

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

Filmes de acetato de celulose incorporados com compostos antociânicos do extrato
das flores de *Clitoria ternatea*

Glória Caroline Paz Gonçalves

Pelotas, 2023.

Glória Caroline Paz Gonçalves

**Filmes de acetato de celulose incorporados com compostos antociânicos do
extrato das flores de *Clitoria ternatea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Dillenburg Meinhart

Co-orientadora: Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze

Co-orientador: Álvaro Renato Guerra Dias

Pelotas, 2023.

Glória Caroline Paz Gonçalves

Filmes de acetato de celulos incorporados com compostos antociânicos do extrato das flores de *Clitoria ternatea*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 04/04/2023.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Dillenburg Meinhart (Orientadora). Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias (Co-orientador). Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Prof^a. Dr^a. Laura Martins Fonseca. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Prof^a. Dr^a. Tayse Ferreira Ferreira da Silveira. Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Prof^a. Dr^a. Vanessa Bordin Viera. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFSM).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me dar forças para não desistir e conseguir concluir essa etapa com coragem e dedicação. À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por nunca medirem esforços para me ajudar durante toda essa caminhada. Obrigada pela educação, por sempre apontar ao caminho do bem, apoiarem meus sonhos e nunca deixar eu desistir dos meus objetivos. Vocês são a minha base, meus exemplos de pessoas do bem, e tudo que faço é por vocês.

Aos demais familiares, principalmente meus padrinhos, avós, tios, tias, primos e primas por compreenderem a falta de abraço e a falta de tempo, mas os dias eram assim durante esta jornada.

Ao meu amor, Juliano, por me apoiar, pelo companheirismo pelo carinho ao longo desse tempo, obrigada por estar sempre por perto, tornando os dias mais leves e alegres.

Aos meus amigos, em especial, o Élder, por não medir esforços para me ajudar, me incentivar e apoiar. A Maria Eduarda, que mesmo a distância, sempre está comigo, e sempre tem os melhores conselhos. E os demais amigos, obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que ganhei ao ingressar no mestrado, Laura, Thaís, Rafael, Alexandra, Thamyres e Bruna, por toda ajuda, pelas descontrações no ambiente de trabalho, tornando-o mais leve e feliz.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana, por nunca medir esforços para ajudar na execução do projeto, principalmente na conclusão, por todos ensinamentos e contribuições na minha vida profissional.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Elessandra, pela paciência e por todas os ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Álvaro, pela execução do canteiro onde foram plantadas as flores utilizadas no meu trabalho, e por toda ajuda na parte agrônômica.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas (PPGCTA – UFPel), por todo conhecimento transmitido durante esse tempo.

Aos demais colegas do DCTA, pela recepção, convívio e por sempre estarem dispostos a ajudar.

A agência de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada, estão guardados no meu coração. Muito obrigado!

Resumo

GONÇALVES, Glória Caroline Paz. **Filmes de acetato de celulose incorporados com compostos antociânicos do extrato das flores de *Clitoria ternatea***. 2023. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A flor da *Clitoria ternatea* é rica em compostos bioativos, principalmente fenólicos não antociânicos e fenólicos antociânicos. O objetivo desse estudo foi avaliar as flores da *Clitoria ternatea* cultivadas na Região Sul do Rio Grande do Sul, extrair os compostos antociânicos utilizando um método de extração ambientalmente amigável, aplicar em filmes de acetato de celulose e investigar o potencial para aplicação do extrato e dos filmes na área alimentícia. Para a otimização da extração, as variáveis tempo, temperatura e volume de solução extratora (água acidificada a 1%) foram avaliadas através de um planejamento fatorial 2^3 , com pontos centrais e axiais, sobre o teor de antocianinas totais. O extrato obtido na condição ótima de extração foi avaliado quanto à composição química, teor de fenólicos não antociânicos e antociânicos, capacidade redutora, atividade antioxidante, toxicidade *in vivo* e atividade frente a patógenos alimentares gram-positivos e gram-negativos. Os filmes de acetato de celulose foram produzidos pela técnica de casting incorporados com o extrato das flores da *Clitoria ternatea*, bem como com as flores liofilizadas, em diferentes concentrações, com a finalidade de ser um indicador de mudança de cor, frente a mudança de pHs. A condição ótima de extração foi de 22,5 mL, 16 min de reação à 45 °C. Os teores de antocianinas monoméricas totais no extrato líquido foram entre 450,29 e 554,63 mg/100 g de flor seca. O extrato liofilizado foi caracterizado por apresentar: capacidade redutora de 806,92 mg GAE/100 g, elevado potencial antioxidante, baixa toxicidade *in vivo* e resultados promissores em relação a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, frente a patógenos alimentares. Neste, foram quantificadas treze antocianinas e nove compostos fenólicos não antociânicos, por UHPLC/MS, que podem estar associadas aos efeitos

observados. Os filmes obtidos com acetato de celulose (20% e 30% de extrato liofilizado; 20% e 30% flor liofilizada) não mudaram de cor frente a diferentes pHs. No entanto, ocorreu a mudança de cor no extrato, na flor liofilizada e nos filmes quando expostos ao cultivo de bactérias gram-negativas (*S. Typhimurium* e *E. coli*). Os resultados sugerem elevado potencial do extrato e os filmes para estudos futuros de aplicação em embalagens ativas para alimentos, especialmente como marcador de contaminação microbiológica de bactérias gram-negativas.

Palavras-chave: Fenólicos; Toxicidade; Cor; Antioxidante; Microbiologia.

Abstract

GONÇALVES, Glória Caroline Paz. **Cellulose acetate films incorporated with anthocyanic compounds of *Clitoria ternatea* flower extract**. 2023.101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The flower of *Clitoria ternatea* is rich in bioactive compounds, mainly non-anthocyanin phenolics and anthocyanin phenolics. The objective of this study was to evaluate the flowers of *Clitoria ternatea* cultivated in the South Region of Rio Grande do Sul, to extract the anthocyanin compounds using an environmentally friendly extraction method, to apply them in cellulose acetate films and to investigate the potential for application of the extract and the films in the food sector. For the optimization of the extraction, the variables time, temperature and volume of extracting solution (acidified water at 1%) were evaluated through a 2^3 factorial design, with central and axial points, on the total anthocyanin content. The extract obtained in the optimal extraction condition was evaluated for chemical composition, non-anthocyanin and anthocyanin phenolic content, reducing capacity, antioxidant activity, in vivo toxicity and activity against gram-positive and gram-negative food pathogens. The cellulose acetate films were produced by the casting technique incorporated with the extract of the flowers of *Clitoria ternatea*, as well as with the lyophilized flowers, in different concentrations, with the purpose of being an indicator of color change, against the change of pHs. The optimal extraction condition was 22.5 mL, 16 min of reaction at 45 °C. The total monomeric anthocyanin contents in the liquid extract were between 450.29 and 554.63 mg/100 g of dry flower. The lyophilized extract was characterized by presenting: reducing capacity of 806.92 mg GAE/100 g, high antioxidant potential, low in vivo toxicity and promising results in relation to minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, against food pathogens. In this, thirteen anthocyanins and nine non-anthocyanic phenolic compounds were quantified by UHPLC/MS, which may be associated with the observed effects. Films obtained with cellulose acetate (20% and 30% lyophilized extract; 20% and 30% lyophilized flower)

did not change color at different pHs. However, a color change occurred in the extract, in the lyophilized flower and in the films when exposed to the culture of gram-negative bacterium (*S. Typhimurium* and *E. coli*). The results suggest a high potential of the extract and the films for future studies of application in active food packaging, especially as a marker of microbiological contamination by gram-negative bacterium.

Keywords: Phenolic; Toxicity; Color; Antioxidant; Microbiology.

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Hipóteses	15
3 Objetivos	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 Revisão bibliográfica	17
4.1 <i>Clitoria ternatea</i> : características botânicas	17
4.2 Compostos antociânicos	20
4.3 Material polimérico	22
4.4 Embalagens de alimentos.....	24
4.5 Indicador microbiológico	26
5 Artigo 1	27
6 Artigo 2	57
7 Considerações finais	88
8 Referências bibliográficas	90

1. Introdução

A *Clitoria ternatea* tem origem do latim do gênero “clitoria”, o termo advém de uma associação das flores com os órgãos genitais femininos. A planta pertence à família das Fabaceae, é herbácea perene, elíptica e com folhas. É cultivada como planta ornamental, cresce como uma trepadeira ou rastejante, e exige pouco cuidado depois de cultivada. A planta é também conhecida como feijão-borboleta, cunhã, ervilha-borboleta, ismênia e palheteira. É originária de regiões da Ásia tropical e atualmente encontrada em diversas regiões como América do Sul e Central, sudeste asiático, China e Índia (OGUIS et al., 2019). No Brasil, seu cultivo é mais comum em climas tropicais, tanto que seu cultivo e desenvolvimento na Região Sul do Rio Grande do Sul foi inédito no presente estudo, devido ao clima subtropical úmido predominante na localidade.

A planta é de crescimento rápido, vigorosa e possui hastes finas de até 4 metros de altura. A germinação leva de 15 a 20 dias e é de fácil multiplicação por sementes. Os frutos são vagens planas de 5 a 7 cm e comprimento, com 6 a 10 sementes em cada vagem. A principal característica sobre esta planta é a cor de das flores, um azul intenso e vivo com marcações amareladas no centro (OGUIS et al., 2019).

A flor da *Clitoria ternatea* é rica flavonóides e outros compostos fenólicos que tem potencial como biorredutores (KRITHIGA et al., 2015; SYAHIRAH et al., 2018; HAVANDA et al., 2019). Os flavonóis majoritários são ternatina, delfidina, caempferol, quercetina e miricetina (OGUIS et al., 2019). As antocianinas (ternativa e delfinidina) são compostos antioxidantes que quando associados à ingestão em seres humanos, apresentam benefícios para saúde, os quais incluem risco reduzido de doença cardíaca coronária, proteção contra obesidade, hipoglicemia, entre outros (CARDOSO et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

As antocianinas, são pertencentes a classe dos flavonóides, constituem grupo de pigmentos polares, solúveis em água e altamente instáveis a temperaturas elevadas, incidência de luz, exposição à oxigênio e são susceptíveis à alteração de estrutura e cor em algumas faixas de pH (CONCENÇO, 2014; SABINO et al., 2021).

Para extrair os compostos antociânicos presentes em diversas matrizes alimentícias, há muitas técnicas que são utilizadas, a técnica convencional mais difundida é a extração com solvente, onde ocorre a combinação de solvente com um processo de aquecimento o qual ocorre a transferência de massa, no entanto, essa técnica apresenta a desvantagem do risco da degradação dos compostos bioativos termolábeis (BARBA et al., 2016; CARVALHO et al., 2018).

As antocianinas ocorrem mais comumente na natureza como glicosídeos de geninas antocianidinas, podendo estar aciladas com ácidos orgânicos como, cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos. Sua estrutura geral é derivada o cátion flavílico (KHOO et al., 2017; AZIMA et al., 2017).

As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, tais como o cátion flavílico, a base quinoidal, o carbinol e a chalcona. Essas estruturas podem sofrer interferência de diversos fatores, entre estes, temperatura, pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas, proporcionando diferentes colorações às antocianinas. O pH é o fator que mais influência na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas. Com o aumento do pH ocorre nas antocianinas a protonação do cátion flavílico e, conseqüentemente, diminuição do número de ligações duplas conjugadas, que são responsáveis pelo aumento nos máximos de absorção destas substâncias (BORDIGNON, 2009). Diante disso, as antocianinas podem ser utilizadas como indicadores de pH, pelo fato de mudarem de cor de acordo com o pH do meio em que se encontram, variando de tons vermelhos quando em meio ácido e tons verdes quando em meio básico (SHARMA et al., 2013).

Uma aplicação dessas antocianinas na indústria alimentícia, seria o desenvolvimento de uma embalagem inteligente, utilizando o indicador de pH obtido das antocianinas das flores da *Clitoria ternatea* para detectar a presença de deterioração oxidativa e de microorganismos patogênicos em alimentos (SINGH et al., 2021). Contudo, a instabilidade desses compostos na presença de luz, variações de

pH, oxigênio, temperatura e umidade (WADHWA et al., 2017; FONSECA et al., 2020) é um limitador para empregá-los em alimentos. Como alternativa para proteger os compostos bioativos das flores da *Clitoria ternatea* se destaca o uso da nanotecnologia, encapsulação e produção de filmes, áreas que pontuam crescente desenvolvimento em ciência de alimentos (GONZÁLEZ et.al., 2015; HE et. al., 2016; PITAKSUTTEEPONG, 2016; SAIDI et. al., 2016; TAN et al., 2016).

Diante das tecnologias que existem na área de alimentos, para proteger esses compostos bioativos, tem-se o uso de polímeros sintéticos. O acetato de celulose é um exemplo de polímero sintético, que é um dos derivados da celulose, componente estrutural de plantas, e pode ser extraído de diversas fontes, como por exemplo do caroço da manga, palha de milho e o mais comum, da madeira. Trata-se de um material promissor, pois é biodegradável e tem a sua utilização em nanofibras, nanocápsulas e em filmes já relatada na literatura (RIBEIRO et al., 2016).

Em relação aos alimentos e a exigência dos consumidores, a indústria constantemente busca por inovações para garantir produto de qualidade e segurança durante seu acondicionamento. Os termos “embalagens ativas” e “embalagens inteligentes” possuem conceitos interligados, pois podem atuar juntas, mas cada uma possui uma ação distinta. No interior de uma embalagem ativa, pode ser adicionado um composto bioativo encapsulado, com atividade antioxidante ou antimicrobiana (WEN et al., 2016). Dessa forma, a embalagem ativa interage com o produto, controlando a sua qualidade, tornando-o seguro e com maior vida útil (MACHADO et al., 2011; BHUSHANI et al., 2014).

As embalagens inteligentes monitoram as condições do alimento e possibilitam uma comunicação com o consumidor informando, por exemplo, o estágio de maturação de um produto, se ele está em condições de ser consumido do ponto de vista microbiológico, dentre outras. Tais embalagens são capazes de identificar possíveis problemas e alterações no produto (MACIEL et al., 2012; RUKCHON et al., 2014). São desenvolvidas utilizando a encapsulação de compostos, uma alternativa para proteger os compostos bioativos termossensíveis (TAN et al., 2016). A maioria

das embalagens inteligentes utiliza sensores simples, como monitores químicos, de temperatura, de pH, microbiológico, entre outros. O indicador de pH colorimétrico tem sido explorado, devido ao seu baixo custo, suas propriedades fáceis de usar e bem caracterizado, que interagem com a atmosfera interna e detectam a presença de gases, umidade e outros marcadores de qualidade (PRIETTO et al., 2017). Elas podem indicar desde oscilações na luminosidade até sobre a qualidade de um alimento, como alterações que indiquem seu vencimento. (PEREIRA et al., 2015).

A maior parte das embalagens convencionais, mais utilizadas pela população mundial, são provenientes de polímeros sintéticos como os derivados do petróleo, os quais não são biodegradáveis, acumulando-se no meio ambiente. Diante dessa preocupação com o impacto dos resíduos gerados, tem-se o uso de materiais biodegradáveis, como os filmes, para novas aplicações na indústria de alimentos (FERREIRA et al., 2012).

Os filmes biodegradáveis podem ser obtidos de fontes animais como quitosana, gelatina, soro do leite, entre outros. E os de fonte vegetal como amido, fécula de mandioca, pectina, zeína e celulose, dentre outros. Os filmes são produzidos por diversos métodos. A técnica de casting é um método simples e consiste em uma suspensão preparada com um polímero, diluído com solvente adequado ao tipo de material polimérico, seguido da adição de um plastificante. A solução é aquecida sob agitação, em seguida, uma quantidade pré-determinada é vestida em placas de petri e secas em estufa com circulação de ar por um tempo e temperatura adequada (GASTI et al., 2022).

2. Hipóteses

Como hipóteses deste trabalho temos que:

- O cultivo da *Clitoria ternatea* na região de Pelotas/RS é possível, embora seja uma planta mais adaptada em clima tropical;
- As flores apresentarão elevado teor de compostos bioativos benéficos, especialmente antocianinas;
- As técnicas de extração verdes, aliadas a otimizações multivariadas, possibilitarão obter um extrato comestível com elevado em compostos antociânicos;
- Os compostos bioativos poderão ser incorporados em alimentos, através da produção de filmes de acetato de celulose pela técnica de *casting*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar as flores da *Clitoria ternatea* cultivadas na Região Sul do Rio Grande do Sul, visando avaliar seu uso potencial na área alimentícia.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar um método ambientalmente amigável para obter um extrato comestível com elevado teor de compostos bioativos;
- Avaliar a composição do extrato obtido quanto ao teor de fenólicos não antociânicos e fenólicos antociânicos, a capacidade redutora, a atividade antioxidante, a toxicidade *in vivo* e atividade frente a patógenos alimentares gram-positivos e gram-negativos;
- Produzir filmes de acetato de celulose pela técnica de casting incorporando o extrato e flores liofilizadas, com a finalidade de ser um indicador que muda de coloração frente a variações de pH do alimento.

4. Revisão bibliográfica

4.1 *Clitoria ternatea*: características botânicas

Cientificamente, a flor da *Clitoria ternatea* atraiu interesse na área de alimentos por possuir compostos antioxidantes e pela sua cor (AB-RASHID et al., 2020; PRABHU et al., 2022). A flor de cor azul brilhante contém uma grande variedade de polifenóis, principalmente antocianinas. Os principais constituintes polifenólicos encontrados nas flores são as antocianinas ternatinas (TAUR et al., 2011; BIYOSHI E GEETHA, 2012; PASUKAMONSET et al., 2016; OGUIS et al., 2019).

A *Clitoria ternatea* produz flores pentâmeras zigomórficas em forma de ervilha com um cálice tubular composto por cinco pétalas. A corola é composta por cinco pétalas livres, com um estandarte grande e arredondado, duas asas enrugadas que costumam ter metade do comprimento do estandarte e duas quilhas brancas que auxiliam na proteção dos órgãos florais (BIYOSHI E GEETHA, 2012) (Figura 1A). As corolas são de cor azul escuro, mas também podem ser em branco e vários tons de azul (BIYOSHI E GEETHA, 2012). O diadelphous C. ternateaos estames consistem em 10 filamentos onde nove são fundidos e um é livre (BIYOSHI E GEETHA, 2012). As vagens de *Clitoria ternatea* são estreitas e achatadas com pontas pontiagudas e geralmente contêm cerca de 10 sementes (Figura 1B). A flor produz folhas compostas pinadas que são ovais e inteiras com pontas emarginadas (Figura 1C). As raízes também produzem grandes nódulos para fixação de nitrogênio (Figura 1D).

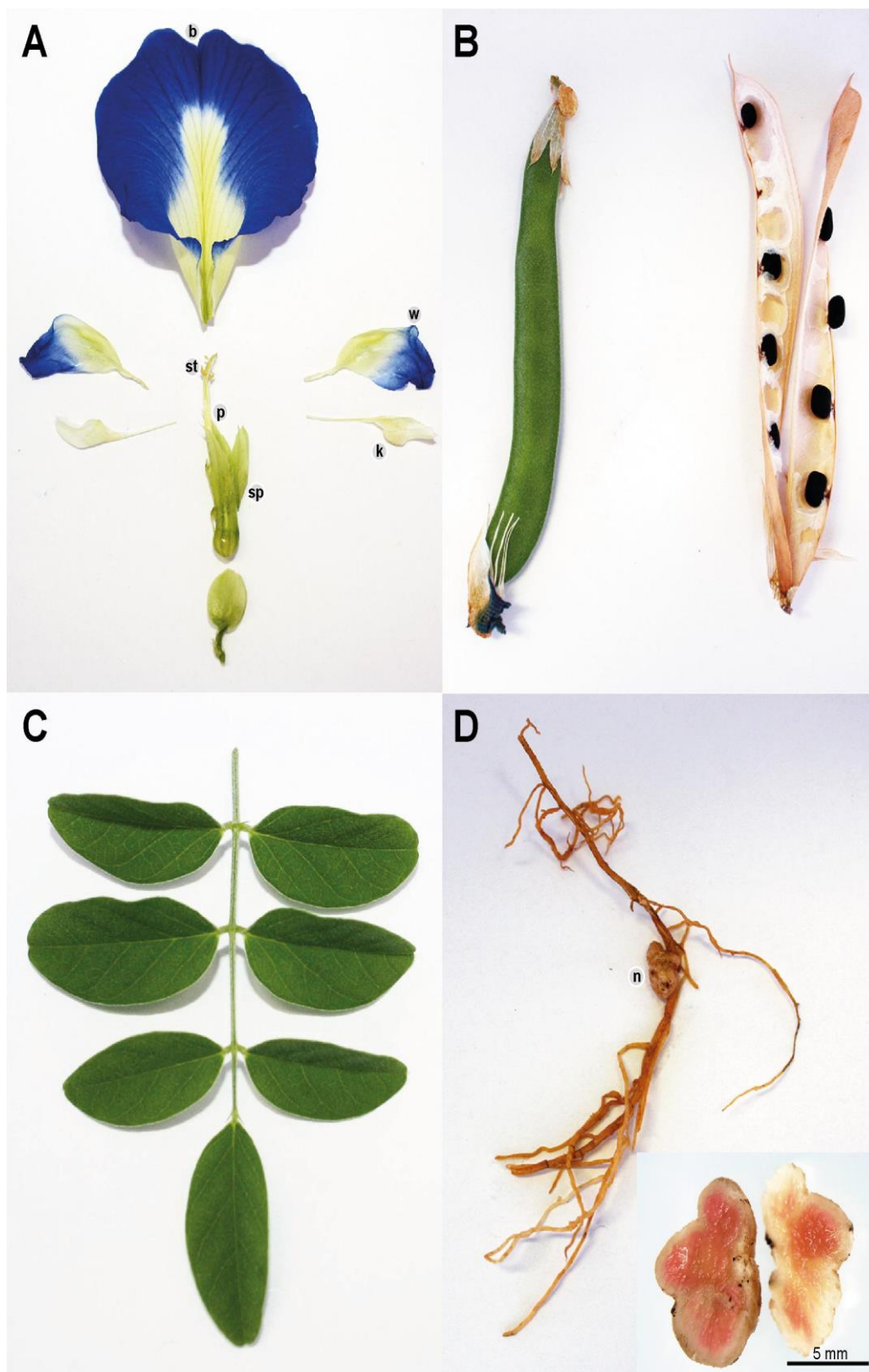


Figura 1. *Clitoria ternatea* (A) flor, (B) vagens, (C) folhas e (D) raízes com nódulos. A flor *Clitoria ternatea* consiste no estame (st), pistilo (p), sépalas (sp) e corola. A corola é composta por cinco pétalas: um estandarte (b), duas asas (w) e duas quilhas (k). *Clitoria Ternatea* possui folhas compostas pinadas, vagens achatadas e pontiagudas e raízes que produzem nódulos (n). Fonte: OGUIS, et al., (2019).

A planta ocorre em ambientes tropicais e subtropicais ao redor mundo. A distribuição da *Clitoria ternatea* dá-se ao fato dela ser tolerante a certas condições de seca, não depende de polinizadores específicos para seu desenvolvimento devido a sua autopolinização e capacidade de fixação de nitrogênio. No entanto, na Região Sul do RS, o clima é subtropical úmido, o qual na maior parte do ano é de temperaturas baixas, no inverno, em alguns locais as temperaturas chegam abaixo de zero, característica que não favorece o desenvolvimento ocorrendo até mesmo a senescência.

Na figura 2, observa-se as regiões ao redor do mundo onde encontra-se as cultivares de *Clitoria ternatea*.



Figura 2. Distribuição de ocorrência da planta *Clitoria ternatea*. Os pontos de ocorrência são aproximados. O símbolo “+” representa onde se encontra a planta.

4.2 Compostos antociânicos

O termo “antocianinas” deriva do grego (anthos, uma flor, e kyanos, azul escuro) são pigmentos fenólicos solúveis em água e são atribuídas aos tons vermelho, roxo e azul. São encontradas em diversas flores e frutas (HONGYAN et al., 2012; KHOO et al., 2017; AZIMA et al., 2017). As antocianinas desempenham diversas funções, principalmente quando adicionadas aos alimentos, confere prevenção contra auto oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos, além de conferir na coloração aos produtos. Porém degradam quando submetidas a altas temperaturas, luz, oxigênio ou mudanças drásticas de pH (SANTOS et al., 2014).

Em solução aquosa, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela). A pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal. Em meio aquoso a hidratação do cátion flavilium leva ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. À temperatura ambiente, e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O pH interfere diretamente no equilíbrio das antocianinas, como ilustrado na Figura 1. Em meio ácido (pH = 1), as antocianidinas apresentam coloração na região visível do vermelho (cátion flavílio) e em pH ainda ácido, porém maior (pH = 4,5), as antocianidinas apresentam uma coloração vermelha bem menos intensa, próxima ao incolor (CARDOSO et al., 2011).

Como alternativa para manter os parâmetros dos compostos antociânicos, tem-se a utilização da técnica de casting para produção de filmes carregados de bioativos, que é capaz de manter a proteção de seus compostos, por ser uma técnica que não utiliza altas temperaturas ou pressões na produção (WEN et al., 2017). Desse modo, é viável a incorporação desses filmes ricos em compostos bioativos pela indústria alimentícia, diretamente no alimento e alvo de muitas pesquisas, na parte de embalagens de alimentos (FONSECA et al., 2019b; FONSECA et al., 2021).

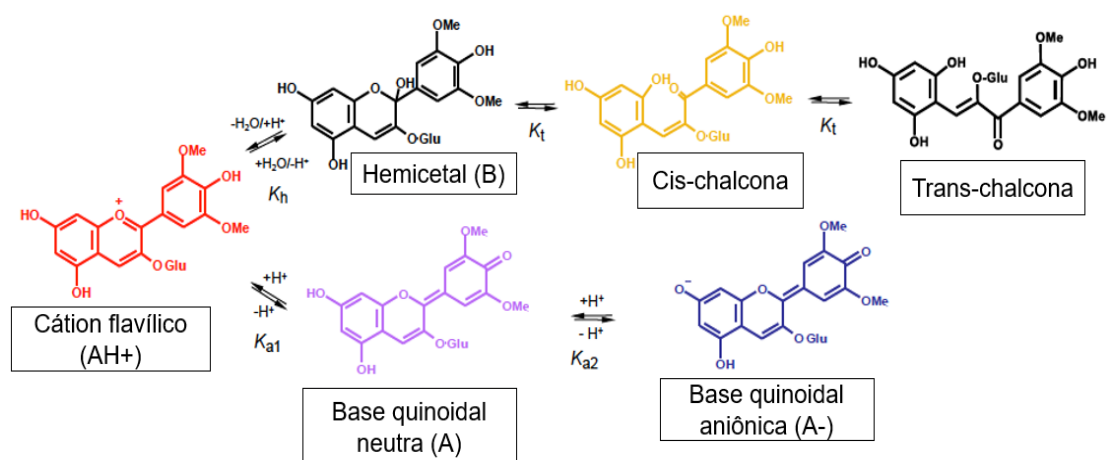


Figura 3. Possíveis transformações estruturais sugeridas para antocianinas em meio aquoso em função do pH. Fonte: FREITAS, 2019.

4.3 Material polimérico

Na produção de filmes pela técnica de *casting* os compostos de interesse (neste caso, os compostos antociânicos) são envolvidos ou revestidos por um material polimérico, resultando na proteção dos compostos de interesse (MENSITIERI et al., 2011; NISTA, 2012; FERREIRA et al., 2016; PEREIRA, 2017). A escolha da matriz polimérica é importante pois deve se incorporar aos compostos bioativos e interagir com eles, não anulando ou degradando os mesmos (CRUZ et al., 2011).

A celulose é um componente estrutural da parede celular de plantas e vegetais, um polímero natural, amplamente distribuído e encontrado na natureza. A celulose tem sido amplamente estudada devido suas características de biodegradabilidade, distribuída em abundância na natureza e modificação química. A celulose pode ser utilizada para adição ou obtenção de filmes, como agentes encapsulantes, aplicação de nanocristais de celulose como aditivo de reforço em embalagens (GONZÁLEZ et. al., 2015) e como a aplicação de acetato de celulose no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (ASSIS, 2021).

Dentre os polímeros utilizados, o acetato de celulose vem sendo estudado por ser um dos ésteres de celulose mais produzidos. Ele apresenta-se como um polímero amorfo, atóxico e inodoro, com uma grande vantagem em relação à celulose, por ser apto à solubilização em vários solventes. É resistente a ácidos fracos, estável em óleo mineral, e permeável ao vapor de água e de álcool. Além de possuir características biodegradáveis, ou seja, não agredindo o meio ambiente (NISTA, 2012).

Os filmes de acetato de celulose são obtidos pela técnica de casting, sendo estes solubilizados em acetona. Esse biomaterial é capaz de conferir características de filme fino, com estrutura continua, hidrofóbicos, transparente, pouca opacidade e baixa elasticidade. No entanto, todas essas características citadas irão depender da quantidade do polímero, presença de agentes plastificantes e carga de compostos bioativos.

As propriedades e aplicações do acetato de celulose são determinadas pela viscosidade de suas soluções, e pelo grau de substituição do polímero. Acetatos de celulose que tenham grau de substituição entre 0,5-1 são solúveis em água (NISTA, 2012).

Com base no estudo de Neves et al. (2017), o uso do acetato de celulose como material de parede, para liberação controlada em fármacos, obteve-se resultados satisfatórios. De acordo com Cruz et al. (2011), o uso de acetato de celulose oriundo das fibras do caroço de manga, mostrou-se eficiente na interação com a matriz.

Um estudo detalhado de Yan et al. (2012), mostrou a eficiência da técnica de *electrospinning*, utilizando o acetato de celulose como material de parede, para produção de nanofibras de alta qualidade. O objetivo da pesquisa foi utilizar diferentes solventes e comparar qual o melhor resultado.

Na área de alimentos, Wongsasulak et al. (2010) produziu nanofibras comestíveis a partir de albumina de ovo juntamente com acetato de celulose, comestível e eletrofiável, para melhorar a eletrofiação, e o resultado foi a fabricação bem sucedida da mistura de soluções de albumina e acetato de celulose.

Assis (2021) produziu filmes ativos de acetato de celulose com adição de diferentes carotenoides, sendo eles licopeno, norbixina e zeaxantina. O estudo provou que os filmes contribuíram para obtenção de embalagem com atividade antioxidante. No estudo de Carvalho et al. (2018), foi desenvolvido um filme ativo de acetato de celulose incorporados de uma nanosuspensão de curcumina. O resultado do estudo foi a obtenção de filmes pigmentados de amarelo, devido a cor do composto bioativo utilizado.

4.4 Embalagens de alimentos

As embalagens tradicionais desempenham um papel fundamental na conservação dos alimentos (FERREIRA, 2012; SUNG et al., 2013). Dois novos conceitos de embalagens são idealizados para promover proteção adicional e garantia da qualidade dos produtos, são eles o conceito de embalagem ativa e de embalagem inteligente (REALINI et al., 2014). As embalagens inteligentes tem como principal característica monitorar as condições de qualidade dos alimentos, dessa forma, em comparação a uma embalagem tradicional, promovem a função de comunicação com o consumidor (VANDERROOST et al., 2014; GHAANI et al., 2016; MA et al., 2016).

Os sistemas de embalagens inteligentes possuem três principais tecnologias: (I) indicadores, que providenciam mais conveniência e/ou informação aos consumidores a respeito da qualidade do alimento; (II) carreadores de dados, como o código de barras e tags de indentificação por rádio-frequência (RFID), que são especificamente direcionados para os propósitos de armazenamento, distribuição e rastreabilidade, e (III) sensores, que permitem uma rápida e definida quantificação de analitos em alimentos (GHAANI et al., 2016).

De acordo com os sistemas de embalagens inteligentes, os mais estudados e constantemente aprimorados são os sensores e indicadores (MOHEBI et al., 2015; SILVA-PEREIRA et al., 2015; GHAANI et al., 2016). Um sensor pode ser definido com um dispositivo utilizado para localizar, quantificar ou detectar energia ou matéria gerando um sinal para a detecção ou para a quantificação de uma propriedade física ou química. Já os indicadores podem ser definidos como substâncias que indicam a concentração, presença ou ausência de substâncias ou o grau de reação entre substância por alterações de características, acima de tudo a cor (BIJI et al., 2015; PEREIRA, 2017).

Os indicadores visuais de pH colorimétrico tem sido amplamente explorados em embalagens inteligentes devido as suas propriedades bem caracterizadas, são de baixo custo e fáceis de usar. São constituídas de pigmentos naturais sensíveis as alterações de pH e são posicionadas no interior da embalagem (RUKCHON et al.,

2014; PRIETTO et al., 2017). O uso desses pigmentos naturais, além de serem obtidos a partir de recursos sustentáveis, com o mínimo de impacto ambiental, apresentam certas vantagens em relação aos sintéticos como: o baixo custo, a não toxicidade, a biodegradabilidade e a ampla disponibilidade na natureza (ISLAM et al., 2013). Um exemplo desses pigmentos, são as antocianinas, as quais são metabólitos secundários encontrados em uma grande diversidade de frutas e vegetais, como exemplo na batata doce, repolho roxo, uvas e, *Clitoria ternatea*. Diversas pesquisas mostram-se promissoras no uso de biopolímeros e antocianinas para produção de sensores de pH, obtidas de repolho roxo e do tegumento do feijão preto (PRIETTO et al., 2017) e também de beterraba e ameixa (CHALES, 2018).

4.5 Indicador microbiológico

As embalagens inteligentes se destacam das demais, por que além de cumprir com o papel de uma embalagem tradicional, tem a capacidade de comunicar o consumidor sobre o estado em tempo real de conservação do alimento, tal comunicação deve ser de fácil interpretação. Essas embalagens proporcionam o conhecimento de fatores como umidade, pH e presença de microrganismos por meio de indicadores incluídos na embalagem (YIN et al., 2023).

Esses indicadores podem indicar alterações químicas ou contaminação por microrganismos em alimentos embalados. Os indicadores comumente utilizados pelas indústrias são os corantes sintéticos, os quais são sensíveis ao pH, ocorrendo a mudança de coloração (YIN et al., 2023; ROY&RHIM, 2021). No entanto esses corantes são agressivos ao meio ambiente e principalmente nocivos à saúde humana, são tóxicos e cancerígenos.

Atualmente, há estudos onde utilizam pigmentos naturais em embalagens inteligentes, como a curcumina e a antocianina. A forma que vem sendo amplamente estudada para utilizar indicadores em embalagens inteligentes, é o uso de filmes carregados com compostos bioativos, os quais são responsáveis pela cor e expostos a diferentes condições, mudam a cor para avaliar o estado de frescor do alimento. No entanto, não há na literatura filmes de acetato de celulose incorporados com compostos antociânicos obtido das flores da *Clitoria ternatea*, como indicador de cor para embalagens de alimentos para garantia da qualidade.

5. Artigo 1

¹GONÇALVES, G.C.P., ¹ROSAS, A.L.G., ¹SOUSA, R.C., ¹VIEIRA, T.R.R., ¹SOUSA, T.C.A., ¹RAMIRES, T., ²SILVEIRA, T.F.F., ³BARROS, L., ¹SILVA, W.P., ¹DIAS, A.R.G., ¹ZAVAREZE, E.R., ¹MEINHART, A.D.

Green method for extraction of anthocyanins from the flowers of *Clitoria ternatea* cultivated in southern Brazil: characterization, in vivo toxicity and biological activities.

Enviado a Food Chemistry.

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPel), ² Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal,³ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

ABSTRACT

The study aimed to develop a green method to obtain an anthocyanin-rich edible extract of *Clitoria ternatea* flowers grown in Pelotas (southern Brazil). The extract was characterized by UHPLC-MSⁿ and analyzed for toxicological potential in an *in vivo* model, reducing capacity, and antioxidant and antimicrobial activities. By using a complete 2³ multivariate design to study the effects of temperature, acidified solvent volume, and time on the total anthocyanin content and reducing capacity, it was possible to determine the optimal point (45 °C, 16 min, and 22.5 mL). Thirteen anthocyanins and eight non-anthocyanins were quantified. *In vivo* toxicity assay using *Galleria mellonella* showed a safe concentration when administered up to 2.2 g of lyophilized extract per body kg. The extract showed antioxidant activity and relevant antibacterial action against three food pathogens, and the method proved to be fast, straightforward, and have a low environmental impact, in addition to producing an extract with high potential for application in food.

Keywords: anthocyanins, phenolics, toxicity, antimicrobial action.

1 INTRODUCTION

Clitoria ternatea, commonly known as butterfly bean or butterfly pea, is a plant native to tropical Asia; it belongs to the *Fabaceae* family and is classified as a fast-growing vine with germination in 15–20 days and thin stems that grow up to 4 m high (Oguis et al., 2019). It is a tropical plant cultivated in full sun with intense flowering; there is no requirement for fertile soils, and it can be cultivated in soils of moderate fertility, especially clayey ones. Moreover, this tropical plant tolerates short drought periods, and watering should be carried out regularly (Dhanasekaran et al., 2019).

In Brazil, *C. ternatea* is cultivated in different regions, especially in warm climates. In southern Rio Grande do Sul State (RS), the climate is predominantly subtropical, characterized by well-defined seasons, and has significant temperature variations. The winter season varies, with average temperatures ranging from 4 to 18 °C and sporadic frosts; because of this, the plant can only be cultivated in the spring and summer. In the literature, there is no data on the cultivation and composition of the flower in the southern region of RS.

C. ternatea has several applications in the medicinal area, such as therapy (Dhanasekaran et al., 2019; Escher et al., 2020; Prabhu et al., 2022), in agriculture as a forage plant, and in the food industry as antioxidant and antimicrobial compounds (Mehmood et al., 2019). *C. ternatea* flowers are rich in phenolic compounds, which have bioactive potential (Jeyaraj et al., 2021), and the main anthocyanins are known as ternatins (compounds derived from delphinidin); the flavonols are kaempferol, quercetin, and myricetin (Oguis et al., 2019). Their petals have vivid blue coloration, indicating the presence of anthocyanins, more notably ternatins, which constitute a family of compounds derived from delphinidin 3,3',5'-triglycoside. This basic structure is modified by acylation and glycosylation (i.e., malonylated with *D*-glucose (G) and malonate (M) in position 3, alternating with *D*-glucose and *p*-coumaric acid (C) in positions 3' and 5' of the lateral chains (Terahara et al., 1996, 1998).

Anthocyanins are present in fruits, vegetables, and flowers and are widely distributed in nature; their colors vary from red, purple, and blue. They belong to the flavonoid class, are polar pigments, soluble in water, highly insoluble to luminosity, heat, and oxygen exposure, and susceptible to variations in some pH ranges (Azima

et al., 2017; Sabino et al., 2021). When added to foods, anthocyanins confer antioxidant activity and interfere with the color of the products (Azima et al., 2017).

Anthocyanins' low stability against external factors (e.g., luminosity and heat) interfere with extraction since, despite high temperatures optimizing their extraction, they reduce their stability or even degrade them. Therefore, optimizing the time, temperature, and solvent volume during extraction is crucial to minimize time and maximize extraction capacity (Urso et al., 2023).

The efficiency of the anthocyanin extraction method is correlated with the composition of the extraction solution, quantity of the solution, amount of raw material, temperature, and extraction time, among other factors. One of the most employed strategies to maximize bioactive compound yields of plant material is by using multivariate design (Oguis et al., 2019; Jeyaraj et al., 2021).

The use of methods that do not use toxic solvents is a recurring topic in research since these solvents harm the environment and handlers' and consumers' health. Thus, using methods with green solvents has been stimulated over the years. These techniques reduce or even eliminate the use of toxic and harmful products, leading to more sustainable technologies and renewable raw materials (Jeyaraj et al., 2021).

Given the above, this study aimed to optimize anthocyanin extraction in the flower extract of *Clitoria ternatea* using acidified water at 1% as a solvent, obtaining an edible extract. A 2³ multivariate design was employed to optimize the time, temperature, and volume of the extraction solution in total anthocyanin extraction and reducing capacity. At the optimal extraction point, we analyzed the total monomeric anthocyanins, reducing capacity, antioxidant activity, anthocyanin characterization, toxicity in *Gallerias mellonella*, and antimicrobial activity in pathogenic bacteria.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents

The reagents used were anhydrous citric acid PA (Tech Profile, CAS 77929), Folin-Ciocalteu phenol reagent (2 mol L⁻¹) (Scientific Exodus, Brazil), sodium carbonate (Synth, Brazil), gallic acid (Dynamics, Brazil), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline) 6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma Aldrich, CAS 30931-67-0, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, CAS 1898-66-4, India),

methanol (Scientific Exodus, CAS 67-56-1, Brazil), potassium persulfate (Synth, Brazil), ethyl alcohol (Dynamics, Brazil), gentamicin (10 µg) (Sensifar), and potato dextrose broth (KASVI, Brazil).

2.2 *Clitoria ternatea* flower samples

C. ternatea flowers were harvested in a field in the municipality of Capão do Leão (31°47'55.8"S 52°25'06.7"W) in RS, southern Brazil. The seeds were provided by a producer from Americana (São Paulo State, Brazil) and grown in a flower bed in full sun during October 2021. The land was prepared using a layer of sand, earth, fertilizer (NPK (S) 10.20.20 (2)), and quicklime. When the seedlings reached 30 cm, their stems were suspended in string wire so the plant could thrive. The maintenance of the flower bed and management of the plants were done every 15 days, and the watering and harvesting of the flowers were done daily. The flowers were harvested between December 2021 and April 2022.

C. ternatea flowers were dried in a lyophilizer (Liotop K 180) and ground in a grinder (Boca Raton, USA) until a 200-mesh granulometry. The sample was stored in a freezer (-18 °C) in packages protected from light, oxygen, and moisture until analysis.

2.3 Optimization of anthocyanin compound extraction from *C. ternatea* flowers

The extraction was optimized through a 2³ complete multivariate design, with central and axial points, totaling 17 experiments. The variables investigated were temperature (30–60 °C), water volume containing 1% citric acid (5–40 mL), and agitation time in a water bath (2–60 min, values corresponding to axial points -1.68 and +1.68, respectively). The complete matrix is listed in Table 1. All experimental conditions were performed in duplicate, and the central point was performed in sextuplicate.

The dependent variables were the total monomeric anthocyanin content and reducing capacity by the Folin-Ciocalteu method. Extraction was performed according to the method of Lee et al. (2005), with some adaptations. In summary, 0.1 g of a freeze-dried sample was added from the extraction solution (composed of acidified water with 1% citric acid) to falcon tubes in volumes. The acid was chosen based on preliminary tests with tartaric, malic, ascorbic, and citric acids, and we observed that

citric acid had the best cost-benefit. The tubes were taken to a water bath (Velp Scientifica, Enzymatic Digester-GDE, Italy) with agitation at 300 rpm and with temperature and time according to multivariate design. The liquid extracts were then filtered in Whatman paper filters and analyzed for total anthocyanins and reducing capacity.

The results were analyzed regarding the possibility of model adjustment through analysis of variance (ANOVA) to predict the optimal extraction conditions. The optimal extraction condition was repeated four times, and its extract was lyophilized and taken for anthocyanin and non-anthocyanin compound identification and quantification by UHPLC-MSⁿ and analysis of *in vivo* toxicity, antioxidant activity, reducing capacity, and antimicrobial activity (in pathogenic food bacteria).

2.4 Total monomeric anthocyanins and extract reducing capacity in the extraction optimization process

The total monomeric anthocyanin content was determined according to Lee et al. (2005). The filtered extracts were evaluated in a spectrophotometer (6705 UV/VIS Spectrophotometer JENWAY) at 520 nm for anthocyanins. The total monomeric anthocyanins were calculated by Lambert-Beer's law and expressed in mg/g of cyanidin-3-glucoside.

The reducing capacity was determined by the Folin-Cicalteau method as per Lee et al. (2005), with adaptations. A 0.25-mL sample/standard/extraction solution aliquot was added to 1.25 mL of Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L reagent solution, followed by agitation for 10 s and rest for 5 min in the dark. Then, 1 mL of sodium carbonate solution 7.5% was added, stirred for 10 s, and left in the dark for 120 min. Finally, the reading was performed at 760 nm in a spectrophotometer (6705 UV/VIS Spectrophotometer JENWAY) while considering the white color. The results were expressed in mg equivalents of gallic acid (mg GAE) per 100 g of *C. ternatea* sample.

2.5 Evaluations of lyophilized extract obtained at the optimal extraction point

The optimal extraction conditions enabled us to obtain 5.78 g of lyophilized extract per 100 g of dry flower.

2.6 Anthocyanin identification and quantification by high-efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Chromatographic anthocyanin separation was achieved with a Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) column at 35 °C. The solvents used were: (A) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and (B) acetonitrile. The gradient elution followed these parameters: 10% B for 3 min, from 10 to 15% B for 12 min, 15% B for 5 min, from 15 to 18% B for 5 min, from 18 to 30% B for 20 min, from 30 to 35% B for 5 min, and from 35 to 10% B for 10 min. The total run time was 60 min, followed by column reconditioning of 10 min using a flow rate of 0.5 mL/min. Double online detection was carried out in a diode array detector (DAD) using 520 nm as the preferred wavelength and in a mass spectrometer (MS) connected to high-efficiency liquid chromatography (HPLC) system via the DAD cell outlet. Mass spectrometry (MS) detection was performed in positive mode using a Linear Ion Trap LTQ XL mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source. Nitrogen served as the sheath gas (50 psi); the system was operated with a spray voltage of 4.8 kV, a source temperature of 320 °C, and a capillary voltage of 14 V. The tube lens offset was kept at a voltage of 75 V. The full scan covered a mass range from 100 to 2000 m/z. The collision energy used was normalized (30%), and data acquisition was carried out using the Xcalibur® software (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

Chromatographic analysis of the phenolic compounds was performed in a Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a DAD coupled to an electrospray ionization mass detector (LC-DAD-ESI/MSⁿ), a quaternary pump, an auto-sampler (kept at 5 °C), a degasser, and an automated thermostatted column compartment. Chromatographic separation was performed with a Waters Spherisorb S3 ODS-2C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) column thermostatted at 35 °C. The solvents were: (A) 0.1% formic acid in water and (B) acetonitrile. The elution gradient established was isocratic 15% B (5 min), 15 to 20% B (5 min), 20–25% B (10 min), 25–35% B (10 min), 35–50% B (10 min), and re-equilibration of the column using a flow rate of 0.5 mL/min. Double online detection was carried out in the DAD using 280, 330, and 370 nm as the preferred wavelengths and in an MS connected to the HPLC system via the DAD cell outlet. The MS detection

was performed in negative mode using a Linear Ion Trap LTQ XL MS (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source. Nitrogen served as the sheath gas (50 psi); the system was operated with a spray voltage of 5 kV, a source temperature of 325 °C, and a capillary voltage of -20 V. The tube lens offset was kept at a voltage of -66 V. The full scan covered the mass range from 100–2000 m/z. The collision energy used was normalized (30%). Data were acquired using the Xcalibur® software (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

The phenolic compounds (anthocyanins and non-anthocyanins) were identified using standard compounds, when available, by comparing their retention times, UV-vis, and mass spectra and the obtained information with data in the literature, giving a tentative identification. A calibration curve for each available phenolic standard was constructed based on the UV signal for the quantitative analysis. For the identified phenolic compounds for which a commercial standard was unavailable, quantification was performed through the calibration curve of the most similar available standard.

2.7 *Galleria mellonella* toxicity assay

The toxicity of the extract was evaluated using the *in vivo* model in *Galleria mellonella*, according to Sardi et al. (2017), with some adaptations. To determine the quantity required to kill ≥50% of the organisms (i.e., the lethal dose [LD₅₀]), ten dilutions of the optimum point of the lyophilized extract diluted in distilled water were selected. The concentrations used were: 10, 25, 40, 55, 70, 85, 100, 115, 130, and 145 mg/mL of extract in water. A control with distilled water was used, and *G. mellonella* larvae (bodyweight: 0.20–0.30 g) were randomly chosen, and 15 healthy larvae (no signs of melanization) were separated for each concentration. A 10-μL aliquot of the solutions was injected into the abdominal hemocoel (where there is greater blood flow) of *G. mellonella* in the penultimate pseudo paw on the left using a Hamilton microsyringe for gas chromatography. The *G. mellonella* were incubated in a BOD greenhouse at 30 °C and monitored by counting after 24, 48, and 72 h.

2.8 Antioxidant activity

The antioxidant activity of the *C. Ternatea* flower extract at the optimal extraction point was determined by the DPPH and ABTS methods. The DPPH method, which is

the ability to donate hydrogen atoms by the compounds in the sample, was performed according to Vinholes et al. (2011, 2014). The DPPH stock solution was prepared with 24 mg of DPPH in 100 mL of methanol; the absorbance was then adjusted between 1.10 ± 0.02 to 515 nm in a microplate spectrophotometer. Then, 20 µL of the sample was added to a 96-well microplate, and the solvent was used to obtain the extract for the control and 200 µL of DPPH solution. The plates were shaken and kept in the dark for 30 min, and reading was performed on a Spectra Max 190 plate reader at a wavelength of 515 nm. The results were expressed as capturing the DPPH free radicals using Equation 1:

$$I (\%) = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

Where $A_{control}$ is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the extract) and A_{sample} is the absorbance of the tested extract in the reaction mixture. The ABTS free radicals were analyzed according to the method of Re et al. (1999); 30 µL of extract and ethyl alcohol (white) were added to 3.0 mL of ABTS solution, mixed in a vortex for 30 s, and kept in the dark for 30 min (room temperature of 25 ± 2 °C). The reading was performed in a spectrophotometer at 734 nm. The results were expressed as a percentage of inhibition calculated by Equation 2, where Abs_{white} is the absorbance of ethanol and Abs_{sample} is the absorbance of the extract reaction.

$$I (\%) = \frac{(Abs_{white} - Abs_{sample})}{Abs_{sample}} \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

2.9 Antibacterial action

The *C. ternatea* flower extract was diluted in 1 mL of sterilized distilled water, and the final concentration of the extract was 1460 mg mL⁻¹. Antibacterial activity was evaluated against three important food pathogens: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), and *Escherichia coli* (ATCC 25922), according to the methods of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2018). The strains were grown in tryptone soybean agar (Acumedia, USA) and incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. The inoculum was standardized at the concentration of 10⁸ CFU mL⁻¹ and sown in Petri dishes containing Mueller-Hinton agar (Kasvi, Brazil). Sterilized paper filter discs (6 mm), impregnated with 20 µL of the

extract, were placed in the agar and incubated at 37 °C for 24 h. Positive control discs of streptomycin (10 µg) were used, and negative control discs were impregnated with sterilized water and citric acid at 1%. The test was performed in duplicate, and an inhibition halo around the discs indicated antibacterial activity. The results were expressed as the mean diameter of the inhibition zones.

2.10 Minimum inhibitory and bactericidal concentrations

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by initially preparing bacterial suspensions of the three pathogens according to the 0.5 McFarland scale ($\approx 10^8$ CFU mL⁻¹). The suspensions were then prepared with a concentration of 10^6 CFU mL⁻¹ in sterilized Mueller-Hinton broth. From this inoculum, 50 mL were added to each well of a 96-well microplate, and the extract was evaluated at different concentrations (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.6, 0.78, 0.39, and 0.19% in relation to the initial extract concentration of 1460 mg mL⁻¹). The microplates were incubated for 24 h at 37 °C. The MIC of a compound is defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth without any visible growth after 24 h of incubation.

To determine the minimum bactericidal concentration (MBC), the wells that showed no visible multiplication were collected and sown in Mueller-Hinton agar. The plates were then incubated under aerobic conditions for 24 h at 37 °C. Thus, we verified the appearance of colonies in the plates, evidencing there were viable cells in the wells. The MBC is the lowest concentration in which 99.9% of the cells initially inoculated were inactivated. Thus, the concentrations that did not obtain cell culture indicated bactericidal activity. Both experiments were carried out in triplicate.

3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed by ANOVA at the 95% confidence level using the Estatística 7.0 and Design Expert 6.0.4 software.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Extraction condition optimization

The results obtained through experimental planning are listed in Table 1. The variables evaluated (temperature, volume, and time) were not significantly different, so

all studied levels could be used to optimize the extraction time. The coefficient of variation of the central point was 10.17% for the total monomeric anthocyanins and 9.87% for the reducing capacity, which are accepted values for analyses at this concentration. This indicates no false negatives in the fit and significance tests. Therefore, the central point (45 °C, 22.5 mL of extraction solution, and 16 min of agitation) was chosen as the optimal extraction point.

The total monomeric anthocyanin values under the different conditions ranged from 433.89 to 570.31 mg/100 g of flower. For reducing capacity expressed by the Folin-Cicalteau method, there was a variation between 1470.00 and 2904.51 mg GAE/100 g of flower. In the optimization of Santos et al. (2023) for commercially acquired *C. ternatea* samples, the authors concluded that the optimal extraction condition was 45 °C, 30 min, and ultrasound potency of 350 W; the authors found values slightly lower than our study for total monomeric anthocyanins (301.09–353.02 mg per 100 g of flower) and reducing capacity by the Folin-Cicalteau method (24.41–30.00 mg GAE/100 g). Escher et al. (2020) quantified the total anthocyanins of the aqueous extract of *C. ternatea* flowers grown in Campo Grande (Mato Grosso do Sul State, Brazil) at 11.7 °C for 30 min and 20 °C for 15 min, and obtaining 31.8 mg/g and 40.5 mg/g.

As demonstrated herein, *C. ternatea* flowers are rich in anthocyanins, which are classified into three types: unacylated, monoacylated, and polyacylated. Polysocylades are the anthocyanins in *C. ternatea* and are highly soluble in water, demonstrating high stability (Oguis et al., 2019; Netravati et al., 2022; Thuy et al., 2022; Santos et al., 2023). Because anthocyanins are thermolabile pigments, a high anthocyanin content will not be obtained if the extraction time is too short due to the low permeation capacity of the extraction solution. Nevertheless, they can degrade if extraction times are too long (Netravati et al., 2022).

Table 1

4.2 Characteristics of the extract obtained at the optimal extraction point

4.2.1 Identification and quantification of major anthocyanins by UHPLC-MSⁿ

The composition of anthocyanins of lyophilized *C. ternatea* flower extracts is presented in Table 2. The extraction was performed in the optimal condition obtained by multivariate design under the conditions of 45 °C, 16 min, and 22.5 mL of distilled water acidified with 1% citric acid.

Thirteen major anthocyanins were identified in the *C. ternatea* flower extract (Table 2), including fragmentation patterns obtained in sequential mass spectrometry, which were all assigned as ternantins. The identity of each compound was designated, when possible, based on their chromatographic behavior and UV-Vis characteristics and the studies of Terahara et al. (1996, 1998), who isolated and elucidated the structure of ternatins A1, A3, B2–B4, D2, D3, and C1–C5. All compounds showed typical anthocyanin-like Uv-Vis spectra with a maximum wavelength in the range reported for ternatins (532–548 nm) (Terahara et al., 1996, 1998).

Compound 1 showed $[M]^+$ with m/z at 1183 yielded fragments at m/z 935 $[M-G-malonate]^+$, 773 $[M-2G-M]^+$, 465 $[M-2G-malonate-G-C]^+$, and 303, which could be assigned as delphinidin. From this data, compound 1 was tentatively designated as ternatin 4. Compound 2 presented $[M+H]^+$ at m/z 1491 and major fragments at m/z 1243, 1081, and 773, evidencing the successive loss of malonate with glucose (248 Da), glucosyl (162 Da), and glucosyl with coumaroyl (308 Da), being tentatively assigned as ternatin A3 (Terahara et al., 1996).

Peaks 3 and 11, which showed $[M]^+$ with m/z at 1329, yielded fragment ions at m/z 1081 $[M-G-malonate]^+$, 919 $[M-2G-malonate]^+$, 773 $[M-G-M-G-C]^+$, 303 (corresponding to delphinidin), and were identified as ternatin C1 and B4, respectively. These isomers were differentiated based on their Uv-Vis spectra, which gave a maximum absorption at 537 nm for ternatin C1, and 546 for B4, corroborating Terahara et al. (1998) for these compounds (0.01% HCl-MeOH).

Peak 4 was designated as ternatin C3 due to its molecular ion $[M]^+$ at m/z 1021 and its fragmentation pattern, which is in agreement with compounds 1–3, yielding ions with m/z 773, 611, 465 $[M-G-M-G]^+$, and delphinidin at m/z 303 $[M-G-M-G-G-C]^+$, and with previous studies (Terahara et al. 1996). Compound 5 showed molecular ion $[M]^+$ of m/z 1799, which matches that of ternatin A2 (Terahara et al., 1996). Moreover, the produced ion fragments (1551, 1389, 1243, and 1081) revealed the pattern $[M-G-malonate]^+$, $[M-2G-malonate]^+$, $[M-3G-malonate-C]^+$, and $[M-4G-malonate-C]^+$,

corroborating that these groups come from positions 3, 3', and 5' in the delphinidin structure.

Compounds 6–13 showed molecular ions with $[M+]$ m/z , corroborating the findings of Terahara et al. (1996, 1998) and other authors who also found ternatins in *C. Ternatea* (Escher et al., 2020; Nair et al., 2015). Although they varied in glucose and acylation quantities, they produced similar patterns of losses of groups G, C, and malonate or gave m/z at 303, suggesting the presence of delphinidin. Together, these data suggest they were linked to positions 3, 3', and 5' in the delphinidin structure. Thus, they were tentatively identified as ternatin D3 (peak 6), ternatin B3 (peak 7), ternatin B2 (peak 9), ternatin B1 (peak 11), ternatin D2 (peak 12), and ternatin D2 (peak D1). Isobaric ternatins B2 and B3 were identified according to their elution order in the reverse phase (Vuong et al., 2021).

PRADO et al. (2019) for the extraction of anthocyanin compounds, the author produced the extract of the flowers of *Clitoria ternatea* under the conditions of 60 °C for 20 min, using water and methanol. It identified eight compounds, including ternatine B2 and D2 and quantified 72.54 mg/g, 66.89 mg/g, respectively. The quantification for ternatin B2 and D2 in the study were 57.94 mg/g and 32,52 mg/g, respectively.

4.2.2 Identification of major non-anthocyanins by UHPLC-MSⁿ

The composition non-anthocyanins of lyophilized *C. ternatea* flower extracts is presented in Table 3. The extraction was performed in the optimal condition obtained by multivariate design under the conditions of 45 °C, 16 min, and 22.5 mL of distilled water acidified with 1% citric acid.

Nine non-anthocyanins were identified, and the fragments obtained are listed in Table 3 and based on their chromatographic behavior, UV-Vis spectra, and fragmentation pattern. All of them were flavonoids and belonged to the flavonol subclass.

Peak 1 showed a deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ at m/z 755 and fragments at m/z 609 $[M-H-146]$ and 301 $[M-H-146-146-162]$, suggesting the loss of two deoxyhexoses (146) and one hexose moieties. The m/z at 301 represented the aglycone and showed typical fragments of quercetin (m/z 271, 255, 151, and 179). The mentioned neutral losses indicate O-glycosylation, and the presence of the aglycone

as a base peak in MS² suggests that these sugars were O-diglycosides. Thus, based on the data and previous studies that found this compound in *C. ternatea*, peak 1 was assigned as quercetin-O-rhamnosyl rutinoid (Escher et al., 2020; Nair et al., 2015).

Compounds 3 and 5, with molecular ions at m/z 609, showed ions at m/z 300 and 301, indicating a neutral loss of 308 Da, which is typical of deoxyhexose with hexose moieties. Peak 5 was identified as rutin (quercetin 3-O-rutinoid) by comparing its UV-Vis spectra, retention time, and fragmentation pattern with an authentic standard. Peak 3 was inferred as quercetin-O-neohesperidoside based on elution order and the produced ions (Chen et al., 2015). Evidence has shown that rutinoids mostly favor the complete loss of the disaccharide unit ($[M-H-308]$), yielding a higher abundance of aglycone peak than for neohesperidosides (Abdelaziz et al., 2020; Rodríguez-Rivera et al., 2014). Moreover, neohesperidosides present more fragment ions due to a series of ring-cross cleavage reactions in the partial glycan structure (Rodríguez-Rivera et al., 2014), here appearing as m/z 446, 489, and 343.

Peak 6 presented $[M-H]$ - at m/z 695 and produced similar fragmentation to compound 3, showing the loss of 308 Da and the aglycone at m/z 301. The mass difference between peaks 3 and 6 is 86 Da, with m/z at 651 $[M-H-CO_2]$ - and 609 $[M-H-86]$, suggesting the presence of a malonyl group. Thus, based on data and the findings of Kazuma et al. (2003), compound 6 was designated as quercetin 3-O-(2"-O- α -rhamnosyl-6"-O-malonyl) - β -glucoside. Quercetin 3-O-glucoside (peak 7, with molecular ion at m/z 463 and main fragment at m/z 300) was identified by comparison with an authentic standard.

Peak 2 showed a deprotonated molecular ion at m/z 625 and a main fragment at m/z 317, resulting from the loss of 308 Da. This compound was tentatively assigned as myricetin rutinoid. Peak 4 had deprotonated molecular ions at m/z 739 and underwent neutral losses of 146 Da (yielding m/z 593) and 308 Da (giving aglycone with m/z 285). The aglycone was identified as kaempferol according to diagnostic fragments (m/z 255 and 227).

Compound 4 was identified as kaempferol-O-rhamnosyl rutinoid (Kazuma et al., 2003). Peak 7 showed $[M-H]^-$ at m/z 593 and produced a main ion at m/z 285 after the neutral loss of 308 Da. The mass difference between compounds 4 and 7 is 146 Da, suggesting the absence of rhamnose moiety in the latter. Peak 6 was inferred as

kaempferol 3-O-neohesperidoside, as its retention time unmatched that of authentic standards of kaempferol 3-O-rutinoside (which also bears deprotonated molecular ion at m/z 593). Moreover, it presented a significant fragment at m/z 429 [M-H-164] due to the loss of a rhamnose moiety, which is characteristic of kaempferol 3-O-neohesperidoside (Kite et al., 2009).

Compound 8, with deprotonated molecular ions at m/z 679, produced ions at m/z 635 [M-H-44], 593 [M-H-86], and 285 [M-H-86-146-162], evidencing the presence of malonyl, deoxyhexose, and hexose moieties. Based on these characteristics and the findings of Kazuma et al. (2003), this compound was identified as kaempferol 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl-6''-O-malonyl)- β -glucoside.

AZIMA et al. (2017) for extracting the flowers of *C. ternatea* obtained from Santan, Perlis, Malaysia, produced the extract in distilled water stirring for 10 min at a temperature of 100 ° C and quantified 0.18 mg/g de kaempferol, 0.01 mg/g of quercetin and 2.96 mg/g of rutin. PRADO et al. (2019) quantified a higher value for kaempferol (462.63 mg/g) e quercetin (89.93 mg/g), amounts similar to the study that presented 35.25 mg/g a 412.14 mg/g of kaempferol e 25.21 mg/g to 135.50 mg/g of quercetin and rutin. MAKASANA et al. (2017) quantified 8.85 mg/g of quercetin and 55.00 mg/g of kaempferol from leaves of *C. ternatea* from India extracted for 60 min at 80° C with methanol.

Tables 2 and 3

3.2.2 *Galleria mellonella* toxicity assay

The *in vivo* *G. mellonella* toxicity assay with concentrations between 0.4 and 5.8 g of lyophilized extract per kg of body weight is presented in Figure 1. We observed that up to 2.2 g of extract/kg body had no toxicity *in vivo*, with a 100% survival rate 72 h after injection. The LD₅₀ was calculated using the polynomial model at 5.08 g of extract/kg body.

Figure 1

A fruit species from Brazil, called *Eugenia spp.*, was evaluated. The extracts capable of killing 50% of the population had average lethal doses of 1.5 g/kg for *E. leitoniii* (seeds), 2.5 g/kg for *E. brasiliensis* (seeds), and 1.25 g/kg body for *E. brasiliensis* (leaf) (Sardi et al., 2017). In another study conducted by Soares et al. (2019), the authors employed *E. stipitata*, *R. rosaefolius*, and *S. mombin* extracts and found that only the *S. mombin* extract led to a survival rate of 50% at 10 g/kg body; the other extracts did not exert toxic effects on the larvae until the concentration of 5 g/kg.

Srichaikul (2018) evaluated the aqueous extract toxicity of *C. ternatea* flowers using Wistar albino rats and reported that the oral dose of 2000 g/kg body showed no mortality and abnormality in the animals, corroborating our data whose values were lower because it is a lyophilized aqueous extract. Notably, the *G. mellonella* model is a low-cost and well-validated approach whose results correlate with those observed in mammals (Sardi et al., 2017).

3.2.3 Reducing capacity and antioxidant activity

The reducing capacity was expressed by the Folin-Cicalteau method and antioxidant activity against DPPH and ABTS radicals were evaluated in the lyophilized extracts obtained when the optimal extraction condition was used. The extract presented a reducing capacity of 806.92 mg GAE/100 g in dry extract, which is higher than the values obtained by Santos et al. (2023), with 24.41–30 mg GAE/100 g of commercially-obtained *C. ternatea* powder samples. Nascimento et al. (2021) employed ultrasound extraction and acquired 5.23–26.4 mg GAE/100 g of oven-dried *C. teranate* flower extract. In addition, Indrianingsih et al. (2021) revealed that the reducing capacity measured by the Folin-Ciocalteu method of *C. ternatea* aqueous extract obtained 2982 mg GAE/g in dry extract. These differences may be related to compound concentrations due to the lyophilization process applied. Furthermore, other factors include the acid used, extraction method, and obtaining the raw material, whether commercially as dried flowers, powdered, or fresh.

C. ternatea flower extracts are characterized by relatively high antioxidant properties. This study presented 17.95% inhibition against PDPH and 53.07% against ABTS. These values are higher than the data of Netravati et al. (2022), who evaluated the antioxidant activity of a *C. ternatea* flower extract obtained by microwave-assisted

extraction and found an inhibition index of 3.49 $\mu\text{L/mL}$ for DPPH and 2.42 $\mu\text{L/mL}$ for ABTS. Indrianingsih et al. (2021) tested extracts and fractions of *C. ternatea* flower extract in methanol extract and hexane soluble fractions and inhibition indexes were not detected. However, the soluble fraction in dichloromethane and ethyl acetate presented an inhibition index of 5.3 and 4.9%, respectively.

These DPPH and ABTS assays are standard methods for evaluating antioxidant activity, relatively stable, and sensitive because they are organic radicals. In addition, these methods are important for screening before more expensive and advanced techniques are applied. Phenolic compounds and other types of bioactive compounds present are responsible for antioxidant activity (Indrianingsih et al., 2021).

3.2.4 Microbiological analysis

The emergence and spread of anti-microbial-resistant pathogens are becoming a global problem (CDC, 2022). To minimize the use of antibiotics in agriculture and, at the same time, meet consumer demands, effective alternative approaches, such as the use of natural preservatives to conserve food, should be explored (Sun et al., 2018). In the present study, it was possible to verify that the *C. ternatea* extract inhibited all bacterial strains tested, both Gram-positive and Gram-negative (Table 4). Gonelimali et al. (2018) reported that plant extracts significantly affect the cell membrane of Gram-positive and Gram-negative bacteria through internal pH decline and hyperpolarization of the cell membrane, concluding that plant extracts are excellent natural antimicrobials with the potential to be employed as food preservatives.

Table 4

Nevertheless, Gram-positive bacteria (*S. aureus*) were more susceptible to the extract (inhibition halo diameter = 25 mm) than Gram-negative bacteria (*S. Typhimurium* and *E. coli*; inhibition halo diameters = 17 and 18 mm, respectively). Previous data also showed the antibacterial action of *C. ternatea* extract using the agar diffusion disc assay and reported diameters of inhibition halos ranging from 7 to 26 mm for different bacterial genera evaluated (Leong et al., 2017). In addition to the present

study, evidence has demonstrated that Gram-positive bacteria are more susceptible to plant extracts than Gram-negative bacteria (Maia et al., 2019; Yuan et al., 2021). Santos et al. (2023) evaluated the antimicrobial potential of *C. ternatea* flower extract by disc diffusion method against Gram-positive bacteria (*S. listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*) and Gram-negative bacteria (*E. Coli*, *Klebsiella Aerogenes*, and *S. Typhimurium*). The authors inhibited three pathogens of the six evaluated: *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, and *K. aerogenes*.

Our findings showed that MIC values ranged from 5.7 to 11.4 mg mL⁻¹ and MBC from 22.8 to 45.6 mg mL⁻¹ (Table 4). In the literature, varying MIC of *C. ternatea* extract are found against several bacterial pathogens, and this variation may be due to the different extraction protocols or strains used in the experiments (Jeyaraj et al., 2022).

5. CONCLUSIONS

A simple, fast, cheap, and low environmental impact method was optimized for extracting *Clitoria ternatea* flower anthocyanins through multivariate optimization. The optimal extraction condition was obtained with 0.1 g of lyophilized flower and 22.5 mL of acidified water with 1% citric acid (0.44% w/v), subjected to agitation for 16 min at 45 °C, which enabled us to obtain an edible extract of chemical and technological characteristics with significant potential given the ability of the extract to inhibit some of the main pathogenic bacteria responsible for food outbreaks. Given our promising findings, we suggest that future studies incorporate the extract into active packaging for food conservation and smart packaging for quality monitoring.

The major anthocyanins were ternatins B1–B3 and A2, and the non-anthocyanins were kaempferol 3-O-neohesperidoside, kaempferol-O-rhamnosyl-rutinoside, and quercetin 3-O-(2"-O- α -rhamnosyl-6"-O-malonyl)- β -glucoside, which were identified by UHPLC/MSⁿ. Anthocyanins have great potential as natural food dyes, as the extracts showed low toxicity in the *in vivo* assays. Nevertheless, further in-depth research is necessary to evaluate the stability of the extract against external factors, such as luminosity and heat treatment.

6. ACKNOWLEDGMENTS AND ETHICAL CONSIDERATIONS

The authors are grateful for the funding by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Superior - CAPES (Financial Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (306378/2015-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS (17/255100009126), the Southern Electronic Microscopy Center (CEME-SUL) of the Federal University of Rio Grande (FURG), to the Mountain Research Center (CIMO) and Polytechnic Institute of Bragança, Portugal, for collaborations.

The authors state that there are no conflicts of interest in the study's publication. The research is registered with the Ministry of the Environment of Brazil, in the National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge, under number A937529.

7. REFERENCES

- ABDELAZIZ, S., YOUSEF, H.M.A., AL-QAHTANI, A., HASSAN, W.H.B., FANTOUKH, O.I. Phitochemical profile, antioxidant and cytotoxic potencial of Parkinsonia aculeata L. growing in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.28, p.1129-1137, 2020.
- AZIMA, A.S., NORIHAM, A., MANSHOOR, N. Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. **Journal of functional foods**, v.38, parte A, p.232-241, 2017.
- CDC (2022) <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- CHEN, Y., HONGLI, Y., WU, H., PAN, Y., WANG, K., JIN, Y., ZHANG, C. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. **Molecules**, v.20, p. 18352-18366, 2015.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- DHANASEKARAN, S.; RAJESH, A.; MATHIMANI, S.; SAMUEL, R.; SHANMUGANATHAN, K.; BRINDHADEVI, K. Efficacy of crude extracts of Clitoria

ternatea for antibacterial activity against gram negative bacterium (*Proteus mirabilis*).
Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.21, p.101328, 2019.

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

GONELIMALI, F.D., LIN, J., MIAO, W., XUAN, J., CHARLES, F., CHEN, M., HATAB, S.R. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. **Frontiers of Microbiology**, v.9, p. 1-8, 2018.

INDRIANINGSIH, A.W., WULANJATI, M.P., WINDARSIH, A., BHATTACHARIYA, D.K., SUZUKI, T., KATAYAMA, T. In vitro studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao*, *Annona muricata* and *Clitoria ternatea*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.33, p.101995, 2021

JEYARAJ, E.J.; LIM, Y.Y.; CHOO, W.S. Antioxidant, cytotoxic, and antibacterial activities of *Clitoria ternatea* flower extracts and anthocyanin-rich fraction. **Scientific reports**, v.12, p.14890, 2022.

JEYARAJ, E.J.; LIM, Y.Y.; CHOO, W.S. Extraction methods of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower and biological activities of its phytochemicals, **Journal of Food Science and Technology**, v.58, n.6, p. 2054-2067, 2021.

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

KITE, G.C., VEITCH, N.C. Assigning glucose or galactose as the primary glycosidic sugar in 3-O-mono-, di- and triglycosides of kaempferol using negative ion electrospray and serial mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v.23, p.3125-3132, 2009.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEONG, C.R., AZIZI, M. A.K., TAHER, M.A., WAHIDIN, S., LEE, K-C., TAN, W-N., TONG, W-Y. Anthocyanins from *Clitoria ternatea* attenuate food-borne *Penicillium*

expansum and its potential application as food biopreservative. **Natural Product Scieces**, v.23, p. 125–131,2017.

MAIA, D.S.V., HAUBERT, L., SOARES, K.S., WURFEL, S.F.R. *Butia odorata* Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. **Journal Food and Science Technology**, v.53, n.3, p. 1663-1668, 2019.

MAKASANA, J., DHOLAKIVA, B.Z., GAJBHIYE, N.A., RAJU, S. Extractive determination of bioactive flavonoids from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Linn.). **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, p.783–799, 2017.

MEMOOD, A.; ISHAG, M.; ZHAO, L.; YAQOOB, S.; SAFDAR, B.; NADEEM, M.; MUNIR, M.; WANG, C. Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.) **Ultrasonics Sonochemistry**, v.51, p. 12-19, 2019.

NAIR, V., BANG, W.Y., SCHRECKINGER, E., ANDARWULAN, N., CISNEROS-ZEVALLOS, L. Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p.6355-6365, 2015.

NASCIMENTO, J.V.; GIULIANGELI, V.C.; KATO, T.; CALLIARI, C.M.; SHIRAI, M. A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of the *Clitoria ternatea* L. flower extracts. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e218101119450, 2021.

NETRAVATI.; GOMEZ, S.; PATHROSE, B.; RAJ N, M.; JOSEPH P, M.; KURUVILA, B. Comparative evaluation of anthocyanin pigment yield and its attributes from Butterfly pea (*Clitoreia ternatea* L.) flowers as prospective food colorant using different extraction methods. **Future Foods**, v.6, p. 100199, 2022.

OGUIS, G, K., GILDING, E.K., JACKSON, M.A., CRAIK, D.J. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide -bearing plant with aplications in agriculture and medicine**Frontiers in Plant Science**, v.10, n.365. p-1-23. 2019.

PRABHU, S., THANGADURAI, T.D., INDUMATHI, T., KALUGASALAM, P. Enhanced visible light induced dye degradation and antibacterial activities of ZnO/NiO nanocomposite synthesized using *Clitoria ternatea* flower extract. **Inorganic Chemistry Communications**, v.146, p.110077, 2022.

PRADO, A.S.L., SHEN, Y., ARDOIN, R., OSORIO, L.F., CARDONA, J., XU, Z., PRINYAWIWATKUL, W. Effects of different solvents on total phenolic and total anthocyanin contents of *Clitoria ternatea* L. petal and their anti-cholesterol oxidation capabilities. **Food Science and Technology**, v.54, n.2, p.424-431, 2019.

RE, R. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237. 1999.

RODRIGUEZ-RIVERA, M.P., LUGO-CERVANTES, E., WINTERHALTER, P., JERZ, G. Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC–ESI–MS/MS. **Food chemistry**, v.158, p.139-152, 2014.

SABINO, B.S., FILHO, E.G.A., FERNANDES, F.A.N., BRITO, E.S., SILVA, I.J.J. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 77-89. 2021.

SANTOS, L.G.; MARTINS, V.G. Optimization of the green extraction of polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: a comparative study with conventional extraction techniques. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v, p.100458, 2023.

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

SOARES, J.C.; ROSALEN, P.L.; LAZARINI, J.G.; MASSARIOLI, A.P.; SILVA, C.F.; NANI, B.D.; FRANCHIN, M. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity, **Food chemistry**, v.281, p.178-188, 2019.

SRICHAIKUL, B. Ultrasonication extraction, bioactivity, antioxidant activity, total flavonoid, total phenolic and antioxidant of *Clitoria Ternatea* linn flower extract for anti-aging drinks. **Pharmacognosy Magazine**, v.14, n.56, p.322-327, 2018.

SUN, X-H., ZHOU, T-H., WEI, C-H., LAN, W-Q., ZHAO, Y., PAN, Y.J., WU, V.C.H. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens, **Food Control**, v.94, p.155-161, 2018.

TERAHARA, N., ODA, M., MATSUI, T., OSAJIMA, Y., SAITO, N., TOKI, K., HONDA, T. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* Flowers. **Journal of Natural Products**, v. 59, n.2, p.139-144, 1996.

TERAHARA, N., TOKI, K., SAITO, N., HONDA, T., MATSUL, T., OSAJIMA, J. Eight New Anthocyanins, Ternatins C1-C5 and D3 and Preternatins A3 and C4 from Young *Clitoria ternatea* Flowers. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.11, 1361-1367, 1998.

THUY, N.M.; BEN, T.C.; MINH, V.Q.; TAI, N.V. Effect of extraction techniques on anthocyanin from butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea* L.) cultivated in Vietnam. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 9, n.6, p. 173-180, 2021.

URSU, M.G.S., MILEA, S.A., PACULARU-BURADA, B., DUMITRASCU, L., RAPEANU, G., STANCIU, S., STANCIUC, N. Coproduct yield comparisons of purple, blue and yellow dent corn for various milling processes. **Food Chemistry**, v. 30, p.100521, 2023.

VINHOLES, J., GONÇALVES, P., MARTEL, F., COIMBRA, M. A., ROCHA, S. M. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chemistry**, v.156, p.204–211, 2014.

VINHOLES, J., GROSSO, C., ANDRADE, P. B., GIL-IZQUIERDO, A., VALENTÃO, P., PINHO, P. G. D., FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anticholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v.129, n.2, p.454–462, 2011.

VOUNG, T.T., SRIVICHAI, S., HONGSPRABHAS, P. Effect of sugar and CaCl₂ concentration on fluorescence quenching characteristics of whey proteins by delphinidin derivatives from butterfly pea flower. **Agriculture and natural resources**, v. 55, p.569-578, 2021.

681 YUAN, G., GUAN, Y., YI, H., LAI, S., SUN, Y., CAO, S. Antibacterial activity and
682 mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their
683 lipophilicities. **Scientific reports**, v.11, p.10471, 2021.

684

TABLE CAPTIONS

Table 1. Decoded variables and responses obtained in multivariate design to obtain the *Clitoria ternatea* flower extracts.

Table 2. Anthocyanin identification and quantification in the lyophilized extract of *Clitoria ternatea* (mg 100 g⁻¹)

Table 3. Identification and quantification of non-anthocyanins in the lyophilized extract of *Clitoria ternatea* (mg 100 g⁻¹).

Table 4. Antibacterial action, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration of *Clitoria ternatea* flower extract against pathogens.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Toxicity of *Clitoria ternatea* flower extract in a *Galleria mellonella* larvae model. The LD₅₀ was determined by polynomial mathematical calculation.

Table 1. Decoded variables and responses obtained in multivariate design to obtain *Clitoria ternatea* flower extracts.

Variables and Coded Levels ⁽¹⁾			Variables and Decoded Levels			Results (mg/100 g) ⁽²⁾	
A	B	C	Temperature (°C)	Volume (mL)	Time (min)	Total anthocyanins	Reducing capacity
-1	-1	-1	36.1	12.1	7.7	433.89	2242.56
1	-1	-1	53.9	12.1	7.7	526.90	2252.20
-1	1	-1	36.1	32.9	7.7	473.75	2090.14
1	1	-1	53.9	32.9	7.7	492.68	1567.86
-1	-1	1	36.1	12.1	24.3	466.34	2265.28
1	-1	1	53.9	12.1	24.3	523.59	2602.81
-1	1	1	36.1	32.9	24.3	504.41	2496.88
1	1	1	53.9	32.9	24.3	478.75	1940.62
0	0	0	45	22.5	16	450.29	2753.47
0	0	0	45	22.5	16	554.63	2904.51
0	0	0	45	22.5	16	471.52	2614.85
-1.68	0	0	30	22.5	16	464.66	2048.53
1.68	0	0	60	22.5	16	470.44	2175.41
0	-1.68	0	45	5	16	456.28	1470.00
0	1.68	0	45	40	16	570.31	2908.08
0	0	-1.68	45	22.5	2	475.29	2283.00
0	0	1.68	45	22.5	30	469.54	1505.78

⁽¹⁾ A: temperature (°C), B: volume (mL), C: time (min). ⁽²⁾ Total monomeric anthocyanins: expressed in mg cyanidine-3-glycoside/100 g of dry flower. Reducing capacity obtained by the Folin-Cicalteau method: expressed in mg equivalent of gallic acid (mg GAE)/100 g of dry flower.

Table 2. Anthocyanin identification and quantification in the lyophilized extract of *Clitoria ternatea* (mg 100 g⁻¹)

Peak	Rt	nm	Major ion (M ⁺ or M+H)	Ion fragment (MS2)	Ion fragment (MS3)	Ion fragment (MS4)	Tentative identification	Average concentration	SD
1	16.67		1183	935, 1139, 773, 1021, 1097, 859, 1165	773, 611, 627, 303		Ternatin C4	2.57	± 0.03
2	18.18	303, 543	1492 [M+H]	1244	1082, 919, 774, 936, 611		Ternatin A3	8.61	± 0.45
3	23.91	300, 543	1329	1081, 1285, 1243, 1167, 1021, 919, 773	773, 919, 611, 303	611, 629, 465, 303	Ternatin C1 or B4	16.80	± 3.36
4	23.91		1021	773, 977, 935, 859, 611, 465	611, 627, 465, 303		Ternatin C3	16.80	± 3.36
5	29.45	291, 546	1799	1551, 1755, 1713, 1637, 611	1389, 1227, 1081, 773, 611		Ternatin A2	20.15	± 2.85
6	30.82		1167	919, 1081, 963, 859, 611	611, 773	303, 465	Ternatin D3	11.76	± 0.78
7	32.88		1637	1389, 1593, 1513, 1475	1227, 1191, 1081, 919, 774, 611	919, 611	Ternatin B3	23.08	± 5.42
8	36.7	292, 543	1551	1389	773, 919, 1081, 1227, 1371		Hydrolyzed ternatin B3 or B2	5.82	± 1.27
9	37.21	292, 546	1638 [M+H]	1390, 1552, 1594, 1476, 1330, 919	1228, 1244, 1082, 920, 936, 773, 611		Ternatin B2	57.94	± 11.10
10	37.66	289, 546	1946	1700	1538, 1391, 1230, 1083, 921	921, 1229, 1392, 774	Ternatin B1	44.47	± 8.31
11	37.66	289, 546	1329	1081, 1285, 1167, 1243	919, 773, 611, 465	611, 303, 773, 757, 465	Ternatin B4 or C1	44.47	± 8.31
12	38.83	294, 546	1475	1227, 1167, 1430	919, 1081, 773, 611, 465	303, 611, 773, 757, 465	Ternatin D2	32.52	± 5.89
13	40.9	293, 552	1784	1536, 1740, 1698, 1227, 1081	919, 1228, 1081, 1390, 1500	303, 466, 611	Ternatin D1	30.92	± 5.58

Rt: retention time; nm: 520; SD: standard deviation; NQ: Below the limit of quantification. Average from triplicate (n = 3).

Table 3. Non-anthocyanin identification and quantification in the lyophilized extract of *Clitoria ternatea* (mg 100 g⁻¹)

Peak	Rt	nm	Major ion (M-H)	Ion fragment (MS1)	Tentative identification	Average concentration	SD
1	8.15	354, 256	755	300, 301, 489, 591, 609	Quercetin-O-rhamnosylrutinoside	25.21	± 0.24
2	11.11	354, 256	609	300, 301	Quercetin-O-neohesperidoside	40.55	± 8.29
3	11.49	347, 266	739	284, 285, 575, 593	Kaempferol-O-rhamnosyl-rutinoside	135.50	± 1.89
4	12.79	354, 257	609	301	Rutin		
5	13.01		695	300, 609	Quercetin 3-O-(2"-O-α-rhamnosyl-6"-O-malonyl)-β-glucoside	37.40	± 0.68
6	13.91	348, 266, 229	593	284, 285	Kaempferol 3-O-neohesperidoside	412.14	± 17.21
7	14.27		463	300, 301	Quercetin 3-O-glucoside	NQ	± NQ
8	16.37		679	635	Kaempferol malonyl rutinoside	35.25	± 3.12

Rt: retention time; nm: 330. SD: standard deviation; NQ: Below the average quantification limit from triplicate (n = 3)

Table 4. Antibacterial action, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration of *Clitoria ternatea* flower extract against pathogens.

Pathogens	Halo size		Control			MIC	MBC
	(mm)		Water	Citric acid	Gentamicin	Mg mL ⁻¹	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	25	No halo	No halo	23	11.4	22.8
<i>Escherichia coli</i>	18	18	No halo	No halo	13	5.6	45.6
<i>Salmonella typhimurium</i>	17	17	No halo	No halo	17	11.4	22.8

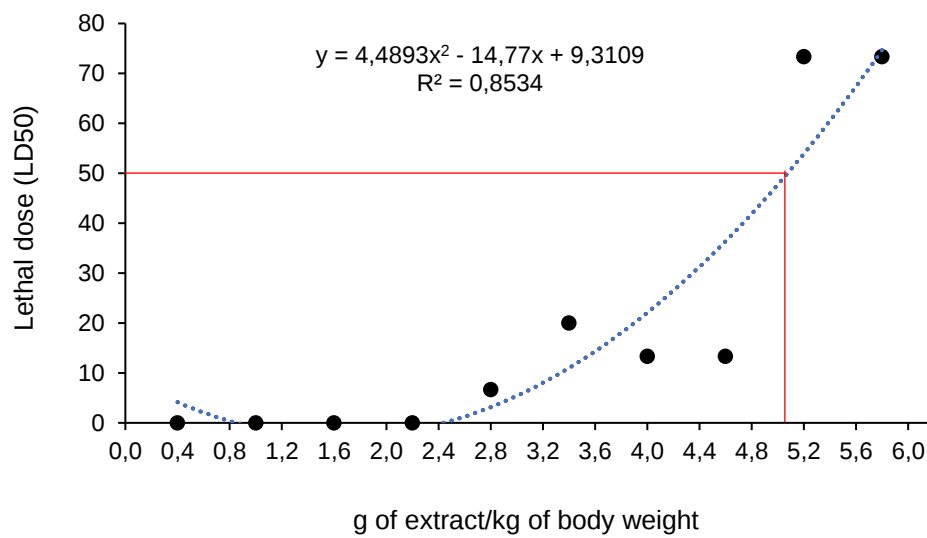


Figure 1. Toxicity of the *Clitoria ternatea* flower extract in a model of *Galleria mellonella* larvae. The lethal dose (LD₅₀) was determined by polynomial mathematical calculation.

6. Artigo 2

¹GONÇALVES, G.C.P., ¹SANTOS, F.N., ¹RAMIRES, T., ¹SILVA, W.P., ¹DIAS, A.R.G.,
¹ZAVAREZE, E.R., ¹MEINHART, A.D.

**Filmes de acetato de celulose incorporados de extrato antociânico das flores de
Clitoria ternatea: potencial para indicador de alterações microbiológicas**

O artigo será submetido na Food Research International

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Resumo

A busca por embalagens comunicativas tem crescido no meio científico e vem sendo cada vez mais reconhecida pelos consumidores como uma forma inteligente de ofertar alimentos seguros e saudáveis. Filmes de acetato de celulose contendo extrato antociânico da flor da *Clitoria ternatea* e da flor liofilizada foram produzidos em diferentes concentrações (20% e 30%, *p/p*). Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting* e avaliados quanto a morfologia, atividade antioxidante, solubilidade em água, parâmetros de cor, atividade microbiológica e potencial como indicador de patógenos. A morfologia dos filmes indicou uma estrutura rígida, semi-transparente, contendo partículas sólidas e espessura elevada. Os filmes apresentaram atividade antioxidante em ambos radicais estudados (ABTS e DPPH). A solubilidade em água dos filmes foi baixa (0,09% a 0,11%), demonstrando potencial dos filmes para serem adicionados em embalagens, podendo ocorrer o contato com o alimento por se tratar de um filme atóxico. A análise de cor dos filmes, expostos a diferentes pHs não diferiu. Porém, no extrato e na flor liofilizada ocorreu a mudança de cor, sendo promissores como indicadores de pH. O principal achado foi na área microbiológica, onde foi constatada a modificação da cor do extrato e dos filmes frente ao crescimento de bactérias gram-negativas (*S. Typhimurium* e *E. coli*), passando da coloração roxa para verde quando há contaminação. Tal resultado indica o potencial dos filmes para serem empregados como indicador de mudança de cor associada a alterações microbiológicas relevantes na área de alimentos.

Palavras-chaves: biodegradável; embalagem; filme; bactérias.

1. Introdução

Os polímeros mais utilizados para fabricação de embalagens para alimentos são os sintéticos ou artificiais, em geral derivados do petróleo e desenvolvidos em laboratório. Essas embalagens plásticas têm baixo custo de produção e maior durabilidade em relação a outros materiais. Além de possuir ótimas condições de barreira e proteção para os alimentos, por exemplo, luz, umidade, gases, entre outras. No entanto, esses materiais possuem desvantagens no que se relaciona ao meio ambiente, visto que não são biodegradáveis, se acumulam ao longo do tempo causando elevado impacto poluente na natureza. Diante disso, tem-se a necessidade de materiais desenvolvidos com polímeros naturais, causando o menor impacto ambiental (GASTI et al., 2022).

O acetato de celulose, obtido da parede celular de plantas e vegetais, está amplamente distribuído na natureza. É um polímero natural, amorfo, atóxico, inodoro, biodegradável e possui boas características para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis (ASSIS, 2021). Esses filmes são obtidos, em geral, pela técnica de casting, caracterizada pela solubilização do biopolímero em acetona, seguido da incorporação dos bioativos e por fim o plaqueamento e secagem dos filmes (ASSIS et al., 2017).

As características desse biomaterial é a obtenção de um filme fino, rígido, baixa elasticidade, hidrofóbico, baixa opacidade e elevada transparência (ASSIS, 2021). Todavia, essas características citadas dependem da quantidade do polímero, presença de agentes plastificantes e carga de compostos bioativos. A adição de compostos bioativos em filmes (por exemplo antocianinas e compostos fenólicos não antociânicos) tem a possibilidade de desenvolver uma embalagem ativa e inteligente, com a capacidade de conservar e monitorar, respectivamente, para garantir a qualidade do alimento e a comunicação com o consumidor (ASSIS, 2021).

Os termos “embalagens ativas” e “embalagens inteligentes” possuem conceitos interligados, pois podem atuar juntas, pois cada uma possui uma ação distinta. A embalagem ativa tem como propósito interagir com o alimento, adicionando um

composto bioativo encapsulado, o qual será liberado ao longo de um período na atmosfera onde encontra-se o produto (WEN et al., 2016b). As embalagens inteligentes tem como principal característica monitorar as condições do alimento e informar em tempo real o estado do produto, utilizam a função de comunicação com o consumidor (VANDERROOST et al., 2014; GHAANI et al., 2016; MA et al., 2016). É sabido, a algum tempo atrás, as embalagens inteligentes eram desenvolvidas somente com a incorporação de substâncias sintéticas na matriz polimérica, porém, essas substâncias químicas são prejudiciais, podendo causar alterações no alimento, consequentemente ao consumidor, além de danos ao meio ambiente (SANTOS, et al., 2023; MOHEBI et al., 2015; SILVA-PEREIRA et al., 2015; GHAANI et al., 2016). Atualmente, estudos são realizados para desenvolver embalagens inteligentes com adição de corantes oriundos de fontes naturais (SANTOS, et al., 2023; CHALES, 2018; PRIETTO et al., 2017).

Os sistemas mais estudados de embalagens inteligentes são os sensores e indicadores. Um sensor pode ser definido com um dispositivo utilizado para localizar, quantificar ou detectar (BIJI et al., 2015; PEREIRA, 2017). Os indicadores podem indicar alterações químicas ou contaminação por microrganismos em alimentos embalados (YIN et al., 2023; ROY&RHIM, 2021).

As antocianinas são pigmentos polares, solúveis em água e são encontradas em diversas matrizes distribuídas pela natureza (KALT et al., 2000 , HONGYAN et al., 2012; KHOO et al., 2017; AZIMA et al., 2017). São de fácil extração, com métodos atóxicos, de baixo custo e biodegradáveis. As flores da *Clitoria ternatea* são fontes desses compostos antociânicos. Os compostos majoritários presente nas flores são as antocianinas (ternatinas), além dos compostos não antociânicos, kaempferol e quercetina; aos quais tem sido associados o potencial antioxidante e antimicrobiano evidenciado nas pesquisas (KRITHIGA et al., 2015; SYAHIRAH et al., 2018; HAVANDA et al., 2019; OGUIS et al., 2019). Ao que consta aos autores, com base na literatura científica consultada, não foram encontrados estudos a respeito da produção de filmes a base de acetato de celulose incorporados com extrato da *Clitoria ternatea* para aplicação no monitoramento da qualidade de alimentos.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi a obtenção de filmes de acetato de celulose, incorporados com extrato liofilizado da *Clitoria ternatea* e flor liofilizada da *Clitoria ternatea*, em diferentes concentrações. Os filmes foram caracterizados pela sua avaliação macroscópica, morfologia, espessura, atividade antioxidante, solubilidade, umidade, cor e atividade microbiológica.

2. Material e métodos

O estudo foi realizado nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), situado no Campus Capão do Leão. Os reagentes utilizados foram: acetona P.A. (Synth/Diadema -SP/Brasil); acetato de celulose P.A (Aldrich chemistry/St-Louis-MO/USA CAS 9004-35-7); cloreto de potássio P.A (Vetec/Duque de Caxias-RJ/Brasil); ácido clorídrico P.A (Êxodo científica/Hortolândia-SP/Brasil); citrato de sódio P.A (Synth/Diadema -SP/Brasil); fosfato de sódio monobásico P.A (Dinâmica/Brasil CAS 7778-770); fosfato de sódio dibásico P.A (Vetec/Duque de Caxias-RJ/Brasil); Radicais livres 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina) ácido 6-sulfônico (ABTS; Sigma Aldrich, CAS 30931-67-0/EUA) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH; Sigma Aldrich, CAS 1898 -66-4/Índia); metanol P.A (Êxodo científica, CAS 67-56-1/Brasil); persulfato de potássio P.A (Synth/Brasil); álcool etílico P.A (Dinâmica/Brasil).

2.1. Obtenção das flores e preparo do extrato

Para obtenção das flores da *Clitoria ternatea*, realizou-se o cultivo inédito dessa planta na Região Sul de Pelotas, precisamente no município do Capão do Leão/RS. As sementes doadas por um produtor do estado de São Paulo, Brazil, foram plantadas, seguido do desenvolvimento e colheita das flores. As pétalas foram armazenadas em Ultrafreezer (-70° C), até serem secas por liofilização. O material seco, foi moído em moedor comum de café (Boca Raton/FL, EUA) e o pó resultante foi armazenado em freezer (-18° C) até o momento da análise.

Para o preparo dos filmes a partir das flores foi utilizado pó das flores liofilizado e moído. Para os filmes preparados com extrato, o pó das flores foi submetido à extração conforme metodologia descrita por Gonçalves et al. (2023): 0,1 g de pó liofilizado das flores da *Clitoria ternatea* foi adicionado em 22,5 mL de solução extratora (água acidificada com 1% de ácido cítrico), em tubos falcon. Os tubos foram levados a banho maria (45 °C) (Velp Scientifica, Enzymatic Digester-GDE, Itália) com agitação em 300 rpm por 16 min. Em seguida, os extratos líquidos foram filtrados em filtros de papel tipo Whatmann e levados para liofilização.

2.2. Preparo de filmes pela técnica de casting

Para obtenção dos filmes pela técnica de *casting*, seguiu-se metodologia proposta por ASSIS et al. (2017) com algumas adaptações. Resumidamente, foi utilizado 3 g de acetato de celulose como material polimérico e 100 mL de acetona. Para completa solubilização agitou-se magneticamente a solução por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 20% e 30% de extrato liofilizado das flores da *Clitoria ternatea* (p/p, extrato/acetato de celulose) e 20% e 30% do pó das flores (p/p, flores/acetato de celulose). As soluções foram mantidas sob agitação magnética por mais 15 minutos. Então, as soluções filmogênicas foram colocadas em placas de vidro (0,39 g/cm²) e submetida a secagem por evaporação de solvente por 24 horas em capela sem circulação de ar. O filme controle foi preparado nas mesmas condições, exceto que o extrato antociânico ou pó das flores não foi adicionado. As concentrações do polímero, extrato, pó das flores e condições de secagem foram definidas a partir de testes preliminares. Após a obtenção, os filmes foram armazenados por 48 horas em temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C) e umidade relativa do ar (UR) ~60%) antes de serem caracterizados.

2.2.1. Caracterização dos filmes

2.2.1.1. Morfologia

A avaliação da morfologia foi realizada por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), onde as amostras foram revestidas com ouro em metalizador. O diâmetro médio dos filmes foi medido na superfície e do corte do filme. Por fim, obteve-se uma

imagem do MEV, com medidas aleatórias utilizando o *software* ImageJ (versão 2015) (FONSECA et al., 2020).

2.2.1.2. Espessura

A espessura do filme (mm) foi determinada com um micromêtro digital (Electronic outside IP54), através de seis leituras em pontos aleatórios dos filmes (PRIETTO, 2017). A avaliação foi feita em triplicata.

2.2.1.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes de acetato de celulose com extrato liofilizado das flores da *Clitoria ternatea* a 20% e 30% e das flores liofilizadas a 20% e 30% foram avaliadas pelo método de inibição do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS•+). O método de DPPH foi seguido BRAND-WILLIAMS et al., 1995, é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes. O DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (515 nm).

Para a análise, primeiramente, foi preparada a solução estoque, pesando 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Logo, tirou-se uma alíquota de 10 mL e dilui-se em 45 mL de metanol, absorbância dessa solução foi ajustada para $1,1 \pm 0,02$ nm em espectrofotômetro (6705 UV/VIS Spectrophotometer JENWAY) no comprimento de onda de 515 nm. Em seguida, pesou-se 2 mg de filme e adicionou-se 3,9 mL do radical DPPH recentemente preparado. Agitou-se em vórtex por 30 s e ficaram mantidos no escuro por 30 minutos até o momento da leitura. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante % de inibição do radical DPPH visto na equação 1:

$$\% \text{ de inibição} = \left[\left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Para reação com o radical ABTS•+, a solução estoque de ABTS•+ 7,4 mM foi preparada pesando 192 mg de ABTS diluído em água destilada, foi completado o

volume em balão volumétrico de 50 mL. Para solução de persulfato de potássio 140 mM, pesou-se 378,4 mg de persulfato de potássio e adicionou-se em balão volumétrico de 10 mL com água destilada. Em seguida, 5 mL da solução estoque foi misturada em 88 µL de persulfato de potássio, essa solução do radical foi mantida no escuro por 16 horas em frasco âmbar e em temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 mL da solução do radical foi diluída em 80 mL de álcool etílico para ajuste de absorbância 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm, em espectrofotômetro (6705 UV/VIS Spectrophotometer JENWAY).

Para reação com os filmes, 2 mg de filme foram adicionados em 3 mL do radical ABTS, foi agitado em vórtex, e mantido no escuro por 30 minutos.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição calculada pela equação 2, sendo "Abs_{branco}" a absorbância do etanol e "Abs_{amostra}" é a absorbância da reação do extrato:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.2.1.4. Solubilidade e teor de umidade

A solubilidade dos filmes foi determinada de acordo o método de Gontard et al.(1994). A análise foi realizada em triplicata, onde os filmes foram cortados em círculo com diâmetro de 2,5 cm e foram secos em estufa a 105 °C por 24 horas até massa seca constante para retirar umidade. Os filmes foram imersos em 50 mL de água destilada em tubos falcons. Os tubos foram agitados em mesa agitadora horizontal por 24 horas a 25 °C. Após, os filmes remanescentes foram retirados dos tubos, secos em estufa a 105°C até peso constante para determinação da massa seca final da amostra. A solubilidade foi expressa em termos de massa solubilizada, através da relação entre a massa inicial e final dos filmes, conforme equação 3:

$$\text{SM} = \frac{(\text{MASSA INICIAL} - \text{MASSA FINAL}) \times 100}{\text{MASSA INICIAL (g)}} \quad \text{Equação 3}$$

O teor de umidade dos filmes foi determinado pelo método descrito pela Associação Americana de Químicos de Cereais (AACC 1995) em estufa a 105 °C com circulação natural de ar até massa constante; os resultados foram expressos em (%).

2.2.1.5. Análise de cor do extrato, pó da flor e filmes expostos a diferentes pHs

As soluções tampões foram feitas pelo método descrito por Gomori (2004). Foi preparado soluções de tampão de pH do 2 ao 8. Para o tampão pH 2 foi utilizado soluções estoque de cloreto de potássio (KCl) a 0,2 M e ácido clorídrico a 0,2 M. Para os tampões pH 3,4,5 e 6 foi utilizado ácido cítrico a 0,1 M e solução de citrato de sódio a 0,1 M. Para o tampão pH 7 e 8 foi utilizado solução estoque de fosfato de sódio monobásico a 0,2 M e fosfato de sódio dibásico a 0,2 M. Todas as soluções foram ajustadas em pHmêtro (KASVI).

Foi utilizado 10 mg de extrato liofilizado, 10 mg de pó da flor e filmes inteiros (35x10 mm). A obtenção do extrato seguiu-se metodologia de Lee et al. (2005).

O espectro das cores dos filmes em diferentes pHs foi determinado por meio de colorímetro, em cinco localizações aleatórias na amostra. De acordo com a metodologia de Prietto, et al. (2017), os filmes foram colocados em um fundo branco padrão antes da medição. Os resultados foram expressos em termos de valor L * (luminosidade; 0 é preto puro e 100 é branco puro), croma a * (- é verde e + é vermelho) e croma b * (- é azul e + é amarelo).

A opacidade foi determinada como a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (S_{black}) e ao padrão branco (S_{white}), em conformidade com a equação 4 (HUNTERLAB, 1997):

$$OPACITY = \frac{S_{Black}}{S_{White}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Os filmes inteiros (35x10 mm) foram imersos em 5 mL de diferentes soluções tampões de pH (2 ao 8). Em seguida, as peças foram secas em estufa com circulação

de ar a 30 ° C por 15 min. A mudança na cor (ΔE) dos filmes expostos em diferentes pHs foi calculada usando a Equação 5.

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Equação 5

Onde ΔE é a mudança de cor; L^* , a^* e b^* são os atributos de cor dos filmes em cada valor de pH; e L_0^* , a_0^* e b_0^* são os parâmetros de cor da amostra de referência.

2.2.1.6. Potencial antibacteriano do extrato e filme

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em ágar segundo Hendessi et al. (2016). Os filmes foram cortados em discos de 6 mm de diâmetro e dispostos no centro das placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MHA, Kasvi, Brasil) previamente inoculado com a bactéria a ser testada (10^8 UFC.mL⁻¹). Foi avaliada a susceptibilidade de micro-organismos Gram-positivos (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram-negativos (*Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. O diâmetro da zona de inibição foi então medido.

3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança, utilizando o software estatística 7.0.

4. Resultados e discussão

4.1. Avaliação macroscópica dos filmes incorporados com extrato das flores da *Clitoria ternatea*

As características macroscópicas dos filmes produzidos contendo 20% e 30% com e sem extrato das flores da *Clitoria ternatea* estão apresentadas na Figura 1. Os filmes contendo 20% e 30% de extrato liofilizado apresentaram transparência, no entanto, é nítido a presença de partículas, as quais não foram totalmente solubilizadas. Os filmes não apresentaram superfície totalmente lisa, apresentando algumas rugosidades e bastante rígido. O filme controle é esbranquiçado e apresenta muitas rugosidades.

A Figura 2 apresenta os filmes contendo 20% e 30% de flor liofilizada e o controle. Ambos filmes contendo flor liofilizada apresentaram cor rosa intensa, o filme contendo 20% de flor liofilizada apresenta baixa transparência, já o filme contendo 30% de flor liofilizada apresentou alta opacidade. Também é possível observar a presença de partículas sólidas e rugosidade. O filme controle apresenta rugosidades e baixa transparência devido a coloração branca.



Figura 1. Avaliação macroscópica dos filmes obtidos com 20 e 30 % de extrato liofilizado de *Clitoria ternatea* e filme controle obtido somente com acetato de celulose.

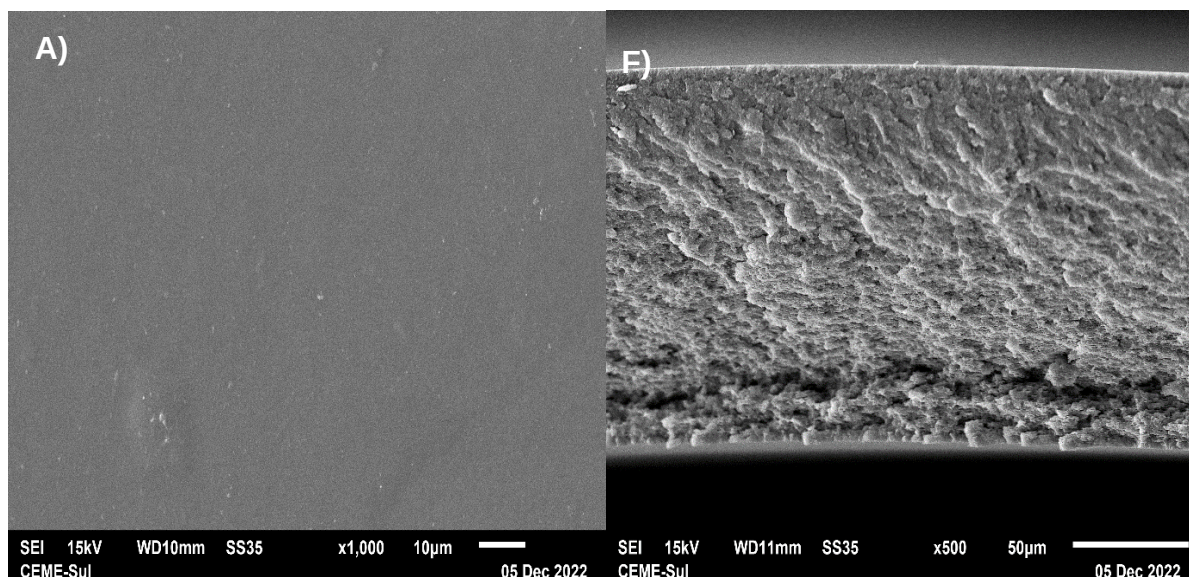


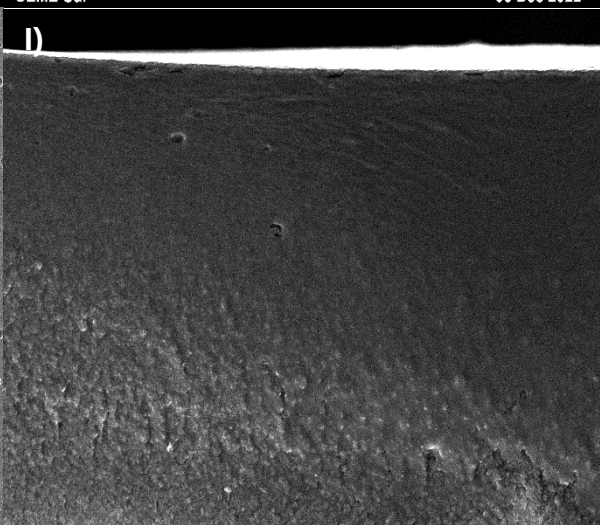
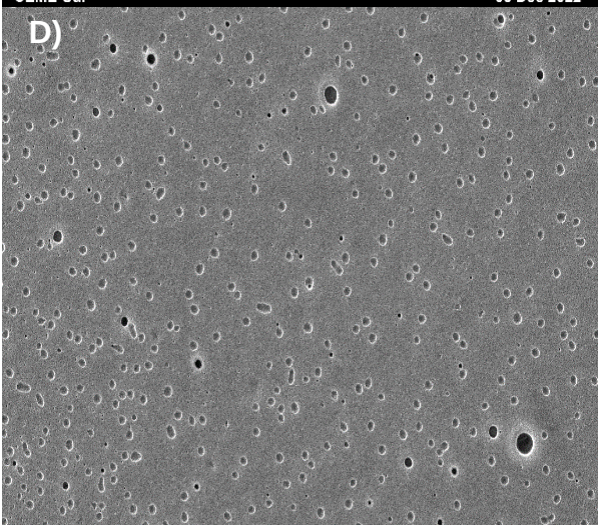
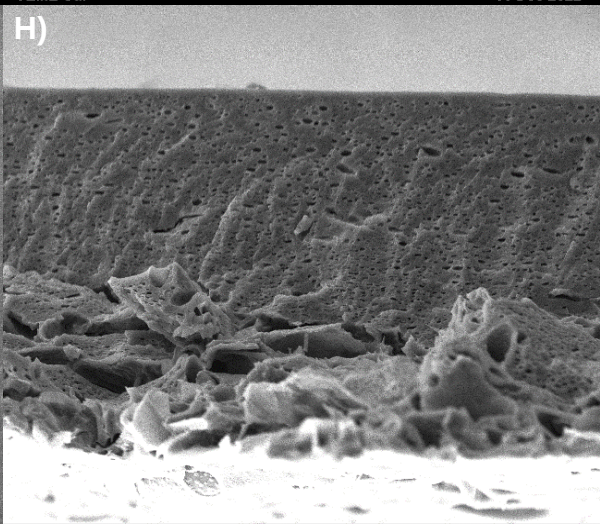
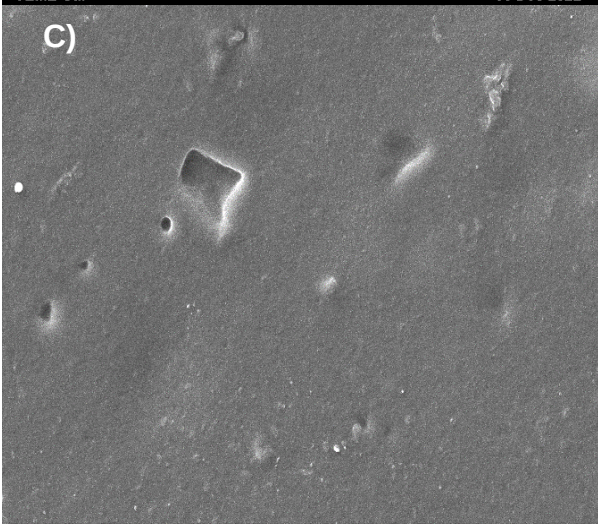
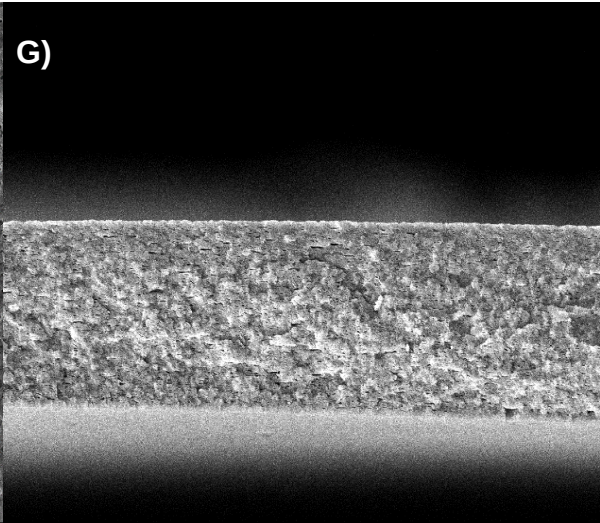
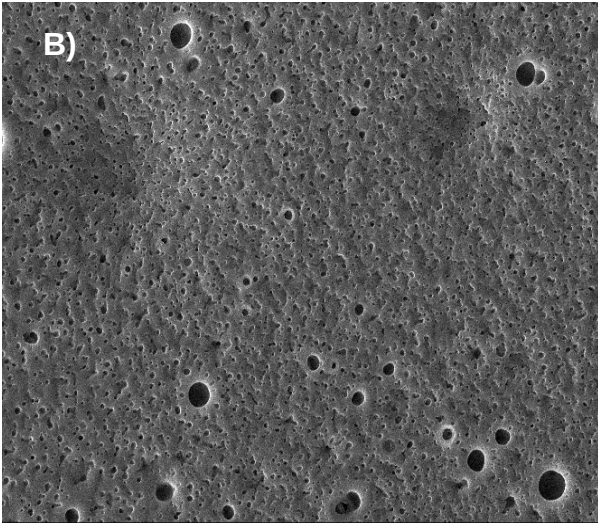
Figura 2. Avaliação macroscópica dos filmes obtidos com 20 e 30% do pó da flor de *Clitoria ternatea* e filme controle obtido somente com acetato de celulose.

4.1.1. Morfologia

A morfologia dos filmes de acetato de celulose incorporadas de extrato liofilizado, flor liofilizada e do filme controle, estão apresentados na Figura 3. O filme controle (Figura 8A) demonstrou superfície lisa, sem poros ou trincas. Assis (2021) demonstrou características semelhantes em seu estudo com filme controle de acetato de celulose e acetona como solvente.

Os filmes contendo extrato 20% e extrato 30% (Figuras 8B e 8D, respectivamente) apresentaram bolhas em sua superfície. Já os filmes contendo flor 20% e flor 30% (Figuras 8C e 8E, respectivamente) apresentaram partículas na superfície, oriundas dos sólidos contidos nas flores, os quais não foram solubilizados na dispersão. As Figuras 8F, 8G, 8H, 8I e 8J indicam a seção transversal dos filmes. Gonçalves et al. (2019) obtiveram filmes de acetato de celulose com adição do plastificante glicerol, e demonstraram em seu estudo características semelhantes as encontradas no presente estudo, onde os filmes apresentaram rugosidade, baixa transparência e opacidade e bolhas. Essas condições estão diretamente ligadas a secagem (VILLALOBOS et al., 2005).





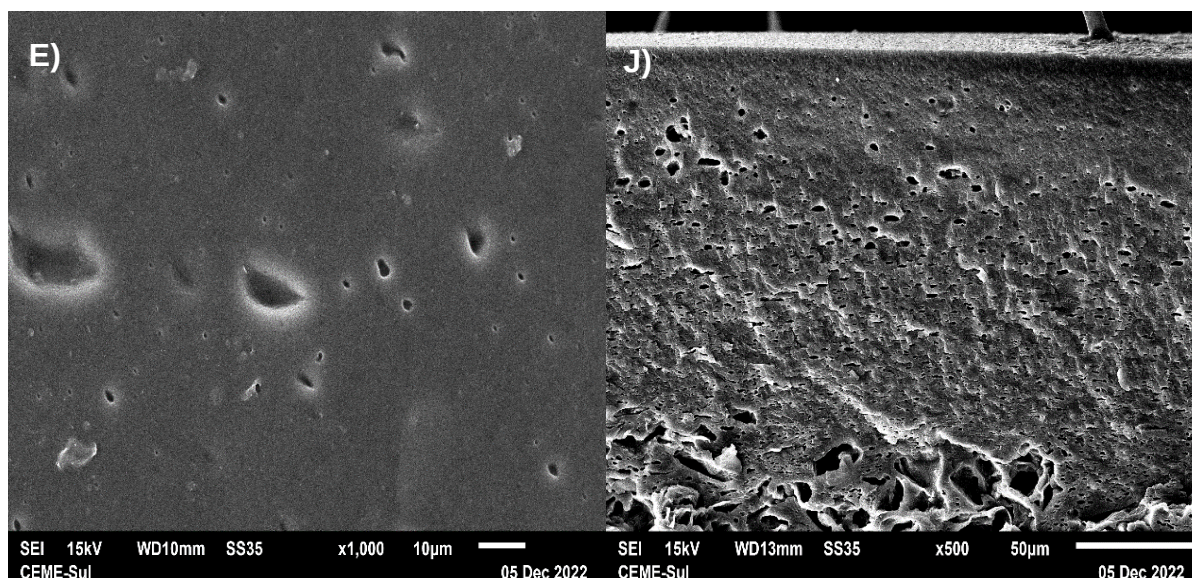


Figura 4. Morfologia da superfície e da lateral dos filmes de acetato de celulose: Controle (A e F), extrato 20% (B e G), flor 20% (C e H), extrato 30% (D e I) e flor 30% (E e J).

4.1.2. Espessura e atividade antioxidante

A espessura do filme controle variou de 0,183 mm a 0,329 mm, e apresentou a maior espessura, seguido do filme contendo extrato a 20% das flores da *Clitoria ternatea* (Tabela 1). Os filmes não demonstraram diferenças de espessura quando adicionado as diferentes concentrações de compostos antociânicos. ASSIS (2021) também demonstrou que o aumento da quantidade de carotenoides nos filmes de acetato de celulose, não demonstrou diferença de espessura. Gonçalves et al. (2019), relataram que o aumento da quantidade de glicerol nos filmes de acetato de celulose, ocorreu o aumento da espessura. Santos et al. (2022) produziram filmes de alginato de sódio incorporados de compostos antociânicos das flores da *Clitoria ternatea* e a espessura não diferiu a medida que foi aumentada a quantidade de compostos bioativos.

Tabela 1. Espessura e atividade antioxidantes dos filmes contendo o extrato e flores liofilizadas de *Clitoria ternatea*.

	Espessura (mm)	Atividade antioxidante (% Inibição)	
		ABTS	DPPH
Controle	0,315± 0,10 ^a	-	-
	0,183± 0,01 ^a	-	-
	0,329± 0,01 ^a	-	-
Flor 20%	0,156± 0,01 ^a	38,31± 0,01 ^a	35,50±0,10 ^b
	0,111± 0,01 ^b	38,16± 0,01 ^a	35,68±0,18 ^b
	0,158± 0,01 ^a	37,73± 0,01 ^a	37,41±0,31 ^a
Extrato 20%	0,129±0,01 ^a	36,87±0,01 ^c	31,42±0,18 ^b
	0,134± 0,01 ^b	37,02±0,01 ^b	31,68±0,09 ^b
	0,140± 0,01 ^b	37,54±0,06 ^a	35,50±0,13 ^a
Flor 30%	0,150± 0,01 ^a	35,87±0,14 ^b	32,36±0,05 ^c
	0,146± 0,01 ^{ab}	36,01±0,18 ^b	34,99±0,10 ^b
	0,132± 0,01 ^b	36,73±0,01 ^a	36,91±0,13 ^a
Extrato 30%	0,251± 0,17 ^a	35,87±0,01 ^b	32,00±0,09 ^c
	0,261± 0,12 ^a	36,01± 0,11 ^b	32,40± 0,10 ^b
	0,352± 0,15 ^a	36,73±0,01 ^a	33,19±0,09 ^a

310 Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey ao nível de 5%
311 de significância.

312 A atividade antioxidante dos filmes incorporados de compostos
313 antociânicos, apresentou percentual de inibição de 31,42% a 38,31% em ambos
314 radicais estudados (ABTS e DPPH). Esse teor elevado da-se pelo fato das
315 antocianinas presentes nas flores da *Clitoria ternatea*, possuir o efeito de eliminação
316 do radical livre, as quais possuem grande número de hidroxilas (SYAHIRAH et al.,
317 2018; HAVANDA et al., 2019).

318 Um estudo de Qi et al. (2022), produziu filmes de etileno vinil álcool (EVOH) e
319 nisina, incorporados com as flores da *Clitoria ternatea* em pó e sementes de romã em
320 pó, e obteve percentual de inibição de 80% para DPPH. Grzebieniarz et al. (2023)
321 demonstraram que os filmes de dupla camada (gelatina e furcellaran) com adição de
322 5% de conteúdo aquoso das flores da *Clitoria ternatea* possuiu maior capacidade de
323 eliminação dos radicais livres DPPH (60%).

Santos et al. (2022) avaliou a atividade antioxidante quanto ao radical ABTS, dos filmes de alginato de sódio incorporados com antocianinas das flores da *Clitoria ternatea*, em simulação em meio aquoso, apresentou maior capacidade sequestradora (23% a 70%) pelo método de inibição de radicais livres (%).

4.1.3. Solubilidade e umidade

Os resultados de solubilidade e umidade dos filmes estão apresentados na Tabela 2. Os filmes controle, contendo extrato 20% e extrato 30% apresentaram menor da solubilidade em água, em comparação aos filmes contendo flor liofilizada 20% e flor 30%. Esse fato pode ser atribuído ao extrato liofilizado, o qual concentra a quantidade de compostos antociânicos e a natureza hidrofílica das antocianinas contidas nas flores da *Clitoria ternatea* e pelo extrato (HALASZ et al., 2018). O teor de umidade não obteve diferenças estatísticas significativas, no entanto, o extrato contendo 20% e 30% obtiveram um pequeno aumento, ~16,3% e ~15,8%, respectivamente.

Singh et al. (2021) avaliaram a solubilidade e umidade de filmes de quitosana e álcool polivinílico incorporados com extrato das flores da *Clitoria ternatea*, e obtiveram teor de solubilidade superior (6,89%) e teor de umidade (~12,63%), tal fato pode ser atribuído ao tipo de material polimérico utilizado para produção do filme.

Com o resultado de solubilidade baixa dos filmes de acetato de celulose, incorporados de compostos antociânicos provenientes das flores da *Clitoria ternatea*, é possível a adição desses filmes dentro de uma embalagem de alimento o qual possua alta atividade de água.

Tabela 2. Solubilidade em água e teor de umidade dos filmes de acetato de celulose contendo o extrato e as flores liofilizadas a 20% e 30% de *Clitoria ternatea*.

	Solubilidade	Umidade
	(%)	(%)
Controle	0,09± 0,01 ^c	14,9±1,80 ^a
Flor 20%	0,11± 0,01 ^{ab}	13,8±2,80 ^a
Flor 30%	0,11± 0,01 ^a	15,3± 1,00 ^a
Extrato 20%	0,09± 0,01 ^{bc}	16,3± 2,70 ^a
Extrato 30%	0,10± 0,01 ^{abc}	15,8±2,50 ^a

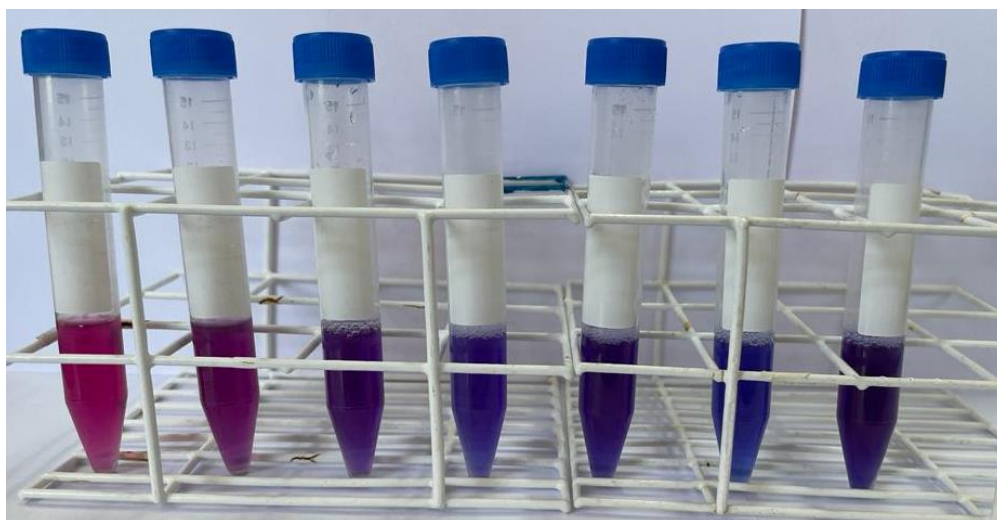
352 Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey ao nível de 5%
 353 de significância.

354 **4.1.4. Análise de cor do extrato, flor liofilizada e filmes expostos a** 355 **diferentes pHs**

356 A mudança de cor do extrato liofilizado no intervalo de pH de 2-8 (Figura 4) e
 357 do pó da flor no intervalo de pH 2-8 (Figura 5) evidencia que: em pH extremamente
 358 ácido (pH 2 e 3) a flor liofilizada apresentou coloração rosada, no entanto, com o
 359 aumento do pH da solução, a coloração variou do violeta ao azul (pH 4 ao 8) – Figura
 360 4. A mudança de cor é mais sensível para a flor liofilizada quando comparada ao
 361 extrato. Já no extrato liofilizado, a mudança de coloração tornou-se mais escura, para
 362 tons de verde, o que se confirmou quando os filmes foram expostos a diferentes
 363 soluções de tampões de pH (Tabela 3, 4, 5 e 6).

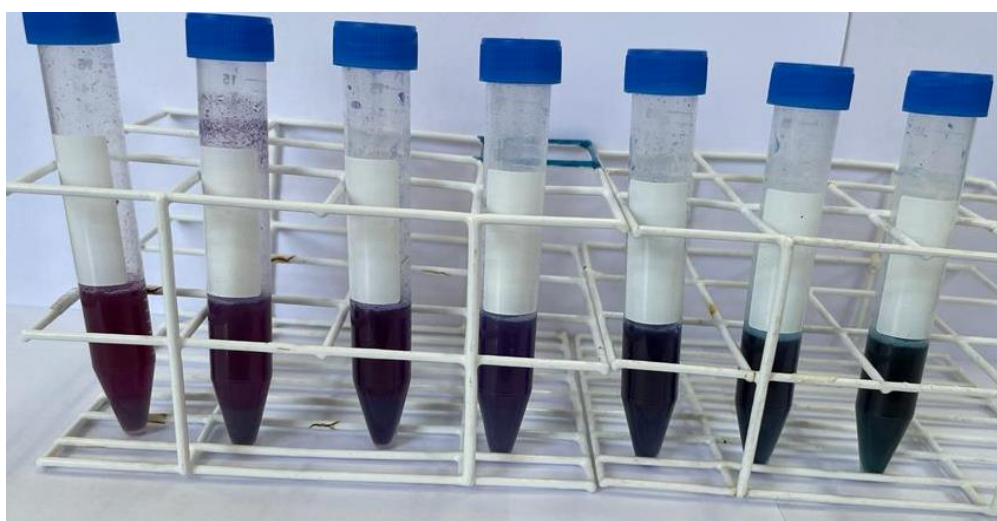
364 O pH é o principal fator que influencia na mudança de cor dos compostos
 365 antociânicos (BORDIGNON, 2009; SHARMA et al., 2013). As antocianinas podem
 366 apresentar diferentes formas estruturais, tais como o cátion flavílico, a base quinoidal,
 367 o carbinol e a chalcona. A principal forma da antocianina é o cátion flavílico, em
 368 solução aquosa o cátion flavilium apresenta coloração vermelho (pH 1 e 2), base

369 anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou
370 levemente amarela) (KHOO et al., 2017; ANDRETTA et al., 2019).



371

372 **Figura 4.** Mudança de cor no pó da flor no intervalo de pH 2 (esquerda) ao 8 (direita).



373

374 **Figura 5.** Mudança de cor no extrato liofilizado no intervalo de pH 2 (esquerda) ao 8 (direita).

375 Os parâmetros de cor em diferentes pHs (2-8), estão apresentados na Tabela
376 3, 4, 5 e 6, para avaliação das coordenadas L^* (preto = 0 ao branco = 100), a^* (+a
377 indica vermelho e -a indica verde) e b^* (+b indica amarelo e -b indica azul). Todos os
378 filmes avaliados apresentaram valor de L^* alto, indicando uma maior luminosidade.
379 De acordo com as coordenadas de cromaticidade, foi possível observar o valor de a^*

diminuir, conforme procedeu-se o aumento do pH, o que indica a presença da coloração rosa com mais intensidade em pHs mais ácidos. Enquanto, no croma b*, os resultados indicaram maior predominância da cor azul.

Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes aos avaliados por Koshy et al. (2022), o qual avaliou a cor de filmes produzidos com proteína isolada de soja e quitina incorporados de antocianinas oriundas do extrato da *Clitoria ternatea*, relatou um maior valor de ΔE , indicando que o filme ficou mais escuro. Os autores também relataram baixo valor do croma a* e do croma b*, indicando a mudança da cor vermelha para verde e a mudança de azul para amarelo. Em relação ao ΔE , valores superiores a 5, indicam que as diferenças de cor podem ser facilmente identificadas a olho nu (POURJAVAHER et al., 2017; KOSHY et al., 2022). Os resultados obtidos para ΔE neste estudo foram superiores a 5, concordando com as Figuras 9 e 10, onde ocorreu a diferença de cor em diferentes pHs, sendo facilmente observada pelo olhar humano.

Tabela 3. Parâmetros de cor (L*, a*, b*, ΔE e opacidade) do filme contendo 20% de extrato de *Clitoria ternatea*, expostos a diferentes pHs.

Extrato 20%				
	L*	a*	b*	ΔE
pH2	70,64 $\pm$ 1,22 ^a	28,87 $\pm$ 2,73 ^c	0,04 $\pm$ 0,97 ^d	76,36 $\pm$ 0,83 ^a
pH3	55,62 $\pm$ 12,01 ^a	28,59 $\pm$ 3,70 ^a	-1,98 $\pm$ 5,10 ^b	63,14 $\pm$ 9,7 ^{ab}
pH4	66,40 $\pm$ 1,57 ^a	26,93 $\pm$ 2,97 ^a	-3,52 $\pm$ 2,07 ^b	71,80 $\pm$ 2,42 ^a
pH5	66,59 $\pm$ 2,19 ^a	29,27 $\pm$ 1,61 ^b	-1,05 $\pm$ 0,40 ^d	72,78 $\pm$ 1,43 ^a
pH6	64,67 $\pm$ 1,45 ^a	26,36 $\pm$ 2,54 ^c	-6,08 $\pm$ 3,69 ^c	70,21 $\pm$ 1,85 ^c
pH7	68,95 $\pm$ 1,87 ^a	24,58 $\pm$ 1,40 ^c	-1,84 $\pm$ 0,40 ^a	73,23 $\pm$ 2,06 ^a
pH8	70,04 $\pm$ 0,69 ^a	25,41 $\pm$ 1,76 ^b	-1,13 $\pm$ 0,84 ^b	74,54 $\pm$ 0,61 ^a
Opacidade	67,57 $\pm$ 2,89 ^c			

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes (p < 0,05). Onde L*: luminosidade; a*:vermelho/verde e b*:amarelo/azul. A opacidade das soluções foram calculadas usando a equação 4. Os valores ΔE das soluções foram calculados usando a Equação 5.

Tabela 4. Parâmetros de cor (L*, a*, b*, ΔE e opacidade) do filme contendo 20% de pó da flor de *Clitoria ternatea*, expostos a diferentes pHs.

Flor 20%				
	L*	a*	b*	ΔE
pH2	45,22 ± 1,96 ^c	43,99 ± 0,52 ^a	10,74 ± 0,53 ^b	64,01 ± 1,43 ^c
pH3	40,50 ± 1,27 ^b	38,87 ± 2,13 ^b	4,57 ± 2,59 ^b	56,37 ± 2,36 ^b
pH4	42,55 ± 0,71 ^c	38,48 ± 1,87 ^b	4,35 ± 0,90 ^c	57,54 ± 1,75 ^b
pH5	45,22 ± 1,96 ^c	43,99 ± 0,52 ^c	10,74 ± 0,53 ^b	64,01 ± 1,43 ^c
pH6	41,83 ± 1,43 ^c	38,87 ± 1,43 ^a	5,27 ± 1,54 ^a	57,38 ± 1,27 ^a
pH7	43,27 ± 1,14 ^c	37,34 ± 2,08 ^a	3,43 ± 1,51 ^b	57,30 ± 1,48 ^c
pH8	45,50 ± 1,41 ^{bc}	38,41 ± 2,34 ^a	7,45 ± 0,99 ^a	60,04 ± 1,84 ^{bc}
Opacidade	67,00 ± 4,11 ^c			

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes (p <0,05). Onde L*: luminosidade; a*:vermelho/verde e b*:amarelo/azul. A opacidade das soluções foram calculadas usando a equação 4. Os valores ΔE das soluções foram calculados usando a Equação 5.

Tabela 5. Parâmetros de cor (L*, a*, b*, ΔE e opacidade) do filme contendo 30% de extrato de *Clitoria ternatea*, expostos a diferentes pHs.

Extrato 30%				
	L*	a*	b*	ΔE
pH2	60,58 ± 2,34 ^b	32,59 ± 2,74 ^c	5,63 ± 1,29 ^c	69,10 ± 0,84 ^b
pH3	57,85 ± 2,47 ^a	34,25 ± 6,05 ^{ab}	1,88 ± 4,96 ^b	67,64 ± 1,27 ^a
pH4	55,68 ± 3,13 ^b	38,90 ± 3,34 ^b	6,91 ± 2,09 ^c	68,41 ± 1,23 ^a
pH5	53,57 ± 2,21 ^b	41,05 ± 3,03 ^c	6,62 ± 2,88 ^c	67,93 ± 1,72 ^b
pH6	59,65 ± 3,42 ^b	28,11 ± 3,13 ^c	1,77 ± 2,6b ^c	66,11 ± 2,21 ^c
pH7	49,02 ± 7,91 ^c	30,66 ± 1,63 ^b	0,69 ± 1,02 ^c	57,91 ± 7,31 ^c
pH8	53,13 ± 3,67 ^b	37,92 ± 3,47 ^a	1,16 ± 4,52 ^b	65,43 ± 4,77 ^{ab}
Opacidade	34,74 ± 8,99 ^a			

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes (p <0,05). Onde L*: luminosidade; a*:vermelho/verde e b*:amarelo/azul. A opacidade das soluções foram calculadas usando a equação 4. Os valores ΔE das soluções foram calculados usando a Equação 5.

Tabela 6. Parâmetros de cor (L*, a*, b*, ΔE e opacidade) do filme contendo 30% de flor de *Clitoria ternatea*, expostos a diferentes pHs.

Flor 30%				
	L*	a*	b*	ΔE
pH2	70,64 ± 1,85 ^d	37,31 ± 1,78 ^b	14,45 ± 1,96 ^a	57,32 ± 2,43 ^d
pH3	43,55 ± 1,37 ^b	37,33 ± 1,69 ^b	13,71 ± 1,94 ^a	59,02 ± 1,14 ^{ab}
pH4	42,40 ± 2,36 ^c	38,24 ± 3,32 ^b	11,75 ± 2,61 ^a	58,35 ± 3,78 ^b
pH5	41,01 ± 1,85 ^d	37,31 ± 1,78 ^a	14,45 ± 1,96 ^a	57,32 ± 2,43 ^d
pH6	34,83 ± 2,92 ^d	16,94 ± 3,63 ^b	1,67 ± 0,84 ^{ab}	38,82 ± 4,10 ^b
pH7	29,71 ± 0,86 ^b	10,55 ± 0,97 ^d	1,82 ± 0,16 ^{bc}	31,59 ± 1,07 ^b
pH8	41,08 ± 9,61 ^c	24,30 ± 9,00 ^b	3,12 ± 1,23 ^{ab}	47,99 ± 12,52 ^c
Opacidade	70,63 ± 9,02 ^c			

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes (p <0,05). Onde L*: luminosidade; a*:vermelho/verde e b*:amarelo/azul. A opacidade das soluções foram calculadas usando a equação 4. Os valores ΔE das soluções foram calculados usando a Equação 5.

4.1.5. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do extrato das flores da *Clitoria ternatea* (Figura 6) e dos filmes de acetato de celulose incorporados com antocianinas das flores da *Clitoria ternatea*, apresentaram halos (Figura 7, 8, 9 e 10). Além da mudança de cor do extrato e também filmes, pela ação das bactérias gram-negativas, os quais apresentavam coloração rosada. Nas Figuras 9 e 10, frente às bactérias *S. Typhimurium* e *E. coli*, ocorreu a mudança de cor do filme para o verde, tanto para o extrato a 20% e 30% quanto para a flor liofilizada a 20% e 30%. É sabido que os resultados da atividade antibacteriana têm relação com o extrato das flores da *Clitoria ternatea*, o qual é rico em antocianinas e compostos fenólicos, e pelo fato de o extrato possuir ácido cítrico, o qual potencializa essas propriedades microbiológicas (BUREL et al., 2021). Porém, os mecanismos que promovem a mudança de coloração dos filmes frente a esses patógenos alimentares deverá ser abordado em estudos futuros.

Santos et al. (2023), analisou a atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco, frente a *S. aureus* (ATCC-6538) e *E. coli* (ATCC-8739) dos filmes de alginato de sódio incorporados de extrato de *Clitoria ternatea*, porém, somente o filme

437 contendo 40% de extrato gerou zonas de inibição e não houve relato do autor na
438 mudança de cor dos filmes na presença das bactérias mencionadas.

439 Grzebieniarz et al., (2023), produziu filmes de dupla camada com gelatina e
440 furcellaran e incorporados com extrato das flores da *Clitoria ternatea* e extrato das
441 sementes de romã e analisou a atividade antibacteriana frente a *S. aureus*,
442 *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. Enterica*, *P. aeruginosa*. O extrato na maior
443 concentração testada, 10%, obteve halos de inibição, no entanto, os filmes não
444 mudaram de cor.

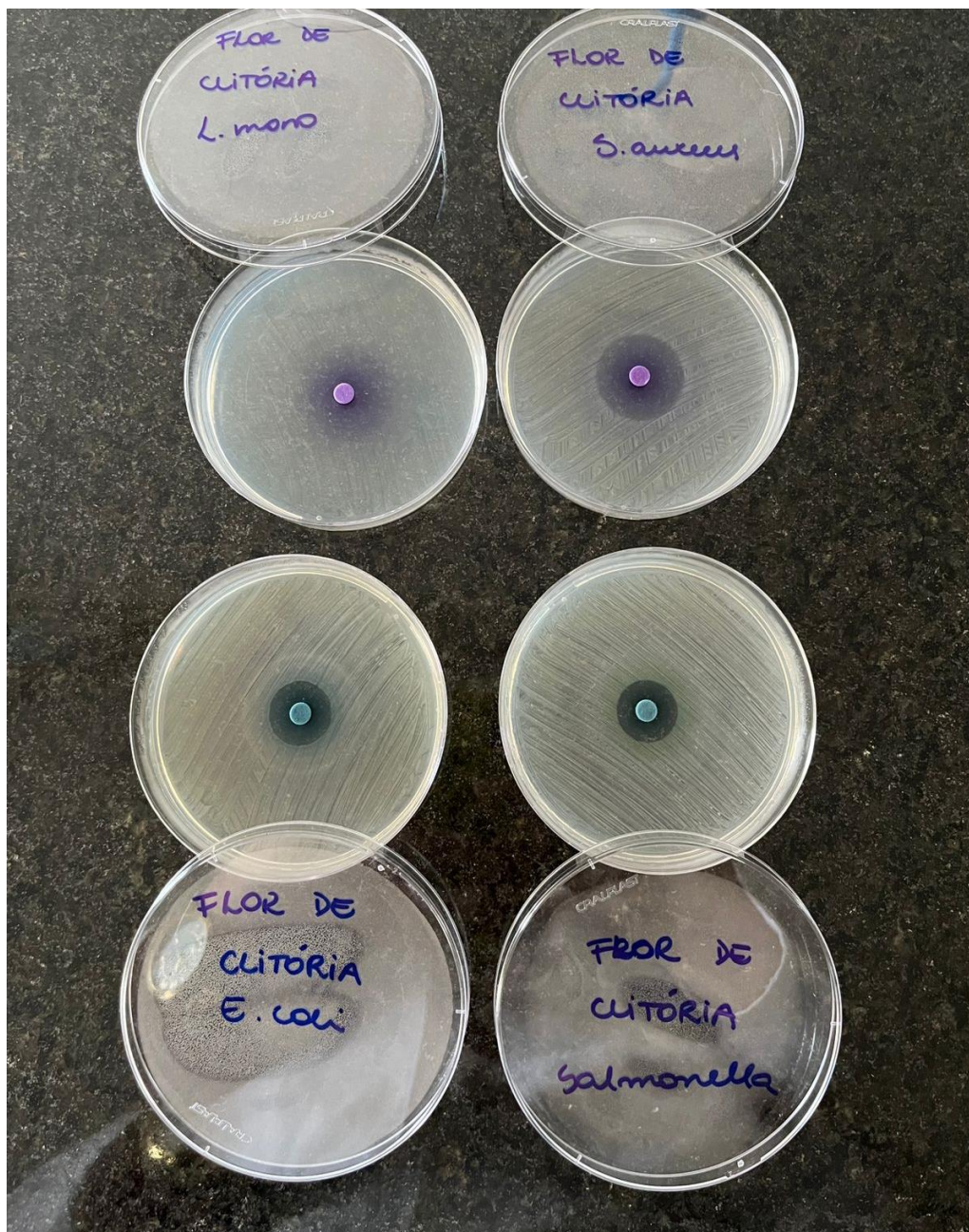
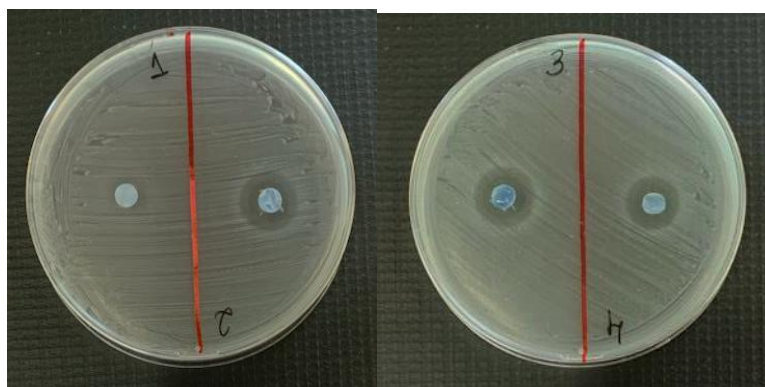
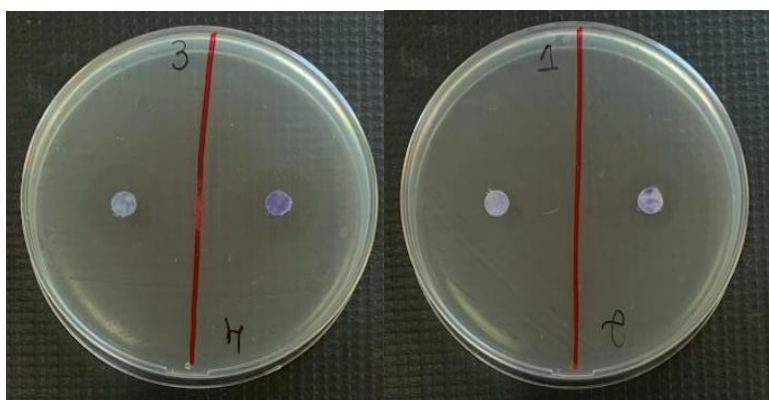


Figura 6. Avaliação microbiológica do extrato livre das flores de *Clitoria ternatea* frente a *Listeria monocytogenes* (sem mudança de coloração), *Staphylococcus aureus* (sem mudança de coloração), *Escherichia coli* (com alteração de cor) e *Salmonella Typhimurium* (com alteração de cor).



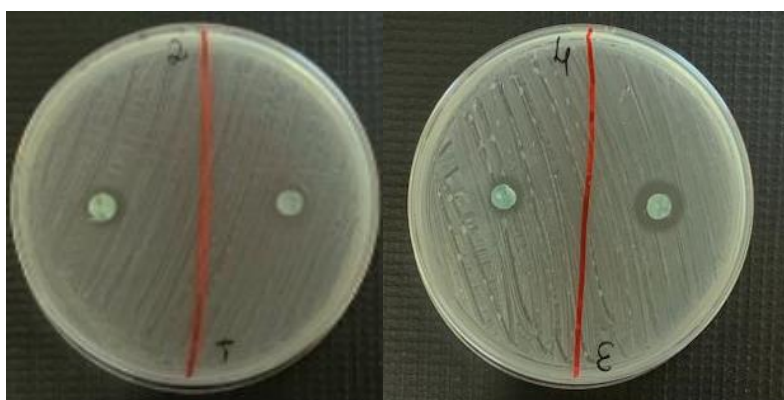
450

451 **Figura 7.** Avaliação microbiológica do filme incorporado com flores de *Clitoria ternatea* frente a
 452 *Staphylococcus aureus*. A numeração das placas corresponde por: (1) Extrato 20%; (2) Extrato 30%;
 453 (3) Flor 20% e (4) Flor 30%.



454

455 **Figura 8.** Avaliação microbiológica do filme incorporado com flores de *Clitoria ternatea* frente a *Listeria*
 456 *monocytogenes*. A numeração das placas corresponde por: (1) Extrato 20%; (2) Extrato 30%; (3) Flor
 457 20% e (4) Flor 30%.



458

Figura 9. Avaliação microbiológica do filme incorporado com flores de *Clitoria ternatea* frente a *Salmonella Typhimurium*. A numeração das placas corresponde por: (1) Extrato 20%; (2) Extrato 30%; (3) Flor 20% e (4) Flor 30%.

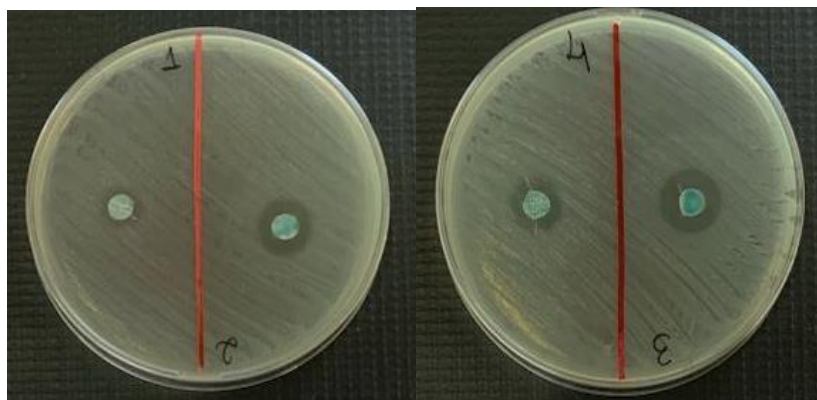


Figura 10. Avaliação microbiológica do filme incorporado com flores de *Clitoria ternatea* frente a *Escherichia coli*. A numeração das placas corresponde por: (1) Extrato 20%; (2) Extrato 30%; (3) Flor 20% e (4) Flor 30%.

5. Conclusão

A produção dos filmes biodegradáveis, utilizando o acetato de celulose, incorporados de compostos bioativos das flores da *Clitoria ternatea*, pode ser uma alternativa para incorporação em embalagens de alimentos. Os filmes apresentam atividade antioxidante e baixa solubilidade em água, tornando possível a incorporação desse material no interior e em contato com alimentos que possuam alta taxa de atividade de água.

A mudança de cor no extrato liofilizado e na flor liofilizada expostas a diferentes soluções de tampões, apresentou potencial para uso em pH indicador em embalagens inteligentes de alimentos. Além da possibilidade uso dos filmes (extrato 20% e 30%) e (flor liofilizada 20% e 30%) como indicador de microorganismos, por conta da modificação da cor dos filmes frente a bactérias gram-negativas (*S. Typhimurium* e *E. Coli*). Os achados do presente trabalho sugere estudos futuros para compreender o

metabolismo responsável pela modificação de cor dos filmes contendo extrato de *Clitoria ternatea*.

6. Referências bibliográficas

AACC- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE QUÍMICOS DE CEREAIS, 1995 AACC- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE QUÍMICOS DE CEREAIS (9ªed.), **Métodos aprovados da associação americana de químicos de cereais**, v. 1e 2, São Paulo,1995.

ANDRETTA, R.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C.; SPADA, J. C. Development and characterization of pH-indicator films based on cassava starch and blueberry residue by thermocompression. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 317–324, 2019.

ASSIS, R.Q., LOPES, S.M., COSTA, T.M.H., FLÔRES, S.H., RIOS, A.O. Active biodegradable cassava starch films incorporated lycopene nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, v.109, p.818-827, 2017.

ASSIS, Renato Queiroz. **FILMES ATIVOS À BASE DE ACETATO DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE LICOPENO, NORBIXINA OU ZEAXANTINA**. 2021. 122f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2021.

ASTM. ASTM D882. **Métodos de teste padrão de transmissão de vapor de água de materiais**. Livro anual de normas ASTM, Sociedade Americana de Testes e Materiais, Filadélfia, p.96-95, 1995.

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

505 BIJI, K. B. et al. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of**
506 **Food Science and Technology**, v.52, n.10, p.6125-6135, 2015.

507 BORDIGNON C.Jr., FRANCESCOTTO, V.,NIENOW, A.A., CALVETE, E.,
508 REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em
509 frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1. p. 183-188. 2009.

510 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; & BERSET, C. L. W. T. Use of a free
511 radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**,
512 v. 28, n1, p. 25-30, 1995.

513 BUREL, C., KALA, A., PUREVDORJ-GAGE, L. Impact of pH on citric acid antimicrobial
514 activity against Gram-negative bactéria. **Letters in applied microbiology**, v.72, n.3,
515 p. 332-340, 2021.

516 CHALES, Eduardo Henrique. **Uso de antocianinas para aplicação em embalagens**
517 **de alimentos**. 2018, 29f. Trabalho de conclusão de curso (Técnico em alimentos
518 integrado ao ensino médio) - Instituto Federal de São Paulo - Campus Barretos, 2018.

519 FONSECA, L. M.; OLIVEIRA, J. P.; CRIZEL, R. L.; SILVA, F. T.; ZAVAREZE, E. R.;
520 BORGES, C. D. Electrospun Starch Fibers Loaded with Pinhão (*Araucaria*
521 *angustifolia*) Coat Extract Rich in Phenolic Compounds. **Food Biophysics**, 2020.

522 GASTI, T., DIXIT, S., HIREMANI, V.D., CHOUGALE, R.B., MASTI, S.P., VOOTLA,
523 S.K., MUDIGOUDRA, B.S. Chitosan/pullulan based films incorporated with clove
524 essential oil loaded chitosan-ZnO hybrid nanoparticles for active food packaging.
525 **Carbohydrate Polymers**, v.277, p.118866, 2022.

526 GHAANI, M. et al. An overview of the intelligent packaging Technologies in the food
527 sector. **Trends in Food Science & Technology**, v.51, p. 1-11, 2016.

528 GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies, In: GOMORI, G.
529 Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, p.11, 2004.

530 GONÇALVES, G.C.P., ROSAS, A.L.G., SOUSA, R.C., VIEIRA, T.R.R., SOUSA,
 531 T.C.A., RAMIRES, T., SILVEIRA, T.F.F., BARROS, L., SILVA, W.P., DIAS, A.R.G.,
 532 ZAVAREZE, E.R., MEINHART, A.D. A green method for anthocyanin extraction from
 533 Clitoria ternatea Flowers cultivated in Southern Brazil: characterization, in vivo toxicity
 534 and biological activity. Artigo submetido na revista Food Chemistry, referente ao
 535 capítulo 1 deste documento. 2023.

536 GONÇALVES, S.M., dos SANTOS, D.C., MOTTA, J.F.G., SANTOS, R.R., CHÁVEZ,
 537 D.W.H., MELO, N.R. Structure and functional properties of cellulose acetate films
 538 incorporated with glycerol. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p.190–197, 2019.

539 GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat
 540 gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties.
 541 **International Journal Food Science Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

542 GRZEBIENIARZ, W., TKACZEWSKA, J., JUSZCZK, L., KAWECKA, A., KRZYSCIĄK,
 543 P., NOWAK, N., GUZIK, P., KASPRZAK, M., JANIK, M., JAMRÓZ, E. The influence of
 544 aqueous butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower extract on active and intelligent
 545 properties of furcellaran Double-Layered films - *in vitro* and *in vivo* research. **Food**
 546 **Chemistry**, v.413, p.135612, 2023.

547 HALASZ, K., CSOKA, L. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace extract
 548 immobilized in chitosan for colorimetric pH indicator film application. **Food Packaging**
 549 **and Shelf Life**, v.16, p.185-193, 2018.

550 HAVANDA, T. LUENGWILAI, K. Variation in floral antioxidant activities and
 551 phytochemical properties among butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) germplasm.
 552 **Genetic Resources and Crop Evolution**, v, 66, n. 4. p. 645-658. 2019.

553 HENDESSI, S., SEVINIS, E.B., UNAL, S., CEBECI, F.C., MENCELOGLU, Y.Z., UNAL,
 554 H. Antibacterial sustained-release coatings from halloysite nanotubes/waterborne
 555 polyurethanes. **Progress in Organic Coatings**, v.101, p.253-261, 2016.

556 HONGYAN, L., ZEYUAN, D., HONGUI, Z., CHANLI, H., RONGHUA, L., YOUNG, C.J.,
 557 RONG T. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in
 558 antioxidant activities. **Food Research International**, v.46, n.1, p. 250-259, 2012.

559 KALT, W., MCDONALD, J.E., DONNER, H. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant
 560 Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. **Journal of Food Science**, v.65,
 561 n.3, p.390–393, 2000.

562 KHOO, H. E., AZLAN, A., TANG, S. T., LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins:
 563 colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health
 564 benefits. **Food and nutrition research**, v.61, n.1, p 2-21. 2017.

565 KOSHY, R.R., REGHUNADHAN, A., MARY, S.K, PILLAI, P.S., JOSEPH, S.,
 566 POTHEN, L.A. pH indicator films fabricated from soy protein isolate modified with chitin
 567 nanowhisker and *Clitoria ternatea* flower extract. **Current Research in Food Science**,
 568 v. 5, p.743-751, 2022.

569 KRITHIGA, N., RAJALAKSHMI, A., JAYACHITRA, A. Green synthesis of silver
 570 nanoparticles using leaf extracts of clitoria ternatea and solanum nigrum and study of
 571 its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. **Journal of**
 572 **Nanoscience**, v. 2015, p.1- 8. 2015.

573 LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric
 574 anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by
 575 the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88,
 576 n. 5, p. 1269-1278, 2005.

577 MA, Q., WANG, L. Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum
 578 incorporating cellulose and extracts from grape skins. **Sensors and Actuators B:**
 579 **Chemical**, v.235, p.401- 407, 2016.

580 MOHEBI, E., MARQUEZ, L. Intelligent packaging in meat industry: An overview of
 581 existing solutions. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.7. p. 3947-
 582 3964, 2015.

583 OGUIS, G, K., GILDING, E.K., JACKSON, M.A., CRAIK, D.J. Butterfly Pea (*Clitoria*
 584 *ternatea*), a cyclotide -bearing plant with applications in agriculture and medicine.
 585 **Frontiers in Plant Science**, v.10, n.365. p-1-23. 2019.

586 PEREIRA, Pamela Freire de Moura. **Desenvolvimento de filmes à base de**
 587 **biopolímeros para aplicação como embalagens inteligentes**. 2017. 72f.
 588 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
 589 Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Rio de Janeiro,
 590 2017.

591 POURJAVAHER, S., ALMASI, H., MESHKINI, S., PIRSA, S., PARANDI, E.
 592 Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and
 593 red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v.156, p.193-
 594 201, 2017.

595 PRIETTO, L., MIRAPALHETE, T.C., PINTO, V.Z., HOFFMANN, J F., VANIER, N.L.,
 596 LIM, L., DIAS, A.R.G., ZAVAREZE, E.R. pH-sensitive films containing anthocyanins
 597 extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT- Food science and**
 598 **technology**, v.80, p.492-500. 2017.

599 QI, D., XIAO, Y., XIA, L., LI, L., JIANG, S., JIANG, S., WANG, H. Colorimetric films
 600 incorporated with nisin and anthocyanins of pomegranate/*Clitoria ternatea* for shrimp
 601 freshness monitoring and retaining. *Food Packaging and Shelf Life*. v.33, p.100898,
 602 2022.

603 RE, R. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization
 604 assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237. 1999.

ROY, S., RHIM, J.W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.61, n.14, p. 2297-2325, 2021.

SANTOS, L.G., ALVES-SILVA, G.F., MARTINS, V.G. Active-intelligent and biodegradable sodium alginate films loaded with *Clitoria ternatea* anthocyanin-rich extract to preserve and monitor food freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.220, p.866-877, 2022.

SANTOS, L.G.; MARTINS, V.G. Optimization of the green extraction of polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: a comparative study with conventional extraction techniques. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v, p.100458, 2023.

SHARMA, P., GUPTA, R., ROSHAN, S., SAHU, S., SHUKLA., GARG, A. Plant extract as a acid base indicators. **Inventi Impact: Planta Activa**, v.3, p.3-5, 2013.

SILVA-PEREIRA, M.P.; TEIXEIRA, J.A.; PEREIRA-JÚNIOR, V.A.; STEFANI, R. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, p. 258- 262. 2015.

SINGH, S., NWABOR, O.F., SYUKRI, D.M., VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Chitosan-poly(vinyl alcohol) intelligent films fortified with anthocyanins isolated from *Clitoria ternatea* and *Carissa carandas* for monitoring beverage freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.182, p.1015-1025, 2021.

SYAHIRAH, L., LUTFI, M.Y., ATIKA, A., HAFIZ, R., ZULHELMI, O.A.,ADZHAN, O., KHOR, P.Y.,. A comparative analysis of clitoria ternatea linn. (Butterfly pea) flower extract as natural liquid pH indicator and natural pH paper. **Dhaka University Journal Pharmaceutical Science**, v. 17, n. 1. p. 97–103. 2018.

VANDERROOST, M. et al. Intelligent packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, v.39, p. 47-62, 2014.

632 VILLALOBOS, R., CHANONA, J., HERNÁNDEZ, P., GUTIÉRREZ, G., CHIRALT, A.
633 Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants
634 as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v.19, 53-61, 2005.

635 WEN, P.; ZHU, D.-H.; FENG, K.; LIU, F.-J.; LOU, W.-Y.; LI, N.; ZONG, M.-H.; WU, H.
636 Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential
637 oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. **Food chemistry**, v.
638 196, p. 996–1004, 2016b. YIN, W., QIU, C., JI, H., LI, X., SANG, S., MCCLEMENTS,
639 D.J., JIAO, A., WANG, J., JIN, Z. Recent advances in biomolecule-based films and
640 coatings for active and smart food packaging applications. **Food Bioscience**, v. 52,
641 p.102378, 2023.

7. Considerações finais

O cultivo das flores da *Clitoria ternatea* foi possível, visto que o clima na região de Pelotas/RS é o subtropical temperado. A planta teve sua floração nos meses de dezembro a abril, onde foi possível realizar a colheita das amostras.

Através do planejamento multivariado foi possível otimizar um método de extração ambientalmente amigável e obter um extrato comestível de forma rápida, simples e econômica. No extrato liofilizado obtido com o ponto ótimo de extração (22,5 mL por 16 min à 45 °C), foi possível quantificar treze antocianinas por UHPLC/MS. A antocianina majoritária é a ternatina B2 (57,94 mg.100g⁻¹). Também foram extraídos nove compostos fenólicos não antociânicos, com destaque para o Kaempferol 3-O-neohesperidoside (412,14 mg.100g⁻¹).

O extrato apresentou elevada quantidade de antocianinas monoméricas totais e capacidade redutora total, além de baixa toxicidade. O extrato obtido no ponto ótimo apresentou atividade antioxidante superior a 50% em relação ao radical ABTS•+. Essa característica é ideal para incorporação em embalagens ativas, com a finalidade da conservação de alimentos. As flores liofilizadas apresentaram capacidade de mudança de cor frente a diferentes pHs, tendo potencial para aplicação em embalagens inteligentes, promovendo a comunicação do produto com o consumidor para assegurar a qualidade e o estado de frescor de um alimento.

Os filmes de acetato de celulose incorporados com 20% e 30% de extrato liofilizado das flores da *Clitoria ternatea*, apresentaram transparência, rigidez e rugosidades. Já os filmes de acetato de celulose contendo 20% e 30% de flor liofilizada da *Clitoria ternatea*, apresentaram cor rosa intensa, rigidez e sem transparência. Apresentaram baixa solubilidade em água e baixa umidade, indicando potencialidade para serem inseridos em contato com alimentos com alta taxa de atividade de água.

Neste estudo, a mudança de cor dos filmes de acetato incorporados de compostos antociânicos não apresentaram resposta, que era uma das hipóteses do

estudo. No entanto, a grande descoberta foi a mudança de cor dos filmes frente a duas bactérias gram-negativas (*S. Typhimurium* e *E. Coli*), causadoras de doenças alimentares, da coloração rosa (em todas as concentrações testadas) para a verde. Dessa forma, os resultados apresentados sugerem a possibilidade de estudos futuros para o desenvolvimento de embalagens inteligentes capazes de detectar a presença desses patógenos alimentares e fazer a comunicação dessa informação para o consumidor. Esses resultados levantam questionamentos e perspectivas de trabalhos futuros para compreender o metabolismo envolvido na mudança de coloração. Além disso, a composição do extrato obtido (quantidade substancial de compostos fenólicos bioativos benéficos e, conseqüentemente, seus efeitos associados tão bem explorados na literatura) deixa o legado para pesquisas que visem a incorporação do extrato das flores em outras matrizes alimentares a fim de melhorar a qualidade funcional de alimentos.

8. Referências bibliográficas

AB-RASHID, S., TONG, W.Y., LEONG, C.R., ABDUL-GHAZALI, N.M., AHMAD, N. TEO, H. S. Anthocyanin Microcapsule from *Clitoria ternatea*: Potential Bio-preservative and Blue Colorant for Baked Food Products. Arabian. **Journal for Science and Engineering**, v.46, n.5, p.65-72, 2020.

ASSIS, Renato Queiroz. **FILMES ATIVOS À BASE DE ACETATO DE CELULOSE COM ADIÇÃO DE LICOPENO, NORBIXINA OU ZEAXANTINA**. 2021. 122f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2021.

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

BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.

BHUSHANI, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 21–33, 2014.

BIJI, K. B. et al. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.10, p.6125-6135, 2015.

BIYISHIB, A. K., GEETHA, K. A. Polymorphism in flower colour and petal type in *Aparajita* (*Clitoria ternatea*). Open Access Journal of Medicinal Aromatic Plants, v.3, p.12–14, 2012.

BORDIGNON C.Jr., FRANCESCOTTO, V.,NIENOW, A.A., CALVETE, E., REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1. p. 183-188. 2009.

CARDOSO, L.M., LEITE, J.P.V., PELUZIO, M.C.G. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Revista Colombiana Ciencias Químico Farmaceutica**, v.40, n.1, p.116-138, 2011.

CARVALHO, M.T., BERGAMASCO, R., GOMES, R.G. METHODS OF EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS: UTILIZATION OF BYPRODUCTS IN AGROINDUSTRY. **Uningá Review**, v.33, n.1, p.66-68, 2018.

CHALES, Eduardo Henrique. **Uso de antocianinas para aplicação em embalagens de alimentos**. 2018, 29f. Trabalho de conclusão de curso (Técnico em alimentos integrado ao ensino médio) - Instituto Federal de São Paulo - Campus Barretos, 2018.

CONCENÇO, F.I.G.R., STRINGHETA, P.C., RAMOS, A.M., OLIVEIRA, I.H.T. Blueberry: Functional Traits and Obtention of Bioactive Compounds. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, n.18. p. 2633-2645. 2014.

CRUZ, A. C. da., MEIRELES, C. da S., RIBEIRO, S. D., RODRIGUES FILHO, G., ASSUNÇÃO, R. M. N. de, CERQUEIRA, D. A. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, v.34, n.3, p. 385–389. 2011.

FERREIRA, A. R. V.; ALVES, V. D.; COELHO, I. M. **Polysaccharide-based membranes in food packaging applications**. **Membranes**, v.22, n.6, 2016.

FERREIRA, M.P.F. **Embalagens ativas para alimentos: Caracterização e propriedades**. 2012. 138f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FILHO, C.L., MARTINS, M.M., ALVES, V. Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional. **Compounds for Food Products. Applied Sciences**, v.9 n.3, p.12-18. 2019.

FONSECA, L. M. OLIVEIRA, J. P.; OLIVEIRA, P. D.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G.; LIM, L. T. Electrospinning of native and anionic corn starch fibers with different amylose contents. **Food Research International**, v. 116, p. 1318–1326, 2019b.

FONSECA, L. M.; OLIVEIRA, J. P.; CRIZEL, R. L.; SILVA, F. T.; ZAVAREZE, E. R.; BORGES, C. D. Electrospun Starch Fibers Loaded with Pinhão (*Araucaria angustifolia*) Coat Extract Rich in Phenolic Compounds. **Food Biophysics**, 2020.

FONSECA, L. M.; SOUZA, E. J. D.; RADÜNZ, M.; GANDRA, E. A.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Suitability of starch/carvacrol nanofibers as biopreservatives for minimizing the fungal spoilage of bread. **Carbohydrate Polymers**, v.252, p.117166, 2021.

FREITAS, V. O mundo colorido das antocianinas. **Revista Ciência elementar**, v.7, n.2, p.1-6, 2019.

GASTI, T., DIXIT, S., HIREMANI, V.D., CHOUGALE, R.B., MASTI, S.P., VOOTLA, S.K., MUDIGOUDRA, B.S. Chitosan/pullulan based films incorporated with clove essential oil loaded chitosan-ZnO hybrid nanoparticles for active food packaging. **Carbohydrate Polymers**, v.277, p.118866, 2022.

GHAANI, M. et al. An overview of the intelligent packaging Technologies in the food sector. **Trends in Food Science & Technology**, v.51, p. 1-11, 2016.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of *electrospinning* as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GÖNEN, S. Ö.; TAYGUN, M. E.; KÜÇÜKBAYRAK, S. Evaluation of the factors influencing the resultant diameter of the electrospun gelatin/sodium alginate nanofibers

via Box-Behnken design. **Materials Science and Engineering**, v. 58, p. 709–723, 2016.

GONZÁLEZ, A.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 777– 784, 2015.

HAVANDA, T. LUENGWILAI, K. Variation in floral antioxidant activities and phytochemical properties among butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v, 66, n. 4. p. 645-658. 2019.

HE, X.; HWANG, H.-M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, p. 1–10, 2016.

HONGYAN, L., ZEYUAN, D., HONGUI, Z., CHANLI, H., RONGHUA, L., YOUNG, C.J., RONG T. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food Research International**, v.46, n.1, p. 250-259, 2012.

ISLAM, S., SHAHID, M., MOHAMMED, F. Perspectives for Natural Products Based Agents Derived from Industrial Plants in Textile Applications—A Review. **Journal of Cleaner Production**, v.57, 2-18, 2013.

KAVITHA, R. Biochemical studies on the effect of ethanolic extracts of *Trichosanthes dioica* and *Clitoria ternatea* in streptozotocin induced male Wistar rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.9, n.11, p.4682–4689, 2018.

KHOO, H. E., AZLAN, A., TANG, S. T., LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food and nutrition research**, v.61, n.1, p 2-21. 2017.

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Fabrication of pure starch fibers by *electrospinning*. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 20–25, 2014.

KONG, L.; ZIEGLER, G. R. Role of molecular entanglements in starch fiber formation by *electrospinning*. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2247–2253, 2012.

KRITHIGA, N., RAJALAKSHMI, A., JAYACHITRA, A. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of clitoria ternatea and solanum nigrum and study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. **Journal of Nanoscience**, v. 2015, p.1- 8. 2015.

MA, Q., WANG, L. Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.235, p.401- 407, 2016.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. DE F.; BRUNO, L. M. Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos. **Documento técnico/ Embrapa Agroindústria Tropical**, v. ISSN 2179, n. 145, p. 32, 2011.

MACIEL, V.B., FRANCO, T., YOSHIDA, C.M.P. Alternative intelligent material for packaging using chitosan films as colorimetric temperature indicators. **Polymers**, v. 22, p. 318–324. 2012.

MAHDAVI, A.S., JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural antocyanins with maltodextrin, goma arábica e gelatina. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.85, p.379–385. 2016.

MENSITIERI, G. et al. Processing and shelf-life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.72- 80, 2011.

MOHEBI, E., MARQUEZ, L. Intelligent packaging in meat industry: An overview of existing solutions. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.7. p. 3947-3964, 2015.

NEVES, M.C., CELLET, T.S.P., ROMERO, A.L., ROMERO, R.B. Desenvolvimento de nano e micropartículas de acetato de celulose para sistemas de liberação controlada de anti-inflamatórios não esteróides. **Colloquium Exactarum**, v. 9, n.4, p.15–24, 2017.

NISTA, Silvia Vaz Guerra. **Desenvolvimento e caracterização de nanofibras de acetato de celulose para liberação controlada de fármacos**. 2012. 127f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2012.

OGUIS, G. K., GILDING, E.K., JACKSON, M.A., CRAIK, D.J. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide -bearing plant with applications in agriculture and medicine **Frontiers in Plant Science**, v.10, n.365. p-1-23. 2019.

PASUKAMONSET, P., KNOW, O., ADISAKWATTANA, S. Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v.61, p.772-779, 2016.

PEREIRA, Pamela Freire de Moura. **Desenvolvimento de filmes à base de biopolímeros para aplicação como embalagens inteligentes**. 2017. 72f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Rio de Janeiro, 2017.

PEREIRA, S.M.C., TEIXEIRA, J. A., PEREIRA, V.A.J. STEFANI, R. Filmes de mistura de quitosana / amido de milho com extrato de *Brassica oleraceae* (repolho roxo) como um indicador visual da deterioração dos peixes. **LWT - Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 61, p. 258 – 262. 2015.

PITAKSUTTEEPONG, T. Nanotechnology: Effective topical delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 16–17, 2016.

PRABHU, S., THANGADURAI, T.D., INDUMATHI, T., KALUGASALAM, P. Enhanced visible light induced dye degradation and antibacterial activities of ZnO/NiO nanocomposite synthesized using *Clitoria ternatea* flower extract. **Inorganic Chemistry Communications**, v.146, p.110077, 2022.

PRIETTO, L., MIRAPALHETE, T.C., PINTO, V.Z., HOFFMANN, J F., VANIER, N.L., LIM, L., DIAS, A.R.G., ZAVAREZE, E.R. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT- Food science and technology**, v.80, p.492-500. 2017.

REALINI, C.E., MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern Society. **Meat Science**, v.98, p.404-415, 2014.

RIBEIRO, S. D., GUIMES, R.F., MENEGUIN, A.B., PREZOTTI, F.G, BONI, F.I., FERREIRA, B.S., DAFLON, M.P. Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*. **Oxford:Elsevier Science**, v. 152, p. 764-774. 2016.

ROY, S., RHIM, J.W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.61, n.14, p. 2297-2325, 2021.

RUKCHON, C., NOPWINYUWONG, A. TREVANICH, S., JINKARN, T., SUPPAKUL, P. Development of food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, v.130, p.547-554, 2014.

SABINO, B.S., FILHO, E.G.A., FERNANDES, F.A.N., BRITO, E.S., SILVA, I.J.J. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 77-89. 2021.

SADEGH-HASSANI, F.; MOHAMMADI NAFCHI, A. Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 67, p. 458–462, 2014.

SAIDI, T.; ZEISS, R. Investigating promises of nanotechnology for development: A case study of the travelling of smart nano water filter in Zimbabwe. **Technology in Society**, v. 46, p. 40–48, 2016.

SANTOS, A.C.A., MARQUES, M.M.P., SOARES, A.K.O., FARIAS, L.M., FERREIRA, A.K.A., CARVALHO, M.L. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. *R. Interd*, v. 7, n.3, p.149-156, 2014.

SHARMA, P., GUPTA, R., ROSHAN, S., SAHU, S., SHUKLA., GARG, A. Plant extract as a acid base indicators. **Inventi Impact: Planta Activa**, v.3, p.3-5, 2013.

SILVA-PEREIRA, M.P.; TEIXEIRA, J.A.; PEREIRA-JÚNIOR, V.A.; STEFANI, R. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, p. 258- 262. 2015.

SINGH, N.K., GARABADU, D., SHARMA, P., SHRIVASTAVA, S.K., MISHRA, P. Anti-allergy and anti-tussive activity of Clitoria ternatea L. in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.224, p.15–26, 2018.

SINGH, S., NWABOR, O.F., SYUKRI, D.M., VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Chitosan-poly(vinyl alcohol) intelligent films fortified with anthocyanins isolated from *Clitoria ternatea* and *Carissa carandas* for monitoring beverage freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.182, p.1015-1025, 2021.

SOUTO, E. B., SEVERINO, P. SANTANA, M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **SciELO**, v. 22, n.1, p. 96-100. 2012.

SUNG, S.Y., SIN, L.T., TEE, T.T., BEE, S.T., RAHMAT, A.R., RAHMAN, W.A., TAN, A.C., VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.33, n.2, p.110-123, 2013.

SYAHIRAH, L., LUTFI, M.Y., ATIKA, A., HAFIZ, R., ZULHELMI, O.A.,ADZHAN, O., KHOR, P.Y.,. A comparative analysis of clitoria ternatea linn. (Butterfly pea) flower extract as natural liquid pH indicator and natural pH paper. **Dhaka Univ. J. Pharm. Sci**, v. 17, n. 1. P. 97–103. 2018.

TAN, A.; CHAWLA, R.; MAHDIBEIRAGHDAR, N. G, S.; JEYARAJ, R.; RAJADAS, J.; HAMBLIN, M. R.; SEIFALIAN, A. M. Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: The next frontier. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery** : JPRAS, v. 69, p. 1–13, 2016.

TAUR, D. J., PATIL, R. Y. Evaluation of antiasthmatic activity of Clitoria ternatea L. roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, n.2, p.374–376, 2011.

THERANI, A. H.; ZADHOUSH, A.; KARBASI, S.; KHORASANI, S. N. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of poly(3 hydroxybutyrate) scaffolds: structural characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, v.18. n.5, p. 2682-2689, 2010.

VANDERROOST, M. et al. Intelligent packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, v.39, p. 47-62, 2014.

WADHWA, G.; KUMAR, S.; CHHABRA, L.; MAHANT, S.; RAO, R. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, n. 1–2, p. 39–58, 2017.

WEN, P.; WEN, Y.; ZONG, M. H.; LINHARDT, R. J.; WU, H. Encapsulation of bioactive compound in electrospun fibers and its potential application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 42, p. 9161–9179, 2017.

WEN, P.; ZHU, D.-H.; FENG, K.; LIU, F.-J.; LOU, W.-Y.; LI, N.; ZONG, M.-H.; WU, H. Fabrication of electrospun polylactic acid nanofilm incorporating cinnamon essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex for antimicrobial packaging. **Food chemistry**, v. 196, p. 996–1004, 2016b.

WONGSASULAK, S., PATEPEEJUMRUSWONG, M., WEISS, J., SUPAPHOL, P., YOOVIDHYA, T. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. **Journal of food engineering**, v.98, n.3. p.371-376, 2010.

YAN, J., YU, D.G. Smoothening electrospinning and obtaining high-quality cellulose acetate nanofibers using a modified coaxial process. **Springer**, v.47, p.7138-7147. 2012.

YIN, W., QIU, C., JI, H., LI, X., SANG, S., MCCLEMENTS, D.J., JIAO, A., WANG, J., JIN, Z. Recent advances in biomolecule-based films and coatings for active and smart food packaging applications. **Food Bioscience**, v. 52, p.102378, 2023.