AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Compostos bioativos em flores comestíveis processadas por radiação

Amanda Cristina Ramos Koike

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

**Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis
Villavicencio**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Compostos bioativos em flores comestíveis processadas por radiação

Amanda Cristina Ramos Koike

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

**Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis
Villavicencio**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

*Aos meus pais Auda (in memoriam) e
Edison e ao meu marido Sergio Akira por
todo amor, dedicação e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio pela confiança sobre tudo pela gentileza e presteza com que me orientou.

À Prof^a. Dra. Isabel Cristina F. R. Ferreira por ter me recebido junto a equipe do “*BioChemcore*” do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal, por ter contribuído enormemente para a realização deste trabalho e pelo carinho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN pela oportunidade de realização profissional e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Bragança - Portugal pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo de pesquisa em polifenóis da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca - Espanha, em especial ao Prof. Dr. Celestino Santos-Buelga.

Agradeço a Dra. Lillian Barros e o Dr. João Barreira por compartilhar todo o conhecimento, tempo e pelo carinho.

Ao Dr. Amílcar L. Antonio e Dr. Ricardo Calhella pelo apoio e esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos brasileiros Dr. Flávio Thihara, Me. Rafael Gonçalves, Tayana Candido, Stella Cardoso, Dra. Renata Souza Leão, Dra. Márcia Ribeiro, M^a Érica Gauglitz, M^a Luana Andrade, Mara Munhoz, Me. Fernando Kondo, Dr. Gustavo Fanaro, Dr. Renato Duarte, Dra. Patricia Takinami, M^a Rejane Daniela e Dr. Marcelo Bardi meu obrigada pela amizade e carinho, assim como pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Estou mais agradecida do que sou capaz de dizer.

Meu muito obrigada aos amigos portugueses Me. Márcio Caroch, M^a Eliana Pereira, M^a Ângela Fernandes, M^a Carla Pereira, Me. José Pinela, M^a Cristina Caleja, Dra. Sandrina Heleno, Me. Custódio Roriz, M^a Andreia Tomas,

M^a Melissa Lopes e M^a Inês Dias pelo carinho, amizade e pela valorosa contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Severino Matias da Esalq/USP pela colaboração tanto na disponibilização dos laboratórios como na contribuição para elaboração deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Machado Pinto e Silvada FSP/USP pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN pela bolsa de doutorado concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari Ribeiro e Carlos Gaia da Silveira, do Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN pela gentileza e auxílio no processamento de amostras.

Aos secretários Marcos Cardoso e Claudia do Centro de Tecnologia da Radiação - IPEN pelo auxílio no departamento administrativo.

A Divisão de Ensino do IPEN pela disponibilidade e auxílio.

A minha família pelo constante incentivo e apoio.

Ao meu marido Sergio Akira Koike pela dedicação e incentivo.

A todos que não foram citados, porém, diretamente ou indiretamente, colaboraram para realização desse trabalho.

*"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre".*

Paulo Freire

“COMPOSTOS BIOATIVOS EM FLORES COMESTÍVEIS PROCESSADAS POR RADIAÇÃO”

Amanda Cristina Ramos Koike

RESUMO

Flores comestíveis são cada vez mais utilizadas nas preparações culinárias, sendo também reconhecidas por seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana, o que exige novas abordagens para melhorar a sua conservação e segurança. Estes produtos altamente perecíveis devem ser cultivados sem o uso de agrotóxicos. Tratamento de irradiação pode ser a resposta a estes problemas, garantindo a qualidade dos alimentos, aumentando seu prazo de validade e desinfestação. *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) e *Viola tricolor* L. (amor-perfeito) são flores amplamente utilizadas nas preparações culinárias, sendo também reconhecidas por suas propriedades antioxidantes e alto teor de compostos fenólicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dose-resposta da irradiação por gama e feixe de elétron (doses de 0, 0,5, 0,8 e 1 kGy) sobre a atividade antioxidante, compostos fenólicos, aspectos físicos e potencial antiproliferativo das flores comestíveis. O flavonoide Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo foi o composto mais abundante em todas as amostras de flores de *Tropaeolum majus*, enquanto Pelargonidina-3-O-soporosídeo foi a principal antocianina. Em geral, as amostras irradiadas demonstraram maior atividade antioxidante. Nas amostras da *Viola tricolor*, os compostos fenólicos mais abundantes foram os flavonóis, especialmente aqueles derivados da quercetina. Em geral, as amostras irradiadas com raios gama, independentemente da dose aplicada, apresentaram quantidades mais elevadas de compostos fenólicos, os quais também foram favorecidos pela dose de 1,0 kGy independente da fonte utilizada. A atividade antioxidante também foi maior entre as amostras irradiadas.

As duas espécies de flores comestíveis não apresentaram as amostras não apresentaram potencial antiproliferativo e citotoxicidade. Assim, os tratamentos por irradiação aplicados, demonstraram ser uma tecnologia viável para preservar a qualidade de pétalas de flores comestíveis, considerando as exigências impostas para sua utilização.

BIOACTIVE COMPOUNDS IN EDIBLE FLOWERS PROCESSED BY RADIATION"

Amanda Cristina Ramos Koike

ABSTRACT

Edible flowers are increasingly being used in culinary preparations, being also recognized for their potential valuable effects in human health, which require new approaches to improve their conservation and safety. These highly perishable products should be grown without using any pesticide. Irradiation treatment might be the answer to these problems, ensuring food quality, increasing shelf-life and disinfection of foods. Irradiation treatment might be the answer to these problems, to ensure food quality, to increase shelf-life and disinfection of foods. *Tropaeolum majus* L. (nasturtium) and *Viola tricolor* L. (johnny-jump-up) flowers are widely used in culinary preparations, being also acknowledged for their antioxidant properties and high content of phenolics. The purpose of this study was to evaluate the dose-dependent effects of gamma and electron beam irradiation (doses of 0, 0.5, 0.8 and 1 kGy) on the antioxidant activity, phenolic compounds, physical aspects and antiproliferative potential of edible flowers. Kaempferol-O-hexoside-O-hexoside was the most abundant compound in all samples of *Tropaeolum majus* flower while pelargonidin-3-O-sophoroside was the major anthocyanin. In general, irradiated samples gave higher antioxidant activity, probably due to their higher amounts of phenolic compounds, which were also favored by the 1.0 kGy dose, regardless of the source. The *Viola tricolor* samples

displayed flavonols as the most abundant phenolic compounds, particularly those derived from quercetin. In general, gamma-irradiated samples, independently of the applied dose, showed higher amounts in phenolic compounds, which were also favored by the 1.0 kGy dose, regardless of the source. The antioxidant activity was also higher among irradiated samples. The two species of edible flowers have not provided the samples did not show potential antiproliferative and cytotoxicity. Accordingly, the applied irradiation treatments seemed to represent a feasible technology to preserve the quality of edible flower petals, considering the requirements imposed by their increasing uses.

.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Flores comestíveis	19
3.1.1 Caracterização botânica	25
3.1.1.1 <i>Tropaeolum majus</i> (L.)	25
3.1.1.2 <i>Viola tricolor</i> (L.)	26
3.2 Atividade antioxidante	28
3.2.1 Estresse oxidativo	28
3.2.2 Antioxidante	29
3.3 Compostos bioativos	31
3.3.1 Compostos fenólicos	31
3.3.2 Flavonoides	34
3.3.3 Antocianinas	36
3.3.4 Carotenoides	38
3.4 Métodos da avaliação de atividade antioxidante	41
3.4.1 Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH (IC 50 %)	41
3.4.2 Ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno	41
3.4.3 Ensaio do Poder redutor	42
3.4.4 Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC	44
3.4.5 Ensaio da determinação de teor de fenólicos	44
3.5 Sensações humanas	44
3.6 Processamento por radiação de alimentos e flores	45
3.6.1 Breve histórico da legislação para irradiação de alimentos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Reagentes e Padrões	51
4.2 Amostras	52
4.3 Fontes de irradiação das amostras	52
4.3.1 Radiação gama	53
4.3.2 Acelerador de elétrons	53
4.4 Análise de tolerância ao processo de irradiação	53
4.5 Procedimento de extração de flores comestíveis	54
4.6 Métodos da atividade antioxidante	54
4.6.1. Atividade captadora de radicais DPPH (IC 50 %)	55
4.6.2 Inibição da descoloração do β -caroteno	56
4.6.3 Poder redutor	56
4.6.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC	57

4.6.5 Determinação de teor de fenólicos	58
4.7 Identificação de compostos fenólicos e antocianinas por técnicas cromatográficas	58
4.7.1. Compostos fenólicos	59
4.7.2 Antocianinas	60
4.8 Avaliação do potencial antiproliferativos	62
4.9 Avaliação de citotoxicidade	64
4.10 Análises colorimétrica	65
4.11 Análise estatística	66
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	67
5.1 Análise de tolerância ao processo de irradiação	67
5.2 Métodos da atividade antioxidante	68
5.2.1 Ensaio com extratos de <i>Viola tricolor</i>	68
5.2.2 Ensaio com extratos de <i>Tropaeolum majus</i>	73
5.3 Identificação de compostos fenólicos e antocianinas por técnicas cromatográficas	79
5.3.1. Compostos fenólicos e antocianinas	79
5.3.1.1 Ensaio com extratos de <i>Tropaeolum majus</i>	79
5.3.1.2 Ensaio com extratos de <i>Viola tricolor</i>	90
5.4 Avaliação do potencial antiproliferativo	100
5.4.1 Ensaio com extratos de <i>Tropaeolum majus</i>	100
5.4.2 Ensaio com extratos de <i>Viola tricolor</i>	101
5.5 Análise Colorimétrica	104
5.5.1 Ensaio de <i>Tropaeolum majus</i>	104
5.5.2 Ensaio de <i>Viola tricolor</i>	106
6 CONCLUSÃO	108
7 TRABALHOS FUTUROS	109
REFERÊNCIAS	110

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Estufas de flores de comestíveis	20
FIGURA 2 - Preparações gastronômicas com flores de comestíveis	21
FIGURA 3 - Flores comestíveis	22
FIGURA 4 - Morfologia da estrutura floral	24
FIGURA 5 - <i>Tropaeolum majus</i> (L.)	25
FIGURA 6 - <i>Viola tricolor</i> (L.)	27
FIGURA 7 - Diagrama das principais causas para a produção de radicais livres, potenciais alvos celulares e consequências do estresse oxidativo.	29
FIGURA 8 - Ácidos fenólicos	32
FIGURA 9 - Classes de flavonoides	33
FIGURA 10 - Estrutura básica das antocianinas	36
FIGURA 11 - Estrutura do licopeno	39
FIGURA 12 - Estrutura dos principais carotenoides encontrados em alimentos	40
FIGURA 13 - Representação esquemática da redução do DPPH	42
FIGURA 14 - Reações do ensaio de Inibição da descoloração do β -caroteno	43
FIGURA 15 - Reações do ensaio Poder redutor	43
FIGURA 16 - Radura: Símbolo internacional para alimentos irradiados	48
FIGURA 17 - <i>T. majus</i> (A); <i>V. tricolor</i> (B)	52
FIGURA 18 - Pétalas de <i>T. majus</i> (A); pétalas de <i>V. tricolor</i> (B)	65
FIGURA 19 - Colorímetro Chroma Meter modelo CR-400	66
FIGURA 20 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>V. tricolor</i> irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação	68
FIGURA 21 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>V. tricolor</i> irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação	69
FIGURA 22 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>V. tricolor</i> irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação.	70
FIGURA 23 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>V. tricolor</i> irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação	71
FIGURA 24 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>T. majus</i> irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação	74
FIGURA 25 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>T. majus</i> irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação	75
FIGURA 26 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>T. Majus</i> irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação	76
FIGURA 27 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de <i>T. majus</i> irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação	77
FIGURA 28 - Cromatograma HPLC de compostos fenólicos de amostras não irradiadas (controle) de flores de <i>T. majus</i> registrado a 280 nm (A) e 370 nm (B). 1: Ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico; 3: Ácido 5-O-cafeoilquínico; 4: Miricetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo; 5: Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico, 6: Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico, 7: Quercetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo; 8: Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo. rutinosídeo	82
FIGURA 29 - Cromatograma HPLC de antocininas de amostras não irradiadas (controle) de flores de <i>T. majus</i> registardo a 520 nm: 1: Delpinidina-O-dihexosídeo; 2: Cianidina-O-dihexosídeo; 3: Pelargonidina-3-O-soporosídeo	83

FIGURA 30 - Cromatograma HPLC de compostos fenólicos de amostras não irradiadas (controle) de flores de <i>V. tricolor</i> registrado a 370 nm: 1: Isoramnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo; 2: Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnósídeo; 3: Isoramnetina-3-O-(6-O-ramosil-galactosídeo); 4: Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucoídeo)-7-O-ramnosídeo; 5: Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo, 6: Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo, 7: Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo); 8: Quercetina-3-O-rutinosídeo; 9: Kaempferol-3-O-rutinosídeo; 10: Isoramenetina -3- O-rutinosídeo.	93
FIGURA 31 - Cromatograma HPLC de antocininas de amostras não irradiadas (controle) de flores de <i>V. tricolor</i> registrada a 370 nm (A). 11: Cianidina-3-O-rutinosídeo;12: Delphinidina-3-O-rutinosídeo; 13: Delphinidina-3-(4"- <i>p</i> -cumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo; 14. Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo	94
FIGURA 32 - Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de <i>T. majus</i> processados por ^{60}CO , expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	101
FIGURA 33 - Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de <i>T. majus</i> processados por acelerador de elétrons, expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	102
FIGURA 34 - Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de <i>V. tricolor</i> processados por ^{60}CO , expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	103
FIGURA 35 - Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de <i>V. tricolor</i> processados por acelerador de elétrons, expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	103
FIGURA 36- Representação gráfica da análise de pétalas de <i>T.majus</i> processadas por ^{60}CO	105
FIGURA 37- Representação gráfica da análise de pétalas de <i>T.majus</i> processadas por aceleradores de elétrons	105
FIGURA 38 - Representação gráfica da análise de pétalas de <i>V. tricolor</i> processadas por ^{60}CO	106
FIGURA 39 - Representação gráfica da análise de pétalas de <i>V. tricolor</i> processadas por aceleradores de elétrons	107

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Atividade antioxidante expressa em valores de EC ₅₀ de amostras de <i>V. tricolor</i> de acordo com a fonte de radiação	72
TABELA 2- Atividade antioxidante expressa em valores de EC ₅₀ de amostras de <i>T.majus</i> irradiadas de acordo com a fonte de radiação.	78
TABELA 3 - Tempo de retenção (R _t), comprimentos de onda de absorção máxima, (λ_{max}), dados dos espectros e massa e identificação de compostos fenólicos em extrato de <i>T.majus</i> .	80
TABELA 4 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>T. majus</i> processada por 60 Co, de acordo com a dose de radiação.	86
TABELA 5 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>T.majus</i> processada por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação.	87
TABELA 6. - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>T.majus</i> de acordo com a fonte de radiação	89
TABELA 7 - Tempo de retenção (R _t), comprimentos de onda de absorção máxima, (λ_{max}), dados dos espectros de massa e tentativa de identificação de compostos fenólicos em extrato de <i>V. tricolor</i> .	91
TABELA 8- Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>V. tricolor</i> processada por ⁶⁰ Co de acordo com a dose de radiação.	97
TABELA 9 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>V. tricolor</i> processada por aceleradores de elétrons de acordo com a dose de radiação.	98
TABELA 10 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores <i>V. tricolor</i> de acordo com a fonte de radiação	99

1 INTRODUÇÃO

O mercado de flores comestíveis está em expansão no Brasil e no mundo, devido a crescente tendência da utilização de flores na gastronomia, gerando aumento de variedades e crescimento econômico.

As flores comestíveis são utilizadas em preparações culinárias com a finalidade de adicionar beleza, aroma, cor e sabor por centenas de anos. Em diversos lugares do mundo, usá-las como alimento é uma antiga tradição. Atualmente, esse tipo de aplicação na culinária tem como objetivo melhorar a qualidade sensorial, entretanto diversas espécies possuem substâncias biologicamente ativas, as quais desempenham importante papel na manutenção da saúde (Creasy, 1999; Mlcek & Rop, 2011; Anderson et al., 2012).

Observa-se, cada vez mais, flores em refeições como ingredientes em saladas, pratos quentes, bebidas e sobremesas. O foco principal é a alta gastronomia, atraindo a atenção de *gourmets* e *chefs*, desfrutando de espaço garantido em restaurantes sofisticados e *buffets*, tratando-se de um nicho de alto padrão no mercado nacional e internacional.

São altamente perecíveis e devem estar livres de insetos, o que representa um desafio, pois são normalmente cultivadas sem o uso de agrotóxicos. Sua alta perecibilidade requer armazenamento em pequenas embalagens plásticas, em ambientes refrigerados, o que representa um custo adicional na cadeia comercial. Vários métodos são aplicados pela indústria de alimentos para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios, assim como garantir a sua qualidade e segurança (Kelley et al., 2003; Newman & O'Conner, 2009; Farkas & Mohácsi-Farkas, 2011).

Tratamentos capazes de aumentar a vida útil e garantir a segurança desses produtos poderiam constituir alternativas para minimizar tais problemas (Rop et al., 2012).

Dentre os tratamentos o processo de irradiação de alimentos tem demonstrando ser uma ferramenta eficaz na preservação e extensão da vida útil de produtos perecíveis, assim como melhorar a qualidade higiênica, promover desinfestação de insetos e segurança alimentar. Além disso, pode ser considerado também, eficiente em relação aos tratamentos químicos usados atualmente no processamento de alimentos por não gerar resíduos, podendo ser utilizado em uma grande variedade de alimentos (Farkas, 2006; Farkas & Mohácsi-Farkas, 2011).

Esse processo consiste na exposição do alimento às radiações ionizantes (isótopos de ^{60}Co ou elétrons acelerados). Este processo é utilizado em vários países, e sua eficiência e segurança tem recebido aprovação por diversas autoridades, como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), União Europeia (UE), Agência Americana para os Alimentos e Medicamentos (FDA), e o *Codex Alimentarius* (Morehouse, 2002; Farkas, 2006; Komolprasert, 2007).

Os feixes de elétrons gerados por aceleradores, nesse processo, têm taxas de dose superiores aos raios gama, desta maneira proporciona maior eficácia e maior rendimento, pois necessitam de um tempo menor de exposição. A aplicação de medidas de baixo custo e sem produção de resíduos nucleares, é viável, porém o poder de penetração em extensão dos feixes de elétrons é limitado, enquanto que os raios gama tem maior poder de penetrabilidade (Gomes et al., 2008; Wei et al., 2014).

As espécies de flores comestíveis *Viola tricolor* L. (amor-perfeito) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) são algumas das pioneiras da “moda” das flores na culinária e estão entre as mais populares.

As flores de amor perfeito são pequenas e delicadas e possuem sabor refrescante e textura aveludada, o que permite sua aplicação desde sobremesas a pratos quentes. Além de utilizadas como alimento, apresentam também aplicação medicinal. Dentre suas atividades biológicas, destaca-se sua propriedade antioxidante, a qual é atribuída à presença de compostos flavonoides, sendo o principal composto encontrado a violantina (Vukics et al., 2008a; Vukics et al., 2008b; Mlcek & Rop, 2011; Piana et al., 2013; Hellinger et al., 2014).

Em relação às flores das capuchinhas, estas têm forte sabor picante e são ótimas em saladas, molhos, pratos grelhados e preparações recheadas. Propriedade antioxidante e antocianinas em suas pétalas foram previamente relatadas em estudos anteriores, tendo sido encontradas as antocianinas pelargonidina, cianidina e delfinidina (Garzón & Wrolstad, 2009; Rop et al., 2012; Bazylko et al., 2013; Bazylko et al., 2014).

Não há relatos na literatura sobre os efeitos da irradiação sobre a atividade antioxidante e compostos fenólicos presentes nas flores comestíveis.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estudar os compostos bioativos das flores comestíveis *T. majus* L. e *V. tricolor* L processadas por radiação em diferentes doses.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar e identificar compostos bioativos;
- Avaliar sua bioatividade;
- Análise colorimétrica;
- Estudo do potencial proliferativo;
- Comparação das técnicas de irradiação (aceleradores de elétrons e ^{60}Co).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Flores Comestíveis

Atualmente, no mercado, há uma grande demanda pelos produtos derivados de plantas, tais como chá verde, decocção de ervas e flores e a formulação de medicamentos. Nestes produtos podemos encontrar partes aéreas da planta, sementes, frutas, raízes e flores usadas em diversas aplicações comerciais, como chá, preparações gastronômicas, extratos e óleos essenciais (Voon et al., 2012).

As flores comestíveis são amplamente exploradas pela indústria de alimentos, no desenvolvimento de chás florais, corantes alimentícios, aromas, bebidas, produtos de panificação ou pela comercialização *in natura* no varejo. As flores são utilizadas em preparações gastronômicas e, sua comercialização é realizada em embalagem de polietileno. Estão cada vez mais populares, evidenciadas pelo aumento de livros de receitas, artigos de revistas e sites sobre o tema, ultrapassando o conhecimento científico relacionado ao seu potencial nutricional (Kelley et al., 2003; Rop et al., 2012; Voon et al., 2012).

Há evidências históricas da aplicação de flores na alimentação pelos romanos, chineses e povos do Médio Oriente. As flores de laranjeiras e roseiras são muito utilizadas desde a antiguidade no Médio e Extremo Oriente (Ortiz, 1992). Já as flores de *courgette* recheadas são apreciadas como entrada na região mediterrânica há muito tempo (Newman & O'Conner, 2009; Rop et al., 2012).

De acordo com Ortiz (1992) o uso de águas florais na gastronomia é datado da Idade Média, sendo à flor de laranjeira e a de rosa as mais utilizadas. Atualmente, as águas florais são usadas na gastronomia do Oriente Médio, Índia

e do Leste Europeu, onde as preparações culinárias normalmente são aromatizadas (Rop et al., 2012).

No século XVII, as flores comestíveis começaram a desempenhar um papel importante na culinária, sendo utilizadas na forma cristalizada para decoração, em compotas, geleias, licores e outros produtos. Por exemplo, o clássico licor verde *Chartreuse*, de origem francesa, utiliza como ingrediente pétalas de cravo (Felippe, 2004).

As flores utilizadas na alimentação não são as mesmas adquiridas em floristas, *garden centers* ou viveiros. O cultivo das flores comestíveis é realizado por produtores especializados e confiáveis, que respeitem os processos de identificação correta das flores, pois algumas são tóxicas ou venenosas e não devem ser utilizadas na alimentação humana, como no caso a azaleia, lírio, copo-de-leite, violeta-africana (Kelley, 2002; Felippe, 2004; Newman & O'Conner, 2009).

FIGURA 1 - Estufas de flores de comestíveis

Fonte: Adaptada de Ervas Finas Horticultura, 2014. (Disponível em: <http://ervasfinasnet.com.br/pt>)

O cultivo de flores comestíveis é realizado em ambiente protegido (FIG. 1), com água e luz controlada, sem o uso de pesticidas, sendo colhidas totalmente abertas durante o dia após o orvalho. Não se utiliza agrotóxicos, apenas produtos naturais para o controle de pragas. Deve-se ressaltar a necessidade de maior

rigor fitossanitário e de manejo em comparação ao cultivo de flores ornamentais (Creasy, 1999; Gegner, 2004).

As flores são utilizadas na culinária para melhorar os atributos sensoriais das preparações gastronômicas (FIG.2), tais como cor, aroma e sabor. Geralmente, as espécies comestíveis são utilizadas na preparação de molhos, guarnições, saladas, produtos de panificação, geleias, xarope, mel, vinagre, azeite, chás, açúcares de flores, flores cristalizadas, flores congeladas em cubos de gelo, adicionadas a queijos, panquecas, crepes e *waffles*. Contudo, algumas são incorporadas em vinhos e licores aromatizados, sendo que as espécies maiores, como a de abóbora, podem ainda ser recheadas e fritas (Ortiz, 1992; Creasy, 1999; Felipe, 2004; Rop et al., 2012).

FIGURA 2 - Preparações gastronômicas com flores de comestíveis
Fonte: Adaptada de Creasy, 1999

A adição de flores nas preparações culinárias como a capuchinha, roseira, jasmim, laranjeira e alfazema podem transmitir um delicado aroma a geleias, licores, compotas, sorvetes, infusões, cremes e vinhos, enquanto outras, como o gerânio e crisântemo proporcionam cor aos pratos estimulando o paladar, uma vez que são pobres em aroma (Ortiz, 1992).

Cerca de 100 espécies são identificadas como comestíveis, entre elas: a *Viola tricolor* (amor perfeito); *Borago officinalis* (boragem); *Calendula officinalis* (calêndula); *Tropaeolum majus* (capuchinha); *Impatiens wallerana* (beijo turco); *Rosemary officinalis* (alecrim); *Hibiscus rosa-sinensis* (hibisco); *Alcea rósea* (malva-rosa); *Lavandula angustifolia* (alfazema); *Pelargonium hortorum* (gerânio)

e *Dianthus chinensis* (cravina) (Creasy, 1999; Felipe, 2004; Gegner, 2004; Jauron & Naeve, 2013).

FIGURA 3 - Flores comestíveis
Fonte: Autora da tese

QUADRO 1 - Cor e sabor das flores comestíveis

Nome científico	Nome comum	Cor	Sabor
<i>Alcea rosea</i>	malva-rosa	diversas	suave
<i>Borago officinalis</i>	borago	Azul	ervas
<i>Calendula officinalis</i>	calêndula	laranja e amarelo	levemente azedo
<i>Centaurea cyanus</i>	marianinha	azul ao violeta	suave
<i>Chrysanthemum</i> spp.	crisântemo	branco ao vermelho	amargo
<i>Dianthus</i> spp.	cravina	bicólores	levemente amargo
<i>Hemerocallis</i>	lírio - amarelo	diversas	adocicado
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	hibisco	diversas	levemente cítrico
<i>Lavandula angustifolia</i>	alfazema	azul e roxo	doce
<i>Monarda didyma</i>	bergamota	diversas	doce
<i>Pelargonium hortorum</i>	gerânio	branco ao carmim escuro	variado
<i>Rosa</i> spp.	rosa	diversas	doce
<i>Rosmarinus officinalis</i>	alecrim	Azul	doce
<i>Syringa vulgaris</i>	lilás	violeta e branca	adocicado
<i>Tropaeolum majus</i>	capuchinha	amarelo ao vermelho	apimentado
<i>Tulipa</i> spp.	tulipa	diversas	doce
<i>Viola tricolor</i>	amor-perfeito	azul ao branco	adocicado

Fonte: Adaptado de Anderson, 2009; Mlcek & Rop, 2011

As flores comestíveis têm na sua constituição proteínas, lipídio, amido, vitamina A, B, C e E, e muitos minerais importantes para uma alimentação saudável (Gerner, 2004; Newman & O'Conner, 2009).

A flor pode ser dividida em pólen, néctar e pétalas e restantes partes (FIG.4). O pólen é uma fonte rica de proteínas, aminoácidos, carboidratos, flavonoides, carotenoides, lipídios saturados e insaturados, geralmente possui pouco sabor ou sabor ligeiramente desagradável, com algumas exceções (Mlcek & Rop, 2011).

O néctar é um líquido adocicado que contém uma mistura equilibrada de açúcares (glucose, frutose e sacarose), aminoácidos (prolina), proteínas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, alcaloides e terpenoide (Mlcek & Rop, 2011).

Nas pétalas e partes restantes encontram-se compostos antioxidantes, vitaminas, minerais, entre outros (Nicolson et al., 2007, Mlcek & Rop, 2011).

FIGURA 4 - Morfologia da estrutura floral

Fonte: Adaptada de angiospermbotanic, 2012 (Disponível em: <http://angiospermbotanic.blogspot.com.br/>)

Em relação às propriedades benéficas na manutenção da saúde, há estudos que relatam que os metabólitos secundários, denominados de fitoquímicos encontrados nas plantas são responsáveis por diversas atividades biológicas (Voon et al., 2012).

As flores comestíveis são consideradas fonte de compostos químicos que apresentam atividade antioxidante, sendo que o teor de compostos polifenólicos presentes, nas mesmas, exibe elevada correlação com sua atividade antioxidante. A variedade de cores reflete os diversos tipos de carotenoides e antocianinas presentes na composição química das flores. O teor de antocianinas encontra-se associado aos níveis de flavonoides, logo a atividade antioxidante pode ser

classificadas como fonte de nutracêuticos na alimentação humana (Fu & Mao, 2008; Mlcek & Rop, 2011; Rop et al., 2012).

A atividade antioxidante e os compostos fenólicos presentes nas flores proporcionam diversos efeitos benéficos à saúde humana. A importância da ingestão de alimentos que apresentem substâncias com potencial antioxidante para a prevenção de doenças crônicas como as cardiovasculares, câncer e doenças cerebrais degenerativas relacionadas com o envelhecimento, tem sido demonstrada (Ikram et al., 2009).

3.1.1 Caracterização Botânica

3.1.1.1 *Tropaeolum majus* (L.) – Capuchinha

A *T. majus* (FIG.5), tem origem na América Tropical, mais especificamente no Peru e México. É encontrada por toda América do Sul e foi introduzida na Europa no século XVII. Atualmente, utilizada no mundo inteiro tanto na medicina como na alimentação, apresenta os seguintes nomes populares: capuchinha, agrião do México; flor de chagas, cinco chagas e chagas, sendo uma das flores comestíveis mais conhecidas e utilizadas (Creasy, 1999; Soares, 2002; Negraes, 2003b).

FIGURA 5 – *T. majus* (L.)
Fonte: Autora da tese

Pertence à família Tropaeolaceae, planta herbácea, anual e suculenta, possui caule mole, retorcido longo e carnoso; que pode atingir 25 cm de altura, suas folhas são grandes e arredondadas caracterizam-se por possuir longos pecíolos e coloração azul-esverdeado, semelhantes a escudos. Os frutos são carnosos e formados por três compartimentos internos que abrigam três sementes (Creasy, 1999; Soares, 2002; Negraes, 2003b; Bastin, 2009).

As flores possuem formato de cálice vistoso, de tonalidade do amarelo claro ao vermelho, passando pelo alaranjado, com manchas escuras no seu interior. Sua floração ocorre na primavera e verão (Negraes, 2003b; Felipe, 2004).

Trata-se uma planta de fácil cultivo, pois se adapta facilmente a vários climas, porém com intolerância ao frio e a geada. Recomenda-se cuidado com a adubação do solo, pois é observado que o solo altamente fértil produz muitas folhas e poucas flores (Soares, 2002; Felipe, 2004; Jauron & Naeve, 2013).

Na culinária são utilizados as folhas, flores, botões florais e frutos. As folhas e flores possui sabor picante e são ótimas em saladas, molhos, omeletes, pratos grelhados, guacamole, preparações recheadas e nas saladas frescas podendo ser misturada com alface, acelga e almeirão (Creasy, 1999; Garzón & Wrolstad, 2009). Os frutos são usados no preparo de pickles. Os botões florais podem ser utilizados como substitutos de alcaparras em pizzas, conserva de vinagre e sal, para temperar saladas e verduras cruas (Negraes, 2003b; Felipe, 2004).

3.1.1.2 *Viola tricolor* (L.) – Amor-perfeito

A *V. tricolor* (FIG. 6) representa uma das mais populares flores comestíveis. É originária da Europa e Ásia Ocidental, porém, atualmente é encontrada no mundo inteiro. Assim como a *T. majus*, é utilizada na alimentação e na medicina (Soares, 2002; Felipe, 2004; Vukics et al., 2008a).

Pertencente à família das Violáceas, conhecida popularmente como amor-perfeito, erva-da-trindade, jácea, viola e violeta-de-três cores. É uma planta herbácea, anual e atinge até 30 cm de altura (Negraes, 2003a; Felipe, 2004).

FIGURA 6 - *Viola tricolor* (L.)

Fonte: Autora da tese

As flores são pequenas, delicadas e isoladas, possui formato arredondado e achatado, com tonalidade azul, amarelo, roxo, róseo ou branco, apresentando, às vezes, os tons combinados numa mesma flor. A floração ocorre melhor em clima frio e sombreado, com solo úmido e bem drenado, florescendo na primavera e inverno, sua propagação ocorre por sementes (Soares, 2002; Felipe, 2004; Jauron & Naeve, 2013).

Devido sua versatilidade, as flores de amor-perfeito são utilizadas em diversas preparações culinárias como: doces, bolos, saladas, sopas, vinagres, manteigas, bebidas (licores, ponches e vinhos), saladas de frutas, carnes, cubos de gelo, permitindo também obter o corante comestível azul e amarelo. Possui textura aveludada e sabor refrescante, sendo flores e folhas utilizadas na alimentação (Creasy, 1999; Newman & O'Conner, 2009).

3.2 Atividade Antioxidante

3.2.1 Estresse oxidativo

Segundo Carocho & Ferreira (2013), os radicais livres são definidos como átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados, os quais são altamente instáveis e ativos, no sentido de reações químicas com outras moléculas. A derivação dos radicais livres ocorre com base em três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, gerando assim, as espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) e de enxofre (ERS). Essas espécies são conhecidas, tanto por terem funções prejudiciais, como benéficas aos organismos vivos, uma vez que são produzidos pelo metabolismo celular, em condições normais.

Os efeitos benéficos ocorrem em concentrações baixas, como por exemplo, quando atuam nas respostas celulares a danos infecciosos. Os efeitos prejudiciais ocorrem quando existe alta produção de ERO, ERN e ERS, ocasionando um desequilíbrio entre o conteúdo de oxidantes versus antioxidantes na célula (Valko et al., 2007).

A este desequilíbrio dá-se o nome de estresse oxidativo, o qual ocorre devido à geração excessiva de radicais livres ou perda da velocidade de sua remoção. Tal processo conduz à oxidação e degradação de lipídios, proteínas e cadeias de DNA, ocasionando a modificação e inibição das funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (Barbosa et al., 2010).

O estresse oxidativo pode ser desencadeado por diversos fatores (FIG. 7): ambientais, fármacos, íons metálicos, radiação e processos de inflamação (Ferreira et al., 2009; Carocho, 2011).

FIGURA 7 - Diagrama das principais causas para a produção de radicais livres, potenciais alvos celulares e consequências do estresse oxidativo.

Fonte: Adaptada de Ferreira et al., 2009

3.2.2 Antioxidante

De acordo com McClements & Decker (2008), o estresse oxidativo ocorre nos organismos expostos a um ambiente oxigenado, desta maneira, os sistemas biológicos desenvolvem métodos de defesa para se proteger contra o processo de oxidação.

Os antioxidantes são compostos que possuem o potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou mesmo inibindo a sua ação de oxidação e, estão em constante atividade nos organismos vivos, mas necessitam estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são permanentemente produzidos (Becker et al., 2004; Huang et al., 2005).

Segundo Niki (2010) há diversas espécies de antioxidantes, e podem ser classificados de acordo com os mecanismos associados: preventivos; captadores; reparadores e de adaptação. Os antioxidantes preventivos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra a formação de ERO, enquanto os

antioxidantes captadores funcionam como a segunda linha de defesa, removendo rapidamente espécies reativas, impedindo o ataque a várias moléculas. Os antioxidantes reparadores atuam numa terceira linha de defesa do organismo, atuando na reparação de lesões, eliminando resíduos ou reconstituindo funções perdidas. Por último, os antioxidantes de adaptação, que constituem a quarta linha de defesa, exercem uma função de adaptação, em que cada antioxidante é produzido e transferido na quantidade necessária para as posições adequadas.

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As enzimáticas são encontradas em grande número e por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Estas defesas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px), a glutathione redutase (GSH-R), entre outras (Barreiros et al., 2006; Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009).

A SOD protege as células aeróbias da ação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), pois estimula a conversão deste radical em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ao passo que, a CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. No sistema composto pela glutathione reduzida (GSH) e enzimas GSH-Px e GSH-R, ocorre à catalisação da redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) em água e oxigênio (Barreiros et al, 2006; Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009).

As células possuem outros compostos antioxidantes, além das enzimas, o que lhe proporciona maior proteção contra a ação dos radicais livres. Os compostos antioxidantes não enzimáticos são provenientes da dieta, sendo a maioria de origem vegetal. As plantas possuem uma grande variedade de antioxidantes, tais como os ácidos fenólicos; flavonoides; carotenoides; cumarinas; taninos e muitos outros compostos fenólicos (Ferreira & Abreu, 2007; Kaur et al., 2006; Youwei et al., 2008).

Nos vegetais os principais grupos de antioxidantes são os compostos fenólicos, com destaque para os flavonoides e carotenoides. Esses compostos

apresentam outras importantes atividades biológicas, como antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica e efeitos imunestimulantes (Nijveldt et al., 2001).

Estes compostos serão abordados profundamente nos próximos itens desta revisão.

3.3 Compostos Bioativos

Segundo Bastos e colaboradores (2009), a denominação compostos bioativos foi determinada para nutrientes e não nutrientes ativos em alvos fisiológicos específicos, que interferem nos processos patológicos de doenças crônicas não transmissíveis. Esta determinação foi possível através de pesquisas e estudos realizados com o objetivo de identificar essas substâncias.

De acordo com Simopoulos (2003), estudos demonstram os efeitos benéficos de uma dieta rica em frutas e vegetais na prevenção de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares.

Os fitoquímicos são um bom exemplo de não nutrientes ativos, denominação aplicada para os compostos químicos encontrados em certos alimentos, que não são essenciais às funções do organismo, mas melhoram a saúde tendo um papel ativo e/ ou protetor. Estes não nutrientes são juntamente com nutrientes, muito importantes na dieta humana (Ferreira et al., 2009).

3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos formam um dos maiores e mais diversos grupos de metabolitos secundários das plantas e representam uma família particularmente rica de fitoquímicos, que consiste em mais de 10.000 compostos. Podem ser classificados de acordo com sua origem, função, efeito e estrutura. Na classificação com base na estrutura, são divididos em: fenóis simples substâncias que contêm apenas um anel aromático e tendo pelo menos um grupo hidroxila e

polifenóis, que possuem mais de um anel aromático (Silva et al., 2007; Pereira et al., 2009).

Os fenóis e polifenóis podem ocorrer como agliconas (não conjugadas) ou glicosiladas (conjugadas), frequentemente ligadas a açúcares ou ácidos orgânicos, mas também com aminoácidos e lipídios. Sendo os flavonoides e os ácidos fenólicos os principais grupos dentre os compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza (Balasundram et al., 2006; Clifford & Brown, 2006).

Os ácidos fenólicos (FIG. 8) dividem-se em derivados do ácido benzoico e derivados do ácido cinâmico. O grupo de derivados do ácido benzoico possui sete átomos de carbonos e estrutura base C_6-C_1 , enquanto o grupo de derivados do ácido cinâmico possui nove átomos de carbonos e estrutura base C_6-C_3 . Nos últimos anos houve uma intensificação de estudos sobre o potencial antioxidante destes compostos (Blasco et al., 2005; Cunha, 2005).

FIGURA 8 - Ácidos fenólicos
Fonte: Adaptada de Pereira et al, 2009

Os flavonoides (FIG. 9) constituem um grande e importante grupo de compostos fenólicos (classe de polifenóis) e podem ser divididos em subgrupos: flavonas, flavonóis, isoflavonoides, flavonas, antocianinas e flavononas. Possui baixo peso molecular e o esqueleto básico dos flavonoides é formado por substâncias aromáticas com quinze átomos de carbono, possui característica C_6 -

C₃-C₆. Estes compostos são encontrados em frutas, folhas, flores, sementes e em outras partes da planta, (Meyers et al., 2003, Cunha, 2005; Pimentel et al., 2005; Gould & Lister, 2006).

FIGURA 9 - Classes de flavonoides
Fonte: Adaptada de Pereira et al, 2009

Nas plantas, desempenham funções de defesa, proteção contra oxidantes e radiação UV. Estão amplamente distribuídos nas plantas, as principais características estão em suas atividades farmacológicas, inibição da oxidação lipídica, assim como atividade antibacteriana e antifúngica; também intervém nos

processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (Moraes-de-Souza, 2007; Daayf & Lattanzio, 2008).

Muitos destes compostos têm atividade antioxidante, atuam como agentes quimiopreventivo e efetivos na redução do estresse oxidativo. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos destaca-se essencialmente no seu elevado potencial para captar radicais livres, tais como radicais superóxido, hidroxila ($H\bullet$) e peroxila ($ROO\bullet$), através de mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e de elétrons. Podem interagir sinergicamente com outros antioxidantes, tais como o ácido ascórbico e os tocoferóis, proporcionando efeitos benéficos peculiares (Shi et al., 2001; Yanishlieva-Maslareva, 2001; Wright et al., 2001).

3.3.2 Flavonoides

Segundo Pimentel e colaboradores (2005), entre os fitoquímicos, os flavonoides são importantes antioxidantes, com capacidade de inibir a peroxidação lipídica e sequestrar radicais como hidroxila e peroxila.

Os flavonoides são compostos de origem biossintética mista, em que a sua formação ocorre pela união de uma subunidade fenólica, proveniente da via do acetato (anel A), a uma subunidade da via do chiquimato, constituída por um anel aromático (anel B) ligado a uma cadeia com três átomos de carbono. As diferenças estruturais encontradas no anel C permitem classificar os flavonoides em classes (Ferreira & Abreu 2007).

Representam um importante grupo de metabolitos secundários das plantas, com diversas e fundamentais funções no desenvolvimento e crescimento das plantas (defesa; absorção de nutrientes e outras), também são responsáveis pelas propriedades sensoriais (Harborne & Williams, 2000; Gould & Lister, 2006).

Alguns estudos epidemiológicos têm apoiado a associação entre uma melhor saúde e o consumo de dietas ricas em alimentos à base de planta, com importante papel na manutenção da saúde e prevenção de doenças, sendo

conferidos alguns destes efeitos protetores a presença dos flavonoides. Todavia, a concentração de flavonoides em alimentos pode variar em quantidade, devido à influência de numerosos fatores tais como: espécie; variedade; clima; grau de maturação pós-colheita e armazenagem (Kyle & Duthie, 2006).

Nos últimos anos, houve uma expansão no interesse sobre os flavonoides, em particular as antocianinas, como potenciais suplementos nutricionais com atividade terapêutica, contribuindo para a descoberta de suas funções antioxidantes. Pode-se atribuir este interesse aos vários benefícios evidenciados aos longos dos anos de estudos sobre o tema, entretanto é necessário ampliar as pesquisas sobre a sua biodisponibilidade, metabolismo e absorção nos seres humanos, assim como o sinergismo com outros componentes da dieta (Behling et al., 2004; Gould & Lister, 2006).

No quadro 2 estão descritos alguns flavonoides normalmente encontrados nos alimentos e as matrizes alimentares

QUADRO 2 - Flavonoides nos alimentos

Flavonoide	Fonte
Cianidina-3-glucosídeo	cereja; jambolão; amora; vinho; morango e uva
Peonidina-3-glucosídeo	cereja; jabuticaba; vinho e uva
Malvidina-3-glucosídeo	uva e vinho
Pelargonidina-3-glucosídeo	morango
Delfinidina-3,5-diglucosídeo	berinjela
Petunidina-3-glucosídeo	uva e vinho
Delfinidina-3-cafeoilglucosídeo-5-glucosídeo	berinjela
Kampferol-3-glucosídeo	morango; vinho e uva
Quercetina-3-glucosídeo	uva; vinho e morango

Fonte: Adaptado de Bobbio & Bobbio, 2003

3.3.3 Antocianinas

Nos últimos anos, observou-se crescimento intensivo das pesquisas sobre os corantes naturais, isso se deve ao progressivo interesse pela busca de potenciais substitutos para os corantes sintéticos. As antocianinas e carotenoides são importantes corantes naturais aplicados na indústria de alimentos (Castañeda Ovando et al., 2009).

As antocianinas (FIG. 10) são os pigmentos responsáveis pelas colorações violeta, azul e todas as tonalidades de vermelho das flores, frutas e diversas hortaliças. Na natureza podem ser encontradas na forma de glicosídeo (conjugada, ligada a um açúcar) e na forma de aglicona (não conjugada) a qual possuem um aromático anel [A] ligado a um anel heterocíclico [C], que contém oxigênio, também possui ligação C-C ligada ao terceiro anel aromático [B], a qual é denominada antocianidina (Coultate, 1998; Bobbio & Bobbio, 2003; Kończak & Zhang, 2004; Schwartz et al., 2008).

FIGURA 10 - Estrutura básica das antocianinas
Fonte: Adaptada de Castañeda-Ovando et al., 2009

Há uma enorme variedade de antocianinas na natureza, foram identificadas e caracterizadas cerca de seiscentas e as mais comuns são derivadas de três

pigmentos básicos: pelargonidina, cianidina e delphinidina (Castañeda-Ovando et al., 2009; Schwartz et al., 2008).

São compostos hidrossolúveis e normalmente extraídos a partir de frutas vermelhas (uva; morango; amora; maçã; cereja; jabolão), rabanete, berinjela, tulipas, rosas e orquídeas, entre outros. As antocianinas mais complexas são encontradas nas flores, pois sua estrutura dobra-se como as proteínas, os anéis de agliconas estão por baixo e por cima através de ligações hidrofóbicas, desta maneira ocorre uma maior estabilidade, no geral são relativamente instáveis e sua estabilidade pode ser afetada por diversos fatores (pH; temperatura; luz; oxigênio e outros) (Dey & Harborne, 1993; Bobbio & Bobbio, 2003; Rein, 2005; Schwartz et al., 2008).

Diversos estudos, envolvendo a propriedade antioxidante das antocianinas, sugerem que o seu teor presentes nos alimentos está relacionado à redução dos riscos de várias doenças degenerativas. Correlação direta entre os teores de antocianinas e a capacidade antioxidante, foi demonstrada em estudos com framboesas, morangos, baguaçu e amoras (Heinonen et al., 1998; Prior et al., 1998; Wang & Lin, 2000; Kuskoski et al., 2006).

Castañeda-Ovando e colaboradores (2009) relataram investigações sobre as propriedades bioativas das antocianinas. Análises realizadas com sementes de uva nos Estados Unidos concluíram que as antocianinas apresentam maior atividade antioxidante do que as vitaminas C e E. Estudos sobre flavonoides presentes no óleo de canola na China evidenciaram o efeito protetor contra peroxidação lipídica na membrana celular, concluindo que os compostos fenólicos são capazes de capturar radicais livres por doação de átomos de hidrogênio.

Com base nos relatos sobre as diversas propriedades atribuídas às antocianinas, fica evidente a necessidade da realização de pesquisas sobre matrizes alimentares que possuam substâncias ativas na sua composição, e métodos que possibilitem sua conservação.

3.3.4 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, tanto na fauna como na flora, são responsáveis pela coloração de flores, frutos e vegetais, assim como de alguns pássaros, insetos e animais marinhos. Estes pigmentos conferem aos alimentos a coloração amarela, laranja e vermelha e que podem sofrer alterações conforme o processamento do alimento. Sendo assim os carotenoides funcionam como indicadores de qualidade de alimentos (Quirós & Costa, 2006; Pinto, 2010).

No quadro 3 estão descritos os principais carotenoides e fontes alimentícias.

QUADRO 3 - Carotenoides em alimentos

Carotenoide	Fonte
α – caroteno	cenoura
β – caroteno	cenoura; manga; abóbora
Luteína	gema de ovo
Criotoxantina	mamão; páprica; milho amarelo
Zeaxantina	milho; gema de ovo
Crocina	açafrão
Bixina	urucum
Capsantina	pimenta vermelha
Capsorrubina	páprica
Violaxantina	amor-perfeito
Licopeno	tomate; melância

Fonte: Adaptado de Bobbio & Bobbio, 2003

A estrutura química dos carotenoides é tetraterpenoides C_{40} formada por oito unidades isoprenoides C_5 , exceto na posição central, onde a essa ligação é invertida e resulta em uma molécula simétrica, e assim, os grupos metila centrais são separados por seis carbonos, e os demais, por cinco. Sua estrutura básica pode sofrer modificações (hidrogenação; ciclização; oxidação e outras), o que

permite uma variedade de estruturas (Bobbio & Bobbio, 2003; Rodriguez-Amaya et al., 2008)

Segundo Bobbio & Bobbio (2003), pode-se considerar a estrutura do licopeno como esqueleto básico (FIG. 11) dos carotenoides e derivar outras estruturas em virtude das modificações (citadas anteriormente).

FIGURA 11 - Estrutura do licopeno

Fonte: Adaptada de Rodriguez-Amaya et al., 2008

Os carotenoides (FIG. 12) dividem-se em carotenos, compostos constituídos apenas por hidrocarbonetos, e as xantofilas que possui oxigênio na sua estrutura. Os principais carotenoides são β -caroteno e licopeno (carotenos); astaxantina, cantaxantina, luteína e zeaxantina (xantofilas) (Coultate, 1998; Cunha, 2005; Quirós & Costa, 2006; Pinto, 2010).

FIGURA 12 - Estrutura dos principais carotenoides encontrados em alimentos

Fonte: Adaptada de Rodriguez–Amaya et al., 2008

Os carotenoides são compostos lipossolúveis, os quais possuem estruturas químicas diversas e funções variadas. Nas plantas, desempenham importante papel no processo de fotossíntese e atuam como agentes de fotoproteção nos tecidos vegetais, tal função é caracterizada devida sua capacidade de inativar as espécies reativas de oxigênio – EROs (Bobbio & Bobbio, 2003; Schwartz et al., 2008).

Na alimentação dos seres humanos e demais animais, a função mais relevante dos carotenoides é a sua capacidade de servir como precursores de

vitamina A (retinol). Alguns carotenoides, além dessa capacidade, apresentam propriedades antioxidantes e melhoram a resposta imunológica. Destacam-se as xantofilas que são eficazes na supressão de radicais livres (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Pinto, 2010).

De acordo com Rao & Rao (2007) os carotenoides tem a capacidade de interromper reações em cadeia em ambiente lipídico, atuando como antioxidantes. Devido à apresentação de ligações duplas, torna-os susceptíveis ao ataque dos radicais peróxilas ($\text{LOO}\bullet$) dando origem a produtos inativos. Também os carotenoides exercem efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose.

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos demonstram os diversos efeitos promotores na saúde atribuídos aos carotenoides como: a redução ao risco de doenças crônicas degenerativas (câncer); cardiovasculares, catarata, degeneração macular; aterosclerose, e os processos de envelhecimento (Rodriguez-Amaya et al., 2008; Carvalho et al., 2013).

Embora os carotenoides sejam micronutrientes, presentes em níveis muito baixos, estão entre os componentes dos alimentos mais importantes e estudados atualmente, juntamente com os flavonoides.

3.4 Métodos de avaliação de atividade antioxidante

3.4.1 Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH (IC 50 %)

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de nitrogênio sintético, e bastante estável devido à deslocação do seu elétron livre, como resultado dessa ação, origina-se a cor púrpura intensa característica dessa molécula (FIG. 13). Reage facilmente com compostos que têm capacidade de doar um átomo de hidrogênio, reduzindo-o e levando à formação de um composto (hidrazina) amarelo-pálido (Antolovich et al., 2002; Amarowicz et al., 2004; Carocho & Ferreira, 2013).

FIGURA 13 - Representação esquemática da redução do DPPH•
 Fonte: Adaptada de Molyneux, 2004

Pode-se descrever a reação do DPPH com um pela seguinte pela equação:

Onde AH representa um composto antioxidante e A[•] representa o radical formado (Brand-Williams, 1995). Atualmente, utiliza-se o valor de EC₅₀ como parâmetro de análise de resultados deste método, definido como a concentração de extrato necessária para provocar a perda de 50 % da atividade do radical DPPH (Molyneux, 2004).

3.4.2 Ensaio da inibição da descoloração do β-caroteno

O ensaio da inibição da descoloração do β-caroteno baseia-se em medições espectrofotométricas com objetivo de avaliar a capacidade de inibição de radicais livres, gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Pode-se representar este ensaio através da equação (FIG. 14) (Kaur & Geetha, 2006).

FIGURA 14 - Reações do ensaio de Inibição da descoloração do β -caroteno
 Fonte: Autora da tese

3.4.3 Ensaio do Poder redutor

O ensaio do Poder Redutor permite medir a capacidade de um determinado antioxidante reduzir o complexo Fe (III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a Fe(II), a sua forma ferrosa. Deste modo, a coloração amarela da solução é alterada para azul da Prússia, dependendo da concentração do antioxidante presente na amostra. A reação desse ensaio baseia-se na redução do ferro (FIG. 15) (Amarowicz et al., 2004; Berker et al., 2007).

FIGURA 15 - Reações do ensaio Poder redutor.
 Fonte: Carocho, 2011

3.4.4 Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC

O ensaio *in vitro* de capacidade de absorção do oxigênio – ORAC é um método, que se baseia na reação da solução de AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] que é um gerador de radical livre com a fluoresceína. Quando adicionada na amostra e quanto menor a intensidade da fluoresceína, maior é a capacidade antioxidante do composto. O mecanismo de ação do AAPH é baseado a partir da produção de radicais peroxila por aquecimento, oxidando assim, a molécula de caráter florescente. Os antioxidantes presentes na amostra retardam a perda da fluorescência e a oxidação, desta forma, este método permite avaliar o potencial antioxidante da amostra estudada (Jardini, 2010; Chisté et al., 2011).

3.4.5 Ensaio da determinação de teor de fenólicos

O método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* um método de avaliação da quantidade de fenóis totais, sendo amplamente aplicado na área de pesquisa. Os fenóis determinados por este método são expressos em equivalentes de ácido gálico (Kellie & Hayball, 2002; Oliveira et al., 2008). Os ácidos que constituem o reagente de *Folin-Ciocalteu* são oxidados em meio alcalino, formando O_2 , que posteriormente reage com o molibdato dando origem a óxido de molibdênio (MoO_4^{4+}), composto que possui uma absorbância bastante elevada ao comprimento de onda de 750 nm (Roginsky & Lissi, 2005; Carochi & Ferreira, 2013).

3.5 Sensações humanas

A análise sensorial é uma ferramenta intensamente utilizada pelas indústrias de alimentos, bebidas, perfumes, cosméticos e outras. Trata-se de uma ciência que utiliza as sensações humanas para avaliar os atributos de um determinado produto. Suas aplicações são amplas, como no controle de garantia de qualidade, estudos de percepção humana, desenvolvimento de novos produtos e testes, entre outras (Dutcosky, 1996).

Na análise sensorial, a aparência de um alimento atua fortemente para a sua aceitabilidade, sendo provavelmente a cor a propriedade mais importante, tanto nos alimentos naturais quanto nos processados. Devido à habilidade humana de perceber facilmente a cor e aparência dos alimentos, esses fatores são os primeiros a serem avaliados pelo consumidor no ato da compra. Mesmo que o alimento seja nutritivo, seguro e econômico, quando este não é atrativo para o consumidor, dificilmente sua compra acontecerá (Bobbio & Bobbio, 1992; Schwartz et al., 2008).

3.6 Processamento por radiação de alimentos e flores

Estudos buscando a otimização das aplicações da radiação ionizante, tanto a nível de pesquisa quanto a industrial, dentre estes, o processamento de matrizes alimentares vem sendo desenvolvidos desde o século XX como meio de preservação dos alimentos. O tratamento por radiação pode ser aplicado independente ou em conjunto com outras técnicas (secagem; fermentação; atmosfera modificada e tratamento químico entre outros), permitindo a diminuição de produtos químicos no processo de conservação dos alimentos (Farkas, 2001; Diehl, 2002).

O *Codex alimentarius* estabelece parâmetros para a aplicação dos raios gama proveniente de isótopos radioativos de ^{60}Co , com energia podendo chegar até 1,33 MeV e ^{137}Cs , com energia de 0,662 MeV. Já os raios X, com energia máxima de 5 MeV e feixes de elétrons gerados por aceleradores de elétrons com energia máxima de até 10 MeV (Farkas, 2006; Farkas & Mohácsi-Farkas, 2011).

As fontes de radiação utilizadas e permitidas não possuem energia suficiente para induzir radioatividade no alimento ou embalagem do alimento, todavia possuem energia suficiente para remoção dos elétrons do átomo para formar íons ou radicais livres. A indução de radiatividade não ocorre devido a energia limiar para a reação estar bem acima de 10 MeV para todos os isótopos encontrados na matriz alimentar (Olson, 1998; Wakeford et al., 1991; Findlay et al., 1993; ICGFI, 1995; Farkas, 2006).

A radiação proveniente de ^{60}Co possui grande poder de penetrabilidade, sendo aplicadas principalmente, no processamento de matrizes alimentares de maior espessura e de formas irregulares, enquanto a capacidade de penetrabilidade dos aceleradores de elétrons, é de apenas alguns milímetros, e são utilizados em alimentos de espessura mais fina, desta forma, proporciona maior rendimento e segurança em relação à radiação gama (Villavicencio, 1998; Fanaro et al., 2007; Supriya et al., 2012).

O processo de irradiação trata-se inicialmente de um fenômeno físico pelo qual ocorre a emissão e propagação de energia, através da matéria ou espaço, resultando na ionização e excitação dos átomos. Numa segunda fase, os efeitos químicos, levam a ruptura de ligações moleculares e a formação de radicais livres. A radiólise da água é o fenômeno mais importante do processo de irradiação de alimentos e/ou materiais que contenham água na sua composição (Radomyski et al., 1994; Kubesh et al., 2005; Azzam et al., 2012)

O emprego de radiação nos alimentos exige exposição controlada e cuidadosa, em relação à radiação ionizante, com objetivo de alcançar o resultado desejado. Algumas pesquisas apresentam que a aplicação do processo de irradiação é efetivo na descontaminação, desinfestação, inibição do brotamento, conservação assim como prolongamento da vida útil do alimento (Hong et al., 2008; Teets et al., 2008; Farkas & Mohácsi-Farkas, 2011).

Diversos fatores externos como: temperatura; presença ou não de oxigênio e por fatores intrínsecos do alimento: estado físico, densidade, umidade, entre outras características, podem interferir no processo de irradiação. Por isso, para cada produto a ser irradiado são estabelecidos procedimentos específicos, assim como diferentes doses de radiação (Sádecká, 2007; Antonio et al., 2011).

Nos alimentos, alguns componentes importantes são encontrados em baixas concentrações e, geralmente, são responsáveis pelo valor nutricional e sensorial dos alimentos. Segundo estudos científicos, geralmente esses componentes são muito sensíveis à radiação, pesquisas demonstram que

macronutrientes são relativamente estáveis a doses de até 10 kGy, enquanto os micronutrientes podem ser sensíveis a quaisquer processamento (Villavicencio, 2000; Fanaro et al., 2011).

As flores também são relativamente sensíveis à radiação ionizante, os danos causados são descritos como: a mudança de cor das pétalas e folhas; ausência da floração e pétalas e folhas murchas (Kikuchi, 2003).

Segundo Sangwanangkul e colaboradores (2008) a sensibilidade das flores de corte ao uso da radiação varia de espécie para espécie. Em estudo realizado foi possível verificar a sensibilidade de algumas espécies de flores: a *Alpinia purpurata* e a *Strelizia reginae* apresentaram baixa sensibilidade à dose absorvida de 0,25 kGy, entretanto, as flores *Zingiber spectabilis*; *Barbatus costus* e *Costus woodsonii*, demonstraram alta sensibilidade a 0,25 kGy.

3.6.1 Breve histórico da legislação para irradiação de alimentos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) acompanha os resultados de estudos com alimentos irradiados desde 1964, juntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), através da realização de eventos científicos com especialistas de diversos países do mundo (Delincée, 2005).

As organizações internacionais incentivam a adoção de padrões internacionais para medidas fitossanitárias, ou seja, o uso de tecnologia para impedir a introdução e/ou disseminação de pragas. O processamento por radiação apresenta-se como um tratamento quarentenário pós-colheita, eficaz na desinfestação de gêneros alimentícios e agrícolas, aprovado em diversos países, visando atender às regras fitossanitários de exportação (AIEA, 2004; Antonio et al., 2012).

A regulamentação de alimentos irradiados no Brasil existe desde 1973, e portarias complementares foram editadas em 1985 e 1989 pela Agência Nacional

de Vigilância Sanitária (ANVISA). A portaria nº 09 de 08 de março de 1985, estimava as normas gerais sobre a irradiação de alimentos e previa o limite superior de irradiação de 10 kGy, a lista dos produtos aprovados para irradiação e suas respectivas doses (Leal et al., 2004; Salum, 2008).

Ainda em 1973, o Decreto nº 72.718 de 29 de Agosto de 1973 estabeleceu as normas gerais para processamento de alimentos irradiados, enfocando principalmente o processo de estocagem, transporte, importação e exportação, venda e consumo de alimentos irradiados. O mesmo Decreto instituiu o símbolo da radura, símbolo internacional do uso da radiação ionizante, no rótulo de produtos irradiados.

A utilização da radura não é obrigatória, em alguns países sua aplicação na rotulagem dos alimentos é opcional, contudo em outros países, em particular os EUA seu uso é obrigatório, e a União Europeia, não estabelecer a utilização deste logotipo internacional. De acordo com o padrão *Codex* o símbolo tem coloração verde com todos os elementos cheios (FIG. 16); entretanto alguns países permitem diferentes modelos e cores (Ehlermann, 2009).

FIGURA 16 - Radura: Símbolo internacional para alimentos irradiados
Fonte: Ehlermann, 2009

A ANVISA aprovou a resolução RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001, “Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos”, desde que não haja comprometimento das propriedades funcionais e sensoriais (Brasil, 2001).

As normas para o emprego dessa tecnologia estão descritas na Resolução nº 21 de 26 de janeiro de 2001, autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que não estabelece quais produtos alimentícios podem sofrer o processo de irradiação, desde que a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometa as qualidades sensoriais e nutricionais do alimento e que a dose mínima aplicada seja suficiente para atingir o objetivo desejado (Brasil, 2001).

De acordo com Fanaro (2013), a resolução RDC nº 21 ainda estabelece que no rótulo dos alimentos processados por radiação, deve constar a seguinte informação: "ALIMENTO TRATADO POR PROCESSO DE IRRADIAÇÃO", com as letras de tamanho não inferior a um terço ($1/3$) do da letra de maior tamanho das informações do rótulo. E quando o alimento irradiado é empregado como ingrediente em outro produto, deve ser mencionada tal informação na lista de ingredientes, entre parênteses, após o nome do mesmo.

As vantagens da aplicação da radiação em alimentos é que esse processo pode ser aplicado em produtos embalados, acarretando alterações mínimas em produtos frescos e perecíveis, permitindo que tais alimentos sejam conservados por mais tempo sem perder sua qualidade, entretanto, não evita a recontaminação ou reinfestação. No âmbito econômico, os custos são competitivos com tratamentos alternativos, uma vez que apresenta baixo consumo de energia durante o processo (Morehouse, 2002; Boaratti, 2004; Araújo, 2012).

Levantamento realizado por Kume e colaboradores (2009) sobre a quantidade de alimentos processados por irradiação no mundo, no ano de 2005, apontou o continente asiático como o que mais utiliza esta tecnologia, tratando cerca de 183 mil toneladas de alimentos. A América (Estados Unidos, Canadá e Brasil) é o segundo que mais irradia alimentos, cerca de 166 mil toneladas. A

China é responsável pela irradiação de 146 mil toneladas de alimentos, enquanto os Estados Unidos por 92 mil toneladas, Ucrânia por 70 mil toneladas e o Brasil processa cerca de 23 mil toneladas, obtendo assim o 4º lugar. Tal estudo estima que no ano de 2005 foram irradiados cerca de 404.804 toneladas de alimentos no mundo. Apesar de todas as vantagens, a irradiação de alimentos não é utilizada em larga escala no Brasil como em outros países (EUA e China), as principais razões parecem ser as preocupações e dúvidas dos consumidores sobre o uso da radiação em alimentos. As pessoas entendem os avanços tecnológicos como meios de melhorar o bem-estar e o padrão de vida, porém, a falta de informação gera desconforto e insegurança (Berhrens et al., 2009; Junqueira-Gonçalves et al., 2011).

A aceitação do consumidor em relação aos alimentos irradiados é uma questão de informação adequada, buscando diminuir a imagem negativa e divulgação da tecnologia, o principal problema é a desinformação sobre o assunto, sendo necessário desmistificar a irradiação de alimentos (Allothman et al., 2009; Teisi et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Padrões

Análises químicas: acetonitrila 99,9 %, n-hexano a 95 % e acetato de etila 99,8 % foram de grau HPLC do Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O solvente metanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal).

Identificação de Compostos fenólicos e antocianinas: padrões-ácido *p*-cumárico; ácido-5-*O*-cafeoilquínico; miricetina; quercetina-3-*O*-rutinosídeo; kampferol 3-*O*-rutinosídeo; isorhamnetina-3-*O*-rutinosídeo; apigenina-6-*C*-glicosídeo; delphinidina-3-*O*-glicosídeo; cianidina-3-*O*-glicosídeo; pelargonidina-3-*O*-glicosídeo foram adquiridos a Extrasynthese (Genay, França).

Análise de potencial antioxidante: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH) foi obtido a partir de Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). Padrões Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) e ácido gálico, fluoresceína (3',6'-dihidroxi[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona) e AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorida) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Análise de potencial antitumoral: soro fetal bovino (FBS), L-glutamina, solução de aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina/estreptomincina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente), e meios de cultura RPMI-1640 e DMEM foram adquiridos da Thermo Fischer Científica (Waltham, MA, EUA). Ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético (TCA) e Tris (2-amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os demais reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e laboratórios especializados. A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

4.2 Amostras

Utilizou-se amostras de flores comestíveis frescas (FIG. 17) das espécies *T. majus* (capuchinha) e *V. tricolor* (amor perfeito) adquiridas de distribuidor especializado em flores comestíveis da cidade de Tatuí, município do estado de São Paulo, localizada a cerca de 130 km da capital paulista.

A escolha das espécies ocorreu com base na tolerância ao processamento por radiação. As pétalas das flores utilizadas apresentavam diferentes fenótipos:

- ✓ *T. majus*: amarelo, laranja e vermelho.
- ✓ *V. tricolor*: amarelo, laranja, roxo, branco e multicolorido.

FIGURA 17 - *T. majus* (A); *V. tricolor* (B)
Fonte: Autora da tese

4.3 Fontes de irradiação das amostras

O processamento por radiação foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN, São Paulo, SP – Brasil. As amostras não irradiadas foram utilizadas como grupo controle.

4.3.1 Radiação gama

No processamento por radiação gama utilizou-se uma fonte de ^{60}Co Gammacell 200 (Nordion Ltd., Ottawa, ON, Canadá), à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), com taxa de dose de 1,26 kGy/h, nas doses 0,5; 0,8; 1 kGy. A dose de radiação foi medida com dosímetro Harwell Âmbar 3042. Após a irradiação, as amostras foram liofilizadas (SL404, Solab, São Paulo, Brasil) e armazenadas em embalagem hermeticamente fechada para ensaios posteriores.

4.3.2 Acelerador de elétrons

O acelerador de feixes de elétrons (Dynamitron, Radiation Dynamics Inc., Edgewood, NY, EUA), foi utilizado na temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). As doses aplicadas foram: 0,5 kGy (taxa de dose: 1,11 kGy/s, energia: 1,400 MeV, corrente de feixe: 0,3 mA, velocidade bandeja: 6,72 m/min), 0,8 kGy (taxa de dose: 1,78 kGy/s, energia: 1,400 MeV, corrente de feixe: 0,48 mA, velocidade de bandeja: 6,72 m/min) e 1,0 kGy (taxa de dose: 2,23 kGy/s, energia: 1.400 MeV, feixe de corrente: 0,6 mA, velocidade de bandeja: 6,72 m/min).

Após a irradiação, as amostras foram liofilizadas e armazenadas nas mesmas condições descritas no item 4.3.1.

4.4 Análise de tolerância ao processo de irradiação

A avaliação de tolerância física ao processo de irradiação das flores comestíveis estudadas foi realizada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP – Brasil.

As análises foram realizadas imediatamente após o processo de irradiação e os atributos analisados foram: alteração na cor, escurecimento, murchamento de pétalas, queda das sépalas e pétalas. Esta avaliação baseou-se em estudo

anterior realizado com flores de corte (Kikuchi, 2000), no qual as flores que apresentaram os atributos indesejados anteriormente citados com a dose mínima de 0,3 kGy foram consideradas não tolerantes. A dose mínima aplicada no presente estudo foi de 0,5 kGy.

4.5 Procedimento de extração das flores comestíveis

O procedimento de extração foi realizado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- LQBA do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal.

Os extratos hidrometanólicos foram preparados a partir da metodologia adaptada de Barros e colaboradores. (2008). As amostras liofilizadas de flores ($\cong$ 0,5 g) foram extraídas com 20 mL de metanol:água 80:20 (v/v), à temperatura $\pm$ 26 °C, sob agitação magnética a 150 rpm (rotações por minuto), durante 60 min e posteriormente filtrada através de papel de filtro Whatman n° 4. Os resíduos foram submetidos novamente ao processo de extração descrito (agitação e filtração).

A evaporação dos extratos hidrometanólicos ocorreu a 35 °C (rotaevaporador Buchi R-210, Flawil, Suíça) para remoção do metanol, sendo então liofilizada a fase aquosa (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, EUA). Os extratos obtidos foram armazenados ao abrigo de luz e umidade para posterior análise.

4.6 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- LQBA do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal, com exceção do ensaio de capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC, o qual foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luís Queiroz” (ESALQ/USP) – Piracicaba, Brasil.

O extrato obtido anteriormente foi utilizado para os ensaios de atividade antioxidante. O extrato foi reabsorvido com metanol:água 80:20 (v/v) na proporção de 20 mg/mL (solução estoque) e realizadas diluições sucessivas (10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; 0,3125 mg/mL; 0,15625 mg/mL). As amostras foram submetidas a ensaios *in vitro* de atividade antioxidante. Os resultados dos ensaios foram expressos em valores de EC₅₀, que se refere à concentração a que 50 % da atividade antioxidante ocorre ou a uma absorbância de 0.5 ocorrida no ensaio do poder redutor. O Trolox® foi utilizado como controle positivo.

4.6.1. Atividade captadora de radicais DPPH (IC 50 %)

A medida da atividade captadora de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Barros e colaboradores (2008).

Na aplicação desta metodologia utilizou-se um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EUA). As amostras (30 µL) das diferentes concentrações das soluções de extrato foram adicionadas em triplicata nas cavidades da microplaca de 96 poços juntamente com a solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L).

A mistura foi mantida durante 60 min em repouso ao abrigo da luz. A redução do radical DPPH foi determinada medindo a absorbância a 515 nm em leitor de microplacas. A atividade de neutralização de radicais (RSA) foi calculada como o percentual de DPPH descolorado:

$$RSA\% = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

Na qual, A_S é a absorção da solução que contém a amostra, e A_{DPPH} é a absorção da solução DPPH.

* RSA =Atividade captadora de radicais livres

4.6.2 Inibição da descoloração do β -caroteno

Para a realização do ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno, foi utilizada a metodologia descrita por Barreira e colaboradores (2008). A solução de β -caroteno foi preparada por dissolução de 2 mg de β -caroteno em 10 mL clorofórmio PA. Transferiu-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e o clorofórmio removido com auxílio de rotaevaporador a 40 °C. O ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) foram adicionados ao balão com agitação vigorosa.

Alíquotas (4,8 mL) da emulsão foram adicionadas a tubo de ensaio contendo 0,2 mL de extrato em diferentes concentrações, e leu-se a absorbância inicial a 470 nm em espectrofotômetro UV-Vis Specord 200 (AnalytikJena, Alemanha). Após leitura os tubos foram incubados a 50 °C em banho-maria sob agitação pelo período de 2 h e mediu-se novamente a absorbância (no mesmo comprimento de onda).

A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada com a relação: absorbância após 2 h de ensaio por absorbância inicial para expressar o resultado em absorbância. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.3 Poder redutor

A metodologia empregada para avaliação do poder redutor foi realizada de acordo com Barros e colaboradores (2011). As diferentes concentrações dos extratos (0,5 mL) foi adicionado solução tampão de fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1 % w/v, 0,5 mL).

Em seguida, as amostras foram submetidas a banho-maria em temperatura de 50°C durante 20 min, e posteriormente, adicionou-se ácido tricloroacético (10 % w/v, 0,5 mL). Transferiram-se 0,8 mL da solução para uma microplaca de

48 poços, adicionando água deionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1 % w/v, 0,16 mL) e a absorbância foi medida a 690 nm no leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.6.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio – ORAC

O ensaio do método ORAC (oxygen radical absorbance capacity) baseou-se na metodologia de Chisté e colaboradores (2011) com modificações. Os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, utilizou-se fluoresceína na concentração inicial de 4,066 mM e concentração final de 508,25 nM e o AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorida) na concentração final de 76 mM. A curva de calibração Trolox® utilizou-se as concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µM/mL.

Selecionou-se 15 mg do extrato das amostras, as quais foram diluídas em 1,5 mL de solução tampão fosfato, o ensaio ocorreu em microplaca de 96 poços (coloração preta). Em cada poço foram adicionados 30 µL da amostra, 60 µL da solução de fluoresceína a 508,25 nM e 110 µL da solução de AAPH a 76 mM. O tampão fosfato foi usado no controle e branco (200 µL). Mediu-se a fluorescência em leitor de microplacas Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, EUA), onde a microplaca foi incubada a 37 °C com agitação durante 2 h, a fluorescência de emissão 528 nm e excitação 485 nm. Registrou-se a fluorescência cada minuto até atingir o zero. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A avaliação do valor de ORAC foi realizada através dos cálculos do valor da área abaixo da curva das amostras (AUC) e expresso em equivalente de µmol Trolox/g de extrato seco.

$$\text{Equação 1} \quad AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0}$$

Na qual AUC é a área abaixo da curva e f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0 e f_n a fluorescência no tempo n (equação gerada pelo leitor de microplaca).

Os resultados foram obtidos (AUC_{net}) pela diferença entre o AUC do controle (AUC_{ct}) e o valor de AUC da amostra (AUC_{am}) ou padrão (AUC_{pd}) conforme demonstrado:

$$\text{Equação 2} \quad AUC_{net} = AUC_{am \text{ ou } pd} - AUC_{ct}$$

4.6.5 Determinação do teor de fenólicos

Os fenóis totais foram determinados pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu* de acordo com Barros e colaboradores (2008). A solução de extrato (1 mL) foi misturada com o reagente de *Folin-Ciocalteu* (5 mL, previamente diluído com água 1:10, v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (diluído em água 75 g/L). Após homogeneização no vórtex, os tubos de ensaio foram colocados em banho seco a 40 °C durante 30 min. A absorbância foi medida a 765 nm. Utilizou-se ácido gálico na determinação da curva padrão e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato.

4.7 Identificação de compostos fenólicos e antocianinas por técnica cromatográficas

Os ensaios para identificação de compostos fenólicos e antocianinas foram realizados no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- LQBA do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal e na Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca – Espanha.

4.7.1. Compostos fenólicos

Os extratos liofilizados foram redissolvidos em metanol aquoso (20 %) a 5 mg/mL, posteriormente, filtrados através de filtros de cromatografia líquida descartáveis de 0,22 µm e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD-ESI/MS). As análises foram realizadas em cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com bomba quaternária e detector de díodos (DAD) acoplado com estação de processamento de dados HP Chem Station (rev. A.05.04).

Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb® S3 ODS-2 C₁₈, 3 µm (4,6 mm × 150 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) a 35 °C. A fase móvel foi (A) 0,1 % de ácido fórmico em água, (B) acetonitrila. O gradiente de eluição estabelecido foi de 10% B a 15% B até 5 min, 15-25 % B até 5 min, 25-35 % B até 10 min, isocrático 50 % B para 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. Realizou-se uma detecção dupla online nm DAD a 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais e no espectrômetro de massa (MS) ligado ao sistema de HPLC.

A detecção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte ESI e analisador de massa triplo-quadrupolo (QqQ), controlada pelo *software* Analyst 5.1. Foi utilizado ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400 °C, 40 psi). O nitrogênio foi utilizado como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio).

A tensão de spray dos íons foi definida a -4500 V em modo negativo. O detector MS foi programado para executar, em série de dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do íon produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os íons na amostra.

As configurações usadas foram: potencial de desagregação (DP) -450 V, potencial de entrada (EP) -6 V, energia de colisão (CE) -10 V. Os espectros foram gravados em modo de íon negativo entre m/z 100 e 1500. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos íons obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25 V e da energia de colisão (CES) 0 V.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção em comparação com padrões comerciais. Para análise quantitativa de compostos fenólicos, a curva de calibração foi obtida por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (1-100 $\mu\text{g/mL}$) de diferentes compostos padrões:

***T. majus*:** ácido *p*-cumárico ($y = 884.6x + 184,5$; $R^2 = 0,999$); ácido 5-O-cafeoilquínico ($y = 313.0x - 58,20$; $R^2 = 0,999$); miricetina ($y = 741.4x - 221,6$; $R^2 = 0,999$); quercetina-3-O-rutinosídeo ($y = 282.0x - 0,3459$; $R^2 = 1,000$); kampferol 3-O-rutinosídeo ($y = 239.2x - 10,59$; $R^2 = 1,000$).

***V. tricolor*:** isorhamnetina-3-O-rutinosídeo ($y = 10,647 + 258.42x$; $R^2 = 0,999$); quercetina-3-O-rutinosídeo ($y = 222.79x + 243,11$; $R^2 = 1,000$); kampferol 3-O-rutinosídeo ($y = 175.02x - 43,887$; $R^2 = 1,000$); apigenina-6-C-glicosídeo ($y = 246.05x - 309,66$).

A quantificação foi realizada com base nos resultados do DAD para áreas dos picos registrados em 280 nm ou 370 nm e os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

4.7.2 Antocianinas

As amostras liofilizadas ($\cong 0,5$ g) foram extraídas com 20 mL de metanol contendo 0.5 % de TFA (ácido trifluoracético) e filtradas através de papel Whatman nº 4 e os resíduos foram submetidos ao processo descrito acima. Os extratos obtidos foram evaporados a 35 °C para remover o metanol, e redissolvido em água.

Na purificação, a solução do extrato foi passada em coluna C-18 SepPak® Vac 3 cc (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), previamente ativada com metanol e depois com água, os açúcares e substâncias mais polares foram removidos por passagem de 10 mL de água e os pigmentos de antocianina foram eluídos com 5 ml de metanol:água (80:20, v /v) contendo 0,1% de TFA. O extrato foi concentrado sob vácuo, liofilizado, redissolvidos em 1 mL de metanol aquoso 20 % e filtrado através de filtros de cromatografias descartáveis de 0,22 µm para análise por HPLC.

Os extratos foram analisados de acordo com o procedimento descrito por Garcia-Marino e colaboradores (2010), a separação foi conseguida numa coluna C₁₈ da AQUA® (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) de fase inversa (5 µm, de 150 mm x 4,6 mm) a 35 °C. Os solventes utilizados foram: (A) 0,1 % TFA em água, e (B) 100 % de acetonitrila. O gradiente utilizado foi: isocrático 10 % B durante 3 min, 10 a 15% B por 12 min, isocrático 15 % B durante 5 min, 15 a 18 % B durante 5 min, 18 para 30% de B por 20 min e 30 a 35 % durante 5 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção foi realizada por DAD, utilizando 520 nm como comprimento de onda preferencial, e do equipamento de MS já descrito anteriormente. Usou-se ar de grau zero como gás nebulizador (40 psi) e gás turbo (600 °C) para secagem do solvente (50 psi). O nitrogênio serviu como a cortina (100 psi) e gás de colisão (alto). A energia de *spray* dos íons foi fixada nos 5000 V em modo positivo. Métodos EMS e ESI foram utilizados para aquisição de espectros de alta resolução e padrões de fragmentação dos íons precursores, respectivamente.

Os parâmetros definidos para o modo EMS foram: potencial de desagregação (DP) 41 V, potencial de entrada (EP) 7,5 V, energia de colisão (CE) 10 V, e os parâmetros para o modo de EPI foram: DP 41 V, EP 7,5 V, CE 10 V e energia de colisão (CES) 0 V.

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação

padrões disponível. Para a análise quantitativa, uma curva de calibração foi obtida por injeção de concentrações conhecidas 50-0.25 µg/mL):

T. majus: delfinidina-3-O-glicosídeo ($y = 557274x + 126,24$; $R^2 = 0,9997$), cianidina-3-O-glicosídeo ($y = 630276x - 153,83$; $R^2 = 0,9995$) e pelargonidina-3-O-glicosídeo ($y = 268748x - 71,423$; $R^2 = 1,0000$)

V. tricolor: delfinidina-3-O-glicosídeo ($y = 557274x + 126,24$; $R^2 = 0,9997$) e cianidina-3-O-glicosídeo ($y = 630276x - 153,83$; $R^2 = 0,9995$).

A quantificação foi realizada com base nos resultados do DAD para áreas dos picos registrados em 520 nm e os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

4.8 Avaliação do potencial antiproliferativos

A realização da avaliação do potencial antiproliferativos das amostras aconteceu no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- LQBA do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal.

A capacidade de inibição de crescimento celular foi avaliada de acordo com Guimarães e colaboradores (2013) e, em quatro linhagens de células tumorais humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular), utilizando o método da sulforrodamina B. As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS) inativado pelo calor e 2 mM do aminoácido glutamina.

A realização de todas as análises ocorreu em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar vertical AV-30/70 (TLStar Industrial, S.L., Terrassa, Espanha). Ao retirar o meio de cultura da caixa de cultura com as respectivas linhagens celulares,

adicionou-se 2 mL do meio de lavagem (HBSS) e, após a sua remoção adicionou-se 1,5 mL de tripsina com o objetivo de desagregar as células.

A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante o período de 3 min para desagregação completa das células. Em seguida adicionou-se 3 mL do meio de cultura para inativação da tripsina. Transferiu-se a suspensão celular para um tubo de falcon estéril para centrifugar (1200 rpm, 5 min.). Em 50 µL de suspensão foram adicionados 50 µL de solução de azul tripano para contagem do número de células na câmara de Neubauer.

Cada linhagem celular foi plaqueada numa densidade apropriada de $7,5 \times 10^3$ células/poço para MCF-7, NCI-H460 e HCT-15 e/ou $1,0 \times 10^4$ células/poço para HeLa e HepG2 em placas de 96 poços. Em seguida foram adicionados 5 diluições das amostras (10 µL) em cada poço, num total de três repetições, juntamente com o volume de células calculado anteriormente. O volume do poço foi completado com meio de cultura.

As microplacas foram seladas, protegidas da luz e armazenadas na incubadora durante o período de 48 h. Após este período, houve a execução do teste da sulforodamina B (SRB), no qual foram adicionados a cada poço 100 µL de ácido tricloroacético frio (TCA, 10 %), e reservada durante 60 min. a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. Posteriormente foram adicionados 100 µl da solução de SRB (01 % em 1 % ácido acético).

Após repouso de 30 min à temperatura ambiente, a microplaca foi lavada com ácido acético (1 %) para remoção do excesso de SRB e depois foi seca. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µL, pH 7,4) num agitador de microplacas Stat Fax-2100 (Awareness Technology, Inc, Palm, EUA). A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, EUA).

Os resultados foram expressos em valores de GI_{50} (concentração de amostra responsável pela inibição de 50 % do crescimento celular), através de uma curva de calibração e utilizou-se a elipticina como controle positivo.

4.9 Avaliação de citotoxicidade

A avaliação de citotoxicidade das amostras foi realizada no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- LQBA do Instituto Politécnico de Bragança – Portugal.

A avaliação de citotoxicidade das espécies de flores comestíveis do presente estudo baseou-se na metodologia descrita por Abreu e colaboradores (2011). Para execução do ensaio, preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, adquirido em matadouro local, denominada de *porcine liver primary cell culture* (PLP2).

Lavou-se os tecidos do fígado de porco em solução salina de Hank, na qual foi acrescentado 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Após lavagem, os tecidos do fígado de porco foram divididos em explantes (tecido vegetal para cultura *in vitro*) de 1x1 mm³. Colocou-se os explantes em caixas de cultura com meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino - FBS (10 %), aminoácidos não essenciais (2 mM), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram armazenados em incubadora a 37 °C. A troca do meio de cultura ocorreu a cada dois dias e o monitoramento da cultura de célula foi realizado com auxílio de microscópio invertido Eclipse Ts 100 (Nikon Instruments Inc., Japão).

Após o período de crescimento, as células foram transferidas para microplaca de 96 poços com uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço e cultivadas em meio DMEM com 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Posteriormente, adicionaram-se as células diferentes concentrações dos extratos das amostras e realizado o teste da sulforodamina B (SRB), conforme descrito no item da avaliação de atividade antitumoral.

Os resultados foram expressos em valores de CI_{50} (concentração de amostra responsável pela inibição de 50 % do crescimento celular), através de uma curva de calibração e utilizou-se a elipticina como controle positivo.

4.10 Avaliação colorimétrica

As análises da colorimetria foram realizadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN, São Paulo, SP – Brasil e utilizou-se as pétalas das flores comestíveis (FIG.18).

FIGURA 18 - Pétalas de *T. majus* (A); pétalas de *V. tricolor* (B)
Fonte: Autora da tese

A avaliação colorimétrica das pétalas das flores comestíveis deste estudo foi realizada conforme metodologia descrita por Takinami (2014) com adaptações. Nesta análise foram usadas flores com mesmo fenótipo (capuchinha – coloração laranja; amor- perfeito – coloração lilás), de maneira a obter resultados uniformes.

Utilizou-se o colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Camera Co. Osaka, Japão) (FIG 19), placa branco padrão de calibração CR-A43 e foram adotados os parâmetros L^* (0 = preto e 100 = branco) que define a luminosidade:

a* (negativo = verde e positivo = vermelho) e b* (negativo = azul e positivo = amarelo).

FIGURA 19 - Colorímetro Chroma Meter modelo CR-400
Fonte: Autora da tese

Para realização das análises posicionou-se o colorímetro na forma vertical sobre a amostra (pétala) em três zonas aleatórias, ocorreram quinze leituras de valores de cor (L^* , a^* e b^*) para cada amostra estudada e como padrão empregou-se o grupo controle (não irradiado), visando à obtenção de resultados coerentes. Nos cálculos dos resultados considerou-se o valor médio.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar a homogeneidade das variáveis investigadas e, quando detectado alguma diferença entre as médias dos grupos, foram comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5 % de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de tolerância ao processo de irradiação

O ensaio sobre a tolerância ao processamento por radiação das flores, das espécies *T. majus* e *V. tricolor*, investigou as alterações quanto aos aspectos físicos. As espécies analisadas apresentaram tolerância ao tratamento, uma vez que não se observou danos físicos visíveis, como: mudança de cor; queda das pétalas, sépala e murchamento das pétalas.

São classificadas como não tolerantes ao processamento espécies de flores de corte tratadas com radiação gama e aceleradores de elétrons nas doses de 0 a 1 kGy, que apresentam alterações físicas nas doses $\geq$ a 0,3 kGy (Tanabe & Dohino, 1995; Kikuchi, 2000).

Estudos observaram que a sensibilidade e tolerância à radiação ionizante variam de espécie para espécie de flor, desta forma recomenda-se não estabelecer parâmetros visíveis em relação à variedade (Kikuchi, 2003; Koike et al., 2011).

Sendo a dose mínima de radiação ionizante recomendada para a desinfestação de produtos alimentícios e agrícolas de 0,3 kGy, e estudos demonstram a intolerância de algumas espécies de flores ao processamento a partir desta dose, fica evidente que há necessidade da adoção de uma dose mínima para o tratamento de flores comestíveis, para garantir sua fitossanidade.

5.2 Métodos da atividade antioxidante

5.2.1 Ensaios com extratos de *Viola tricolor*

A atividade antioxidante do extrato da amostra *V. tricolor*, foi avaliada por meio dos ensaios: Poder redutor; *Folin-Ciocalteu*; Atividade captadora de radicais DPPH; Inibição da descoloração do β -caroteno e Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).

Os resultados da capacidade antioxidante do extrato de *V. tricolor* processado com radiação gama estão representados na FIG.20 e 21.

FIGURA 20 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *V.tricolor* irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de extrato

FIGURA 21 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *V.tricolor* irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em μmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato

Na FIG. 22 e 23 estão expressos os valores dos resultados obtidos na análise de extratos de *V. tricolor* tratadas por feixes de elétrons.

FIGURA 22 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *V.tricolor* irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de extrato

FIGURA 23 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *V.tricolor* irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em μmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato

Nos dados obtidos, as amostras irradiadas não apresentaram diferença significativa mostrou maior poder de redução ao comparar com o grupo controle, independente da fonte de radiação utilizada.

Contudo, os resultados das amostras tratadas com 0,8 kGy em acelerador de elétrons apontaram alto potencial na inibição da descoloração do β -caroteno da amostra estudada (6,61 mg/mL) em relação as demais doses aplicadas e controle. Visando confirmar tal resultado, repetiu-se o ensaio e obtiveram-se resultados semelhantes.

Efeitos semelhantes foram observando em trabalhos sobre a influência do processo de irradiação nas substâncias antioxidantes presentes em alimentos, tais estudos apresentaram aumento significativo no teor de fenólicos de amostras

de *Cammellia sinensis* e *Illx paraguariensis* tratadas com doses máximas de 10 kGy (Furgeri et al, 2009; Fanaro, 2013).

Entretanto, não é conhecido o motivo pelo qual tal fenômeno acontece, bibliografia para este tema é escassa, evidenciando a necessidade do aprofundamento sobre os efeitos do processamento com radiação, visto que pode haver um aumento da disponibilidade de substâncias relevantes para manutenção da saúde humana.

Na TAB.1 estão expressos os dados obtidos da atividade antioxidante para todas as doses aplicadas neste trabalho, de acordo com a fonte utilizada no processamento.

TABELA 1 - Atividade antioxidante expressa em valores de EC₅₀ de amostras de *V. tricolor* de acordo com a fonte de radiação

Ensaio	Valores de EC ₅₀ (mg/mL de extrato)	
	Fonte de irradiação	
	⁶⁰ CO	Acelerador de elétrons
Poder redutor	0,27±0,04 ^a	0,25±0,03 ^a
Folin – Ciocalteu*	176±12 ^a	177±21 ^a
DPPH	0,24±0,03 ^a	0,26±0,05 ^a
Inibição de descoloração do β-caroteno	1,6±0,4 ^a	3,1±2,00 ^b
ORAC**	215±24 ^a	180±31 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

n= 9.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística (p>0,05)

*Resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de extrato.

**Resultados expressos em µmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato.

Ao comparar os resultados dos ensaios realizados nesta pesquisa em relação às fontes de radiação utilizada, é notória a diferença encontrada na capacidade de inibição do β -caroteno nas amostras irradiada por acelerador de elétrons em relação as amostras processadas com radiação gama. Nos demais ensaios não houve diferenças estatísticas tanto nas diferentes doses de radiação assim como fonte utilizada.

5.2.2 Ensaio com extratos de *Tropaeolum majus*

A capacidade antioxidante do extrato de *Tropaeolum majus* foi determinada pela atividade captadora do radical DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β - caroteno e ORAC.

Os resultados obtidos nas avaliações da atividade antioxidante foram sistematizados nas FIG.24 - 27 correspondentes a cada fonte de radiação. Na TAB. 2 constam os dados em relação à fonte de radiação utilizada.

FIGURA 24 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *T. majus* irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de extrato

De acordo com os resultados obtidos para extratos de *T. majus* processada com ^{60}Co (raios gama), pode-se dizer que a atividade antioxidante foi afetada positivamente pelo processo, visto que foi observado um aumento da inibição de descoloração do β-caroteno nas amostras tratadas com as doses de 0,5 e 0,8 kGy. Todavia, no ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio - ORAC houve uma diminuição crescente dos valores conforme a dose, como pode-se observar na FIG. 25

FIGURA 25 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *T. majus* irradiadas por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em μmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato

Os resultados para amostra de *T. majus* processadas por feixes de elétrons são apresentados nas FIG. 26 e 27.

FIGURA 26 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *T.majus* irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de extrato

FIGURA 27 – Atividade antioxidante expressa em valores E_{50} de amostras de *T. majus* irradiadas por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação. Resultados expressos em µmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato

Na TAB.2 estão apresentados os resultados da amostra *T. majus* para as fontes aplicadas na execução do presente trabalho, assim como nos ensaios com *V. tricolor*, compilou-se todos os dados obtidos para as doses usadas conforme a fonte de radiação.

TABELA 2- Atividade antioxidante expressa em valores de EC₅₀ de amostras de *T. majus* irradiadas de acordo com a fonte de radiação

Valores de EC ₅₀ (mg/mL de extrato)		
Ensaio	Fonte de irradiação	
	⁶⁰ CO	Acelerador de elétrons
Poder Redutor	0,32±0,01 ^a	0,28±0,02 ^a
DPPH	0,64±0,05 ^a	0,67±0,05 ^a
Inibição de descoloração do β-caroteno	1,00±0,1 ^a	1,2±0,3 ^a
ORAC*	199±23 ^a	211±22 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

n= 9.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

*Resultados expressos em μmol de trolox equivalente (ET) por g de extrato.

Conforme resultados quanto à fonte de radiação, a atividade antioxidante, as amostras não foram afetadas nos ensaios executados.

De acordo com os resultados ficou evidente que os extratos de flores da *T. majus* são agentes redutores ativos, mostrando também potencial da atividade captadora de radical DPPH, seguida pela capacidade de inibição da descoloração do β-caroteno.

Portanto, de maneira geral, a capacidade antioxidante das flores de *T. majus* não sofreu influência negativa pelo processo de irradiação, independente da dose ou fonte de radiação usada.

5.3 Identificação de compostos fenólicos e antocininas por técnicas cromatograficas

5.3.1. Compostos fenólicos e antocianinas

5.3.1.1 Ensaios com extratos de *Tropaeolum majus*

A caracterização dos compostos fenólicos no extrato de *T. majus* foi realizada por análise de HPLC-DAD/ESI-MS, e os dados de tempo de retenção, comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) dos principais íons fragmentados - MS² para a identificação e quantificação dos derivados de compostos fenólicos do grupo controle (não irradiado) estão apresentados na TAB. 3.

TABELA 3 - Tempo de retenção (R_t), comprimentos de onda de absorção máxima, ($\lambda_{\max}$), dados dos espectros e massa e identificação de compostos fenólicos em extrato de *T. majus*

Composto	R_t (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íons Moleculares (m/z)	MS^2 (m/z)	Identificação
1	5.4	326	353	191(100), 179(69), 173(16), 135(44)	Ácido 3-O-cafeoilquínico
2	7.1	310	337	191(33), 163(100), 119(48)	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico
3	8.4	326	353	191(100), 179(3), 173(2), 135(3)	Ácido 5-O-cafeoilquínico
4	13.1	356	641	479(3), 317(100)	Miricetina-O-hexósido-O-hexosídeo
5	13.4	312	337	191(100), 173(10), 163(11), 119(5)	Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico
6	14.3	306	337	191(100), 173(9), 163(13), 119(2)	Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico
7	16.0	354	625	463(4), 301(100)	Quercetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo
8	18.5	348	609	447(8), 285(100)	Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo
9	12.9	524	627	303(100)	Delpinidina-O-dihexosídeo
10	15.3	518	611	287(100)	Cianidina-O-dihexosídeo
11	17.6	502	595	271(100)	Pelargonidina-3-O-soporosídeo

O espectro de massa e UV obtido por análise de HPLC-DAD/ESI-MS mostrou que a espécie *Tropaeolaceae* é caracterizada pela presença de ácidos fenólicos (derivados de hidroxicinamil) e flavonoides. A análise MS² revelou fragmentos de glicosídeos de flavonoides (miricetina, quercetina e kaempferol) e antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina). A presença de derivados de hidroxicinamoil e glicosídeos flavonoides são coerentes com os resultados obtidos por Bazylo e colaboradores (2013).

Em estudos fitoquímicos anteriores, a ocorrência de quercetina e kaempferol em *T. majus* foi relatada (Mietkiewska et al, 2004; Zanetti et al., 2004; Bazylo et al., 2013). A presença das antocianinas cianidina, delfinidina e pelargonidina em *T. majus* foi relatada por Garzón & Wrolstad (2009). Os perfis cromatográficos dos fenólicos registrados a 280 nm (A) e 370 nm (B) de amostra controle (não irradiados) são dados nas FIG.28 e 29.

FIGURA 28 -Cromatograma HPLC de compostos fenólicos de amostras não irradiadas (controle) de flores de *T. majus* registrado a 280 nm (A) e 370 nm (B). 1: Ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: Ácido 3-*p*-cumaroilquínico; 3: Ácido 5-O-cafeoilquínico; 4: Miricetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo; 5: Ácido *cis*-5-*p*-cumaroilquínico, 6: Ácido *trans*-5-*p*-cumaroilquínico, 7: Quercetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo; 8: Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo

FIGURA 29 -: Cromatograma HPLC de antocianinas de amostras não irradiadas (controle) de flores de *T. majus* registrado a 520 nm: 1: Delpinidina-O-dihexosídeo; 2: Cianidina-O-dihexosídeo; 3: Pelargonidina-3-O-soporosídeo

De acordo com dados espectrais de massa o composto 1 foi identificado como Ácido 3-O-cafeoilquínico, baseado na hierárquica de agrupamentos descrito por Clifford e colaboradores (2003). Adotando os mesmos critérios, identificou-se o composto 3 como Ácido 5-O-cafeoilquínico por comparação com padrão utilizado nesta análise e fragmentos de espectro de massa (MS^2) relatado por Clifford e colaboradores (2003; 2005).

O composto 2 foi identificado como o Ácido 3-p-cumaroilquínico, conforme pico base m/z 163 ([ácido p-cumárico]). Os compostos 5 e 6 foram identificados como Ácido 5-p-cumaroilquínico segundo o pico base m/z 191 e fragmentos do pico m/z 163, denominando tais compostos como os *cis* e *trans*, respectivamente (Clifford et al., 2003; Barros et al., 2012).

Na identificação do composto 4, se observou a presença de íon molecular $[MH-162]$ para o pico m/z 641, e fragmentos m/z 479 $[MH-162]$, com base nas características apresentadas e espectro UV, identificou-se o composto como Miricetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo.

O composto 7 revelou absorção e espectro de massa coerente com a Quercetina-glicosídeo, sendo assim, identificou-se o composto como Quercetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo. O composto 8 foi identificado como Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo, considerando a molécula (m/z 609) e fragmentos de MS^2 (m/z 447 e 285). Em estudos anteriores foi relatada a ocorrência de quercetina e Kaempferol glicosídeo em *T. majus* (De Medeiros et al., 2000; Mietkiewska et al., 2004; Zanetti et al., 2004).

Com relação as antocianinas os picos 1 e 3 (FIG. 28) foram identificados como delphinidina-O-dihexosídeo e pelargonidina-3-O-soporosídeo com base no espectro de massas, sendo a pelargonidina -3- O- soporosídeo identificada como a principal antocianina presente nas pétalas de *T. majus*.

A presença de compostos derivados de antocianinas (cianidina, delphinidina e pelargonidina) em flores de *T. majus* foi descrita por Garzón & Wrolstad (2009),

no estudo realizado por tais pesquisadores a maioria das tentativas de identificação foram para o composto Pelargonidina-3-O-soporosídeo. As proporções apresentadas de 29 % para delphinidina, 32 % para cianidina e 44 % para pelargonidina são coerentes com os valores relatados por Garzón & Wrolstad (2009).

Todavia, na presente pesquisa, a natureza e posição dos substituintes de açúcar das antocianinas detectadas não foram estabelecidas, embora, de acordo com os autores anteriores, o composto 3 poderia ser especulado como sendo a Pelargonidina-3-O-soporosídeo.

Em relação à influência do processamento de radiação nos compostos fenólicos identificados, os resultados obtidos estão expressos nas TAB.4 e 5, de acordo com a fonte de radiação aplicada (^{60}CO e acelerador de elétrons).

O composto Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo foi o composto mais abundante em todas as amostras analisadas, representando mais que 50 % de todos os compostos fenólicos quantificados. Por outro lado, o composto Ácido *trans*-5-*p*-cumaroilquínico apresentou a menor quantidade, com exceção, das antocianinas quantificadas. O composto Pelargonidina-3-O-soporosídeo foi o mais abundante.

TABELA 4 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *T. majus* processada por ^{60}Co , de acordo com a dose de radiação

Quantificação (mg/g de extrato)					
Composto	Identificação	Dose de radiação			
		controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
1	Ácido 3-O-cafeoilquínico	1,56±0,01 ^a	2,00±0,04 ^a	2,52 ±0,01 ^a	2,74±0,01 ^b
2	Ácido 3- <i>p</i> - cumaroilquínico	0,93±0,02 ^a	1,50±0,02 ^a	1,64±0,02 ^b	1,40±0,03 ^a
3	Ácido 5-O-cafeoilquínico	1,95±0,04 ^a	1,82±0,02 ^a	2,50±0,10 ^b	2,82±0,06 ^b
4	Miricetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo	0,62±0,01 ^a	0,33±0,01 ^b	0,56±0,01 ^a	0,58±0,02 ^a
5	Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,38±0,01 ^a	0,28±0,01 ^a	0,42±0,02 ^a	0,51±0,03 ^b
6	Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,29±0,01 ^a	0,33±0,03 ^a	0,41±0,01 ^a	0,42±0,02 ^a
7	Quercetina- O-hexosídeo-O-hexosídeo	0,78±0,01 ^a	0,46±0,05 ^b	0,73±0,05 ^a	0,90±0,09 ^a
8	Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo	9,80±0,10 ^a	4,80±0,02 ^b	6,00±0,03 ^a	12,0±0,04 ^a
Quantificação (mg/g de extrato)					
9	Delphinidina-O-dihexosídeo	3,20±0,1 ^a	1,30±0,1 ^a	2,30±0,90 ^a	1,72±0,90 ^a
10	Cianidina-O-dihexosídeo	0,21±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a	0,15±0,02 ^a	0,15±0,01 ^a
11	Pelargonidina-3-O-soporosídeo	5,80±0,10 ^a	2,30±0,08 ^b	2,70±0,09 ^b	4,70±0,10 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística ($p \leq 0,05$).

TABELA 5 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *T. majus* processada por acelerador de elétrons de acordo com a dose de radiação

		Quantificação (mg/g de extrato)			
Composto	Identificação	Dose de radiação			
		Controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
1	Ácido 3-O-cafeoilquínico	1,56±0,01 ^a	1,90±0,04 ^a	1,80 ±0,01 ^a	2,74±0,01 ^b
2	Ácido 3- <i>p</i> - cumaroilquínico	0,93±0,02 ^a	0,80±0,05 ^a	1,00±0,01 ^a	1,60±0,04 ^b
3	Ácido 5-O-cafeoilquínico	1,95±0,04 ^a	2,30±0,10 ^a	1,80±0,03 ^a	3,20±0,05 ^b
4	Miricetina-O-hexosídeo-O-hexosídeo	0,62±0,01 ^a	1,45±0,01 ^b	0,60±0,01 ^a	0,80±0,01 ^a
5	Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,38±0,01 ^a	0,50±0,02 ^a	0,40±0,01 ^a	0,70±0,01 ^a
6	Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,29±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a	0,30±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a
7	Quercetina- O-hexosídeo-O-hexosídeo	0,78±0,01 ^a	1,90±0,08 ^a	0,70±0,06 ^a	1,00±0,04 ^a
8	Kaempferol-O-hexosídeo-O-hexosídeo	9,80±0,10 ^a	10,0±0,10 ^a	12,00±0,10 ^a	15,0±0,04 ^b
		Quantificação (mg/g de extrato)			
9	Delphinidina-O-dihexosídeo	3,20±0,10 ^a	2,00±0,10 ^a	1,20±0,90 ^a	2,00±0,10 ^a
10	Cianidina-O-dihexosídeo	0,21±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a
11	Pelargonidina-3-O-soporosídeo	5,80±0,10 ^a	3,00±0,08 ^a	3,50±0,10 ^a	4,90±0,10 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística (p≤0,05).

Ao analisar os resultados, verifica-se o aumento dos compostos fenólicos presentes na amostra de *T. majus*, apresentando os maiores valores as amostras processadas com dose de 1,0 kGy, com exceção das antocianinas, que mostraram maior sensibilidade ao processo de irradiação.

TABELA 6. - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *T. majus* de acordo com a fonte de radiação

Quantificação (mg/g de extrato)			
Composto	Identificação	Fonte de radiação	
		⁶⁰ Co	Acelerador de elétrons
1	Ácido 3-O-cafeoilquínico	2,20±0,50 ^a	2,00±0,50 ^a
2	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	1,40±0,30 ^a	1,00±0,30 ^a
3	Ácido 5-O-cafeoilquínico	2,30±0,40 ^a	2,30±0,50 ^a
4	Miricetina-O-hexósido-O-hexosídeo	0,50±0,10 ^a	0,80±0,40 ^a
5	Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,40±0,10 ^a	0,50±0,10 ^a
6	Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,36±0,05 ^a	0,30±0,10 ^a
7	Quercetina-O-hexósido-O-hexosídeo	0,70±0,20 ^a	1,10±0,50 ^a
8	Kaempferol-O-hexóide-O-hexosídeo	8,00±3,00 ^a	14,00±4,00 ^a
Quantificação (mg/g de extrato)			
9	Delphinidina-O-dihexosídeo	2,00±1,00 ^a	2,00±1,00 ^a
10	Cianidina-O-dihexosídeo	0,16±0,04 ^a	0,16±0,04 ^a
11	Pelargonidina-3-O-soporosídeo	4,00±1,00 ^a	4,00±1,00 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

5.3.1.2 Ensaios com extratos de *Viola tricolor*

A bioatividade de flores comestíveis é altamente relacionada com a sua composição em compostos fenólicos (Vukics et al., 2008b;. Piana et al., 2013). Por conseguinte, o perfil fenólico de *V. tricolor* foi caracterizado por análise de HPLC-DAD-ESI/MS, comparando tempo de retenção, comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) e principais íons fragmentados - MS² na tentativa de identificar e quantificar os derivados de compostos fenólicos (TAB. 7 e FIG. 30 e 31).

TABELA 7 - Tempo de retenção (R_t), comprimentos de onda de absorção máxima, ($\lambda_{\max}$), dados dos espectros de massa e identificação de compostos fenólicos em extrato de *V. tricolor*

Composto	R_t (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íons Moleculares (m/z)	MS^2 (m/z)	Identificação
1	14.3	228, 260, 306sh, 358	771	315(100)	Isorhamnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo
2	15.2	256, 266sh, 300sh, 356	755	609(2), 591(3), 489(4), 343(2), 301(100)	Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo
3	15.5	232, 266, 306sh, 350	623	315(100)	Isorhamnetina-3-O-(6-O-ramnosil-galactósídeo)
4	15.7	256, 266sh, 298sh, 354	797	755(20), 489(3), 301(100)	Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo
5	16.1	266, 300sh, 348	739	593(3), 285(100)	Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo
6	16.4	258sh, 272, 346	577	517(2), 487(15), 473(30), 457(27), 383(24), 353(33)	Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo)
7	16.6	254, 266sh, 302sh, 354	769	623(12), 605(12), 503(8), 357(8), 315(100)	Isorhamnetin-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo)
8	16.9	258, 266sh, 300sh, 354	609	301(100)	Quercetina-3-O-rutinosídeo
9	18.5	266, 300sh, 348	593	285(100)	Kaempferol-3-O-rutinosídeo
10	18.9	254, 266sh, 302sh, 354	623	315(100)	Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo
11	18.1	282, 520	595	449(11), 287(100)	Cianidina-3-O-rutinosídeo
12	26.7	282, 524	611	465(15), 303(100)	Delpinidina-3-O-rutinosídeo
13	28.1	280,310sh, 530	919	757(26), 465(12), 303(100)	Delfinidina-3-(4"-p-cumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo
14	31.5	282,312sh, 522	903	741(36), 449(12), 287(100)	Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo

FIGURA 30- Cromatograma HPLC de compostos fenólicos de amostras não irradiadas (controle) de flores de *V. tricolor* registrado a 370 nm: **1:** Isoramnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo; **2:** Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnósídeo; **3:** Isoramnetina-3-O-(6-O-ramosil-galactosídeo); **4:** Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucoídeo)-7-O-ramnosídeo; **5:** Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo, **6:** Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo, **7:** Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo); **8.** Quercetina-3-O-rutinosídeo; **9** Kaempferol-3-O-rutinosídeo; **10** Isoramenetina -3- O- rutinosídeo

FIGURA 31 - Cromatograma HPLC de antocianinas de amostras não irradiadas (controle) de flores de *V. tricolor* registrada a 370 nm (A). 11.: Cianidina-3-O-rutinosídeo; 12: Delpinidina-3-O-rutinosídeo; 13: Delfinidina-3-(4''-p-cumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo; 14. Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo

Segundo os dados obtidos na caracterização e identificação dos compostos fenólicos presentes na amostra de *V. tricolor* observa-se a presença de classes de flavonoides, particularmente a flavona (composto 6, um derivado de apigenina), flavonol (derivados de isoramnetina, quercetina e kaempferol) e antocianina (derivadas de delphinidina e cianidina).

A análise dos íons fragmentos sugere que todos os compostos presentes, exceto o composto derivado de apigenina (C-glicosilada), são remanescentes de glicosídeo. A presença de glicosídeos flavonoides em *Viola tricolor* foi relatada anteriormente por diversos pesquisadores (Vukics et al., 2008a; Vukics et al., 2008b; Gonçalves et al., 2012)

Os glicosídeos flavonoides dos compostos 1-5 e 7-10 apresentam espectro UV de derivados de flavonol-3-O-glicosil. Os fragmentos dos íons m/z 285, 301 ou 315 foram observados em abundância, o que pode corresponder a aglicona desprotonada de kaempferol, quercetina e isoramnetina, respectivamente.

A fragmentação dos compostos 1 (m/z 771), 3 (m/z 623), 7 (m/z 769) e 10 (m/z 623), mostrou o mesmo pico base m/z 315 coerente de derivados de isoramnetina, apoiado pelo seu espectro. O composto 10 foi identificado como Isoramnetina-3-O-rutinosídeo, segundo seu tempo de retenção, massa e UV-Vis em comparação com padrão comercial. Entretanto, o composto 3 apresentou mesmo espectro de massa do composto 10, porém, eluído mais cedo.

O espectro de massa do composto 7 (m/z 769) sugerem a presença de um hexósilo e ligados a isoramnetina. Ferreres e colaboradores (2008) fizeram tentativas de identificação de composto com espectro de UV semelhante em sementes de *Catharanthus roseus*, sendo identificado como Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo).

Os compostos 2 (m/z 755), 4 (m/z 797) e 8 (m/z 609) revelaram absorção e espectro de massa coerente com quercetina-glicosídeo. O composto 8 foi identificado como Quercetina-3-O-rutinosídeo, conforme o seu tempo de retenção,

massa em relação ao padrão comercial. Enquanto o composto 2 foi caracterizado como Quercetina-3-O-(6-O-rhamnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo. O composto 4 apresentou peso molecular superior ao composto 2, que aponta a forma acetilada da Quercetina-3-O-(6-O-rhamnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo.

Os espectros UV e de massa dos compostos 5 e 9 parecem corresponder a derivados de Kampferol. O Composto 9 foi identificado como Kampferol 3-O-rutinosídeo por comparação das suas características espectrais e cromatográficas em relação ao padrão comercial. O íon molecular do composto 5 indica um glicósido kaempferol e como a partir dos dados obtidos não foi possível concluir sobre a natureza e posição da ligação dos açúcares, a tentativa de identificação do composto foi atribuída ao Kampferol-3-O-(6-O-ramnosyl-glucosídeo)-7-O-ramnoídeo.

O composto 6 revelou um íon molecular m/z 577, libertando íons do fragmento MS^2 m/z 517, 487, 473, 457, 383, 113 e 353, os quais são característicos de flavonas-C-glicosiladas (Cuyckens & Claeys, 2004; Ferreres, et al., 2003). Esses dados estão de acordo com a estrutura de violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo), composto identificado em *V. tricolor* e que tem sido consistentemente relatado em estudos (Vukics et al., 2008a; Vukics et al., 2008b)

Os compostos 11-14 foram identificados como derivados de antocianinas (cianidina e delphinidina), com base na sua absorção e espectros de massa em Cianidina 3-O-rutinosídeo, Delphinidina 3-O-rutinosídeo, Delphinidina-3-(4"-*p*-coumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo (violanina) e Cianidina-3-(coumaroil) - metilpentosil-hexosil-5-hexosida, respectivamente, em flores de *Viola odorata* por Karioti e colaboradores (2011).

Os efeitos do processamento por radiação nos compostos fenólicos presentes nas amostras de *Viola tricolor* foram avaliados em relação à fonte de radiação utilizada (^{60}Co e aceleradores de elétrons) e as doses aplicadas (TAB. 12 e 13).

Em geral, as amostras irradiadas com ^{60}Co apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos independentemente da dose utilizada. Além disso, os compostos foram favorecidos quando se utiliza a dose de 1,0 kGy, independente da fonte de radiação utilizada.

TABELA 8 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *V. tricolor* processada por ^{60}Co de acordo com a dose de radiação

		Quantificação (mg/g de extrato)			
Composto	Identificação	Dose de radiação			
		controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
1	Isoramnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo	6,0±0,1 ^a	6,3±0,1 ^a	9,5 ±0,3 ^b	7,1±0,5 ^a
2	Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	46,0±1,0 ^a	53,0±0,8 ^a	61,0±1,0 ^a	69,0±1,0 ^b
3	Isoramnetina-3-O-(6-O-ramosil-galactosídeo)	5,2±0,1 ^a	4,8±0,3 ^a	6,0±0,2 ^a	7,6±0,3 ^a
4	Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	12,6±0,4 ^a	14,0±0,5 ^a	15,0±0,4 ^b	12,0±0,3 ^a
5	Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	3,0±0,2 ^a	3,2±0,2 ^a	3,9±0,2 ^a	4,1±0,2 ^b
6	Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo)	2,1±0,1 ^a	1,8±0,1 ^a	2,3±0,1 ^a	2,3±0,1 ^a
7	Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo)	5,1±0,2 ^a	6,0±0,3 ^a	7,3±0,3 ^a	7,7±0,4 ^b
8	Quercetina-3-O-rutinosídeo	28,0±1,0 ^a	29,0±1,0 ^a	24,0±0,5 ^a	30,0±0,6 ^b
9	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	2,5±0,2 ^a	3,0±0,2 ^a	3,4±0,2 ^a	2,6±0,1 ^a
10	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo	1,6±0,1 ^a	2,0±0,2 ^a	1,7±0,1 ^a	1,4±0,1 ^a
		Quantificação (mg/g de extrato)			
11	Cianidina-3-O-rutinosídeo	0,70±0,04 ^a	1,10±0,01 ^a	1,10±0,20 ^a	1,20±0,20 ^b
12	Delpinidina-3-O-rutinosídeo	3,30±0,20 ^a	4,00±0,02 ^a	4,50±0,32 ^a	4,80±0,20 ^b
13	Delfinidina-3-(4"- <i>p</i> -cumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo	10,2±0,50 ^a	12,00±0,20 ^a	13,3±0,06 ^a	14,4±0,40 ^b
14	Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo	6,60±0,20 ^a	9,00±0,30 ^b	6,60±0,20 ^a	7,70±0,30 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística ($p \leq 0,05$).

TABELA 9 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *V. tricolor* processada por aceleradores de elétrons de acordo com a dose de radiação

Composto	Identificação	Quantificação (mg/g de extrato)			
		Dose de radiação			
		controle	0,5 kGy	0,8 kGy	1,0 kGy
1	Isoramnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo	6,00±0,1 ^a	5,50±0,3 ^a	6,40 ±0,4 ^a	5,8±0,4 ^a
2	Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	46,00±1,0 ^a	43,00±1,0 ^a	46,00±1,0 ^a	49,0±0,8 ^b
3	Isoramnetina-3-O-(6-O-ramosil-galactosídeo)	5,20±0,1 ^a	4,00±0,4 ^a	5,10±0,3 ^a	5,50±0,4 ^a
4	Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	12,60±0,4 ^a	13,00±0,4 ^a	13,60±0,7 ^a	12,00±0,3 ^a
5	Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	3,00±0,2 ^a	3,00±0,1 ^a	3,30±0,2 ^a	3,20±0,2 ^a
6	Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnosídeo)	2,10±0,1 ^a	2,00±0,1 ^a	2,00±0,1 ^a	2,00±0,1 ^a
7	Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo)	5,10±0,2 ^a	5,10±0,3 ^a	4,70±0,2 ^a	5,20±0,3 ^a
8	Quercetina-3-O-rutinosídeo	28,00±1,0 ^a	29,00±0,7 ^a	22,00±0,6 ^a	30,00±0,4 ^b
9	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	2,50±0,2 ^a	2,10±0,1 ^a	0,73±0,2 ^b	2,40±0,1 ^a
10	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo	1,60±0,1 ^a	1,00±0,1 ^a	1,10±0,2 ^a	1,20±0,2 ^a
Quantificação (mg/g de extrato)					
11	Cianidina-3-O-rutinosídeo	0,7±0,04 ^a	0,5±0,30 ^a	0,4±0,05 ^a	0,1±0,10 ^b
12	Delpinidina-3-O-rutinosídeo	3,3±0,20 ^a	2,7±0,20 ^a	2,3±0,20 ^a	3,0±0,31 ^a
13	Delfinidina-3-(4"- <i>p</i> -cumaroil)-rutinsídeo-5-glucosídeo	10,2±0,50 ^a	8,0±0,40 ^a	6,5±0,50 ^a	8,5±0,50 ^a
14	Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo	6,7±0,20 ^a	5,7±0,30 ^a	2,7±0,20 ^b	5,0±0,30 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indica diferença estatística ($p \leq 0,05$).

TABELA 10 - Quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos de flores *V. tricolor* de acordo com a fonte de radiação

		Quantificação (mg/g de extrato)	
Composto	Identificação	Fonte de radiação	
		⁶⁰ Co	Acelerador de elétrons
1	Isoramnetina-hesoxil-pentosil-hexosídeo	7,0±1,0 ^a	6,0±1,0 ^a
2	Quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	57,0±9,0 ^a	46,0±2,0 ^a
3	Isoramnetina-3-O-(6-O-ramosil-galactosídeo)	6,0±1,0 ^a	5,0±1,0 ^a
4	Acetil-quercetina-3-O-(6-O-ramnosilglucosídeo)-7-O-ramnosídeo	13,0±1,0 ^a	12,0±1,0 ^a
5	Kaempferol-3-O-(6-O-ramnosilglucósido)-7-O-ramnosídeo	3,6±0,5 ^a	3,1±0,2 ^a
6	Violantina (apigenina-6-C-glucosil-8-C-ramnósídeo)	2,1±0,3 ^a	1,9±0,2 ^a
7	Isoramnetina-3-O-(2,6-di-O-ramosil-glucosídeo)	6,0±1,0 ^a	5,0±0,3 ^a
8	Quercetina-3-O-rutinósídeo	28,0±2,0 ^a	28,0±3,0 ^a
9	Kaempferol-3-O-rutinósídeo	2,9±0,4 ^a	2,2±0,2 ^a
10	Isoramnetina-3-O-rutinósídeo	1,6±0,3 ^a	1,3±0,3 ^a
Quantificação (mg/g de extrato)			
11	Cianidina-3-O-rutinosídeo	1,0±0,2 ^a	0,6±0,2 ^a
12	Delpinidina-3-O-rutinosídeo	4,0±1,0 ^a	2,8±0,4 ^a
13	Delfinidina-3-(4"- <i>p</i> -cumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo	12,0±2,0 ^a	8,0±1,0 ^a
14	Cianidina-3-(cumaroil)-metilpentosil-hexosil-5-hexosídeo	7,0±1,0 ^a	5,0±1,0 ^a

Valores representam a média±desvio padrão.

Letras iguais na mesma linha indica igualdade estatística (p>0,05).

5.4 Avaliação do potencial antiproliferativo

5.4.1 Ensaios com extratos de *Tropaeolum majus*

Os resultados obtidos nos ensaios dos extratos da espécie *T. majus* (FIG.32 e 33), foram semelhantes aos da análise com flores de *V. tricolor* - amor perfeito.

Independente da dose ou fonte de radiação aplicada, a maioria das amostras não apresentou atividade antitumoral para as quatro linhagens celulares, assim como, não demonstraram toxicidade ($>400 \mu\text{g/mL}$). Na linha celular HepG2 (carcinoma hepatocelular) as amostras apresentaram valores menores que $400 \mu\text{g/mL}$, no entanto, próximos a este valor, apontando a baixa atividade antiproliferativa da amostra.

FIGURA 32–Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de *T. majus* processados por ^{60}Co , expressa em valores de Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

FIGURA 33—Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de *T. majus* processados por acelerador de elétrons, expressa em valores de Cl_{50} (µg/mL)

5.4.2 Ensaio com extratos de *Viola tricolor*

A espécie *V. tricolor* estudada, mostrou baixa atividade antitumoral para as quatro linhagens celulares, independente da dose ou fonte de radiação aplicada (FIG.34 e 35). No ensaio de citotoxicidade efetuado em células primárias de fígado de porco não tumoral (PLP2), as flores de amor perfeito não apresentaram toxicidade (>400 µg/mL) independente da dose ou fonte de radiação aplicada.

FIGURA 34—Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de *V. tricolor* processados por ^{60}Co , expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

FIGURA 35—Atividade antiproliferativa e citotoxicidade dos extratos de *V. tricolor* processados por acelerador de elétrons, expressa em valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Nos resultados apresentados foi possível verificar que a inibição do crescimento das células tumorais das linhagens celulares estudadas foi baixa, pois os valores obtidos estão próximos ou maiores a $>400 \mu\text{g/mL}$, tendo em vista que o valor $>400 \mu\text{g/mL}$ é utilizado como referência para indicar ou não atividade antitumoral de amostras.

Quando comparamos os resultados de ambas às espécies de flores com o padrão (elipticina) aplicado como controle positivo desta avaliação, fica notório o baixo poder de inibição de crescimento de células tumorais das amostras estudadas.

Contudo, pesquisas sobre a bioatividade de diferentes espécies de flores, como Guimarães e colaboradores (2013) apontaram o potencial de inibição do crescimento celular para as linhagens celulares utilizadas no presente estudo (MCF-7; NCI-H460; HeLa e HepG2). A espécie *Chamaemelum nobile* L., conhecida popularmente como camomila romana, apresentou atividade antitumoral para todas as linhas celulares estudadas.

Carocho e colaboradores (2014) estudaram o potencial antitumoral de flores de *Castanea sativa* M. e os resultados obtidos para infusão desta espécie comprovaram sua potencialidade de inibir o crescimento de células das linhagens HCT15 (carcinoma de cólon) e HepG2.

Desta maneira, compreende-se que algumas espécies de flores podem ser promotoras na redução ao risco de doenças como o câncer. No caso das flores analisadas na presente pesquisa, os resultados não mostraram ação na inibição do crescimento de células cancerígenas, ou seja, atividade antitumoral, todavia os resultados dos ensaios de atividade antioxidante e compostos fenólicos demonstraram o alto potencial como fontes de substâncias redutoras do estresse oxidativo como flavonoides e antocianinas.

5.5 Análise colorimétrica

De acordo com Della (1989) a aparência é uma característica sensorial dos alimentos, composta de cor, o brilho, o tamanho, textura e forma. A cor está relacionada com os alimentos frescos de qualidade, tornando-se o primeiro critério aplicado para a sua aceitação ou rejeição por parte dos consumidores.

Os parâmetros aplicados na análise colorimétrica das flores comestíveis foram:

L* (0 = preto e 100 = branco) que define a luminosidade

a* (negativo = verde e positivo = vermelho)

b* (negativo = azul e positivo = amarelo).

5.5.1 Ensaios de *Tropaeolum majus*

As análises de colorimetria das pétalas de *T. majus* estão representadas nas FIG. 36 e 37, de acordo com a fonte de irradiação. Podemos observar que as amostras irradiadas permaneceram com as mesmas características da amostra controle. Nesta análise utilizaram-se flores de coloração laranja.

FIGURA 36– Representação gráfica da análise de pétalas de *T.majus* processadas por ^{60}Co

FIGURA 37– Representação gráfica da análise de pétalas de *T.majus* processadas por aceleradores de elétrons

De acordo com resultados apresentados para os parâmetros analisados (L^* , a^* e b^*) observou-se o favorimento da cor em relação ao grupo controle, independente do processamento por radiação.

5.5.2 Ensaios de *Viola tricolor*

Os resultados obtidos das análises colorimétrica das pétalas de *V. tricolor* são apresentados nas FIG. 38 e 39, de acordo com a fonte de radiação. Nesta análise utilizaram-se flores de coloração lilás.

FIGURA 38– Representação gráfica da análise de pétalas de *V.tricolor* processadas por ^{60}Co

FIGURA 39– Representação gráfica da análise de pétalas de *V tricolor* processadas por aceleradores de elétrons

Segundo os resultados da análise das pétalas, o parâmetro L* (luminosidade) mostrou que a amostra irradiada com dose de 1,0 kGy (independente da fonte de irradiação) diferem significativamente das demais amostras. Contudo, nos demais parâmetros (a* e b*) observou-se um aumento dos parâmetros de cor em relação ao controle.

Pode-se atribuir tais resultados ao favorecimento de alguns compostos fenólicos pelo processamento por radiação, demonstrado nas análises cromatográficas das amostras.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os referenciais e ensaios expostos no presente trabalho, conclui-se que o processamento das amostras por radiação não comprometeu os compostos bioativos presentes nas espécies de flores comestíveis *T. majus* e *V. tricolor* estudadas. Portanto, a irradiação das mesmas demonstrou-se uma tecnologia viável para preservar a qualidade de flores comestíveis. Entretanto não foi observada atividade antiproliferativas assim como toxicidade.

Entre as doses aplicadas, a dose 0,8 kGy demonstrou melhores características de conservação (física e química) quando comparada com o grupo controle, o que pode-se que afirmar a utilização de aceleradores de elétrons, uma vez que há se visto uma tendência mundial na aplicação desta tecnologia na conservação de alimentos.

7 TRABALHOS FUTUROS

Em função das conclusões obtidas com este trabalho, surgem questões tais como: qual seria a aceitação do público em relação às características sensoriais das flores comestíveis tratadas por irradiação? Há influência no perfil nutricional em função do tratamento com radiação ? A vida de prateleira dos alimentos, alvo deste estudo, seria alterada após o processamento por radiação?

REFERENCIAS

1. ABREU, R. M. V.; FERREIRA, I. C. F. R.; CALHELHA, R. C.; LIMA, R. T.; VASCONCELOS, M. H.; ADEGA, F.; CHAVES, R.; QUEIROZ, M. J. R. P. Anti-heptocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothien-2-yl pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR Studies. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 46. p. 5800-5806, 2011.
2. AIEA (Technical Report). Agência Internacional de Energia Atômica- Food irradiation with emphasis on process control and acceptance in Asia. www.iaea.org. 2004
3. ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. *Trends Food Sci Tech*, v. 20, p. 201-212, 2009.
4. AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, v. 84, p. 551 – 562, 2004.
5. ANDERSON, R. Edible flowers - *University of Kentucky* – College of Agriculture, 2009.
6. ANDERSON, R.; SCHNELLE, R.; BASTIN, S. Edible flowers – University of Kentucky – *College of Agriculture, Food and Environment*, 2012. Disponível em: <<http://www.uky.edu/Ag/CDBREC/introsheets/edible.pdf>> Acesso em: 02 julho 2014.
7. ANTOLOVICH M.; PRENZLER P.D.; PATSALIDES E.; MCDONALD S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, v. 127, p. 183–198, 2002.
8. ANTONIO, A. L.; FERNANDES, A.; BARREIRA, J. C. M.; BENTO, A.; BOTELHO, M. L.; FERREIRA, I. C. F. R. Influence of gamma irradiation in the antioxidant potential of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) fruits and skins. *Food Chem. Toxicol.*, v. 49, p. 1918–1923, 2011.
9. ANTONIO, A. L.; CAROCHO, M.; BENTO, A.; QUINTANA, B.; BOTELHO, M. L.; FERREIRA, I. C. F. R. Effects of gamma radiation on the biological, physico-chemical, nutritional and antioxidant parameters of chestnuts – A review. *Food Chem. Toxicol.*, v. 50, p. 3234-3242, 2012.

10. ARAÚJO, M. M. **Efeito do processamento por ionização, calor e micro-ondas na degradação do ácido fólico**. 2012 – Tese (Doutoramento) – Instituto Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 148 p. Disponível em < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-29062012-134537/pt-br.php>>. Acesso em: 20 jan 2013.
11. AZZAM, E.I.; JAY-GERIN, J.P.; PAIN, D.; Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Lett.**, v. 327, p. 48-60, 2012.
12. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agrindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, v.99, p. 191-203, 2006.
13. BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de, C. G.; de PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutri., Campinas**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
14. BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; Pereira, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. **Food Chem.**, v. 107, p. 1106–1113, 2008.
15. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006
16. BARROS, L.; FALCÃO, S.; BAPTISTA, P.; FREIRE, C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chem.**, v. 111, p. 61-66, 2008.
17. BARROS, L.; CABRITA, L.; VILAS BOAS, M.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. **Food Chem.**, v. 127, p. 1600-1608., 2011.
18. BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R., SANTOS-BUELGA, C. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 1576-1582, 2012.
19. BASTIN, S. Edible flowers. University of Kentucky - **Extension Specialis**, 2009. Disponível em: <<http://www.ca.uky.edu/hes/fcs/factshts/FN-SSB.025.pdf>> Acesso em: 20 janeiro 2011.
20. BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos relacionados dos alimentos no contexto de processos inflamatórios à obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

21. BAZYLKO, A.; GRANICA, S.; FILIPEK, A.; PIWOWARSKI, J.; STEFAŃSKA, J.; OSIŃSKA, E.; KISS, A. K. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Ind. Crop. Prod.**, v. 50, p. 88-94, 2013.
22. BAZYLKO, A.; PARZONKOA, A.; JEZ, W.; OSINSKA, E.; KISS, A. K. Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. **Ind. Crop. Prod.**, v. 55, p. 19-24, 2014.
23. BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **Eur. Food Res. Technol.** v. 219, p. 561-571, 2004.
24. BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
25. BEHRENS, J. H.; BARCELLOS, M. N.; FREWER, L. J.; NUNES, T. P.; LANDGRAF, M. Brazilian consumer views on food irradiation. **Innov. Food Sci. Emerg.**, v.10, p.383-389, 2009.
26. BERKER, K. I.; GÜCLÜ, K.; TOR, I.; APAK, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, v. 72, p. 1157–1165, 2007.
27. BLASCO, A. J.; ROGERIO, M. C.; GONZALEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical Index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal. **Anal. Chim. Acta**, v. 539, p. 237-244, 2005.
28. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Varela, 1992.
29. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução a química de alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003.
30. BOARATTI, M.F.G. **Análise de perigos e pontos críticos de controle para alimentos irradiados no Brasil**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares –IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em < <http://www.ipen.br/biblioteca/teses/22982.pdf>> Acesso em: 03 jan 2010.
31. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Trends Food Scie. Tech.**, v. 28, p. 25–30, 1995.
32. BRASIL. **Regulamento técnico para irradiação de alimentos. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 21**, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2001.

33. CAROCHO, M. S. **Caracterização química de fungos micorrízicos e plantas de *Pinus pinaster* ao longo dos primeiros estádios de simbiose.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnico de Bragança – IPB, Portugal. 106 p. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10198/8627> > Acesso em: 20 junho 2013.
34. CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v. 51, p. 15-25, 2013.
35. CAROCHO, M.;B, CALHELA, R.; QUEIROZ , M. J. R. P.; BENTO, A.; MORALES, P.; SOKOVIC, M. FERREIRA, I. C. F. R. Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. **Ind. Crop. Prod.**, v. 62, p. 42-46, 2014.
36. CARVALHO, E.; FRASER, P. D.; MARTENS, S. Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. **Food Chem.**, v. 139, p. 744–752, 2013.
37. CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M. DE L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chem.**, v.113, p. 859–871, 2009.
38. CHEN, C. C.; LIU, L. K.; HSU, J. D.; HUANG, H. P.; YANG, M. Y.; WANG, C. J. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. **Food Chem.**, v. 91, p. 691-607, 2005.
39. CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. da C.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chem.**, v. 127, p. 419-426, 2011.
40. CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. A. A hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, p. 2900-2911, 2003.
41. CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. A. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, p. 3821-3832, 2005.
42. CLIFFORD, M. N.; BROWN, J. E. Dietary Flavonoids and Health — Broadening the Perspective In: Andersen, Ø.M.; Markham, K. R. (Ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC - Press, 2006. p. 397–411.
43. COULTATE, T. P. **Manual de química y bioquímica de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1998.
44. CREASY, R. **The edible flowers garden**. 1.ed. Boston: Periplus Editions, 1999.

45. CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
46. CUNHA, C. de S.; CASTRO, C. F. de; PIRES, C. P.; PIRES, I. S. C.; HALBOTH, N. V.; L. S. Influência da textura e do sabor na aceitação de cremes de aveia por indivíduos de diferentes faixas etárias. **Alim. Nutr.**, v. 20. n. 4, p. 573-580, 2009
47. CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, p. 1-15, 2004.
48. DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent Advances in Polyphenol Research**, v. 1. New Jersey: Blackwell Publishing, 2008.
49. DELINCEE, H. **Chemical and Biological Methods for the Identification of Irradiated Food**, European School of Advanced Studies on Nuclear and ionizing Radiation Technologies: University of Pavia , Italy, p. 1- 6, 2005.
50. DELLA MODESTA, R. C. **Análise sensorial de alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1989.
51. DE MEDEIROS, J. M.; MACEDO, M.; CONTANCIA, J. P.; NGUYEN, C.; CUNNINGHAM, G.; MILES, D. H. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 157-165, 2000.
52. DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant phenolics methods in plant biochemistry**, 2. ed. London: Academic Press Limited. 1993.
53. DIEHL, J. F. Food irradiation - past, present and future. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 211–215, 2002.
54. DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**, Curitiba: Ed. Universitária Champagnat, 1996.
55. EHLERMANN, D. A. E. The RADURA-Terminology and food irradiation **Food Control**, v. 20, p. 526–528, 2000.
56. FANARO, G. B.; ARAÚJO, M. M.; THOMAZ, F. S.; DUARTE, R. C.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Comparison of treatment in soybean grains between ^{60}Co and e-beams applications. In: International Nuclear Atlantic conference (INAC) - VIII ENAN, 2007. **Proceedings...** Santos, SP. Associação Brasileira de Energia Nuclear (ABEN), 2007.
57. FANARO, G. B.; DUARTE, R. C.; ARAÚJO, M. M.; PURGATTO, E.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Evaluation of gamma-radiation on green tea odor volatiles. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 80, p. 85-88, 2011.
58. FANARO, G. B. **Efeito da radiação ionizante em chás da planta *Camellia sinensis* irradiadas com diferentes atividades de água**. 2013 – Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-

CNEN/SP, São Paulo. 108p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-08072013-100338/pt-br.php>. Acesso em: 15 novembro 2013.

59. FARKAS, J. Irradiation for better foods. *Trends Food Scie. Tech.*, v. 17, p. 148-152, 2006.
60. FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. History and future of food irradiation. *Trends Food Scie. Tech.*, v. 20, p. 1-6, 2011.
61. FELIPPE, G. M. *Entre o jardim e a horta: as flores que vão para a mesa*. 2.ed. São Paulo: Senac, 2004.
62. FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A. de; PETTINELLI, M. L. C. de V.; SILVA, M. A. A. P. da; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. de M. *Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos*. Campinas: SBCTA, 2000.
63. FERREIRA, I. C. F. R., ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise* - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro, 2007.
64. FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; ABREU, R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.*, v. 16, p. 1543–1560, 2009.
65. FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A. de; PETTINELLI, M. L. C. de V.; SILVA, M. A. A. P. da; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. de M. *Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos*. Campinas: SBCTA, 2000.
66. FERRERES, F.; PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; SOTTOMAYOR, M. New Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of *Catharanthus roseus*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 9967-9974, 2008.
67. FINDLAY, D. J. S.; PARSON, T. V.; SENÉ, M. R. Irradiation of food and the induction of radioactivity. *Radiat Phys Chem.*, v. 42, n. 1-3, p. 417-420, 1993.
68. FU, M. R.; MAO, L. C. In vitro antioxidant activities of five cultivars of daylily flowers from China. *Nat. Prod. Res.*, v. 22, p. 584 –591, 2008.
69. FURGERI, C.; NUNES, T. C. F.; FANARO, G. B.; SOUZA, M. F. F.; BASTOS, D. H. M.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Evaluation of phenolic compounds in maté (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 78, p. 639-641, 2009.
70. GARCÍA-MARINO, M.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Colour and pigment composition of red wines obtained from comaceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal. Chim. Acta*, v. 660, p. 134-142, 2010.

71. GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. Major anthocyanins and antioxidant activity of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). **Food Chem.**, v. 114, p. 44-49, 2009.
72. GEGNER, L. Edible flowers. **The National Sustainable Agriculture Information Service**, 2004. Disponível em: <<https://attra.ncat.org/attra-pub/summaries/summary.php?pub=38>>. Acesso em: 20 janeiro 2011.
73. GOMES, C.; SILVA, P.; CHIMBOMBI, E.; KIM, J.; CASTELL-PEREZ, E.; MOREIRA, R. G. Electron-beam irradiation of fresh broccoli heads (*Brassica oleracea* L. italica). **LWT – Trends Food Scie. Tech.**, v. 41, p. 1828-1833, 2008.
74. GONÇALVES, A. F. K.; FRIEDRICH, R. B.; BOLIGON, A. A.; PIANA, M.; BECK R. C. R., ATHAYDE, M. L. Antioxidant capacity, total phenolic contents and HPLC determination of rutin in *Viola tricolor* (L) flowers. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, p. 32-37, 2012.
75. GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: Andersen, Ø.M.; Markham, K. R. (Ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC - Press, 2006. p. 397–411.
76. GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CALHELHA, R. C.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; QUEIROZ, M., J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. **Food Chem.**, v. 136, p. 718-725, 2013.
77. HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p.481-504, 2000.
78. HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **J. Agr. Food Chem.**, v. 46, p. 4107–4112, 1998.
79. HELLINGER, R.; KOEHBACH, J.; FEDCHUK, H.; SAUER, B.; HUBER, R.; GRUBER, C. W.; GRÜNDEMANN, C. Immunosuppressive activity of an aqueous *viola tricolor* herbal extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, p. 299–306, 2014.
80. HONG, Y. H.; PARK, J. Y.; PARK, J. H.; CHUNG, M. S.; KWON, K. S.; CHUNG, K.; WON, M.; SONG, K. B. Inactivation of enterobacter sakazakii, bacillus cereus, and salmonella typhimurium in powdered weaning food by electron-beam irradiation. **Rad Phys Chem.**, v. 77, p. 1097-1100, 2008.
81. HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
82. ICGFI. The development of X-ray machines for food irradiation. Vienna, Austria, 1995.

83. IKRAM, E. H. K.; ENG, K. H.; JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A.; IDRIS, S.; AZLAN, A. Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. **J. Food Compos. Anal.**, v. 22, p. 388–393, 2009.
84. JARDINI, F. A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum L.*) - ação da fração de ácidos fenólicos *in vivo* e sobre cultura de células**. 2010. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-USP/SP, São Paulo. 115p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-31052010-150831/pt-br.php>> Acesso em: 10 janeiro 2013.
85. JAURON, R.; NAEVE, L. Edible flowers – Iowa State University Extension, **Iowa State University of Science and Technology**, 2013. Disponível em: <<https://store.extension.iastate.edu/Product/Edible-Flowers>>. Acesso em 14 fevereiro 2014.
86. JUNQUEIRA-GONÇALVES, M. P.; GALOTTO, M. J.; VALENZUELA, X.; DINTEN, C.D.; AGUIRRE, P.; MILTZ, J. Perception and view of consumers on food irradiation and the Radura symbol. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 80, p. 119-122, 2011.
87. KARIOTI A.; FURLAN, C.; VINCIERI F. F; BILIA A. R., Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. **Anal Bioanal Chem.**, v. 399 p. 1715–1723, 2011.
88. KAUR, G.; ALAMB, M. S.; JABBAR, Z.; JAVED, K.; ATHAR, M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. **J. Ethnoph.** v. 108, p. 340–348, 2006.
89. KAUR, I. P., GEETHA, T. Screening methods for antioxidants – a review. **Mini Ver. Med. Chem.**, v. 6, p. 305-312, 2006.
90. KELLIE, L. T.; HAYBALL, P. J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, p. 636–644, 2002.
91. KELLEY, K. M. Consumer's guide to purchasing, producing, storing, and using edible flowers, **Penn State College of Agricultural Sciences Department of Horticulture**, 2002.
92. KELLEY, K. M.; CAMERON, A. C.; BIERNBAUM, J. A.; POFF, K. L. Effect of storage temperature on the quality of edible flowers. **Postharvest Bio. Tec.**, v. 27, p. 341-344, 2003.
93. KIKUCHI, O. K. Tolerance to gamma radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 57, p. 555-557, 2000.
94. KIKUCHI, O. K. Gamma and electron-beam irradiation of cut flowers. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 66, p.77-79, 2003.
95. KOIKE, A. C. R.; ARAÚJO, M. M. ; COSTA, H. S. F.; ALMEIDA, M. C.; VILLAVICENCIO. Tolerance of edible flowers to gamma irradiation. In:

International Nuclear Atlantic conference – INAC 2011. **Proceedings...** Belo Horizonte, MG. Associação Brasileira de Energia Nuclear (ABEN), 2011.

96. KOMOLPRASERT, V. Packaging for foods treated by ionizing radiation. In: JUNG, H. H. (Ed.). **Packaging for nonthermal processing of food**. IFT Press: Blackwell Publishing, 2007. p. 87-116.

97. KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 5, p. 239–240, 2004.

98. KUBESH, K.; ZONA, R.; SOLAR, S.; GEHRINGER, P. Degradation of catechol by ionizing radiation, ozone and the combined process ozone electron-beam. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 72, p. 447-453, 2005.

99. KUME, T.; FURUTA, M.; TODORIKI, S.; UENOYAMA, N.; KOBAYASHI, Y. Status of food irradiation in the world. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 78, p. 222-226, 2009.

100. KUSKOSKI, E. M.; GARCÍA, A. A.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciê. Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

101. KYLE, J. A. M.; DUTHIE, G. G. Flavonoids in foods. In: Andersen, Ø.M.; Markham, K. R. (Ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC - Press, 2006. p. 397–411.

102. LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K.; GUEDES, K.; RODRIGUES, R. R. Ressonância paramagnética eletrônica – Rpe aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). **Ciê. Tecnol. Alim.**, v. 24, p. 427-430, 2004.

103. LIMA, V. L. A. G. de; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S. do; GOMES, P. B.; GUERRA, N. B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da universidade federal rural de Pernambuco. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 927-935, 2006.

104. MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipids. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Ed.) **Fennema's food chemistry**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. P. 155-182.

105. MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, p. 6887–6892, 2003.

106. MIETKIEWSKA, E.; GIBLIN, E. M.; WANG, S.; BARTON, D. L.; DIRPAUL, J.; BROST, J. M.; KATAVIC, V.; TAYLOR, D. C. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in Arabidopsis results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. **Plant Phys.**, v. 136, p. 2665-2675, 2004.

107. MLCEK, J.; ROP, O. Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. **Trends Food Scie. Tech.**, v. 22, p. 561–569, 2011.

108. MOLYNEUX, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26, p. 211–219, 2004.
109. MORAES-DE-SOUZA, R. A . **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusão de ervas consumidas no Brasil**. 2007 Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, 60 p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-08082007-165038/pt-br.php>> Acesso em: 24 fevereiro 2011.
110. MOREHOUSE, K. M. Food irradiation – US regulatory considerations. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 281–284, 2002.
111. NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: beleza**. 1.ed. São Paulo: Bei Comunicações, 2003a.
112. NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. 1.ed. São Paulo: Bei Comunicações, 2003b.
113. NEWNAM, S. E.; O'CONNER, A. S. Edible flowers. **CSU Extension**, n. 7237, 2009. Disponível em: <<http://www.ext.colostate.edu/pubs/garden/07237.html>, 2009> Acesso em: 20 janeiro 2011.
114. NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. **Nectaries and nectar**. Dordrecht: Springer, 2007.
115. NIJVELDT, R.J.; van NOOD, E.; van HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; van NORREN, K.; van LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 4, p. 418–425, 2001.
116. NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Bio. Med.**, v. 49, p. 503–515, 2010.
117. PEREIRA, D.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J., ANDRADE, P. Phenolics: from chemistry to biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202–2211, 2009.
118. PIANA, M.; SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; de BRUM, T. F.; SILVA, C. R.; BOLIGON, A. A.; OLIVEIRA, S. M.; ZADRA, M.; HOFFMEISTER, C.; ROSATTO, M. F.; TONELLO, R.; LAPORTA, L. V.; FREITAS, de R. B.; BELKE, B. V.; JESUS, R. da S.; FERREIRA, J.; ATHAYDE, M.R. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 458–465, 2013.
119. PIMENTEL, C. V. de M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: Introdução às substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

120. PINTO, J. F. **Nutracêuticos e alimentos funcionais**. Lidel – Edições Técnicas, lda. Lisboa – Porto, 2010.
121. PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; N. LISCHNER, N.; EHLEN-FELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *vaccinium* species. **J. Agr. Food Chem.**, v. 46, p. 2686–2693, 1998.
122. PRIOR, R. L.. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 570-578, 2003.
123. OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 2326– 2331, 2008.
124. OLSON, D.G. Irradiation of food. *Food Technol.*, v. 52, p. 56-62, 1998.
125. ORTIZ, E.L. **Bons sabores – Guia prático para cozinhar com ervas aromáticas, especiarias & condimentos**. Lisboa: Editorial Verbo, 1992.
126. OLSON, D. G. Irradiation of food. **Food Technol.**, v. 52, p. 56-62, 1998.
127. QUIRÓS, A. R. B.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. **J. Food Compos. Anal.**, v. 19, p. 97-11, 2006.
128. RADOMYSKI, T.; MURANO, E.A.; OLSON, D.G.; MURANO, P.S. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review. **J. Food Protect.** v. 57, n. 1, p. 73-86, 1994.
129. RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharm. Res.**, v. 55, p. 207-216, 2007.
130. REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. 2005. Dissertação (Mestrado) - University of Helsinki, Helsinki, Finlândia . 86 p. Disponível em: <helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20822/copigmen.pdf?sequence=1>
131. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides** -tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 2008.
132. ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v. 92, p. 235-254, 2005.
133. ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; NEUGEBAUEROVA, J.; VABKOVA, J. Edible flowers - A new promising source of mineral elements in human nutrition. **Molecules**, v. 17, p. 6672-6683, 2012.

134. SÁDECKÁ J. Irradiation of spices – A review. **Czech J. Food Sci.**, v. 25: p. 231–242, 2007.
135. SALUM, D. C., **Determinação de voláteis produzidos durante o processamento por radiação de ervas alimentícias e medicinais**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 125 p. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-21082009-180650/pt-br.php> > Acesso em: 20 jan 2010.
136. SANGWANANGKUL, P.; SARADHULDHAT, P.; PAULL, R, E. Survey of tropical cut flower and foliage responses to irradiation. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 48, p. 264-271, 2008.
137. SCHWARTZ, S.; ELBEL, J. H. von; GIUSTI, M. M. Colorants. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R (Ed.) **Fenema's food chemistry**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. P. 571-632.
138. SIMOPOULOS, A. P. "Preface", In: SIMOPOULOS, A. P. ; GOPALAN, C. (Eds), Plants in human health and nutrition policy. **World Rev. Nutr. Diet.**, Basel: Karger, 2003, v. 91, p. 133-137.
139. SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chem.**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.
140. SHI, H.; NOGUCHI, N., NIKI, E. Introducing natural antioxidants. In: POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited., 2001. p. 147-158
141. SOARES, C.B.L.V. **O livro de ouro das flores**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 2002.
142. SUPRIYA, P., SRIDHAR, K.R., NARESHKUMAR, S., GANESH, S. Impact of electron beam irradiation on fatty acid profile of canavalia seeds. **Food Bioprocess Tech.** v. 5, p. 1049–1060, 2012.
143. TANABE, K.; DOHINO, T. Responses of 17 species of cut flowers to electron beam irradiation. **Res. Bull. Pl. Prot. Japan**, v. 31, p. 89-94, 1995.
144. TAKINAMI, P. Y. I. **Obtenção de biopolímeros de gelatina por radiação ionizante**. 2014. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo 136 p. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-13062014-092057/pt-br.php> > Acesso em: 20 agosto 2014.
145. TEETS, A. S.; SUNDARARAMAN, M.; WERE, L. M. Electron beam irradiated almond skin powder inhibition of lipid oxidation in coked salted ground chicken breast. **Food Chem.**, v. 111, p. 934-941, 2008.

146. TEISI, M. F., FEIN, S. B., & LEVY, A. S.. Information effects on consumer attitudes toward three food technologies: organic production, biotechnology and irradiation. **Food Qual. Pref.**, v. 20, p. 586 - 596, 2009.
147. THOMASSET, S. C.; BERRY, D. P.; GARCEA, G.; MARCZYLO, T.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Dietary polyphenolic phytochemicals promising cancer chemopreventive agents in humans: A review of their clinical properties. **Int. J. Cancer**, v. 120, p. 451–458, 2007.
148. VALKO, M.; LEIBFRITZ D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. B.**, v. 39, p. 44-84, 2007.
149. VILLAVICENCIO, A. C. L. H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ⁶⁰Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 1998. Tese (Doutoramento). Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF-USP –São Paulo, SP.
150. VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCEÉ, H.; BOGNAR, A. Effect of gamma irradiation on the thiamine, roboflavion and vitamin B6 content in two varieties of Brazilian beans. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 57, n. 3-6, p. 229-303, 2000.
151. VOON, H.C.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comp. Rev. Food Sci. F.**, v.11, p. 34-55, 2012.
152. VUKICS, V.; KERY, A.; BONN G. K.; GUTTMAN, A. Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 390, p. 1917-1925, 2008a.
153. VUKICS, V.; RINGER, T.; KERY, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, v. 1206, p. 11–20, 2008b.
154. WAKEFORD, C. A.; BLACKBURN, R.; SWALLOW, A. J. Induction and detection of radioactivity in foodstuffs irradiated with 10 MeV electrons and X-rays. **Radiat Phys Chem.**, v. 38, n. 1, p. 29-38, 1991.
155. WANG, S. Y.,; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J. Agr. Food Chem.**, v. 48, p. 140–146, 2000.
156. WEI, M.; ZHOU, L.; SONG, H.; YI, J.; WU, B.; LI, Y.; ZHANG, L.; CHE, F.; WANG, Z.; GAO, M.; LI, S. Electron beam irradiation of sun-dried apricots for quality maintenance. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 97, p. 126-133, 2014.

157. WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, p.1 173-1183., 2001.
158. YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting oxidation. In: POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORGON, M.(Ed.) **Antioxidants in food: Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited., 2001
159. YOUWEI, Z.; JINLIAN, Z.; YONGHONG, P. Comparative study on the free radical scavenging activities of some fresh flowers in southern China. LWT. **Food Sci. Tech.**, v. 41, p. 1586–1591, 2008.
160. ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). IHERINGIA **Série Botânica**, v. 59, p. 173-178, 2004.
161. ZHANG, Y.;VARRED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by non-toxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sci.**, v. 76, p.1465-1472, 2005.
162. ZURLO, C.; BRANDÃO, M. **As ervas comestíveis**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1990.