantas anteriormente. Após identificar este tetrapirrol na espécie, Pirone ampliou sua investigação e também evidenciou a presença de bilirrubinas nos arilos azuis de *Ravenala madagascariensis*, não associando, entretanto, a coloração dos arilos a sua presença (Pirone, 2010).

Devido à ausência de dados na literatura que definem a origem da coloração dos arilos, sua aplicação efetiva em cosméticos e os seus efeitos, o objetivo deste trabalho se concentra na investigação da composição química do componente presente nos arilos que confere a coloração azul característica dessa estrutura.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Analisar a natureza química dos pigmentos dos arilos de *R. madagascariensis*, padronizando sua obtenção para aplicação para produtos de uso humano.

2.2. Específicos

- 1) Caracterizar morfológicamente as sementes e os arilos da espécie *R. madagascariensis*;
- 2) Padronizar os extratos vegetais a serem empregados nos ensaios e avaliar a natureza química dos pigmentos azuis;
- 3) Avaliar a natureza química dos metabólitos secundários dos extratos
- 4) Analisar quali e quantitativamente a presença de metabólitos primários nos extratos
- 5) Avaliar a composição centesimal dos arilos de *R. madagascariensis*
- 6) Analisar a toxicidade dos extratos padronizados dos Arilos.

3. DESENHO EXPERIMENTAL

3.1. Material Vegetal

As amostras dos arilos azuis utilizados foram coletadas do vegetal *Ravenala madagascariensis* situadas na cidade de Juiz de Fora – MG. Os arilos foram processados manualmente, separados das sementes e armazenados em temperatura ambiente. Uma exsicata da planta já havia sido enviada para o Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora. A amostra com número de depósito CESJ 63816, foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Gonçalves Salimena.

3.2. Análise por microscopia óptica de campo claro e de fluorescência

Para a avaliação por microscopia óptica os arilos secos foram reidratados em solução de hidratação em concentração 5:4:1 de água destilada, álcool etílico 96% e glicerina respectivamente e 5 gotas de detergente, em temperatura ambiente por 3 dias. Após o período de incubação na solução, os arilos foram cortados transversalmente em micrótomo de Ranvier, colocados em lâmina com água e cobertos com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX 41 com câmera fotográfica Power Shot A640 Cannon® acoplada. As análises foram conduzidas no Laboratório de Anatomia Vegetal no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) sob a supervisão da Dr^a Nádia Sílvia Somavilla.

O preparo das amostras para a análise por microscopia de fluorescência consistiu no corte de fibras dos arilos frescos com estilete. As fibras cortadas foram colocadas em lâminas e cobertas com lamínulas. As lâminas foram observadas em microscópio BX 51 com câmera fotográfica Power Shot A640 Cannon® acoplada, com a utilização de filtro DAPI. As análises foram conduzidas no Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

3.3. Análise por microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar os aspectos morfológicos e composição química dos arilos. Foram analisadas fibras de arilos azuis ainda presas às sementes, para avaliar a morfologia destas, e também o extrato dos arilos azuis em SDS 10% (0,1g de arilos em 5ml de solução de SDS 10%) liofilizado. As sementes foram levadas sem nenhum preparo prévio ao microscópio. As análises foram conduzidas em Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada TM3030 Hitachi® com módulo EDS SwiftED3000 no Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CentralBio) da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.4. Seleção de faixa de pH e comprimento de onda de máxima absorção da luz UV-VIS do extrato dos arilos em SDS.

Para a seleção da melhor extração foram definidas faixas de pH e comprimento de onda específicas durante o planejamento fatorial. A densidade óptica (DO), que se tornou a métrica para o padrão de resposta no planejamento fatorial, foi escolhida a partir da varredura das amostras em espectrofotômetro e identificação da DO de

máxima absorção do extrato, encontrada por volta de 620nm. Enquanto a faixa de pH foi avaliada através de testes com variação de pH entre o ácido e o básico. O extrato básico foi regulado utilizando-se o sal TRIS e o extrato ácido foi regulado com HCl 0,5M (**Figura 8**). Analisando a densidades ópticas destas amostras obteve-se a faixa de pH mais indicada para o planejamento fatorial. O extrator dodecil sulfato de sódio (SDS) foi escolhido devido a hipótese de que a coloração observada nos arilos pode estar relacionada à presença de cromoproteínas, já que é um detergente iônico capaz de extrair proteínas em amostras biológicas.

3.5. Planejamento fatorial da extração do pigmento azul

Para identificar a via de extração mais apropriada para as amostras foi feito um planejamento fatorial dos experimentos. Este planejamento envolveu a organização do desenho experimental, a compilação de dados e a otimização do experimento. Inicialmente, já que a resposta das amostras às variáveis era desconhecida, foi realizado um ensaio exploratório no modelo 2^3 (**Tabela 2**) com a análise de três fatores, tempo; pH e concentração de SDS e dois níveis, superior (+) e inferior (-). Neste primeiro ensaio foram avaliadas variações de tempo em 24h e 48h, de pH em valores entre 5 e 6 e entre 8 e 9 e da concentração do extrator SDS em 2% e 10%. Foram pesados 0,1g de arilos in natura previamente tratados com hexano em tubos falcon e adicionados 5ml de solução extratora (SDS 2% ou 10% solubilizado em água deionizada). As amostras foram maceradas com o auxílio da ferramenta *Potter*. O pH foi verificado utilizando-se potenciômetro de bancada, os valores de pH foram ajustados utilizando-se sal TRIS para regulação básica ou Ácido clorídrico 0,5M para ajuste ácido. Após os ajustes de pH as amostras foram levadas ao banho ultrassom por 15 minutos e armazenadas em temperatura ambiente por 24h ou 48h. O tratamento com hexano foi feito como tentativa de retirar o componente ceroso dos arilos e assim melhorar a extração do pigmento. Foi pesado 1g de arilos em um béquer e adicionados 15ml de hexano P.A. A solução foi mantida em temperatura ambiente até a secagem da amostra e o processo foi repetido mais duas vezes. As amostras foram preparadas de forma randomizada, seguindo ordem de sorteio segundo a tabela abaixo.

Tabela 2: Planejamento fatorial exploratório 2^3 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de *R. madagascariensis*

AMOSTRA	TEMPO	SDS	pH
5	24h	2%	5-6
6	48h	2%	5-6
3	24h	10%	5-6
2	48h	10%	5-6
8	24h	2%	8-9
1	48h	2%	8-9
7	24h	10%	8-9
4	48h	10%	8-9

A partir dos resultados do ensaio exploratório foi desenvolvido um segundo ensaio, uma modelagem de planejamento 3^2 (**Tabela 3**), com a avaliação de dois fatores, variação de pH e variação de concentração de SDS, em três níveis, inferior (-), intermediário (0) e superior (+). O tempo foi então fixado em 24h por não apresentar significância estatística em suas variações. A densidade óptica foi então avaliada em soluções de pH 8; 8,5 e 9 e com concentração de extrator variando entre 9%, 10% e 11%. O preparo das amostras foi feito seguindo o padrão do ensaio exploratório. No plano fatorial as repetições dos pontos centrais são as replicatas do modelo, a partir destes foram feitos os cálculos estatísticos de média, variância e erro padrão. As amostras do segundo ensaio também foram preparadas de forma randomizada, seguindo ordem de sorteio. A avaliação em ambos os ensaios foi realizada por medição do espectro de emissão da cor azul com varredura em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Device) entre 400nm e 750nm.

Tabela 3: Planejamento fatorial de modelagem 3^2 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de *R. madagascariensis*

AMOSTRA	TEMPO (fixo)	SDS	pH
3	24h	9%	6
6	24h	10%	6
9	24h	11%	6
8	24h	11%	5,5
4	24h	10%	5
11	24h	10%	5,5
10	24h	10%	5,5
1	24h	9%	5
7	24h	11%	5
2	24h	9%	5,5
5	24h	10%	5,5

3.6. Preparo das amostras para análise fitoquímica

Foram preparados extratos dos arilos de *R. madagascariensis* com diferentes polaridades nos seguintes solventes: hexano (apolar), etanol (polaridade intermediária) e em SDS 10% (polar), adicionando-se 1g de arilos frescos em 3 tubos falcon, aos quais acrescentou-se separadamente 10mL dos diferentes tipos de solvente (Hexano, Etanol e SDS 10%). A produção dos extratos foi realizada por maceração estática. Os arilos foram deixados 24 horas no solvente, sendo em seguida, centrifugados a 2.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e armazenado em um béquer tarado identificado. Este processo foi repetido 3 vezes para os extratos hexânico e etanólico. Após o processo, os extratos foram secos para

a obtenção do rendimento e armazenados com proteção contra luz e em refrigeração. Os extratos em SDS 10% passaram pelo mesmo processo dos extratos orgânicos, entretanto não houve repetição. A maceração estática foi realizada com 10ml de solvente durante 24 horas, em seguida, o material foi centrifugado a 2.000rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado para um béquer tarado identificado e a secagem ocorreu em capela e em temperatura ambiente.

3.7. Análise fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar, para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários, foi feita seguindo protocolo descrito por Matos (1997), com modificações. As soluções foram preparadas na concentração de 10mg/mL (40 mg de cada amostra em 4ml de MeOH) para a identificação de alcalóides pelo método de precipitação com os reagentes Dragendorff, Hager e Mayer; triterpenos e esteróides através do método de Liebermann-Burchard; cumarinas utilizando solução de KOH 10%; compostos fenólicos com solução de FeCl₃ 3%; flavonoides com solução de AlCl₃ 5%; antraquinonas através de solução de NaOH 0,5M; saponinas através do índice de espuma e taninos utilizando solução de gelatina. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

3.7.1. Alcalóides

Em uma microplaca foram utilizados 3 poços, com 150µl de amostra e 50µl dos diferentes reagentes utilizados para identificação de alcalóides em cada poço, reativos de Hager, Mayer e Dragendorff. O resultado foi marcado pelo aparecimento (positivo) ou não (negativo) de precipitado ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff.

3.7.2. Triterpenos e Esteróides

150µl de amostra foram adicionados em uma microplaca. Em seguida, acrescentamos 1 gota de anidrido acético e 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O indicativo para o resultado positivo para a presença de esteróides foi o aparecimento de cor azul-esverdeada e para a presença de triterpenóides a cor vermelha.

3.7.3. Cumarinas

A amostra foi gotejada em uma tira de papel de filtro. Em seguida, foi adicionada 1 gota da solução de KOH a 10% na tira. Após secagem em temperatura ambiente a tira de papel de filtro foi observada em luz UV 365nm. O aparecimento de fluorescência de cor azulada foi indicativo da presença de cumarinas.

3.7.4. Compostos fenólicos

A amostra foi gotejada em uma tira de papel de filtro, seguida de uma solução de FeCl₃ a 2%. A presença de compostos fenólicos é indicada pelo aparecimento de uma mancha azul escura.

3.7.5. Flavonóides

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada e em seguida adicionada uma solução de AlCl₃ 5%. O papel foi observado sob luz UV 365nm. A presença de flavonóides foi indicada pelo aparecimento de fluorescência de cor amarela.

3.7.6. Antraquinonas

Em uma microplaca foram adicionados 150µl da amostra e 50µl de NaOH 0,5M. O resultado positivo para a presença de antraquinonas foi marcado pelo aparecimento de coloração vermelha na solução.

3.8. Determinação do conteúdo de flavonóides

O conteúdo de flavonóides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas e colaboradores (2004), com algumas modificações. A rotina foi utilizada como padrão. A curva de calibração foi preparada, utilizando-se alíquotas de 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2mL de uma solução etanólica de rutina (0,5mg/mL). Adicionou-se a quantidade de etanol necessária para obter 4,8mL em cada tubo, e uma gota de ácido acético glacial. Posteriormente, adicionou-se 0,2mL de uma solução etanólica de cloreto de alumínio 2%, totalizando 5mL em cada tubo. O branco foi preparado da mesma forma que a amostra, porém substituindo a solução etanólica de cloreto de alumínio a 2% por etanol. Após 40min de incubação, a 20°C e ao abrigo da luz, as absorbâncias foram medidas a 415nm no espectrofotômetro.

Para o doseamento dos extratos foi preparada uma solução estoque a 500µg/mL em etanol para os extratos orgânicos e foi feita uma diluição de 1:10 em etanol para os extratos em SDS 10%. Dessas soluções pipetou-se 0,2mL para uma série de tubos

de ensaio devidamente identificados e foram adicionados 4,6mL de etanol, 1 gota de ácido acético glacial e 0,2mL da solução etanólica de cloreto de alumínio a 2%, obtendo-se uma solução de 5mL em cada tubo. O branco foi preparado com 0,2mL da amostra, 1 gota de ácido acético e diluído para 5mL com etanol. Após 40 min de incubação, a 20°C e ao abrigo da luz, as absorvâncias das soluções foram registradas em espectrofotômetro a 415nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de rutina (ER).

3.9. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

A determinação do teor de fenóis foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (Dowd,1959; Folin & Ciocalteu,1927). O ácido tânico foi utilizado como padrão. A curva de calibração foi preparada, com concentrações variando de 7,5 a 350 μ g/mL de uma solução metanólica de ácido tânico (500 μ g/mL). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 μ L do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 μ L da amostra e 100 μ L de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30min de incubação ao abrigo da luz, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 770nm.

Para o doseamento dos extratos foi preparada uma solução estoque a 500 μ g/mL dos extratos orgânicos em metanol e foi feita uma diluição de 1:10 em metanol para os extratos em SDS 10%. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 μ L do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 μ L da amostra e 100 μ L de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30min de incubação ao abrigo da luz, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 770nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

3.10. Cromatografia em camada delgada para análise de fitoconstituintes, peptídeos e de capacidade antioxidante

Para a realização da cromatografia de camada delgada foram preparados extratos orgânicos (hexânico e etanólico) e em SDS 10% através de maceração estática.

Cerca de 100 mg dos extratos orgânicos foram diluídos em 1000µL de metanol P.A. (Concentração final= 100mg/mL). Para os extratos em SDS 10%, 100µL dos extratos brutos foram diluídos em 1000µL de metanol P.A. Foram feitas análises para a presença de Cumarinas e peptídeos e para a atividade antioxidante das amostras. Foram aplicados cerca de 10µL de cada amostra em cromatoplaça de sílica gel (F254) por meio de capilar de vidro. As cromatoplaças foram eluídas em cuba cromatográfica saturada, utilizando-se fases móveis e reagentes reveladores para cada componente investigado.

As Cumarinas foram investigadas com o uso de uma solução de éter e tolueno 50:50 (V/V) como fase móvel, a cumarina preparada em metanol P.A. como padrão e o hidróxido de potássio a 10% como revelador. O resultado foi observado através da visualização da placa em luz UV 365nm, com fluorescência esverdeada como indicativo de resultado positivo. A análise de peptídeos e atividade antioxidante foi realizada com fase móvel composta por uma mistura de hexano, acetato de etila e solução de NaOH a 0,5M 50:50:01 (V/V/V). Como reagente revelador para a presença de peptídeos foi utilizada a Ninidrina 0,5% e para a atividade antioxidante o revelador foi o DPPH a 0,01%.

3.11. Análises centesimais

Todas as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.11.1. Umidade

A determinação da umidade foi feita por secagem à pressão atmosférica, método baseado na determinação de perda de massa por secagem em condições especificadas de temperatura e tempo. A metodologia segue o protocolo descrito no manual de Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz, 2008, com adaptações. Foram pesados aproximadamente 0,5g dos arilos em placa de petri previamente tarada. O material foi seco em estufa a 105°C aproximadamente junto com areia purificada por 2 horas, em seguida, foi retirado da estufa, resfriado em dessecador e pesado. As operações de secagem foram repetidas durante 30

minutos e as de resfriamento até que o peso entre duas secagens tivesse uma diferença menor ou igual a 2mg. A umidade %m/m foi calculada por meio da fórmula:

$$(N \times 100) \div P = \text{umidade \% m/m}$$

Sendo: N: a perda de massa em g

P: massa da amostra em g

3.11.2. Lipídios

A determinação de lipídios nos arilos foi feita através da digestão direta em Soxhlet (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Foram pesados aproximadamente 2g de arilos em um cartucho de Soxhlet, que foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Este extrator foi acoplado a um balão de fundo chato previamente tarado a 105°C e adicionado de éter o suficiente para um Soxhlet e meio. O material foi então mantido sob aquecimento em chapa elétrica à extração contínua por 8 horas (com 4 a 5 gotas por segundo). Em seguida, o cartucho foi retirado, o éter destilado e o balão com o resíduo extraído foi levado para uma estufa a 105°C por cerca de 1 hora. Por fim, o material foi novamente pesado e as operações de aquecimento foram repetidas por 30 minutos na estufa e as de resfriamento até o peso constante por 2 horas. O teor de lipídios em % m/m foi calculado por meio da fórmula:

$$(100 \times N) \div P = \text{lipídios \% m/m}$$

Onde: N= número de gramas de lipídios

P= número de gramas da amostra

3.11.3. Proteínas

Para determinar a matéria nitrogenada total dos arilos foi aplicado o método de Kjeldahl (Costa *et al*, 2019) em 3 etapas: digestão, destilação e titulação. Os arilos foram digeridos em ácido sulfúrico, na presença dos catalisadores sulfato de potássio P.A. e sulfato de cobre P.A., a quente no digestor em capela de exaustão. A digestão ocorreu em temperatura moderada (50°C) inicialmente, com seu aumento até 380°C após o escurecimento do material. Após o material adquirir cor esverdeada o aquecimento foi mantido por mais 30 minutos. A amostra foi então retirada do digestor e resfriada em temperatura ambiente e acrescida de 30ml de água destilada para a

dissolução do digerido. Em seguida o digerido dissolvido foi transferido para o destilador, onde foi feita uma destilação por arraste de vapor, até o recolhimento de aproximadamente 100ml do destilado. Nesta etapa na saída do condensador foi encaixado um Erlenmeyer de 250ml contendo 10ml de solução de ácido ortobórico 4% (m/v) com indicador misto para Kjeldahl. O destilado por sua vez foi titulado através de solução de ácido clorídrico 0,05mol/L com o ponto de parada indicado pela mudança da cor verde para a roxa. Água destilada foi utilizada durante o processo como prova em branco. O teor percentual de nitrogênio total foi calculado por meio da fórmula:

$$\{(A - B) \times Ci\} \times fc \times 1,4 \div g = \% NT$$

Sendo: % NT: teor percentual (m/m) de nitrogênio total;

A: volume gasto na titulação da amostra;

B: volume gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

fc: fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g: porção da alíquota da amostra.

3.11.4. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi obtido através de incineração (Costa *et al*, 2019) 5g de arilos foram pesados em uma cápsula previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Em seguida, a cápsula foi levada para uma chapa elétrica para secagem. A amostra foi carbonizada em temperatura baixa, incinerada em mufla a 550°C até a eliminação completa do carvão e resfriada em dessecador até a temperatura ambiente. Após o resfriamento a amostra foi pesada. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até o peso constante. O teor de cinzas %m/m foi calculado segundo a fórmula:

$$\frac{(100 \times N)}{P} = \text{cinzas \% m/m}$$

Onde: N = número de g de cinzas

P= número de g da amostra

3.11.5. Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido através de diferença matemática entre os teores de umidade, cinzas, lipídios e proteínas segundo a fórmula:

$$100 - \text{umidade} - \text{lipídios} - \text{proteínas} - \text{cinzas} = \text{teor de carboidratos}$$

3.12. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi desenvolvida para calcular com segurança o conteúdo proteico que seria posteriormente aplicado nos testes de citotoxicidade *in vitro*. Assim, a dosagem foi feita através de um ensaio de detecção colorimétrica em microplaca do kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit, já que devido à incompatibilidades com o SDS presente no extrato os outros métodos para dosagem, como o método de Bradford por exemplo, não foram efetivamente aplicáveis (Zaia, 1998). O ensaio foi desenvolvido seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente foram preparados os padrões de albumina, diluídos em água deionizada, para compor a curva de concentração proteica. A amostra utilizada foi o extrato padronizado dos arilos em SDS 10% (0,1g em 5ml de solução). O ensaio foi realizado em triplicatas.

3.13. Caracterização proteica do pigmento azul por Eletroforese

O conteúdo proteico dos extratos de *R. madagascariensis* foi avaliado através de eletroforese em gel desnaturante. O extrato padronizado dos arilos em SDS 10% foi primeiramente precipitado utilizando-se o ácido tricloroacético (TCA). Em microtubos foram adicionados 900µl da amostra acrescidos de 100µl de TCA. As amostras foram centrifugadas a 8000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, foram adicionados ao microtubo mais 900µl de água destilada e 100µl de TCA e a amostra foi novamente centrifugada. Após a remoção do sobrenadante foi realizada a lavagem do pellet com adição de 1ml de água destilada, homogeneização e centrifugação a 8000rpm por 15 minutos, o processo de lavagem foi repetido 3 vezes. Após a precipitação o pellet resultante foi ressuscitado em tampão de amostra para eletroforese, composto por Tris-HCl (0,2M pH 6,8), glicerol 15% (v/v), SDS 3% (w/v) e azul de bromofenol 0,01% (w/v).

A eletroforese foi conduzida utilizando-se o sistema do tipo horizontal em suporte Amersham ECL Box GE Healthcare com gel pronto de mesma marca com concentração de SDS de 8-16%. O gel passou por uma pré-corrída de 12 minutos a 160V antes da aplicação das amostras imerso em tampão de corrida Amersham ECL Gel 10X 1:10 em água destilada, seguindo orientação do fabricante. Em seguida, foram aplicadas no gel as amostras e o padrão de peso molecular Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard com intervalo entre 3,5 - 260kDa.

A corrida eletroforética foi realizada em uma voltagem de 140 por 60 minutos. Após este tempo o gel foi submerso em 1L de solução fixadora, composta por etanol, ácido acético e água destilada 40:10:50 (v/v) durante 30 minutos. Na sequência, o gel foi corado com coloração Comassie Brilliant Blue R-250 0,01% com etanol 25% (v/v) e ácido acético 5% (v/v) submerso em solução por 10 minutos. O gel foi então lavado com água destilada a fim de remover o corante em excesso, e aplicado em solução descorante, composta por ácido acético 8% (v/v), etanol absoluto 25% (v/v) e água destilada 67% (v/v) até a visualização das bandas, sob agitação de 60rpm em bandeja agitadora. Por fim, o gel foi levado a uma solução de conservação, composta por glicerol e água destilada 87:13 (v/v), durante mais 30 minutos.

3.14. Caracterização proteica por Espectrometria de Massas

A análise preliminar para identificação de proteínas presentes em extrato de arilos de *Ravenala madagascariensis* foi feita através da digestão in gel e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os peptídeos encontrados tiveram suas sequências estipuladas por sequenciamento *de novo* pelo software PEAKs v8.5. Após identificação, os peptídeos passaram por uma análise BLAST e um alinhamento com a sequência THU71878.1 de *Musa balbisiana*.

As bandas do gel identificadas na Eletroforese com aproximadamente 14kDa foram excisadas e submetidas a análise por espectrometria de massas. Inicialmente as amostras passaram por tratamento prévio e por uma digestão in gel pela enzima tripsina. Os peptídeos tripticos resultantes foram ressuspensos em 20µL de solução de ácido trifluoroacético 0,1% Fluka®. Em seguida, 5µL foram injetados utilizando o sistema nano UHPLC UltiMate® 3000 (Dionex®) equipado com coluna Nano-Trap Acclaim PepMap100 C18 (100µm i.d. × 2cm, 5µm, 100 Å; Thermo Scientific®) e coluna capilar Acclaim PepMap100 C18 RSLC (75µm i.d. × 15cm, 2µm, 100Å; Thermo

Scientific®). Os peptídeos foram, inicialmente, retidos no trap utilizando fase móvel composta de ACN 2% com TFA 0,05% e, depois de passados 3 minutos, foram eluídos a uma vazão de $3\mu\text{L. min}^{-1}$. Estes peptídeos eluídos foram submetidos à separação cromatográfica em coluna C18 utilizando-se fase móvel, composta por ácido fórmico 0,1%, ACN 80% e ácido fórmico 0,1%, com vazão de $0,300\mu\text{L. min}^{-1}$ sob modo gradiente de 4 a 90% de ACN em 61min, à 40°C .

O nanoUHPLC é um sistema acoplado ao instrumento Q-Exactive Thermo Scientific® através de uma fonte Nanospray Flex Ion Thermo Scientific®, realizando a análise por espectrometria de massas dos peptídeos eluídos. A fonte Nanospray Flex Ion é equipada com emitter de aço-inoxidável nano-bore ($150\mu\text{m o.d.} \times 30\mu\text{m i.d.}$, Proxeon, Thermo Scientific®) e operou sob voltagem de 1,9kV, no modo positivo com temperatura de 250°C . Foi realizada uma varredura no modo *scan* à uma resolução de 70.000 com tempo máximo de injeção de 100ms e acúmulo de íons no valor de 3×10^6 . Neste equipamento o processo de fragmentação de íons ocorre na cela de *higher-energy collisional dissociation* (HCD) e, neste método foram selecionados os 12 íons mais intensos monitorados na faixa de 300-2.000m/z, com carga ≥ 2 e ≤ 5 , que foram isolados em uma faixa de 2m/z antes de serem fragmentados, com energia de colisão normalizada em 30V. Os espectros MS/MS gerados foram adquiridos com resolução de 17.500, com tempo máximo de injeção de 150ms e acúmulo de íons no valor de 5×10^5 íons. O tempo de exclusão utilizado foi de 40 segundos. Em seguida, o espectro de massas obtido foi submetido à busca em banco de dados através do *software* PEAKs v8.5. Após a identificação dos peptídeos foi realizada uma análise BLAST e um alinhamento com a sequência THU71878.1 de *Musa balbisiana*.

3.15. Espectroscopia Raman dos arilos azuis de *Ravenala madagascariensis*

A técnica de Raman possui fundamento no processo de interação entre a matéria e a radiação. Esta é realizada por processos de espalhamento de luz através da matéria. Dessa forma, quando a luz monocromática incide na matéria ela pode ser absorvida, espalhada ou transmitida. A intensidade da luz que é espalhada é proporcional ao quadrado da polarização. A técnica é então dependente da simetria das oscilações atômicas que acabam modificando a polarização do meio. Os espectros Raman foram obtidos diretamente dos arilos da planta, e podem ser

observados um com 256 varreduras, e outro com 512 varreduras. Foi utilizado equipamento Bruker modelo RFS100, com transformada de Fourier, excitado com laser em 1064nm (NeYAG), potência nominal do laser na amostra de 175mW, detetor de germânio resfriado com nitrogênio líquido, e com resolução espectral de 4cm⁻¹. Os ensaios foram conduzidos no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (Neem) do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a supervisão do Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

3.16. Atividade biológica *in vitro* (Citotoxicidade *in vitro*)

No presente estudo foi utilizada a seguinte linhagem: linha de fibroblasto L929 (derivado de tecido conjuntivo de camundongo) (CCL-1™)

3.16.1. Cultura de Células

As células estavam criopreservadas em meio de congelamento composto por 90% de SFB e 10% de DMSO. O descongelamento aconteceu a 37°C e as células foram transferidas para tubo falcon de 50mL contendo meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) e foram centrifugadas (1400rpm, por 10min a 4°C). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura suplementado (10% de SFB + 1% de antibiótico + 0,1% 2-mercaptoetanol). Em seguida, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25cm² e incubadas à temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A cada dois ou três dias, realizou-se a troca do meio de cultura, monitorando as células até alcançarem confluência de aproximadamente 80%, quando então foram transferidas para garrafas maiores (75cm²). Para a retirada das células foi utilizado o tratamento com solução de tripsina-EDTA (0,25%) por 3 a 5 minutos em 37 °C.

Após um período de incubação de aproximadamente 3 dias, as células foram ressuspensionadas em meio RPMI suplementado e foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán, e transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de 10⁴ células por poço, em um volume final de 100µL. As células foram então incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A segunda etapa do ensaio consistiu na remoção do meio de cultura presente, com consequente retirada de células mortas, e adição de 200µL de meio de cultura

suplementado (5% de SFB + 1% de antibiótico + 0,1% 2-mercaptoetanol) contendo o tratamento em seis diferentes concentrações (800; 400; 200; 100; 50; 25µg/mL) em quadruplicata. Todas as placas continham controles não tratados (apenas meio de cultura) e controle do solvente utilizado no preparo das substâncias (SDS 10%). Seguiu-se uma nova incubação por 24 horas, quando então foi realizado o ensaio de MTT (Teste de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Os ensaios foram conduzidos no Departamento de Parasitologia Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora sob a supervisão do Dr. Gilson Costa Macedo.

3.16.2. Avaliação da Viabilidade Celular pelo Teste de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100µL de uma solução contendo meio de cultura (RPMI) e 10% (v/v) do reagente MTT (5mg/mL). A placa foi incubada por um período de 2 horas e 30 minutos em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (RISS *et al*, 2016). Ao final deste intervalo, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Para calcular a viabilidade foi utilizada a equação mostrada abaixo:

$$Viabilidade (\%) = 100 \times DO_{595a} \div DO_{595CTe}$$

Onde:

DO_{595a}: valor médio da densidade óptica das amostras testadas

DO_{595CTe}: valor médio da densidade óptica do controle estimulado e não tratado (CTe).

Fonte: ISO 10993-5:2009

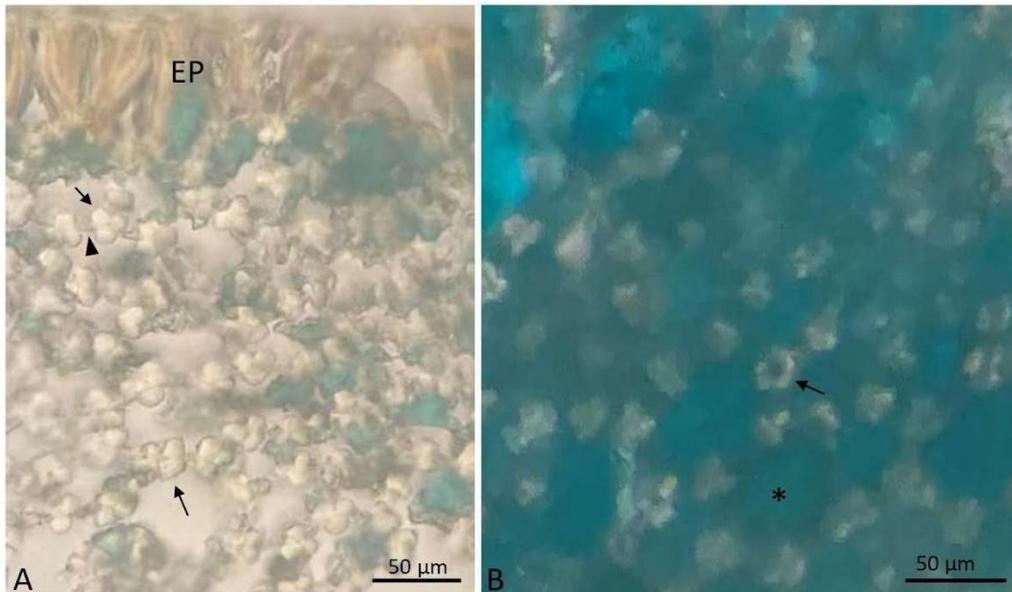
4. RESULTADOS

4.1. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência

Os cortes transversais mostraram uma epiderme de células alongadas com paredes espessadas e coloração amarelada. O parênquima apresenta células isodiamétricas

com espessamentos nos ângulos das células, opostos aos espaços intercelulares (Figura 4).

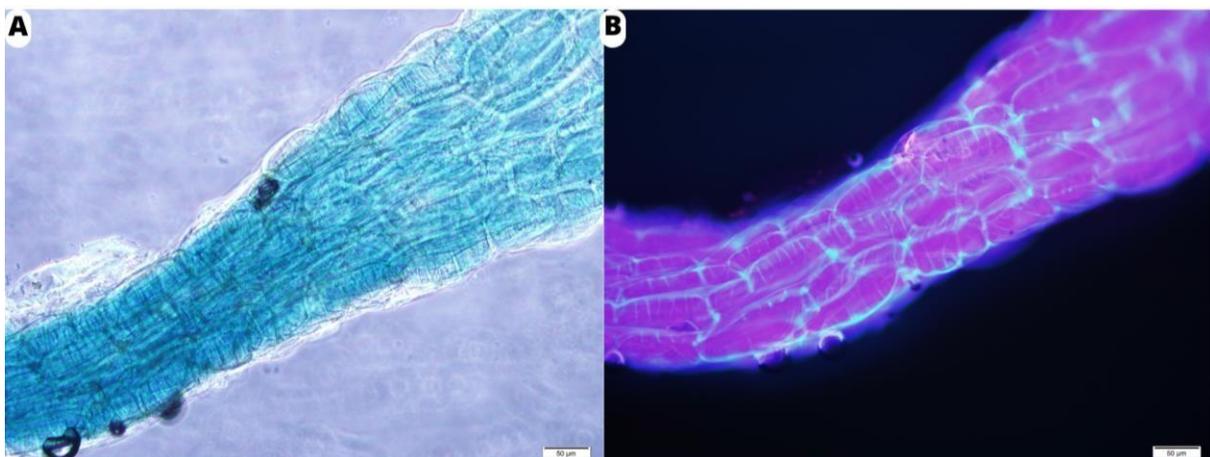
Figura 4 - Avaliação histológica de cortes transversais dos arilos de *Ravenala madagascariensis*.



Legenda - Cortes transversais de arilo de *Ravenala madagascariensis*. sem uso de corantes. A. Células sem conteúdo. B. Células com conteúdo (*). EP: Epiderme. Setas: Espessamento das paredes das células parenquimáticas. Cabeça de seta: Paredes celulares finas nas células do parênquima.

A análise por microscopia óptica com emissão de fluorescência (Figura 5) de uma fibra de arilo, por sua vez, levou a identificação da característica fluorescente das amostras por toda a extensão da fibra.

Figura 5 - Fibra de arilo em campo claro e avaliação da emissão de fluorescência dos arilos de *R. madagascariensis* observados por microscopia óptica.

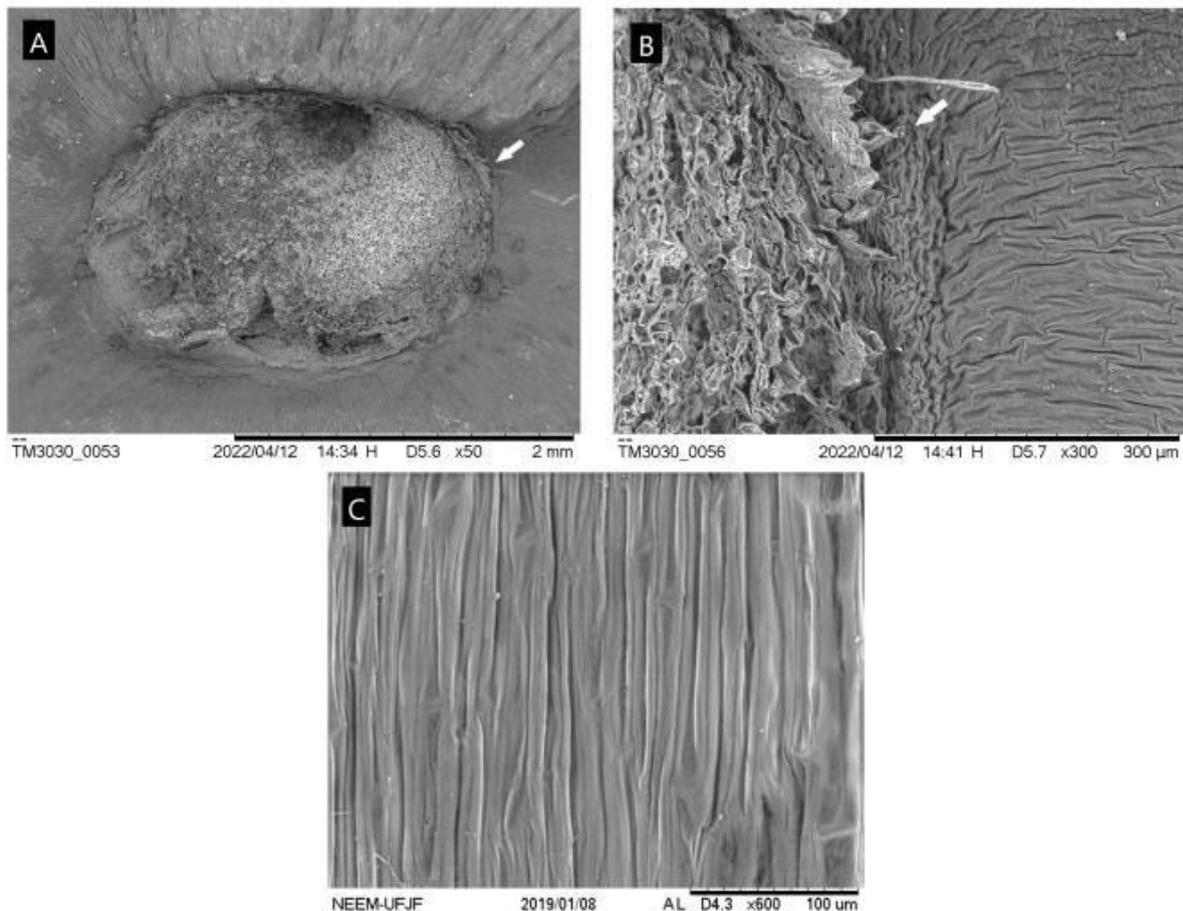


Legenda: Em **(A)** Microscopia óptica de campo claro da fibra de Arilo azul de *R. madagascariensis*. Em **(B)** Análise de fluorescência da fibra de Arilo azul por microscopia óptica, com utilização de filtro DAPI.

4.2. Microscopia eletrônica de varredura

A partir da visualização das amostras de arilo azul, sem nenhum tratamento prévio, foi possível determinar a composição de 86% de carbono, 11% de oxigênio e 3% de silício na amostra. Enquanto o extrato liofilizado apresentou composição de 52% de carbono, 18% de oxigênio, 3% de sódio, 11% de alumínio, 7% de enxofre e 6% de nitrogênio (**Figuras 6 e 7**).

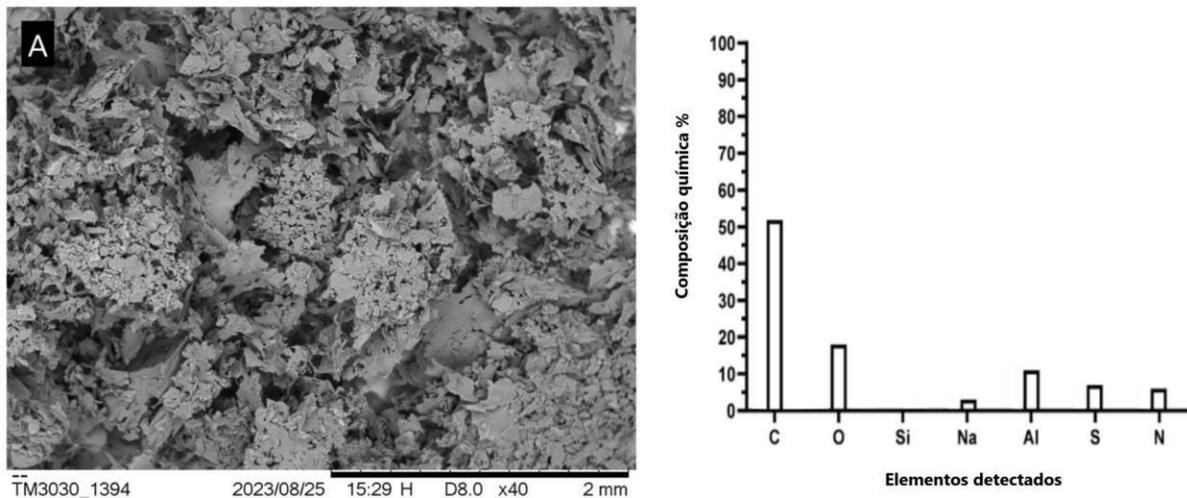
Figura 6 – Aspectos gerais do extrato das fibras de arilo azul de *Ravenala madagascariensis* e sua inserção na semente



Legenda: Aspectos morfológicos das estruturas dos arilos de *R. madagascariensis* observados por MEV. **(A)** Destaque para a parte central da semente de onde as estruturas celulares que compõem os arilos estão surgindo (seta branca). Em **(B)**, aumento e foco na inserção dos arilos na semente. Em **(C)** aspectos das células que compõem os arilos em

maior aumento, os compartimentos são homoganeamente distribuídos ao longo da extensão dos arilos.

Figura 7- Microscopia eletrônica do extrato liofilizado de arilos de *R. madagascariensis* e gráfico com composição da amostra em %

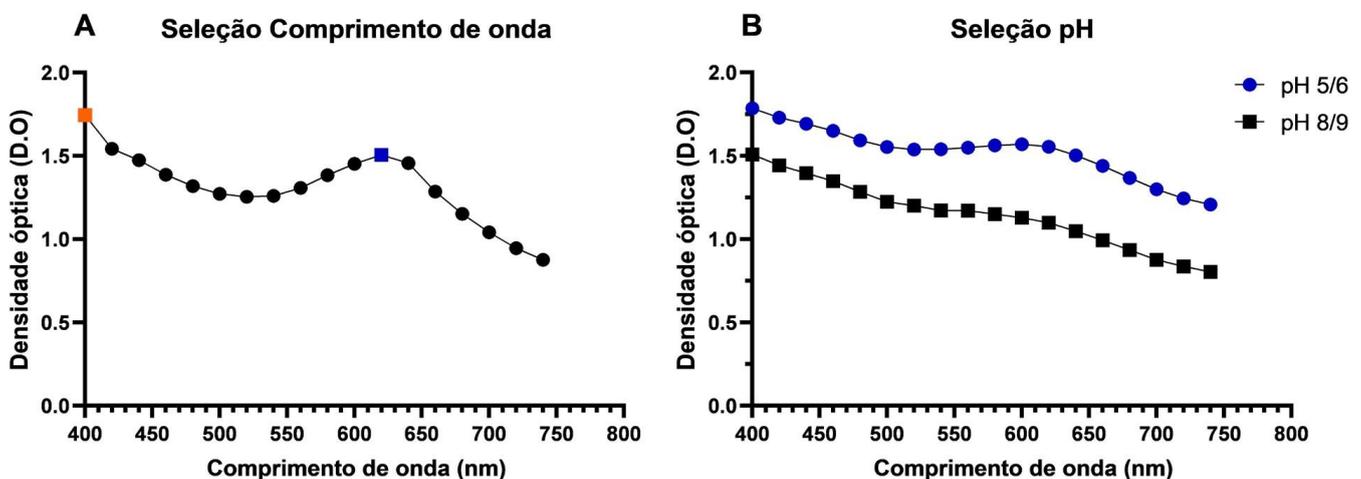


Legenda: Em (A) extrato dos arilos de *R. madagascariensis* em SDS 10% liofilizado. Ao lado gráfico com a composição química em % da amostra. Elementos: C - carbono; O - oxigênio; Si - silício; Na - sódio; Al - Alumínio; S - enxofre e N - nitrogênio.

4.3. Seleção da faixa de pH e comprimento de onda de máxima absorção da luz UV-VIS do extrato dos arilos em SDS

Com a análise das densidades ópticas destas amostras obteve-se a faixa de pH mais indicada para o planejamento fatorial entre pH 5 e pH 6 e o comprimento de onda de D.O. de máxima absorção em 620nm (**Figura 8**).

Figura 8 - Seleção de pH e seleção do comprimento de onda de máxima absorção de luz para extração mais eficiente do pigmento das amostras.



Legenda - Em **(A)** o gráfico representa a varredura do espectro de luz visível de um extrato de *R. madagascariensis* para identificação da D.O. de máxima absorção. Com destaque em laranja para o pico em 400nm e destaque em azul para o pico em 620nm. Em **(B)**, a avaliação do pH de dois extratos de *R. madagascariensis* para evidenciar em qual ambiente, ácido ou básico, ocorre a melhor extração do pigmento. Com destaque em azul para os extratos com pH entre 5 e 6.

4.4. Planejamento fatorial da extração do pigmento azul

No ensaio exploratório foram avaliados três fatores, com duas variações cada, para a extração: o tempo (24h e 48h), concentração do extrator SDS (2% e 10%) e o pH (5/6 e 8/9). Além de uma repetição com tratamento prévio com hexano a fim de identificar se a retirada do componente ceroso da amostra tornaria melhor a extração (**Tabela 4**). Os resultados foram arranjados em valores de densidade óptica obtidos por espectrofotometria.

Tabela 4 - Resultados do planejamento fatorial exploratório 2³ para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de *R. madagascariensis*.

AMOSTRAS	TEMPO	SDS	pH	R1_HEX (D.O. 620nm)	R2_SHEX (D.O. 620nm)
1	24h	2%	5-6	0,53895	1,50615
2	48h	2%	5-6	1,0154	1,2565
3	24h	10%	5-6	0,483	1,5546
4	48h	10%	5-6	1,20945	0,86175
5	24h	2%	8-9	1,06075	1,11195
6	48h	2%	8-9	0,9095	0,7387
7	24h	10%	8-9	0,8291	1,0981

8	48h	10%	8-9	0,80905	1,03895
---	-----	-----	-----	---------	---------

Legenda - R1_HEX: Respostas do ensaio com tratamento prévio com hexano; R2_SHEX: Respostas do ensaio sem tratamento prévio sem hexano. O destaque amarelo indica o melhor tratamento. As amostras estão organizadas em ordem numérica crescente para facilitar a interpretação da tabela, mas a ordem de preparo segue a representação demonstrada na Tabela 1.

Com os resultados obtidos foi possível evidenciar que o tratamento com hexano não apresenta melhora na extração e que as melhores variações dos fatores avaliados são aquelas da amostra 3 com extração em 24h, concentração de SDS a 10% e valor de pH entre 5 e 6. No planejamento fatorial exploratório não foi observada uma influência significativa da variável tempo. Já que a variação dos níveis baixo e alto do tempo mantendo as outras variáveis fixas não resultaram em mudanças impactantes nas respostas observadas. Sendo assim, a fim de otimizar a extração o tempo foi fixado no nível baixo (24h), e um novo ensaio explorando o melhor resultado obtido no planejamento exploratório foi desenvolvido.

Na segunda avaliação, uma modelagem de planejamento 3^2 (3 níveis e 2 variáveis), o fator tempo foi fixado em 24h e as variações da concentração do extrator (SDS) e do pH passaram de duas para três, com um valor menor, um intermediário e um maior, sendo a variação da concentração do extrator em 9%, 10% e 11% e a variação de pH em 5, 5,5 e 6 (**Tabela 5**). Os resultados foram avaliados e concluiu-se que a melhor forma de extração foi aquela testada no extrato número 4, com pH em 5 e o extrator sds a 10%.

Tabela 5 – Resultados do planejamento fatorial de modelagem 3^2 para otimização das condições de extração do pigmento azul dos Arilos de *R. madagascariensis*.

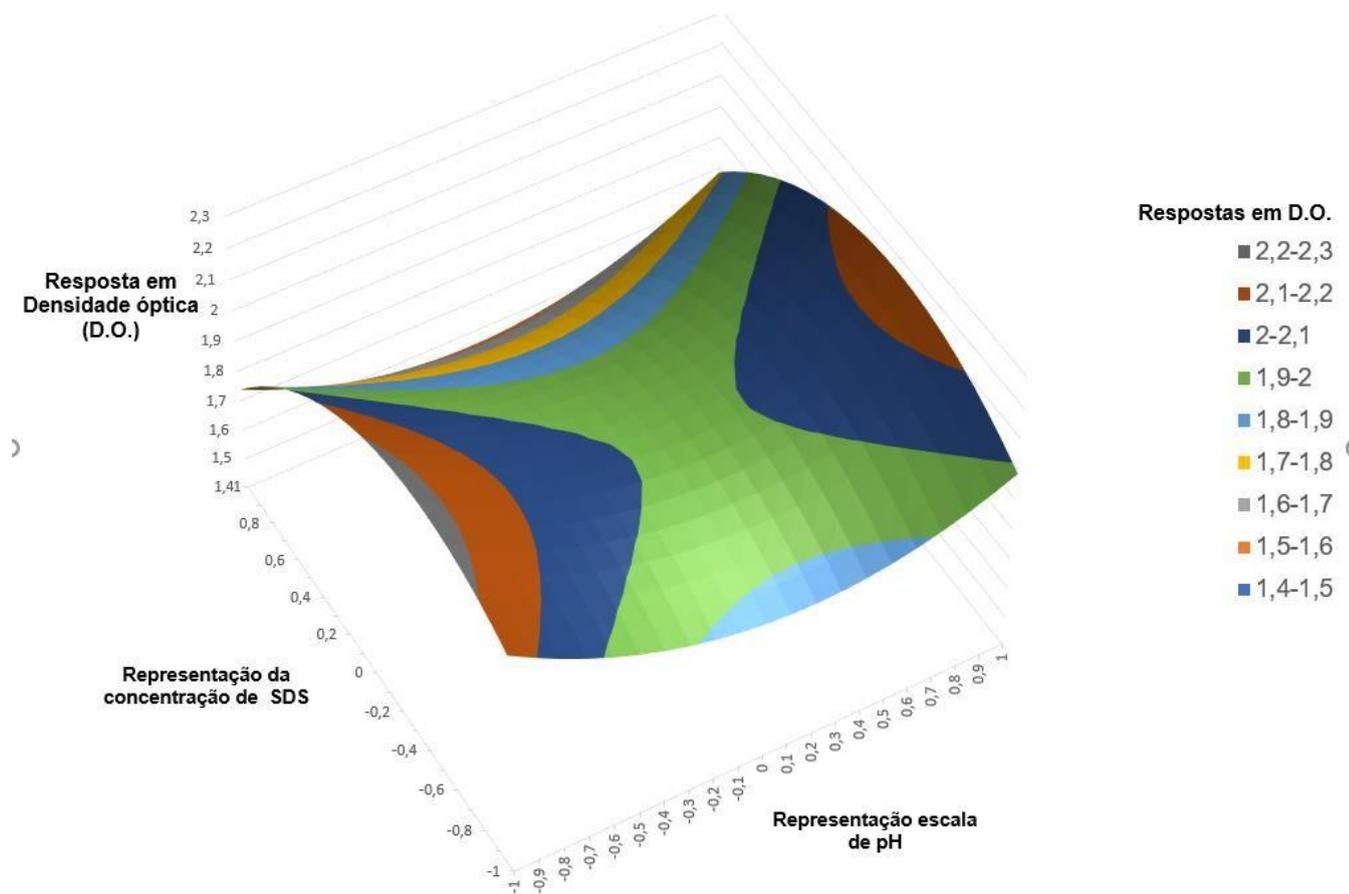
AMOSTRAS	pH	SDS	Resposta (D.O. 620 nm)
1	5	9%	2,0089
2	5,5	9%	2,0350
3	6	9%	1,9564
4	5	10%	2,3850

5	5,5	10%	1,9711
6	6	10%	2,1004
7	5	11%	1,6976
8	5,5	11%	1,5223
9	6	11%	1,8587
10	5,5	10%	1,9422
11	5,5	10%	1,8519

Legenda - O destaque em amarelo identifica a amostra com melhores condições de extração. As amostras estão organizadas em ordem numérica crescente para facilitar a interpretação da tabela, mas a ordem de preparo segue a representação demonstrada na Tabela 2.

De acordo com os resultados obtidos e as análises estatísticas realizadas a partir das triplicatas do ponto central do ensaio, com variância igual a 0,003 e desvio padrão relativo em termos de porcentagem igual a 0,2%, foi possível concluir que as variações de pH não são significativamente impactantes para a melhor resposta em densidade óptica quanto a concentração do extrator SDS. Essa conclusão pode ser observada na figura 9, onde estão representados os eixos com os valores de pH, SDS e as respectivas respostas em densidade óptica.

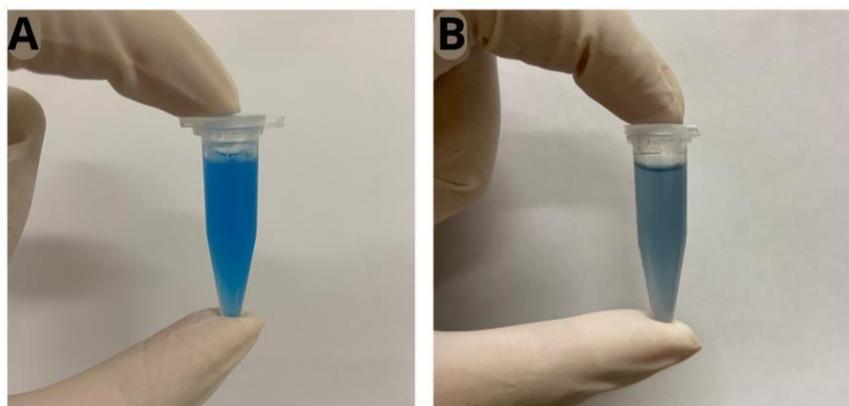
Figura 9- Superfície de resposta obtida através do planejamento fatorial.



Legenda: As cores indicam os níveis de resposta em D.O. na superfície do ensaio. As análises estatísticas indicaram que não há falta de ajuste no experimento. Os valores no eixos das representações de concentração de SDS e de escala de pH são valores codificados que vão de -1 a 1.

O extrato padronizado após o planejamento fatorial apresentou uma ótima estabilidade de coloração (**Figura 10**), permanecendo azul por tempo considerável de 52 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Figura 10: Avaliação da estabilidade de coloração do extrato dos arilos de *R. madagascariensis* em solução de SDS 10% mantido a temperatura ambiente



Legenda: Em (A) o extrato dos arilos em SDS 10% após 24h de extração. Em (B) o mesmo extrato após 52 dias sendo mantido em temperatura ambiente.

4.5. Análise fitoquímica dos extratos dos arilos

Após a secagem os extratos hexânicos e etanólicos de *Ravenala* tiveram os seus pesos quantificados (**Tabela 6**). O extrato em SDS teve o maior rendimento e todos os extratos apresentaram um aspecto ceroso.

Tabela 6- Peso e aspecto dos extratos hexânico, etanólico e em SDS de *R. madagascariensis*.

Amostra	Peso(mg)	Aspecto
RH	486	Azul claro e ceroso
RE	204	Amarelo esverdeado e ceroso
RSDS	845	Verde escuro e ceroso

Legenda - RH: Extrato hexânico de *R. madagascariensis*; RE: Extrato etanólico de *R. madagascariensis*; RSDS: Extrato em SDS de *R. madagascariensis*.

A marcha fitoquímica revelou a presença de Alcalóides em todas as amostras avaliadas. Entretanto, não foi observada a presença de outros metabólitos. Inicialmente a avaliação da presença de cumarinas havia positivado nos extratos em SDS e em etanol. Entretanto devido a característica fluorescente da amostra o resultado foi considerado indeterminado para a presença de cumarinas (**Tabela 7**).

Tabela 7- Resultados da triagem fitoquímica dos diferentes extratos de *R. madagascariensis*.

Metabólitos	RH	RE	RSDS
Alcalóides	+	+	+
Triterpenos e Esteróides	-	-	-
Cumarinas	ID	ID	ID
Compostos Fenólicos	-	-	-
Flavonoides	-	-	-

Antraquinonas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Taninos	-	-	-

Legenda – (+) positivo; (-) negativo; (ID) indeterminado; RH: Extrato hexânico de *R. madagascariensis*; RE: Extrato etanólico de *R. madagascariensis*; RSDS: Extrato em SDS 10% de *R. madagascariensis*.

4.6. Teores de flavonoides e fenóis

A análise do teor de flavonoides e fenóis (**Tabela 8**) revelou que os extratos não possuíam essas substâncias em sua composição, já que todas as amostras apresentaram resultados negativos com teores não detectáveis pelo método utilizado.

Tabela 8- Teores de flavonoides e substâncias fenólicas em extratos de *R. madagascariensis*.

Constituinte	RH	RE	RSDS
Flavonoides	ND	ND	ND
Fenóis	ND	ND	ND

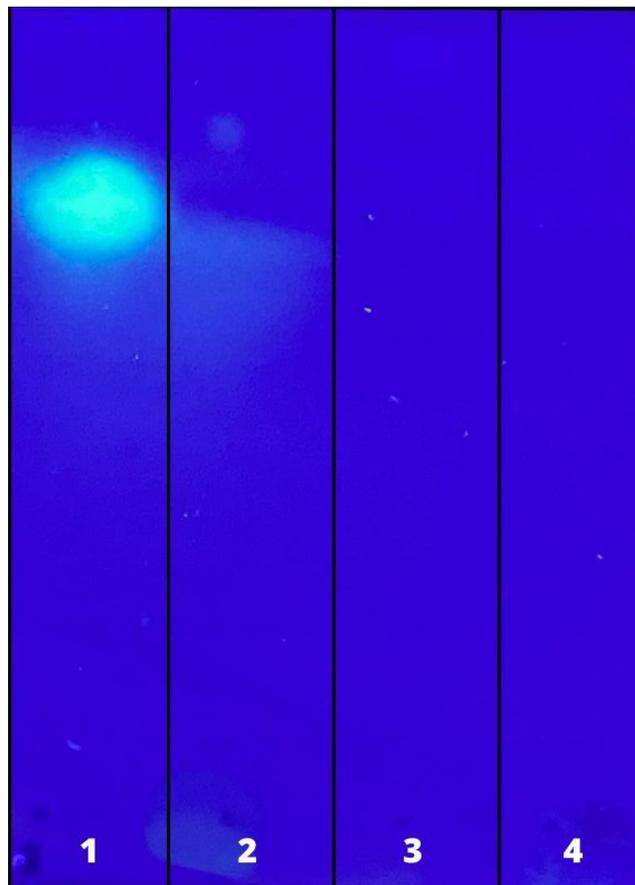
Legenda - ND: Não detectado. RH: Extrato hexânico de *R. madagascariensis*; RE: Extrato etanólico de *R. madagascariensis*; RSDS: Extrato em SDS 10% de *R. madagascariensis*.

4.7. Cromatografia em camada delgada para análise de fitoconstituintes, peptídeos e de capacidade antioxidante

Com o intuito de identificar as classes de constituintes químicos presentes nas amostras e a capacidade antioxidante dos extratos de *R. madagascariensis*, foi realizada a técnica de cromatografia por camada delgada (CCD). Foi avaliada a presença de Cumarinas, peptídeos e a atividade antioxidante da amostra, utilizando-se reveladores e fases móveis específicas para cada um. Os resultados não indicaram a presença de cumarinas em nenhum dos três extratos avaliados (etanólico, hexânico e em SDS 10%) (**Figura 11**). Por sua vez, a revelação com Ninidrina apresentou resultados positivos nos extratos etanólico e hexânico com o aparecimento de uma banda rósea com $R_f=0,6$, e resultado negativo no extrato em SDS 10% (**Figura 12**). A análise da atividade antioxidante através do agente revelador DPPH 0,01% apresentou resultados positivos no extrato etanólico e em

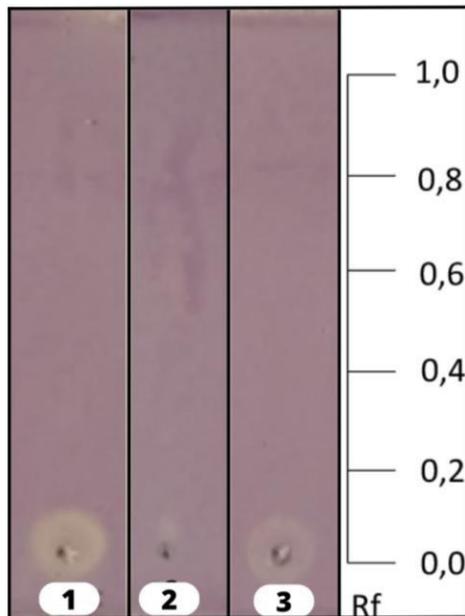
SDS 10% com o aparecimento de uma banda clara com Rf próximo de 0,0 indicando atividade antioxidante, e resultado negativo para o extrato em hexano, já que não foram observadas bandas claras após a revelação (**Figura 13**).

Figura 11- Cromatoplaça dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% para análise da presença de Cumarinas



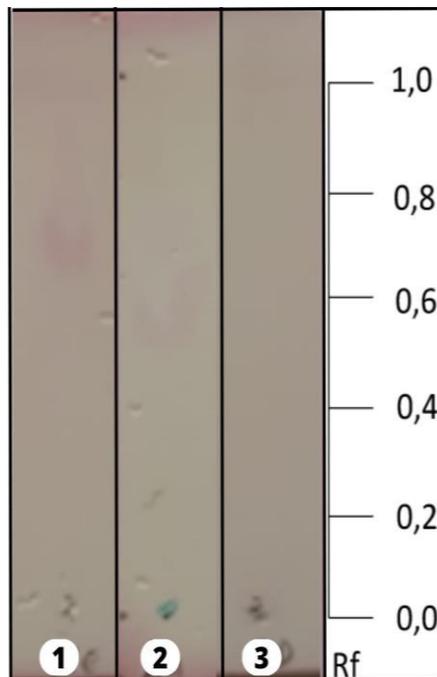
Legenda: Cromatoplaça para revelação de cumarinas com **(1)** padrão de cumarina utilizado; **(2)** extrato etanólico; **(3)** extrato hexânico; **(4)** extrato em SDS 10%. Fluorescência esverdeada como marcador de resultado positivo.

Figura 12 - Cromatoplaças dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% reveladas com DPPH para identificação de atividade antioxidante



Legenda: Cromatoplaça dos extratos etanólico (1); Hexânico(2) e extrato em SDS 10% (3) revelados com o reagente DPPH para investigação de atividade antioxidante dos extratos.

Figura 13 - Cromatoplaça dos extratos etanólico, hexânico e em SDS 10% reveladas com Ninidrina para identificação da presença de peptídeos



Legenda: Cromatoplaça dos extratos etanólico (1); Hexânico(2) e extrato em SDS 10% (3) revelados com o reagente Ninidrina para investigação da presença de peptídeos. Banda de rósea como marcador de positividade.

4.8. Análises centesimais

As análises centesimais de umidade, lipídios, proteínas, teor de cinzas e carboidratos feitas em triplicatas apresentaram os resultados descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das análises centesimais.

Componentes analisados	Umidade (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	RMF (%)	Carboidratos (%)
Amostra 1	3,71	81,44	7,48	0,78	6,59
Amostra 2	3,81	81,45	7,03	0,75	6,96
Amostra 3	3,60	81,46	6,79	0,80	7,35
Média	3,71	81,45	7,1	0,78	6,96

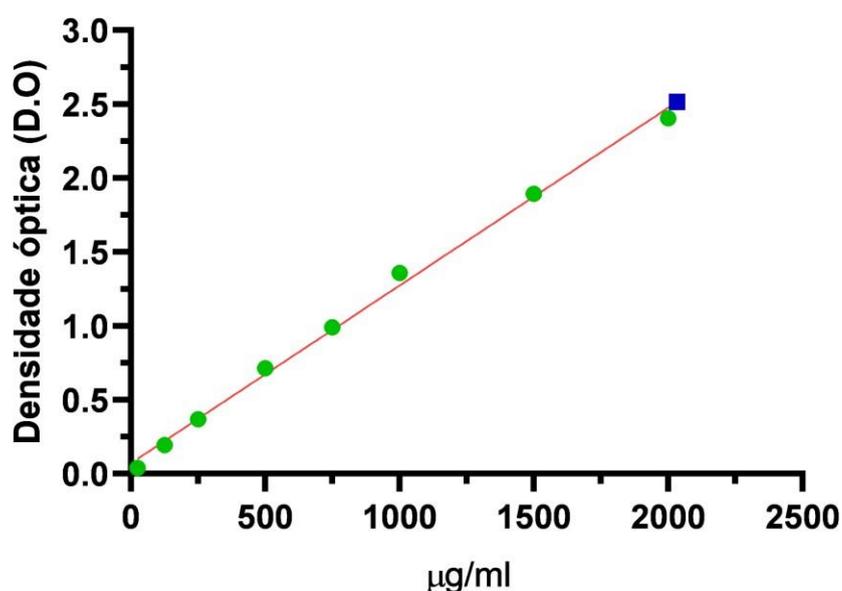
Legenda: RMF- Resíduos minerais fixos (teor de cinzas)

4.9. Dosagem de proteínas dos extratos padronizados

A dosagem do conteúdo proteico no extrato dos arilos de *R. madagascariensis* avaliado através de kit comercial de detecção colorimétrica em microplaca resultou em uma concentração de proteínas igual a aproximadamente $2033,2\mu\text{g/ml}$. Resultado obtido através da equação de regressão linear demonstrada a baixo e resultando em uma curva de concentração proteica ilustrada na figura 14.

$$Y = 0,001202 \times X + 0,07112$$

Figura 14 - Curva de concentração proteica

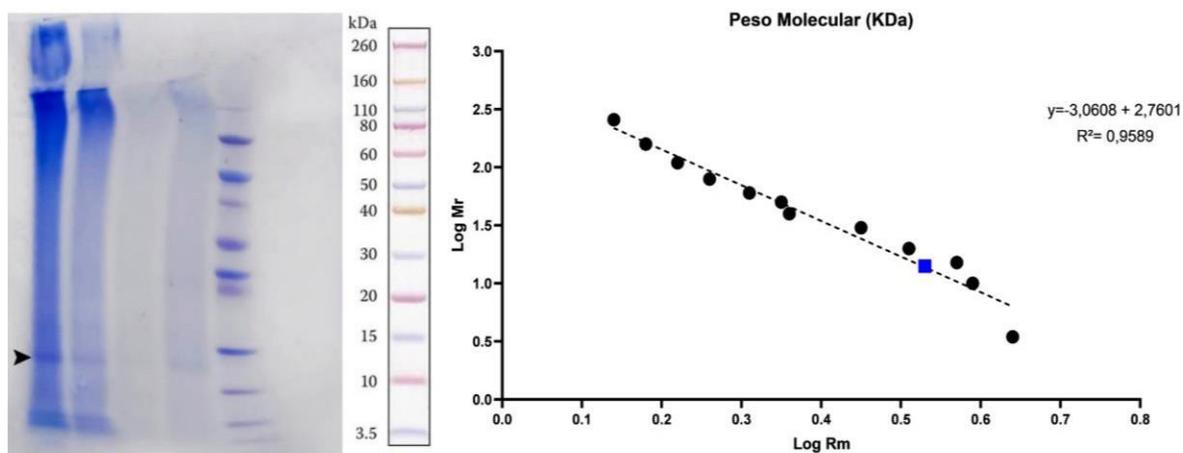


Legenda: Os pontos em verde representam os padrões de albumina utilizados para formação da curva de dosagem e o quadrado azul representa a amostra.

4.10. Caracterização proteica do pigmento azul por eletroforese

O peso molecular da proteína investigada foi obtido através do cálculo de massa feito a partir da eletroforese dos extratos em SDS 10% de *R. madagascariensis* padronizados no planejamento fatorial. Com a comparação das bandas no gel com o padrão utilizado e o cálculo de massa foi possível definir o tamanho da proteína em 14,03KDa (**Figura 15**).

Figura 15 - Gel de eletroforese dos extratos de *R. madagascariensis* e curva de peso molecular da proteína alvo em kDa



Legenda: A imagem mostra um gel de eletroforese com extratos de *R. madagascariensis*. À esquerda é possível visualizar as bandas proteicas indicadas com a seta e à direita o padrão de peso molecular utilizado em kDa. O gráfico ao lado representa a curva de peso molecular da proteína alvo com os pontos pretos representando as proteínas do padrão molecular e o quadrado azul representando a posição da proteína alvo.

4.11. Caracterização proteica por espectrometria de massa

Através da digestão em gel e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi possível detectar 3 peptídeos, Pep1 (PDFTLDPAYGVDLR); Pep2 (LAGGPYWDVPLGR) e Pep3 (SGGDQNLFPLEFVSPTK), nos extratos de *R. madagascariensis*, com suas sequências estipuladas por sequenciamento *de novo* pelo software PEAKs v8.5. Todos os 3 peptídeos ostentam uma qualidade espectral boa, indicando que as sequências peptídicas puderam ser determinadas de forma correta pelo software utilizado. Na figura 16, figura 17 e figura 18 estão os dados espectrais dos 3 peptídeos identificados, ilustrando a identificação da série y em sua quase totalidade para as 3 sequências.

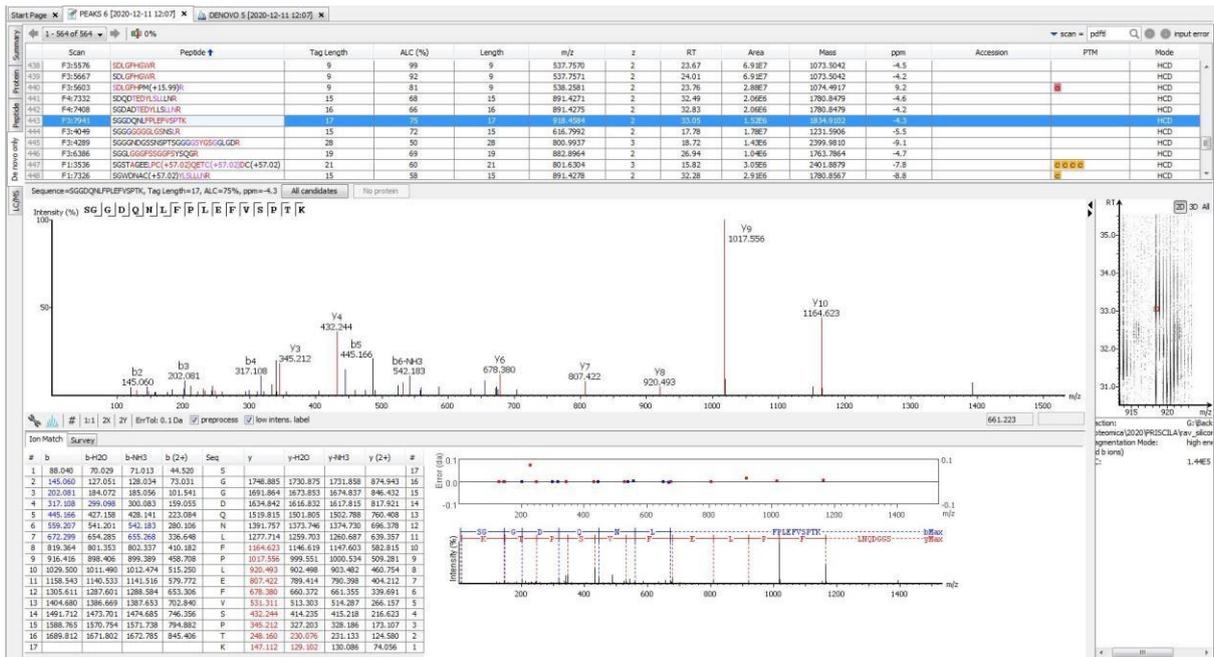
Figura 16 - Dados espectrais Pep 1 (PDFTLDPAYGVDLR).



Figura 17- Dados espectrais Pep 2 (LAGGPYWDVPLGR)



Figura 18 - Dados espectrais Pep 3 (SGGDQNLFPLEFVSPTK).



Por meio da análise BLAST foi evidenciada uma homologia significativa com a sequência THU71878.1 (hypothetical protein C4D60_Mb04t06150 [Musa balbisiana]), que apesar de ser identificada como proteína hipotética, possui domínios conservados de “secretory-peroxidase”, como as regiões conservadas de ligação a grupo heme, sítio ativo, sítio de ligação e substrato de ligação íons cálcio. Por fim o alinhamento das sequências dos 3 peptídeos com a sequência THU71878.1 de *M. balbisiana*, expõe sequências fortemente conservadas, com destaque para Pep2 sendo 100% idêntico e Pep3 apresentando somente uma diferença conservativa, E/D (Figuras 19 e 20). Os resultados obtidos com a Espectrometria de massas sugerem que a proteína em questão é uma peroxidase.

Figura 19 - Sequência THU71878.1

>tr|A0A4S8KA43|A0A4S8KA43_MUSBA Peroxidase OS=Musa
 balbiana OX=52838 GN=C4D60_Mb04t06150 PE=3 SV=1
 MALSISSFLMVLAAALALSPLCFAPFPGGPFLLYPQFYDHSCPKAQEIVKFIVAKAVAKEA
 RMAASLLRLHFHDCFVKGCDA SILLDSSGTIVSEKGSIPNRNSVRGF EVIDEIKSALEK
 ACPHTVSCADILALAARDSTV LAGGPYWDVPLGR RDSL GASI QGSNNIPAPNNTFQ
 TILTKFKL KGLDLVDFVALSGSHTIGLSRCTSFQRLYNQ TGKGF PDFTLDPAYAAHLR
 TRCPR SGGDQNL FPLDFVSPTK FDN SYFRNLMAKKGLLSSDEILFTNNPATMHLVEL
 YAAHNE LFFQHFARSMVKMG NITPLTGNKGEIRMNCRKLNHQ

DFTLDPAYGVDLR – peptídeo 1

LAGGPYWDVPLGR – peptídeo 2

SGGDQNLFPLEFVSPTK – peptídeo 3

Legenda: Sequência THU71878.1 com destaque de sequências conservadas para Pep1 (azul), Pep2 (laranja) e Pep3 (verde). O destaque em preto nos peptídeos identificados são diferenças de aminoácidos.

Figura 20 - Alinhamento das sequências de peptídeos identificados com THU71878.1.



Legenda: Caixas roxas indicam as sequências conservadas para os peptídeos.

4.12. Espectroscopia Raman dos arilos azuis de *Ravenala madagascariensis*

A análise aponta que a qualidade dos espectros piora com o acúmulo dos mesmos, isto é, a qualidade espectral é melhor no espectro obtido com 256 varreduras (**Figura 21**), quando comparado com o de 512 (**Figura 22**). Entretanto, as principais bandas vibracionais estão presentes em ambos, e são facilmente atribuídas à presença de vibrações referentes aos grupos CH_2 e CH_3 , na região entre 2880 e 2940cm^{-1} . Outras bandas podem ser observadas, na região entre 1300 e 1650cm^{-1} , e são características de vibração de grupos CH_2 e CH_3 , típicos da presença de lignina na estrutura do material (bandas em 1440 e 1300cm^{-1}), enquanto a banda observada em 1615 (que aparece desdobrada no espectro com 512 varreduras, em 1630 e 1605) pode ser atribuída à presença de grupos $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{O}$, vibrações típicas da estrutura da hemicelulose.

O espectro Raman obtido da amostra extraída com hexano pode ser observado na Figura 23. O arilo, depois da extração do corante, apresenta espectro Raman idêntico ao do material antes da extração, indicando então que as bandas observadas não são devidas ao corante, e sim à matriz. Observando os espectros, e o desdobramento das bandas em 1600cm^{-1} , podemos sugerir a mesma atribuição vibracional para os componentes principais contidos no material: lignina e celulose (Alves *et al*, 2016).

Figura 21 - Espectro Raman obtido com 256 varreduras

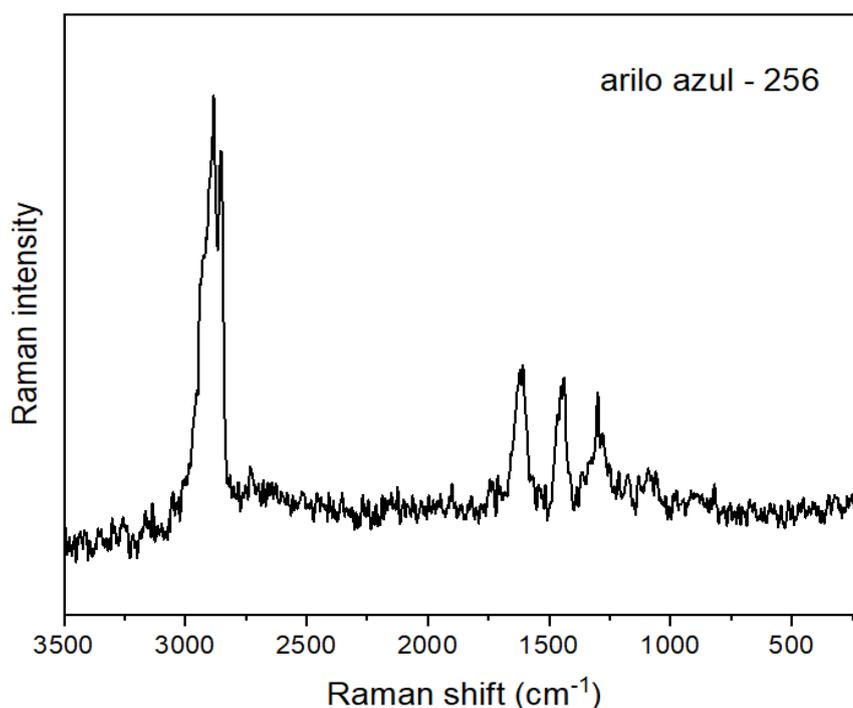


Figura 22 - Espectro Raman obtido com 512 varreduras

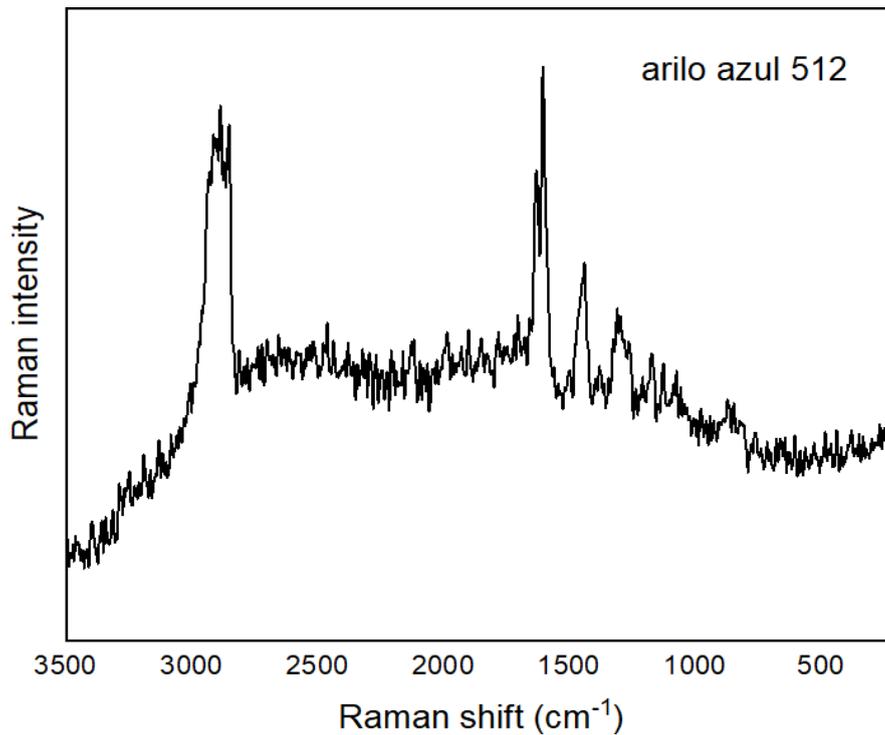
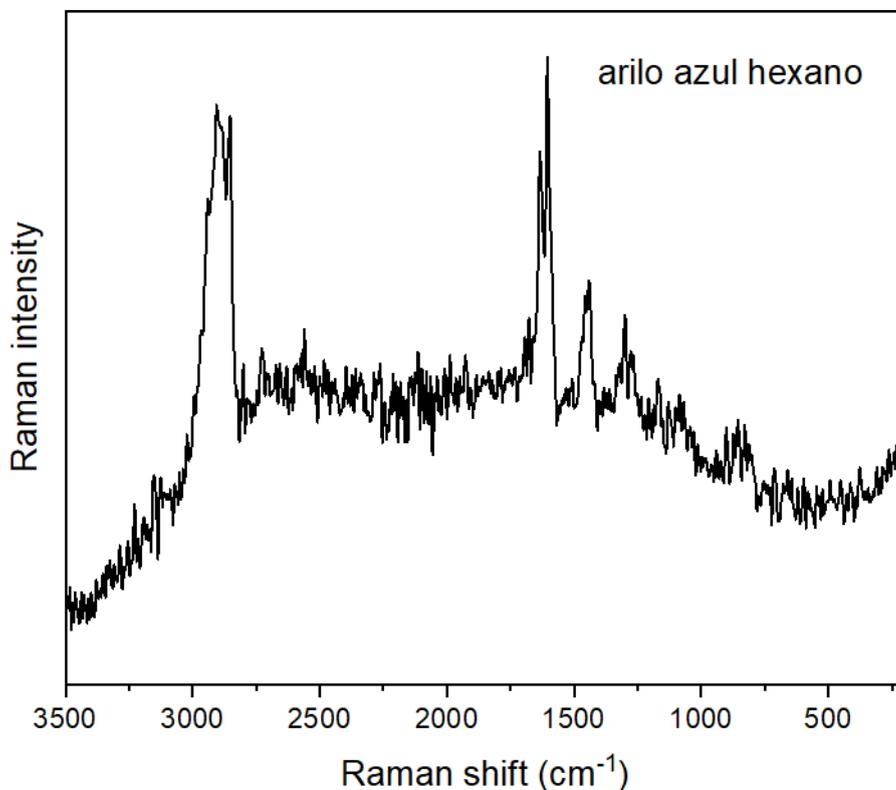


Figura 23 - Espectro Raman obtido da amostra extraída com hexano



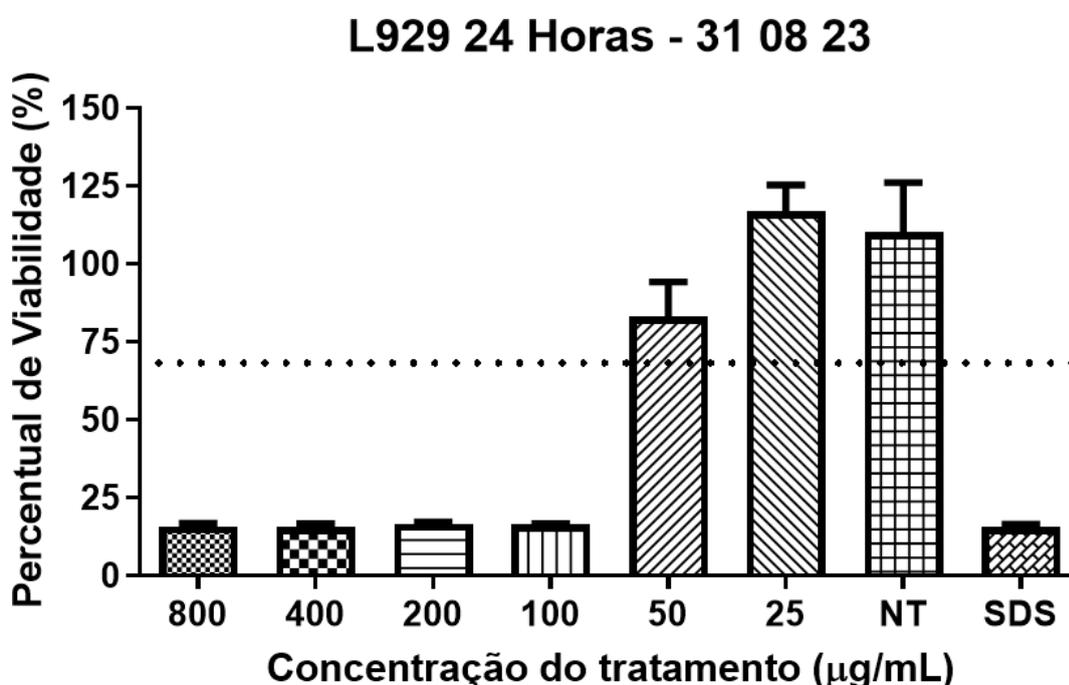
4.13. Atividade biológica *in vitro* (Citotoxicidade *in vitro*)

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para a avaliação de quais concentrações dos extratos dos arilos em SDS 10%, padronizados no planejamento

fatorial, levariam a morte celular. Dessa forma, células da linhagem de fibroblasto L929 (derivado do tecido conjuntivo de camundongo) foram tratadas com diferentes concentrações da amostra por 24 horas (**Figura 24**).

Os resultados demonstraram que as concentrações entre 800 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causaram mais morte celular. Enquanto para as concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a porcentagem de viabilidade celular observada foi acima de 70% conforme medido pelo método MTT.

Figura 24 - Avaliação da citotoxicidade do extrato em SDS 10% de arilos de *Ravenala madagascariensis* em cultura de células L929.



Legenda: NT: controle não tratado (apenas meio de cultura); SDS: controle do solvente utilizado (SDS 10%).

5. DISCUSSÃO

As estruturas que recobrem as sementes de algumas espécies da família Steriliaceae, conhecidas como arilos, são de fato muito interessantes. Sua coloração frequentemente vibrante chama atenção e possui grande potencial para utilização como corante natural, principalmente os arilos azuis da espécie *Ravenala*

madagascariensis, por possuírem uma cor de difícil acesso na natureza. Patentes de alcance mundial já abordam o uso dos arilos em formulações cosméticas.

Renimel e Andre em 2011, trazem o uso de extratos de *R. madagascariensis* como ativos hidratantes em uma formulação cosmética de *skincare* a fim de restaurar, manter ou reforçar o estado de hidratação da pele e agir como um *antiaging*. Em 2017 Andre e Garcia desenvolveram uma patente acerca do uso dos arilos de *R. madagascariensis* como corantes naturais em compostos cosméticos cerosos, sólidos e pastosos, principalmente maquiagens, mas também para uso em outros produtos corporais e alimentícios. O grupo de pesquisa do Laboratório de Estrutura e função de Proteínas da Universidade Federal de Juiz de Fora também já aplicou o extrato de arilos de *R. madagascariensis* como corante em formulações cosméticas estáveis, concluindo que o extrato se trata de um agente promissor para incorporação em fórmulas farmacêuticas e cosméticas (Manoel *et al*, 2019).

Apesar destas patentes não serem tão recentes, a origem química dos princípios ativos utilizados por elas, os arilos, não é conhecida. Conhecer essa origem, o procedimento mais adequado para a extração, as propriedades biológicas e físico-químicas e as incompatibilidades são fundamentais para a produção de um produto seguro e que atenda às expectativas visadas com o seu desenvolvimento.

A literatura ainda é muito escassa em descrições sobre a análise histológica dos arilos de *R. madagascariensis*. As informações existentes na literatura descrevem os arilos como estruturas fibrosas frequentemente coloridas que revestem as sementes e estão normalmente associadas à polinização por animais que são atraídos pelas cores dos arilos (Melin *et al*, 2012). Para a espécie *S. nicolai* que guarda algumas similaridades, o trabalho de Dwarka e colaboradores em 2020 traz detalhadamente as descrições das estruturas por diversos métodos, além da descrição da formação e da detecção da presença da bilirrubina nestes arilos (Dwarka *et al*, 2020).

Em nosso trabalho foram utilizadas técnicas de microscopia na tentativa de elucidar o arcabouço dos arilos, sua morfologia, histologia e composição química. Com os resultados obtidos através da análise por microscopia óptica, foi possível observar células alongadas, com a parede celular espessa na epiderme e coloração amarelada. Com o aprofundamento dos cortes foi possível visualizar também a disposição da coloração azul no arilo. A cor se encontra dispersa e no interior de

quase todas as células, se tornando mais presente com a aproximação do interior das fibras dos arilos.

Durante a investigação também foi utilizada a microscopia de fluorescência, através da qual foi observada uma característica muito curiosa dessas estruturas: a capacidade fluorescente. Ao levar um corte de algumas fibras de arilo fresco para o microscópio foi observada fluorescência em toda a fibra, levando a conclusão de que todo aquele pigmento azul internalizado nas células dos arilos é fluorescente. Esta característica gera interesse como potencial agregador de valor na utilização de extratos de arilos como pigmentos que além da sua cor natural também seriam capazes de trazer fluorescência ao produto pigmentado.

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar como são as inserções das fibras dos arilos na sua semente, inserções de aparência firme e com camadas, estas também presentes por todo o comprimento das fibras. Para mais, através desta técnica ainda foi descrita a composição química dos arilos, que *in natura* são compostos principalmente por uma alta porcentagem de carbono e pequenas porcentagens de oxigênio e silício. Porém, era possível que os resultados da composição estivessem sendo mascarados pela grande quantidade de cera presente nos arilos.

Sendo assim, partindo da ideia de que não estava sendo possível acessar o interior da amostra foi preparado um extrato dos arilos e este foi liofilizado e levado ao microscópio. Os resultados obtidos indicaram uma composição menor de carbono, fato justificado pela diminuição da cera presente na amostra, uma composição maior de oxigênio, sódio, alumínio, enxofre e nitrogênio. Alguns elementos químicos como enxofre e sódio podem estar presentes devido ao extrator utilizado no preparo do extrato, o Dodecil sulfato de sódio (SDS). Entretanto, a presença de nitrogênio na amostra serviu como indicador da presença de compostos nitrogenados.

As maiores fontes de corantes naturais são os vegetais. Produzindo corantes através de todas as suas partes, raiz, caule, folhas, frutas e flores, de diversas cores como vermelho, preto, marrom, amarelo, verde e azul (Marques, 2022). Normalmente, substâncias do metabolismo secundário de vegetais estão relacionados com a variedade de pigmentos em suas espécies (Bobbio, 1992). A cor apresentada pelos arilos de *Sterilitziaceae* (laranja e azul) pode estar associada à presença de

antocianinas (polifenólicos glicosilados), metabólitos distribuídos em todos os vegetais classificados quimicamente como compostos fenólicos, capazes de atribuir cores como azul e roxo, entre outras, aos vegetais e representantes de um importante subgrupo da classe dos flavonoides (Tanaka & Ohmiya, 2008; Liu *et al*, 2018).

Diante dos dados previamente relatados na literatura, foi de nosso interesse avaliar a presença de quais metabólitos secundários estariam presentes nesta amostra. Para isso, foram escolhidos solventes de polaridades distintas, sendo obtidos extratos hexânicos (apolares), etanólicos (polaridade intermediária) e em solução aquosa de SDS (polar). Após a execução dos ensaios clássicos para as principais classes de metabólitos secundários, como alcalóides, triterpenos, esteróides, cumarinas, compostos fenólicos, flavonóides, antraquinonas, saponinas e taninos, além da análise de teores de flavonoides e fenóis, não foram observados resultados positivos que nos levassem a um grupo químico para dar seguimento às análises. A positividade encontrada para os alcalóides pode na verdade ser uma reação cruzada a presença de proteínas na amostra, já que uma das limitações das técnicas utilizadas para identificação destes metabólitos é o resultado falso-positivo com proteínas, purinas, alfa-pironas, algumas cumarinas, hidroxifenóis e lignanas (Mascato, 2013).

A presença indeterminada de cumarinas pôde ser elucidada através dos resultados obtidos com as análises das cromatoplasmas. Não foi possível observar nenhum indício de presença deste metabólito utilizando fase móvel e padrão específicos. Entretanto, foram obtidos resultados positivos para a possível presença de peptídeos, já que em dois extratos observou-se bandas na revelação com ninidrina, revelador que reage com aminoácidos (Medina & Lozano, 2016). Também se constatou, através da revelação da cromatoplasma com DPPH, a capacidade antioxidante das amostras. Outra característica importante para a implementação dos arilos em cosméticos, por exemplo.

Desta forma, neste trabalho, a análise fitoquímica não evidenciou correlação entre o pigmento azul dos arilos de *R. madagascariensis* e os metabólitos secundários. As antocianinas que são normalmente associadas à cor azul dos vegetais, possuem sua estabilidade sob influência da sua estrutura química, da presença de oxigênio, da variação de pH, temperatura e luz, o que as torna instáveis. Portanto, a ausência de fenóis nas amostras, e a estabilidade do pigmento testada por aproximadamente 2

meses são fatores que descartam a influência de antocianinas na cor azul observada nos arilos de *R. madagascariensis*.

Com a ausência de metabólitos secundários relacionados a pigmentação dos arilos e resultados sugerindo fortemente a presença de proteínas nos mesmos, foram desenvolvidas análises centesimais a fim de identificar teores de carboidratos, gordura, umidade e proteínas. As análises centesimais, que seguiram as metodologias descritas do documento de Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz, apresentaram resultados que reforçaram a presença considerável de proteínas na amostra. Os resultados demonstraram quantidade de carboidratos e proteínas próximos a 7% da amostra, enquanto os Lipídios detêm uma grande porcentagem de aproximadamente 81%. A alta concentração de lipídios reitera a barreira que a composição cerosa oferece para o acesso ao interior dos arilos e também para a extração do pigmento. No planejamento fatorial desenvolvido foi utilizado o tratamento com hexano na tentativa de romper esta barreira de lipídios, entretanto não foi possível observar melhora na extração do pigmento.

O planejamento citado à cima se trata de um sistema multivariado de otimização experimental, ou seja, ele permite a avaliação do efeito de um número maior de variáveis simultaneamente, partindo de um número reduzido de ensaios experimentais (Cunico *et al*, 2008). Neste trabalho o planejamento foi desenvolvido com a finalidade de identificar a via de extração mais apropriada para os pigmentos azuis dos arilos e resultou em uma padronização de condições que tornaram a extração do pigmento melhor. Através desse sistema chegamos a conclusão de que a variável que mais interfere na extração do pigmento é a concentração do extrator e que o comprimento de onda com o maior pico de absorção se encontra na região de 620nm. Esta faixa de absorção se encontra na mesma faixa da ficobiliproteínas, proteínas pigmentadas encontradas em cianobactérias e algas vermelhas. Estas proteínas são compostas por uma proteína e um pigmento chamado de ficobilina, que por sua vez é formada por grupos prostéticos tetrapirrólicos com um sistema conjugado capaz de deslocar elétrons como consequência da excitação luminosa em determinados comprimentos de onda (Portillo, 2021).

A natureza química dos pigmentos azuis dos arilos ainda não foi descrita na literatura. No desenvolvimento de sua patente em 2017, Andre e Garcia ligam a formação da cor dos arilos de *R. madagascariensis* a um fenômeno óptico conhecido como iridescência. Este fenômeno de ocorrência física, seria causado por uma região das células superficiais da epiderme da planta, presentes em forma de estrutura de multicamadas responsável pelo mecanismo de interferência da luz. Entretanto, as características demonstradas em nossos estudos levam a hipótese de que a coloração observada pode estar relacionada à presença de cromoproteínas. Proteínas cromóforas apresentam ligação com cromóforos, grupos funcionais orgânicos que absorvem na região ultravioleta ou de luz visível, de natureza não proteica, responsáveis pelo desenvolvimento da cor (Solomons, 2001). Os grupos cromóforos possuem muitos elétrons, que são capazes de absorver energia e luz visível. Ao fazer isso os elétrons se excitam e quando voltam ao seu estado fundamental apresentam uma coloração específica. Quando as cores são formadas através desse processo químico, a absorção da luz dependerá do cromóforo presente na molécula. A cor observada será a complementar ao comprimento de onda absorvido pelo grupo cromóforo (Skoog, 2006).

Como mencionado anteriormente, em nosso experimento o espectro de visível do extrato em SDS apresenta o comprimento de onda com o maior pico de absorção de 620nm, valor que se encontra na faixa de absorção onde a cor absorvida é amarela e a cor complementar é azul-esverdeada (595nm - 650nm) indicando que nos arilos a cor se dá pelo processo químico descrito. Também foi observado em nossas análises um pico de absorção em 400nm que pode estar associado à deterioração parcial das proteínas extraídas. Pirone e colaboradores em 2009 e 2010 identificaram a presença de bilirrubina, um tetrapirrol de cor amarela-alaranjada produzido a partir da degradação do grupo heme por mamíferos e alguns outros vertebrados, em oito espécies de ordens de angiospermas. Os autores acreditam que os grupos cromóforos possuem papel importante para a composição da cor dos arilos da família *Strelitziaceae*.

Em mamíferos, a conexão entre bilirrubina e proteínas, por exemplo, cria novos padrões de absorção de luz e de emissão de fluorescência desse tetrapirrol (Croce *et al*, 2014), semelhantes aos observados nos extratos de arilos padronizados em nosso estudo. Pigmentos azuis brilhantes solúveis em água já foram descritos na literatura

(ficocianina e aloficocianina) e são produtos valiosos, com diversas aplicações comerciais e usados como corantes cosméticos naturais ou como sondas fluorescentes em citometria de fluxo e imunoenaios (Lauceri *et al*, 2019).

Os indicativos da presença de proteínas e a necessidade de calcular com segurança o conteúdo proteico que seria posteriormente aplicado nos testes de citotoxicidade levaram a realização da dosagem de proteínas que resultou em uma concentração de proteínas igual a aproximadamente 2033,2g/ml. A caracterização proteica do pigmento azul por eletroforese indicou o peso molecular da proteína investigada em 14,03kDa. Resultado reprodutível em diversos ensaios desenvolvidos. Os fragmentos do gel analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas resultaram na identificação de peptídeos com sequências conservadas com homologia significativa com uma proteína hipotética da *Musa balbisiana* com domínios de uma secretory-peroxidase sugerindo que a proteína investigada em nosso trabalho se trata de uma peroxidase, enzima antioxidante com bom potencial de aplicação em cosméticos (Scotti, *et al*, 2007).

Os resultados obtidos com os espectros Raman indicaram que as principais bandas vibracionais observadas se apresentam em ambas as varreduras diretas dos arilos da planta e também na varredura da amostra tratada com hexano. Desta forma, constatou-se que estas bandas estão relacionadas com a composição da matriz dos arilos e não com o pigmento presente nas amostras. Os espectros encontrados podem ser atribuídos a presença de lignina e celulose, polímeros importantes para a estrutura das plantas (Alves, 2016). Polímeros como a lignina tem grande potencial para atuar como agente antioxidante para biocombustíveis sujeitos à oxidação (Matos, 2019). Entretanto, as análises Raman não foram capazes de complementar os dados, apontando a presença de bandas vibracionais relacionadas aos grupos funcionais característicos de proteínas. É possível que o acesso ao interior dos arilos onde o pigmento está presente em abundância tenha sido dificultado pelas estruturas externas da amostra de arilo *in natura*.

Os ensaios de atividade biológica de citotoxicidade dos extratos dos arilos *in vitro* indicaram viabilidade celular acima de 70% nas duas menores concentrações do tratamento e abaixo de 25% nas outras concentrações. Estes resultados demonstraram que a toxicidade resultante está associada à presença de teores

maiores de SDS e não ao pigmento em si presente nos extratos. Neste cenário de baixa toxicidade do pigmento, presença de proteínas e a atividade antioxidante das mesmas, são evidentes a presença de peptídeos no pigmento e os benefícios da aplicação dos extratos dos arilos de *Ravenala madagascariensis* como agentes ativos e pigmentos em cosméticos e outros produtos para consumo humano. Entretanto, a avaliação dos teores mais baixos de SDS para a extração do pigmento deve ser mais extensivamente estudada, a fim de diminuir problemas associados a toxicidade deste composto e possibilitar uma aplicação segura e efetiva.

Os cosmeceuticos são produtos funcionais com princípios ativos munidos de atividades biológicas capazes de causar modificações positivas e duráveis na pele, podendo mudar a fisiologia da mesma. Dentre os principais princípios ativos estão os peptídeos e proteínas (Zhang & Falla, 2009). As proteínas são essenciais para a saúde da pele e dos cabelos, por sua capacidade de ligar a água à camada córnea da pele e seus anexos (Secchi, 2008). Dessa forma, cosméticos com a adição de proteínas podem ser aplicados para melhorar a hidratação e a pigmentação da pele, reduzindo também linhas de expressão combatendo o envelhecimento precoce (Bonilha *et al*, 2020). Produtos *antiaging* adicionados de antioxidantes vem sendo cada vez mais procurados para fins estéticos e o uso de extratos dos arilos de *Ravenala madagascariensis* se encaixa relevantemente nessa função, sua definição proteica e característica antioxidante são fatores cruciais para aplicação nesse tipo de produto. Além disso, sua atividade como pigmento pode ser empregada na coloração de diversos produtos cosméticos, como batons, sombras e maquiagens em geral.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposta uma caracterização e análise do pigmento azul presente nos arilos de *Ravenala madagascariensis*. As análises morfológicas/histológicas empregando várias técnicas de microscopia evidenciaram a presença do pigmento azul disperso nas células das fibras dos arilos com uma maior concentração da coloração na parte interior. As diversas análises empregadas encontram obstáculos para detectar a presença do nitrogênio ou a presença das ligações peptídicas em função do elevado teor de polissacarídeos e ceras presentes nestas estruturas. A

avaliação fitoquímica não identificou nenhum metabólito secundário presente que pudesse ser responsável pela cor azul observada nos arilos, excluindo, juntamente com os resultados negativos nas análises dos teores de flavonoides e fenóis, a possibilidade da cor ser formada por antocianinas. De forma curiosa, foi possível identificar atividade antioxidante dos extratos e a presença de peptídeos. O planejamento fatorial da extração do pigmento azul conseguiu apontar para as condições ideais de extração, a qual se mantém estável por um período próximo a 2 meses, a temperatura ambiente. A caracterização proteica do pigmento azul por eletroforese associada a espectrometria de massas sugeriu que a molécula em questão seria uma peroxidase, que não foi possível ter sua atividade confirmada por ensaios laboratoriais. A identidade e a potencial aplicação da proteína alvo desta dissertação ainda permanece em dúvida e necessitará de ensaios complementares para sua completa elucidação.

7. REFERÊNCIAS

1. ALVAREZ, R.; VAZ, B.; GRONEMEYER, H.; DE LERA, A. R. **Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids.** *Chemical reviews*, 114(1), 1-125. 2014.
2. ALVES, A. P. P. *et al.* **The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy.** *Vibrational Spectroscopy*, 86, 324-330, 2016.
3. ANDRE, P.; GARCIA, M. **Dyestuffs of plant origin and use thereof for colouring compositions, in particular cosmetic compositions.** U.S. Patent n. 9,839,603, 12 dez. 2017.
4. BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.A. **Introdução à química de alimentos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. 234 p
5. BONILHA, G. C.; COSTA, G. M. D.; CAMPOS, PMBG Maia. **Rheological, texture, and sensory analyses and in vivo clinical efficacy of cosmetic formulations containing ascorbyl tetraisopalmitate.** *Biomedical Biopharmaceutical Research*, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2020.
6. CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. **Corantes alimentícios.** *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 20, n. 2, 2002.
7. COSTA, R.G.B. *et al.* **Controle de qualidade em queijo minas padrão: métodos físico-químicos, microbiológicos e moleculares** – Brasília, DF: Embrapa, 2019.

8. CROCE, A. C., FERRIGNO, A., SANTIN, G., VAIRETTI, M., & BOTTIROLI, G. **Bilirubin: an autofluorescence bile biomarker for liver functionality monitoring.** Journal of biophotonics, 7(10), 810-817. 2014
9. CRON, G. V. *et al.* **Phylogenetic Relationships and Evolution in the Strelitziaceae (Zingiberales).** Systematic Botany, v. 37, n. 3, p. 606-619, 2012.
10. CUNICO, M. W. M. *et al.* **Planejamento Fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica.** Visão Acadêmica, v. 9, n. 1, 2008.
11. FOLIN, O. ; CIOCALTEU, V.. **On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.** J. biol. Chem, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.
12. DE BARROS, A.L. *et al.* **Corantes alimentícios amarantho, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficos à saúde humana.** Journal of Applied Pharmaceutical Sciences, 2016.
13. DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability.** Critical reviews in food science and nutrition, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.
14. DOS SANTOS, P.O.; PINHEIRO, L.K.X; DE ABREU, M.R.R. **Mapeamento tecnológico dos pigmentos naturais.** Cadernos de Prospecção, v.9, n.1, p. 121-121, 2016.
15. DOWD, L. E. **Spectrophotometric determination of quercetin.** Analytical Chemistry, v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959.
16. DUVALE, S.A.H; *et al.* **Antimicrobial and antioxidant activities of the fruits of bemavo, a variety of Ravenala madagascariensis Sonn.(Strelitziaceae).** World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences, v. 2, n. 2, p. 030-039, 2020.
17. DWARKA, D. *et al.* **A comparative microstructural study of the animal pigment, bilirubin, in seed arils of Strelitzia nicolai.** South African Journal of Botany, v. 128, p. 109-118, 2020.
18. GANDÍA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. **Biological Activities of Plant Pigments Betalains,** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56:6, 937-945. 2016 DOI: 10.1080/10408398.2012.740103
19. GRUBER, J. V.; LUDWIG, P. L. **Composition for treating skin pigmentation.** Applicant: LONZA WALKERSVILLE INC. WO 2013/092973 A2. 27 de junho de 2013.
20. HADIPOUR, E.; TALEGHANI, A.; TAYARANI-NAJARAN, N.; TAYARANI-NAJARAN, Z. **Biological effects of red beetroot and betalains: A review.** Phytotherapy Research, 34(8), 1847-1867. 2020

21. HAMERSKI, L.; REZENDE, M.J.; SILVA, B.V. **Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia** Rev. Virtual Quim., 5 (3), 394-420. 2013
22. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020
23. LAUCERI, R., ZITTELLI, G. C., & TORZILLO, G. (2019). **A simple method for rapid purification of phycobiliproteins from Arthrospira platensis and Porphyridium cruentum biomass.** Algal Research, 44, 101685. 2019
24. LEE, Yoon-Mi *et al.* **Dietary anthocyanins against obesity and inflammation.** Nutrients, v. 9, n. 10, p. 1089, 2017.
25. LIU, Y., TIKUNOV, Y., SCHOUTEN, R. E., MARCELIS, L. F., VISSER, R. G., & BOVY, A. (2018). **Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review.** Frontiers in chemistry, 6, 52. 2018
26. LOPES, T. *et al.* **Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade.** Current Agricultural Science and Technology, v. 13, n. 3, 2007.
27. MANOEL, L.A.V. *et al.* **Desenvolvimento e estabilidade de formulação cosmética obtida com corante natural azul.** HU Revista, v. 45, n. 3, p. 254-260, 2019.
28. MAOKA, T. **Carotenoids as natural functional pigments.** Journal of natural medicines, 74(1), 1-16. 2020.
29. MARQUES, I.B. **Prospecção de corantes naturais oriundos de flores comestíveis.** 2022.
30. MARTINS, P.H.P.; DOS SANTOS, B.S.M; DE SOUZA, G.M.L. **Natural pigments as an alternative to synthetic coloring and preservatives for the animal food industry: a review.** The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC, Vol. 08 N. 10. 2022
31. MASCATO, D. R. L. H. **Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) e de suas frações: um ensaio in vitro.** 2013.
32. MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza: Edições UFC, 141 p. 1997.
33. MATOS, M. *et al.* **Nanopartículas de lignina para controle de processos oxidativos.** 2019.
34. MATTIOLI, R. *et al.* **Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases.** Molecules, v. 25, n. 17, p. 3809, 2020.

35. MEDINA, P.; LOZANO, J. **Separación de aminoácidos contenidos en una muestra de yogurt por cromatografía en capa fina.** 2016.
36. MELIN, A.D. *et al.* **Why aye-ayes see blue.** American journal of Primatology, v. 74, n. 3, p. 185-192, 2012
37. MENDONÇA, J.N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias.** 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
38. MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. **Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts.** Food chemistry, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.
39. MOHAMED, E.M. *et al.* **Bioassay-guided isolation, metabolic profiling, and docking studies of hyaluronidase inhibitors from ravenala madagascariensis.** Molecules, v. 25, n. 7, p. 1714, 2020.
40. PIRONE, C.L. **Bilirubin: an animal pigment in the zingiberales and diverse angiosperm orders.** 2010.
41. PORTILLO, F. V. L.; JIMÉNEZ, A. **Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción.** Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. BioTecnología, Vol. 25 No.5. 2021
42. RAKOTOARIVELO, N.H. *et al.* **Medicinal plants used to treat the most frequent diseases encountered in Ambalabe rural community, Eastern Madagascar.** Journal of ethnobiology and ethnomedicine, v. 11, p. 1-16, 2015.
43. RENHE, I.R.T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo (Genipa americana L.).** 2008.
44. RENIMEL, I.; ANDRE, P. **Extract of the plant ravenala madagascariensis and use as cosmetic hydrating agent** 2011.
45. RISS, T. L. *et al.* **Cell viability assays.** Assay Guidance Manual, 2016.
46. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains.** Food Research International, 124, 200-205. 2019
47. ROWLES III, J.L.; ERDMAN JR, J.W. **Carotenoids and their role in cancer prevention.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1865, n. 11, p. 158613, 2020.
48. SANTOS, M.S.V. *et al.* **Prospecção tecnológica em bases de patentes com foco em corantes e pigmentos alimentícios obtidos de fontes naturais.** Research, Society and Development, v. 10, n. 3, p. e53810313603-e53810313603, 2021.

49. SCHIOZER, A.L. *et al.* **Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal.** 2013.
50. SCOTTI, L. *et al.* **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, p. 153-166, 2007.
51. SECCHI, G. **Role of protein in cosmetics.** Clinics in dermatology, v. 26, n. 4, p. 321-325, 2008.
52. SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** tradução da 8ª edição. 2006.
53. SOLOMONS, T. W. G., FRYHL, C. B. **Química Orgânica.** Vol 1, 7. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2001.
54. SUROOWAN, S. *et al.* **Above the Invasive and Ornamental Attributes of the Traveler's Palm: An In Vitro and In Silico Insight into the Anti-Oxidant, Anti-Enzymatic, Cytotoxic and Phytochemical Characterization of Ravenala madagascariensis.** Antioxidants, v. 12, n. 1, p. 184, 2023.
55. TANAKA, Y.; OHMIYA, A. **Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways.** Current opinion in biotechnology, v. 19, n. 2, p. 190-197, 2008.
56. VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. **Pigmentos naturais bioativos.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009
57. WANG, Y.; LI, J.; LI, B. **Chitin microspheres: A fascinating material with high loading capacity of anthocyanins for colon specific delivery.** Food Hydrocolloids, v. 63, p. 293-300, 2017.
58. ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química nova, v. 21, p. 787-793, 1998.
59. ZANONI BOLDRIN, T. **Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9.** 2010. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
60. ZHANG, L. ; FALLA, T. J. **Cosmeceuticals and peptides.** Clinics In Dermatology, [s.l.], v. 27, n. 5, p.485-494, set. 2009. Elsevier BV.

