

**Caracterização química e bioativa de diferentes flores do género
Impatiens e estudo do seu potencial uso na indústria alimentar**

ELEOMAR DE OLIVEIRA PIRES JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná para a obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por:

Doutora Lillian Barros
Doutora Cristina Caleja
Prof^a Doutora Carolina C. Garcia

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri.

Bragança

2020

*“Decidi não esperar as oportunidades e sim, buscá-las.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz”*

Walt Disney

Este trabalho é financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E e TRANSCoLAB 0612_TRANS_CO_LAB_2_P. Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto *Mobilizador* Norte-01-0247-FEDER-024479: ValorNatural®.



Agradecimentos

Gratidão é o segredo! Tanto pelas coisas boas que aconteceram, quanto pelas coisas que no final viraram lições.

Agradeço primeiramente à **Professora Doutora Isabel Ferreira** pela oportunidade de trabalho, aceitação do meu tema de pesquisa proposto e por permitir-me participar e da equipa de pesquisa do Centro de Investigação de Montanha.

Agradeço em especial à orientadora **Doutora Lillian Barros**, por todo o suporte, orientações e correções feitas no decorrer do desenvolvimento deste trabalho, pela confiança depositada e, por me oferecer a oportunidade de trabalhar com toda sua equipa de pesquisa.

Creio que palavras são incapazes de demonstrar o quão sou grato pela parceria, amizade e admiração que construí por essa pessoa. Deste modo, quero agradecer a **Doutora Cristina Caleja**, que não mediu esforços para me apoiar em tudo que precisei ao decorrer da execução deste trabalho, desde seus ensinamentos em laboratório, suas sugestões, correções e suas preocupações diárias comigo. Pois me fez enxergar, o quão sou capaz de evoluir no segmento da pesquisa e investigação. Sou realmente e imensamente grato a ti!

Sou muito grato também a **Professora Doutora Carolina Castilho Garcia** da UTFPR de Medianeira, por toda a colaboração durante este período, por ter me escolhido como orientando, por aceitar minha sugestão de tema de pesquisas e por apoiar-me e fornecer-me todo suporte e incentivo.

Gostaria de agradecer o **Professor Doutor Gustavo Hassemer**, da UFMS, Campus Três Lagoas pela identificação botânica e depósito das amostras no Herbário Flor da UFSC, Florianópolis. Além disso, agradeço também a **Professora Doutora Carla Camara** da UTFPR de Medianeira, pelo preparo das exsiccatas destinadas a identificação botânica.

Sou imensamente grato a toda equipa do BioChemCore e do CIMO, que me deram todo o apoio, acompanhamento e atenção, em todas as vezes que estive no laboratório. Por terem me acolhido e me auxiliado na execução de todas as minhas análises, mas também por todas amizades construídas que levarei comigo pra sempre.

Agradeço minha mãe **Pedrina**, pelas orações de coragem e toda a paciência para comigo nos meus momentos mais difíceis, e ao meu pai **Eleomar**, pelo exemplo de sabedoria, persistência e força, por sempre apoiar-me em todas as etapas que fizeram-se necessárias para essa conquista, desde o início da minha vida acadêmica.

Gratidão aos meus avós **Maria, Benedito Pires e Benedito Pedroso**, que souberam me passar valores de vida, contribuindo para que eu me tornasse uma pessoa melhor, em

especial a minha avó **Joséfa** (*In memoriam*), que sempre esteve a zelar por mim e que de modo singelo incentivou-me por todo meu percurso de graduação.

Agradeço a minha namorada **Mônica Cristina**, por toda sua parceria e dedicação. Pois sei que seu carinho e afeto foram de extrema importância para todos os meus dias, e que apesar da distância sempre lutou por mim. Quero que saibas que és uma mulher admirável e que motiva-me a lutar cada dia mais pelo nosso futuro.

Sou grato também, à minha irmã **Letícia**, a meus familiares, especialmente meus primos **Érika, Jaine, Jaqueline, Josimar, Ketilin e Nayane**, e padrinhos **Margarida e Anderson**, que me apoiaram financeiramente, emocionalmente e me deram suporte documental para que eu conseguisse estudar em Portugal. E que mesmo estando longe acompanharam-me e apoiaram-me em todos os momentos. Vocês são Incríveis!

Gratidão aos colegas de turma, em especial a **Rafaela Binhara, Bruna Yuu e Isa Paula** e à todas as amigas que construí na UTFPR e no IPB ao longo de toda a graduação e mestrado.

Também sou grato aos meus professores e todo departamento de engenharia de alimentos da UTFPR, em especial a **Daiane Lenhard, Eliane Colla, Valdemar Padilha e William Terroso**, aos quais admiro muito e pude trabalhar em projetos incríveis. Agradeço também, a psicóloga **Mônica Kido** e toda sua equipe do núcleo de assuntos estudantis da UTFPR, por todos os aconselhamentos nos momentos de desespero e ansiedade, estes que foram inúmeros mas que sempre consegui contornar da melhor forma possível.

Agradeço a todas as pessoas que compraram meus cones de chocolate e auxiliaram-me na captação de recursos para meu sustento durante este um ano de estadia em Portugal. Creio eu, que sem este recurso, não sei se estaria aqui hoje.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram em Portugal e que igualmente passaram por toda esta caminhada, entre os bons e difíceis momentos, que sempre estivemos juntos e torcendo uns pelos outros. Agradeço toda a amizade e companheirismo e desejo-vos todo o sucesso do mundo. E também a minha mãe de Bragança **Dona Ana**, que sempre estás preocupada comigo e que me auxilia sempre que preciso.

Finalmente, agradeço à **Universidade Tecnológica Federal do Paraná** e ao **Instituto Politécnico de Bragança** por terem disponibilizado este mestrado, pelo suporte administrativo e pela isenção das propinas concedidas ao programa de dupla diplomação.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE EQUAÇÕES	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. FLORES COMESTÍVEIS	3
2.1.1 História e benefícios para saúde	6
2.1.2 Caracterização do gênero <i>Impatiens</i>	9
2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS	9
2.2.1 Classificação de compostos fenólicos	13
2.2.2 Antocianinas: aspetos químicos e propriedades bioativas	15
2.2.3 Técnicas de extração de antocianinas	21
2.3. CORANTES NATURAIS NA INDÚSTRIA ALIMENTAR	22
2.3.1 Corantes naturais vs corantes artificiais	24
2.3.2 Aplicação das antocianinas como ingredientes na indústria alimentar	26
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 IDENTIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>IMPATIENS</i> ...	30
4.2. PADRÕES E REAGENTES	31
4.3. ANÁLISE COLOROMÉTRICA	32
4.4. DETERMINAÇÃO DE PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i> E <i>I. WALLERIANA</i>	33
4.4.1 Compostos fenólicos não antociânicos	33
4.4.2 Compostos fenólicos antociânicos	34
4.5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOACTIVAS DAS PÉTALAS DE <i>I.</i> <i>BALSAMINA</i> E <i>I. WALLERIANA</i>	36
4.5.1 Atividade antimicrobiana	36
4.5.2. Atividade antioxidante	38
4.5.3 Avaliação da atividade citotóxica	40

4.5.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória	41
4.6. DETERMINAÇÃO DAS PROPIEDADES NUTRICIONAIS DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i>	41
4.7. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i>.....	43
4.7.1 Açúcares	43
4.7.2 Ácidos gordos.....	44
4.7.3 Ácidos orgânicos	45
4.8. AVALIAÇÃO DO EXTRATO EM RECHEIO DE “BOMBOCAS”.....	45
4.8.1. Preparação das amostras de “bombocas”	45
4.8.2. Avaliação da cor do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira. 47	
4.8.3. Avaliação nutricional do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira.....	48
4.8.4. Avaliação do teor em açúcares e ácidos gordos do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira.....	48
4.8.5. Avaliação da atividade antioxidante do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira	48
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. AVALIAÇÃO DA COR DAS PÉTALAS DAS FLORES DAS ESPÉCIES <i>I. BALSAMINA</i> E <i>I. WALLERIANA</i>.....	50
5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS PÉTALAS DAS FLORES DAS ESPÉCIES <i>I. BALSAMINA</i> E <i>I. WALLERIANA</i>	51
5.3. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DAS PÉTALAS DE FLORES DE DAS ESPÉCIES <i>I. BALSAMINA</i> E <i>I. WALLERIANA</i>	58
5.3.1 Atividade Antibacteriana.....	58
5.3.2 Atividade Antifúngica	60
5.3.3 Atividade Antioxidante, Citolóxica e Anti-inflamatória.....	61
5.4. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i>	65
5.5. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i>	66
5.6. INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DAS PÉTALAS DE <i>I. BALSAMINA</i> COMO ALTERNATIVA CORANTE PARA UM PRODUTO DE PASTELARIA.	
69	
6. CONCLUSÃO	79
7. REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

a^*	Cromaticidade (vermelho/verde)
A375	Linha celular de melanoma
AOAC	Metodologias Oficiais de Análise de Alimentos
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
ATCC 1022	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ATCC 11632	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 11730	<i>Aspergillus versicolor</i>
ATCC 13311	<i>Salmonella typhimurium</i>
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 35210	<i>Escherichia coli</i>
ATCC 36839	<i>Penicillium funiculosum</i>
ATCC 6275	<i>Aspergillus niger</i>
ATCC 9112	<i>Penicillium ochrachloron</i>
b^*	Cromaticidade (azul/amarelo)
BC-T0	Bomboca Controlo Tempo 0
BC-T3	Bomboca Controlo Tempo 3
BC-T7	Bomboca Controlo Tempo 7
BHT	Hidroxitolueno butilado
BI-T0	Bomboca <i>Impatiens</i> Tempo 0
BI-T3	Bomboca <i>Impatiens</i> Tempo 3
BI-T7	Bomboca <i>Impatiens</i> Tempo 7
BJ	Linhagem celular normal de controlo
BS-T0	Bomboca Morango Tempo 0
BS-T3	Bomboca Morango Tempo 3
BS-T7	Bomboca Morango Tempo 7
CH ₀	Densidade ótica da hemólise completa a 0 min
CIMO	Centro de Investigação de Montanha
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX-1	Enzimas inflamatórias ciclooxigenase
COX-2	Enzimas inflamatórias ciclooxigenase
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão

DU145	Linha celular de cancro de próstata
E102	Tartrazina
E104	Amarelo de quinoleína
E110	Amarelo-sol
E122	Azorubina
E123	Amaranto
E124	Ponceau
E127	Eritrosina
E128	Vermelho 2
E131	Azul patenteado
E133	Azul-brilhante
E151	Negro brilhante BN
E154	Castanho FK
E155	Castanho HT
E163	Antocianinas
EAC	Extração Assistida por Calor
EAM	Extração Assistida por Micro-ondas
EAU	Extração Assistida por Ultrassons
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
ESI	Fonte de ionização electrospray
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO	Organização (das Nações Unidas) para a Agricultura e Alimentação
FBS	Soro Bovino Fetal
FID	Detetor de ionização de chama
GC	Cromatografia gasosa
GC-FID	Cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama
GI ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de inibição do crescimento celular
H	Horas
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HBSS	Solução salina de Hank's
HeLa	Linha celular do carcinoma da cervical
HepG2	Linha celular do carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência.
Ht ₅₀	Tempo hemolítico de 50% (min)
HTB140	Linha celular para melanoma

IC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a inibição 50% da atividade citotóxica
INT	Cloreto de iodonitrotetrazólio
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
IPS-1	Saponina
L*	Luminosidade
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LOX	Enzimas inflamatórias lipoxigenase
LPS	Lipopolisacáridos
LTQ XL	Espectrómetro de massa Linear Ion Trap
MA	Malte ágar
MCF-7	Linha celular do carcinoma da mama
MeOH	Metanol
MeONQ	2-metoxi-1,4-naftoquinona
MF	Fração microfiltrada
MHB	Mueller-Hinton agar
[M-H]-	Ião pseudomolecular modo negativo
µg	Microgramas
Min	Minutos
MNQ	2-metoxi-1,4-naftoquinona
MS	Espectrometria de massa
MS ²	Fragmentação do ião molecular
n.d.	Não detetado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCI-H460	Linha celular do carcinoma de pulmão
NCTC 7973	<i>Listeria monocytogenes</i>
NED	Etilenodiamina
NF	Fração nano filtrada
NH ₃	Azoto amoníaco
Nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
OxHLIA	Inibição da Hemólise Oxidativa
PANCs	Plantas Alimentares Não Convencionais
PBS	Tampão fosfato-salino
PC3	Linha celular de cancro de próstata
Pf	Peso fresco
pH	Potencial hidrogeniónico

PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco
PNT2	Células normais de controlo
PR	Paraná
Ps	Peso seco
RAW 264.7	Célula animal macrófago
RGB	Sistema de cores aditivas (<i>Red, Green e Blue</i>)
Rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio para crescimento de cultura celular
Tr	Tempo de retenção
S ₀	Densidade ótica da amostra no tempo 0
SC	Santa Catarina
SFB	Soro Fetal de Bovino
SRB	Sulforodamina B.
St	Densidade ótica da amostra no tempo t
CAT	Compostos Antociânicos Totais
TCA	Ácido Tricloroacético
FT	Flavonóides Totais
TFA	Ácido Trifluoroacético
CNAT	Compostos Não Antociânicos Totais
AFT	Ácidos Fenólicos Totais
CFT	Compostos Fenólicos Totais
TSB	Caldo de Soja Trípico
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
WM793	Linha celular de melanoma
λ_{max}	Comprimento de onda de máxima absorção na região UV-Vis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento espontâneo de <i>Impatiens walleriana</i>	9
Figura 2. Corte longitudinal: <i>I. walleriana</i> (A) e <i>I. niamniamensis</i> (B).	10
Figura 3. Estrutura da <i>I. walleriana</i> . A: ramos; B: flor; C: fruto.	11
Figura 4. <i>Impatiens balsamina</i>	12
Figura 5. Principais classes de fitoquímicos naturais.....	13
Figura 6. Transformações das antocianinas conforme o pH	20
Figura 7. Mercado de corantes alimentares a nível mundial.....	24
Figura 8. Representação esquemática do objetivo do presente trabalho.....	29
Figura 9. Amostras frescas para análise colorimétrica de <i>I. walleriana</i> (A, B); <i>I. balsamina</i> (C, D).....	32
Figura 10. Evaporação do extrato BL.	33
Figura 11. Filtração do extrato de cor laranja e rosa de <i>I. balsamina</i>	35
Figura 12. Material recolhido para análise no HPLC	35
Figura 13. Microplaca após a incubação.....	39
Figura 14. Bloco digestor de matéria orgânica.. ..	42
Figura 15. Tubos com a fração lipídica evaporada.	42
Figura 16. Amostras das pétalas após a incineração.	43
Figura 17. MME das “bombocas” referente as proteínas (a) e hidratos de carbono (b). ...	72
Figura 18. MME de frutose no recheio das “bombocas”.	74
Figura 19. MME das coordenadas de cores para os recheios das “bombocas”, onde a) L^* - luminosidade; b) a^* - verde-vermelho; e c) b^* - azul-amarelo.	76
Figura 20. Cor dos recheios das “bombocas” com os diferentes extratos obtidos através das coordenadas de cor L^* , a^* e b^*	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Flores comestíveis e respetivas aplicações nutricionais.....	4
Tabela 2. Bioatividades encontradas em diferentes partes do género <i>Impatiens</i>	7
Tabela 3. Estrutura química, nomenclatura e origem das principais antocianinas.....	16
Tabela 4. Compostos antociânicos presentes no género <i>Impatiens</i>	17
Tabela 5. Corantes artificiais e seus efeitos adversos.	25
Tabela 6. Corantes naturais e suas aplicações.	26
Tabela 7. Amostras de <i>Impatiens</i> , na sua forma fresca, liofilizada e extrato hidroetanólico correspondente.	31
Tabela 8. Formulações dos recheios das “bombocas”.	47
Tabela 9. Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) de amostras das pétalas de <i>I. balsamina</i> (cores: laranja_BL e rosa_BR) e de <i>I. walleriana</i> (cores: laranja_WL e rosa_WR) (média \pm DP).50	
Tabela 10. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de máxima absorção na região UV-Vis (λ_{max}), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos nos extratos de pétalas de <i>Impatiens balsamina</i> L. (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de <i>Impatiens walleriana</i> L. (cor laranja_WL e cor rosa_WR) (média \pm DP).	55
Tabela 11. Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) das amostras de pétalas de <i>I. balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de <i>I. walleriana</i> (cor laranja_WL e cor rosa_WR).	58
Tabela 12. Atividade antifúngica (CMI e CMF mg/mL) das amostras de pétalas de <i>I. balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de <i>I. walleriana</i> (cor laranja_WL e cor rosa_WR).	60
Tabela 13. Resultados do ensaio de inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA), atividade citotóxica, hepatotóxica e anti-inflamatória das amostras de pétalas de <i>Impatiens balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de <i>Impatiens walleriana</i> (cor laranja_WL e cor rosa_WR) (média \pm DP).....	64
Tabela 14. Composição nutricional (g/100 g peso fresco) das amostras de pétalas de <i>I. balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média \pm DP).....	65
Tabela 15. Percentagem de ácidos gordos individuais e ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados das pétalas de <i>I. balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média \pm DP).....	67
Tabela 16. Ácidos orgânicos (g/100 g dw) das amostras de pétalas de <i>Impatiens balsamina</i> (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média \pm DP).	68
Tabela 17. Grupos de “bombocas” confeccionados.....	70
Tabela 18. Perfil nutricional das “bombocas”, expresso em g/100 g de massa fresca.....	70
Tabela 19. Representação dos ácidos gordos mais abundantes, bem como os o total de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), expressos em percentagem relativa, bem como os açúcares solúveis, expressos em g/100 g de massa fresca.....	74
Tabela 20. Representação das coordenadas de cor L^* , a^* e b^* para as diferentes “bombocas”.	75
Tabela 21. Atividade antioxidante das amostras de “bombocas”.	77

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Percentagem da população de eritrócitos (PE) no ensaio OXHILIA.	39
Equação 2. Tempo de atraso da hemólise.	39
Equação 3. Determinação da energia total.	43

RESUMO

As Plantas Alimentares Não Convencionas (PANCs) são plantas consideradas potencialmente adequadas para consumo humano, que geralmente crescem espontaneamente no ambiente sem condições prévias de cultivo e/ou tratamento. Apesar de muitas dessas plantas estarem disponíveis em abundância na natureza, são ainda pouco conhecidas pela população que as classifica como “ervas daninhas”. Dentro do universo das PANCs, as flores comestíveis destacam-se como uma fonte de nutrição utilizadas desde a antiguidade, normalmente classificadas como excelentes fontes de substâncias benéficas para a saúde humana.

As flores do gênero *Impatiens* são muito utilizadas para fins ornamentais em projetos de paisagismo, e apesar de serem comestíveis, o seu uso em aplicações alimentares ainda não é prática comum. As cores atrativas características destas flores tem vindo a despertar grande interesse por parte da indústria alimentar que procura fontes naturais de ingredientes corantes. A associação de efeitos adversos com o consumo excessivo de alguns aditivos artificiais tendem a afetar as escolhas dos consumidores que atualmente, exigem produtos mais saudáveis e mais naturais. Desta forma, são várias as matrizes vegetais que tem vindo a ser exploradas.

Neste sentido, este trabalho visou a identificação botânica e a caracterização colorimétrica das pétalas de duas espécies de *Impatiens*, *I. balsamina* e *I. walleriana*, nas variedades rosa e laranja de ambas. De um modo mais aprofundado, os compostos fenólicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor de díodos e detetor de espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS) e foram analisadas diferentes bioatividades (atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotoxicidade).

Todas as amostras estudadas apresentaram quantidades expressivas de compostos fenólicos, em especial ácidos fenólicos e flavonoides. A espécie *I. balsamina* apresentou uma maior variedade de compostos fenólicos, no entanto, ambas as variedades rosa foram as detentoras da maior quantidade de compostos tanto antociânicos como não antociânicos. Esse resultado vai de encontro aos obtidos nas bioatividades, nos quais *I. balsamina* rosa se destacou como o extrato com potencial bioativo mais promissor.

Ambas as variedades de *I. balsamina* foram caracterizadas química e nutricionalmente seguindo metodologias oficiais de análise AOAC. As flores apresentaram elevado teor em água (90%) e baixas quantidades de macronutrientes e cinzas. A variedade

laranja apresentou teores mais elevados de gordura ($0,12 \pm 0,01$ g/100 g pf) e proteínas ($0,33 \pm 0,01$ g/100 g pf), enquanto a variedade rosa apresentou valores mais elevados de hidratos de carbono ($4,76 \pm 0,02$ g/100 g pf) e valor energético ($21,145 \pm 0,003$ kcal/100 g pf). Relativamente ao perfil em ácidos gordos, a variedade laranja apresentou teor mais elevado em ácidos gordos saturados ($44,9 \pm 0,5$ %) enquanto que a variedade rosa apresentou predominância dos polinsaturados ($52,7 \pm 0,5$ %), nos quais os ácidos esteárico (C18:0), linoleico (C18:2n6) e γ -linoleico (C18:3n6) foram os maioritários. Por sua vez, o ácido succínico surgiu como o ácido orgânico maioritário para ambas as variedades.

Tendo em vista a possível aplicação industrial como ingrediente corante natural o extrato de pétalas rosa de *Impatiens balsamina* foi selecionado para incorporação em recheio de “bombocas”, comparando os resultados obtidos com “bombocas” tradicionais (recheio branco) e de recheio rosa (preparadas utilizando gelatina comercial de morango com corante E163). Notou-se que o extrato das flores de *I. balsamina* apresentou resultados notáveis, sendo capaz de proporcionar aumento razoável do teor proteico do produto final e realçar sua coloração.

Apesar de a cor conferida pelo extrato ser um pouco mais clara que a apresentada pela gelatina de morango, esta parece sugerir um aspeto mais natural que, em adição com a atividade funcional conferida, atende às expectativas atuais dos consumidores, apresentando potencial de aplicação na indústria alimentar.

Palavras-chave: *Impatiens*, Composição química, Compostos fenólicos, Compostos antociânicos, Bioatividades, Ingredientes naturais.

ABSTRACT

Non-Conventional Food Plants (PANCs) are plants considered to be potentially suitable for human consumption, which generally grow spontaneously in the environment under previous conditions of cultivation and / or treatment. Although many of these plants are available in abundance in nature, they are still little known by the population that classifies them as "weeds". Within the universe of PANCs, edible flowers stand out as a source of nutrients used since ancient times, normally classified as excellent sources of substances beneficial to human health.

Flowers of the genus *Impatiens* are widely used for ornamental purposes in landscaping projects, and although they are edible, their use in food applications is not yet common practice. The attractive colors characteristic of these flowers has aroused great interest on the part of the food industry that seeks natural sources of coloring ingredients. The association of adverse effects with the excessive consumption of some artificial additives has been affecting the choices of consumers who currently demand healthier and more natural products. In this way, several plant matrices have been explored.

In this sense, this work aimed to characterize the petals of two species of *Impatiens*, *I. balsamina* and *I. walleriana*, in the pink and orange varieties of both. The phenolic compounds were determined by high performance liquid chromatography coupled to a diode detector and mass spectrometry detector (HPLC-DAD-ESI / MS) and different bioactivities (antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxicity activities) were analyzed.

All samples studied showed significant amounts of phenolic compounds, especially phenolic acids and flavonoids. The species *I. balsamina* showed a greater variety of phenolic compounds; however, both pink varieties had the greatest amount of both anthocyanin and non-anthocyanin compounds. This result is in line with those obtained in bioactivities, in which *I. balsamina* pink stood out as the extract with the most promising bioactive potential.

Both varieties of *I. balsamina* were chemically and nutritionally characterized following official AOAC analysis methodologies. The flowers had a high water content (90%) and low amounts of macronutrients and ash. The orange variety had higher levels of fat (0.12 ± 0.01 g / 100 g fw) and proteins (0.33 ± 0.01 g / 100 g fw), while for the pink variety it had higher values of carbohydrates (4.76 ± 0.02 g / 100 g fw) and energy value (21.145 ± 0.003 kcal / 100 g fw). Regarding the fatty acid profile, the orange variety had a higher content of saturated fatty acids ($44.9 \pm 0.5\%$) while the pink variety showed a predominance of polyunsaturated fatty acids ($52.7 \pm 0.5\%$), in which the stearic acids (C18:

0), linoleic (C18:2n6) and γ -linoleic (C18:3n6) the majority. In turn, succinic acid emerged as the major organic acid for both varieties.

Given the possible of the possible industrial application as natural coloring ingredients, the extract of *I. balsamina* rose petals was selected for incorporation into “bombocas” filling, comparing with traditional “bombocas” (white filling) and pink filling (prepared using commercial gelatine of strawberry with dye E163). The extract of the flowers of *I. balsamina* showed remarkable results, being able to provide a reasonable increase in the protein content of the final product and enhance its color.

Although the color conferred by the extract is a little lighter than that presented by strawberry gelatin, it seems to suggest a more natural aspect that, in addition to the functional activity conferred, meets the current expectations of consumers, presenting potential for application in the food industry.

Keywords: *Impatiens*, Chemical composition, Phenolic compounds, Anthocyanic compounds, Bioactivities, Natural ingredients.

1. INTRODUÇÃO

Desde a época da pré-histórica que se recorre ao uso de diversas plantas para as mais diversas finalidades, nomeadamente como fonte alimentar, para fins medicinais, ou até mesmo para atividades religiosas (Toledo, Galetto, & Colantonio, 2009). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 1992), define-se como planta comestível aquela que apresenta uma ou mais partes (raízes, tubérculos, bolbos, rizomas, colmos, talos, folhas, brotos, flores, frutos e sementes; ou ainda látex, resina e goma) que podem ser introduzidas na dieta humana, ou que são usadas para obtenção de óleos e gorduras comestíveis, especiarias, bem como extratos, pigmentos, compostos bioativos, corantes, conservantes e afins. O Brasil é considerado o território com a maior área de biodiversidade terrestre reunindo cerca de 15 a 20 % das espécies de plantas globais. No entanto, muita dessa biodiversidade é ainda desconhecida uma vez que, muitas dessas plantas não estão catalogadas em herbários nem em coleções de sementes vivas ou bancos de germoplasma. Além disso, de um ponto de vista alimentar, é possível afirmar que muita dessa biodiversidade é desperdiçada, pois não é comum a comercialização de frutos nativos em grande escala (Kinupp, 2014).

A nível mundial, existem aproximadamente doze mil quinhentos e setenta e cinco espécies vegetais dotadas de partes comestíveis. No entanto, apenas algumas espécies se encontram disponíveis no quotidiano alimentar humano. Dentre esse pequeno grupo, apenas doze espécies mais populares são responsáveis por 80% dos alimentos consumidos no planeta (Modelski, 2015). Neste contexto, foi criado por Kinupp (2007), o termo “Plantas Alimentares Não Convencionais” (PANCs) que se refere as espécies vegetais que possuem partes comestíveis (sendo nativas, ou exóticas), que crescem espontaneamente ou que são cultivadas, e que não são incluídas com frequência no nosso quotidiano. Adicionalmente, as PANCs caracterizam-se pelo seu fácil cultivo podendo ser encontradas em jardins, quintais e parques, sendo muitas vezes classificadas como “daninhas”, inço ou mato (Food and Agriculture Organization Of The United Nations, 2012; Kinupp, 2014; Modelski, 2015). Assim, algumas flores comestíveis são também classificadas como PANCs e, utilizadas como alimento de forma não rotineira (Kinupp, 2014; Mlcek & Rop, 2011).

Os brócolos e a couve-flor são exemplos de inflorescências comestíveis popularmente consumidas com regularidade pela população. No entanto, a maioria das flores passam despercebidas aos olhos dos consumidores que não reconhecem a sua existência (Fernandes, Casal, Pereira, Saraiva & Ramalhosa., 2016).

As flores comestíveis têm vindo a ser exploradas na área da gastronomia para a finalização de pratos, elaboração de sobremesas, combinação com bebidas e na área farmacêutica, para a obtenção de cosméticos, fármacos e extratos. Atualmente, também a indústria alimentar tem despertado interesse no estudo e exploração do potencial destas flores para o desenvolvimento de novos produtos ou ingredientes (Pires, Barros, Santos-Buelga & Ferreira, 2019; Trinh, Choi & Bae, 2018). As flores, tais como outros vegetais, são consideradas potenciais fontes de substâncias benéficas para a saúde humana uma vez que, possuem na sua composição compostos bioativos nomeadamente, carotenoides e compostos fenólicos (Azmir et al., 2013). No entanto, alguns estudos destacam que o consumo de flores deverá ser feito de forma cautelosa uma vez que, algumas poderão apresentar riscos toxicológicos para os seres humanos, devido à presença de substâncias tóxicas e de possuírem partes muitas vezes não comestíveis como caules, sépalas e pistilos (Fernandes et al., 2016).

Apesar do amplo potencial de exploração das PANCs, existem ainda poucos estudos que as caracterizam o que, pode justificar o facto de a introdução de flores na ementa diária da população constituir ainda um dilema (Kinupp, 2004). Atualmente, os consumidores buscam cada vez mais alimentos rotulados como mais saudáveis e naturais, de modo a impulsionar a indústria alimentar na procura de novos ingredientes naturais para melhorar as características sensoriais, bem como o tempo de prateleira dos produtos. O facto de várias flores comestíveis estarem descritas na literatura como fonte de diversos compostos bioativos, e conseqüentemente associadas a benefícios para saúde humana, pode justificar o crescente número de estudos científicos sobre estas.(Pires et al., 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FLORES COMESTÍVEIS

A alimentação desempenha um papel imprescindível na sociedade e é considerada um importante indicador de desenvolvimento de vínculos comerciais e de dispersão de culturas. Tendo em conta que, os padrões e regras de alimentação podem variar quanto à cultura do seu consumidor, a introdução de alimentos exóticos e não convencionais podem-se contrapor a culturas previamente estabelecidas (Rodrigues et al., 2017).

Atualmente, existem alguns conflitos culturais relacionados com a alimentação que se centram no facto de alguns alimentos serem considerados de uso comum para determinada população e, ao mesmo tempo causar estranheza e/ou curiosidade por parte de outra. Por exemplo, a utilização de insetos na dieta humana é prática comum em países como o México e China; no entanto, na Europa, essa prática é vista ainda com estranheza (Acuña, Caso, Aliphath & Vergara 2011; Hartmann, Shi, Giusto & Siegrist, 2015). Do mesmo modo, o universo das flores comestíveis tem vindo a constatar alguma resistência à aceitação deste tipo de alimentos na dieta humana. Apesar destas flores serem consideradas ricas em nutrientes e compostos bioativos, elas ainda apresentam pouca exploração e popularidade em aspetos de aplicação como fonte alimentar (Pinakin, Kumar, Suri, Sharma & Kaushal, 2020; Rodrigues et al., 2017).

As Plantas Alimentares Não Convencionas (PANCs) são plantas consideradas potencialmente próprias para consumo que se desenvolvem no ambiente de modo espontâneo, ou seja, sem condições prévias de cultivo e/ou tratamento (Barreira et al., 2015). Apesar de muitas dessas plantas estarem disponíveis em abundância na natureza e apresentarem baixo custo, são ainda pouco conhecidas pela população que as classifica como ervas “daninhas”, “matos”, “invasoras” ou “infestantes” uma vez que, surgem em locais indesejados como quintais e jardins (Kinupp, 2007). Algumas PANCs podem ser oriundas de espécies de plantas classificadas como convencionais, ou seja, podem ser plantas frequentes no nosso quotidiano, mas que apresentam uma das suas partes comestíveis de uso não convencional. Destas, podem ser destacadas como exemplo o coração da bananeira, as flores da abóbora, ou até mesmo os talos e folhas da cenoura (Kinupp, 2014). Dentro do universo das plantas alimentares não convencionais, as flores comestíveis destacam-se como as mais popularmente utilizadas como alimento desde a antiguidade (Mlcek & Rop, 2011).

Atualmente, existem diversas flores comestíveis aplicadas em diferentes produtos

alimentares nomeadamente, molhos, geleias, xaropes, licores, vinagres, mel, óleos, flores cristalizadas, cubos de gelo, saladas, chás, bebidas e sobremesas (Matyjaszczyk & Śmiechowska, 2019). Na **Tabela 1**, estão apresentadas algumas flores comestíveis com as respetivas aplicações.

Tabela 1. Flores comestíveis e respetivas aplicações nutricionais.

Flores Comestíveis	Nome Científico	Aplicação Nutricional
Amor-perfeito	<i>Viola tricolor</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, saladas.
Centáurea	<i>Centaurea cyanus</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas.
Violeta doce	<i>Viola odorata</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados e bebidas.
Phlox	<i>Phlox</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados e bebidas.
Forsítia	<i>Forsythia Vah</i>	Decoração de pratos e gelados, bebidas.
Freesia	<i>Freesia Eckl. ex Klatt</i>	Decoração de pratos e sobremesas, gelados e bebidas.
Fúcsia	<i>Fuchsia</i> L.	Decoração de sobremesas, gelados e bebidas.
Hawthorn	<i>Crataegus</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados, sumos.
Hibisco	<i>Hibiscus</i> L.	Decoração de pratos, sobremesas e bebidas.
Jasmim	<i>Jasminum</i> L.	Decoração de pratos, infusões.
Trevo	<i>Trifolium</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados e bebidas.
Lavanda	<i>Lavandula</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados e bebidas.
Papoila comum	<i>Papaver rhoeas</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, infusões.
Hollyhock	<i>Alcea</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, saladas, sumos.
Chagas	<i>Tropaeolum</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, saladas.
<i>Impatiens</i>	<i>Impatiens</i> L.	Decoração de pratos e saladas.
Petúnia	<i>Petúnia</i> Juss.	Decoração de pratos e sobremesas, saladas.
Prímula	<i>Primula</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, bebidas.
Peônia	<i>Paeonia</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados, bebidas.
Rosa	<i>Rosa</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, bebidas, sumos.
Camomila	<i>Matricaria</i> L.	Decoração de pratos, saladas, infusões.
Margarida	<i>Bellis</i> L.	Decoração de pratos, sobremesas, saladas.
Orquídea	<i>Orchis</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados.
Prímula	<i>Oenothera</i> L.	Decoração de pratos e sobremesas, gelados.

Adaptado de Matyjaszczyk & Śmiechowska (2019).

Relativamente à classificação de flores comestíveis, Zhao et al., (2019a) definiu três grupos distintos: flores de frutas, vegetais e flores aromáticas e medicinais. Estudos apontam para a existência de um grande número de espécies de flores comestíveis, classificadas entre 100 géneros e 97 famílias (Lu, Li & Yin, 2016).

Uma revisão bibliográfica realizada recentemente e baseada em mais de cem estudos relacionados com as flores comestíveis, relatou as principais características e propriedades nutricionais de diversas espécies (Fernandes, Casal, Pereira, Saraiva & Ramalhosa, 2017). Dentre os diversos constituintes das flores a água é o principal elemento da sua composição, representando cerca de 70% a 95% da sua constituição total. Adicionalmente, os macronutrientes maioritários são os hidratos de carbono, seguidos das proteínas e lipídios. No entanto, existem algumas variações na composição das flores comestíveis quando comparados diferentes estudos da literatura, normalmente justificados pelas condições de crescimento (local e condições ambientais e de solo), bem como condições de extração. A literatura destaca a presença de ácidos fenólicos e flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas e antocianinas) como as substâncias bioativas predominantes nas flores comestíveis e as responsáveis pelas propriedades antioxidantes (Zheng, Meenu & Xu, 2019).

Os diversos constituintes das flores tem vindo a ser explorados devido às propriedades nutricionais e medicinais descritas (Oyeyemi, Arowosegbe & Famosa, 2017). O pólen é apresentado como sendo rico em hidratos de carbono, carotenoides, flavonoides, proteínas e ácidos gordos saturados e insaturados (Mlcek & Rop, 2011). Por sua vez, o néctar é composto por uma mistura de açúcares e por proteínas, aminoácidos livres, lipídios, alcaloides, fenol, terpenóides, iões inorgânicos e ácidos orgânicos (Nicolson, Nepi & Paci, 2007). Finalmente, as pétalas apresentam um conteúdo rico em antioxidantes, vitaminas e minerais que desempenham papéis fundamentais na saúde humana (Fernandes et al., 2017; Mlcek & Rop, 2011).

O consumo de flores normalmente é feito de um modo integral. No entanto, de acordo com a espécie, apenas algumas partes devem ser ingeridas devido a possíveis efeitos tóxicos para o consumidor bem como características de amargor. Um exemplo são as partes brancas da base de pétalas de rosas e crisântemos que podem proporcionar amargor indesejável (Fernandes et al., 2017). É importante salientar que existem ainda poucos estudos toxicológicos executados para flores comestíveis. No entanto, alguns estudos registaram a inexistência de toxicidade, quando ingeridas em quantidades moderadas (Fernandes et al., 2016).

Dentre as diferentes plantas comestíveis, existem algumas que são popularmente conhecidas e que, conseqüentemente, são utilizadas mais rotineiramente na dieta diária humana. Por exemplo, *Taraxacum officinale*, popularmente reconhecido como “dente-de-leão”, é uma flor utilizada com frequência na culinária e que, possui uma composição rica em carotenoides, vitamina A, vitamina C e fósforo mineral (Qureshi, Adil, Hack, Alagawany & Farag, 2017). Também os receptáculos das rosas são muito utilizados na ornamentação de pratos e apresentam na sua composição valores consideráveis de vitamina C (Youssef & Mousa, 2012). Do mesmo modo, as flores de gengibre apreciadas pelas sua aparência chamativa, são muito consumidas principalmente em países asiáticos e apresentam na sua composição elevados conteúdos de potássio (máx. 737,21 mg/100 g), cálcio (máx. 140,15 mg / 100 g) e ferro (0,32 mg / 100 g) (Rachkeeree et al., 2018).

Segundo Koike et al., (2015a), a incorporação de plantas comestíveis tem visado contribuir para melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos. O aumento de estudos que caracterizam e relacionam a composição de flores comestíveis com diversas propriedades bioativas tem justificado a sua crescente procura e consumo (Koike, Antonio, Ferreira & Villavicencio, 2014).

2.1.1 História e benefícios para saúde

A utilização de flores na alimentação humana é considerada uma prática ancestral (Newman & O’Connor, 2009). Registros históricos apontam que os povos romanos tinham o costume de utilizar flores na cozinha, assim como, os povos do Oriente Médio (Newman & O’Connor, 2009). Essa cultura por sua vez, perpetua-se até a atualidade em países europeus como a Itália, França, mas também no continente asiático. As flores popularmente consumidas apresentam grande diversidade no formato, cor e sabor, sendo aplicadas na alimentação com a finalidade de ornamentar pratos e valorizar as qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos (Mlcek & Rop, 2011).

A nível mundial verificam-se algumas diferenças nos hábitos de consumo de flores comestíveis, que poderão ser justificadas pela influência exercida pelos costumes e cultura regional. Existem relatos sobre a inserção de flores comestíveis em diversos pratos da culinária do oriente, por exemplo a utilização de algumas espécies (lírio, lótus, açafraão, rosa e calêndula) como ingredientes em receitas de bolos e infusões, bem como a aplicação de rosas comestíveis na elaboração de molhos (Cunningham, 2015; Ge & Ma, 2013; Rodrigues et al., 2017). Por sua vez, na América flores de abóbora eram colhidas pela tribo Zuni na

manhã anterior à sua abertura e em seguida consumidas *in natura*, fritas, adicionadas a sopas ou secas e armazenadas para o Inverno (Cunningham, 2015). Já na Europa, diversas flores como: begônias, calêndulas, cravos, crisântemos e trevos, são utilizadas desde tempos longínquos em banquetes da aristocracia, para ornamentação de pratos e bebidas (Rop, Mlcek, Jurikova, Neugebauerova & Vabkova, 2012; Stradley, 2015).

A incorporação de flores comestíveis na dieta humana, para além de contribuir para os conceitos gourmets de culinária tornando os pratos cada vez mais atrativos, contribui para a adição de aromas e sabores exóticos e delicados e para a saúde do consumidor, devido à existência de compostos bioativos na sua composição, nomeadamente os compostos fenólicos (Fernandes et al., 2017; Pires, Dias, Barros, Calhella et al., 2018).

Apesar de não serem considerados nutrientes essenciais para a vitalidade humana, os compostos fenólicos, atuam como substâncias com propriedades funcionais (antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-proliferativos), propriedades que também podem ser encontradas no género *Impatiens*, conforme a **Tabela 2**, que por sua vez, estão relacionadas diretamente com o combate de patologias e distúrbios, como doenças cardiovasculares, ateroscleroses, distúrbios degenerativos e diabetes (Anantharaju et al., 2016; Gioxari, Kogiannou, Kalogeropoulos & Kaliora, 2016; Chen, Gnanaraj, Arulselvan, El-Seedi & Teng, 2019).

Tabela 2. Bioatividades encontradas em diferentes partes do género *Impatiens*.

Espécie	Partes Estudadas	Bioatividades	Referências
<i>Impatiens balfourii</i> Hook.f.	Partes aéreas	Antimicrobiana Antioxidante	Szewczyk et al., 2016
	Partes aéreas	Antimicrobiana Antioxidante	Szewczyk et al., 2016
<i>Impatiens balsamina</i> L.	Raízes e partes aéreas		Szewczyk et al., 2018b
	Material vegetal inteiro	Antioxidante	Delgado-Rodriguez et al., 2017
	Hastes e talos		Su et al., 2012
	Material vegetal inteiro		Delgado-Rodriguez et al., 2017
	Sementes	Antimicrobiana	Manikandan et al., 2016
	Hastes e talos		Su et al., 2012
	Sementes		Patel et al., 1998
	Flores	Anti-hepática	Li et al., 2017
	Folhas		Mahyun et al., 2018
	Vagens, raízes, caules e folhas	Antibacteriana	Wang et al., 2011
Flores	Antidiabética	Li et al., 2015	
Flores	Anti-hepática	Li et al., 2015	
Flores	Antinocepitiva	Imam et al., 2012	
<i>Impatiens bicolor</i> Royle	Partes Aéreas	Antibacteriana	Nisar et al., 2010

Espécie	Partes Estudadas	Bioatividades	Referências
		Antifúngica	Nisar et al., 2010
<i>Impatiens capensis</i> Meerb.	Folhas	Anti Dermatite	Motz et al., 2015
	Raízes e partes aéreas	Citotóxica	Szewczyk et al., 2018b
	Raízes e partes aéreas	Antioxidante	Szewczyk et al., 2018b
<i>Impatiens glandulifera</i> Royle.	Folhas, flores e raízes	Antinocepitiva	Szewczyk et al., 2018c
		Anti ansiedade	Szewczyk et al., 2018c
	Partes aéreas	Antimicrobiana	Szewczyk et al., 2016
		Antioxidante	
	Raízes, caules e folhas	Antitumoral	Cimmino et al., 2016
	Partes aéreas	Antimicrobiana	Szewczyk et al., 2016
		Antioxidante	
<i>Impatiens noli-tangere</i> L.	Raízes e partes aéreas	Citotóxica	Szewczyk et al., 2018b
			Szewczyk, 2018b
	Folhas secas e hastes	Antioxidante	Paun et al., 2018
	Folhas, flores e raízes	Antinocepitiva	Szewczyk, 2018c
		Anti ansiedade	Szewczyk, 2018c
	Folhas secas e hastes	Anti-inflamatória	Paun et al., 2018
	Partes aéreas	Antimicrobiana	Szewczyk et al., 2016
		Antioxidante	
<i>Impatiens parviflora</i> DC.	Raízes e partes aéreas	Antioxidante	Szewczyk et al., 2018b
		Antinocepitiva	Szewczyk et al., 2018c
	Folhas, flores e raízes	Ansiolítica	Szewczyk et al., 2018c
<i>Impatiens textori</i> Miq.	Flores	Antipruriginosa	Ueda et al., 2005
		Anti anafilática	Ueda et al., 2005
		Antiplaquetária	Ueda et al., 2003
	Flores	Antialérgica	Iwaoka et al., 2010
<i>Impatiens walleriana</i> Hook. f.	Partes aéreas	Antimicrobiana	Szewczyk et al., 2016
		Antioxidante	
	Material vegetal inteiro	Antioxidante	Delgado-Rodriguez et al., 2017
		Antimicrobiana	Delgado-Rodriguez et al., 2017

Autoria Própria (2020).

Estudos realizados com infusões de misturas de flores de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* cv. *Hangju*) e frutos de mirtilos (*Lycium barbarum*) reportaram a existência de oito compostos fenólicos, oriundos principalmente das flores, que justificam a atividade antioxidante e anti-inflamatória nas diferentes amostras (Zhang, He, He & Jing, 2019). Um estudo realizado por Lockowandt et al., (2019), com centáurea (*Centaurea cyanus* L.), uma planta daninha de flores azuladas utilizada para fins alimentares, decorativos e de pigmentação, destacou a capacidade antibacteriana contra um painel de bactérias Gram-positivas e a presença de tocoferóis, ácidos orgânicos, derivados de apigenina e cianidinas. Jabeur et al., (2017) destacou a composição nutricional de *Hibiscus sabdariffa* L. bem como

a presença de compostos bioativos e pigmentos naturais de interesse com possível aplicação na indústria alimentar.

Os diversos estudos realizados têm contribuído para o crescente interesse, procura e aplicação de flores comestíveis. No entanto, devido ao elevado número de espécies ainda pouco estudadas são vários os estudos em curso que visam o conhecimento e valorização de flores.

2.1.2 Caracterização do gênero *Impatiens*

As plantas do gênero *Impatiens* pertencem à família Balsaminácea, caracterizam-se por serem herbáceas perenes, eretas, com caules suculentos-carnosos, que podem atingir 20 a 40 cm de altura, sendo oriundas do continente Africano. Possuem folhas simples, com flores solitárias de cores variadas e com frutos elipsoides em forma de cápsula suculenta com deiscência explosiva. Estas plantas podem ser consumidas pelo ser humano tanto *in natura* como na forma processada. Apresentam um sabor adocicado e são usualmente aplicadas como enfeites para saladas ou flutuadas em bebidas. Devido à sua beleza, esta herbácea é cultivada mundialmente para fins ornamentais, principalmente em intervenções paisagísticas. São muito comuns no território brasileiro, sendo encontradas facilmente em floriculturas, comércios e florestas (Kinupp, 2014; Stradley, 2015). No sudeste brasileiro esta herbácea distanciou-se do seu ambiente de cultivo podendo ser encontradas de forma subespontânea (**Figura 1**) em regiões de serra e ambientes húmidos (Kinupp, 2014).

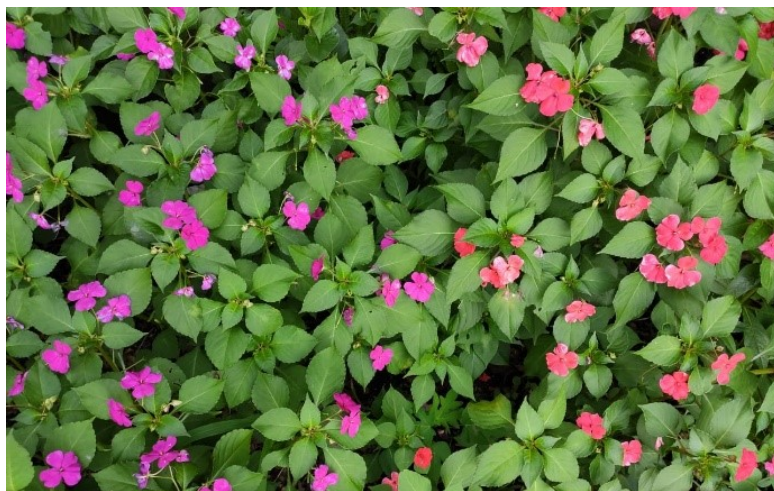


Figura 1. Crescimento espontâneo de *Impatiens walleriana* (Fonte: Autoria própria, 2019).

O termo *Impatiens* surgiu associado ao comportamento “impaciente” característico

destas plantas uma vez que as vagens explodem sob leve pressão quando maduras, dispersando de modo aleatório as suas sementes pelo ambiente (Britannica Academic, 2017). Este gênero de planta apresenta características de suculência em toda a sua composição. As suas hastes são tipicamente grossas, muitas vezes semi-translúcidas. Por sua vez, as folhas apresentam finas espessuras, tornando-se membranosas e geralmente quase transparentes quando secas (Grey-Wilson, 1980).

Estas plantas são popularmente reconhecidas por apresentarem flores de cores atrativas, que podem variar entre o roxo, amarelo, rosa, vermelho ou branco. Além disso, as suas flores são brilhantes, devido principalmente ao fenômeno causado pela luz refletida das células na sua superfície. Quanto à sua resistência, pode-se afirmar que o gênero apresenta fragilidade, uma vez que são facilmente danificadas (Britannica Academic, 2017). A morfologia geral das flores do gênero pode ser observada na **Figura 2**.

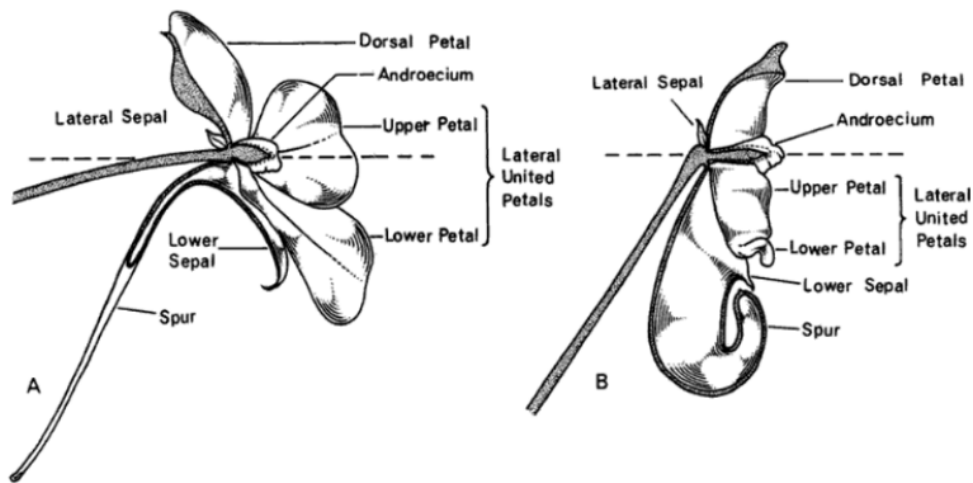


Figura 2. Corte longitudinal: *I. walleriana* (A) e *I. niarniamensis* (B). (Fonte: Grey-Wilson, 1980).

Em 1980, Grey-Wilson estimou a existência de aproximadamente 850 espécies do gênero *Impatiens* espalhadas pelo mundo; mais tarde um estudo levado a cabo por Raymond Morgan (2007), revelou a existência de mais de 1000 espécies deste gênero. Dados mais atuais apresentados pela *The Plant List* (2013), afirmam a existência de 1404 espécies deste gênero. A abundância destas plantas, aliada ao baixo custo em comparação a outros gêneros de flores tornam estas plantas atrativas a serem estudadas e exploradas (Kinupp, 2014). No entanto, o número de espécies disponíveis comercialmente é ainda muito restrito.

No Estado de São Paulo, no Brasil, existe apenas uma espécie (*Impatiens walleriana*)

com características subespontânea, sendo habitualmente encontrada na encosta atlântica ou em áreas florestais. Popularmente, é conhecida como “beijo”, “beijo-de-frade”, “beijo-turco” e “maria-sem-vergonha” e caracteriza-se por frutificar e florescer ao longo de todo o ano (Souza, 2002). A **Figura 3** apresenta a estrutura da *I. walleriana*.

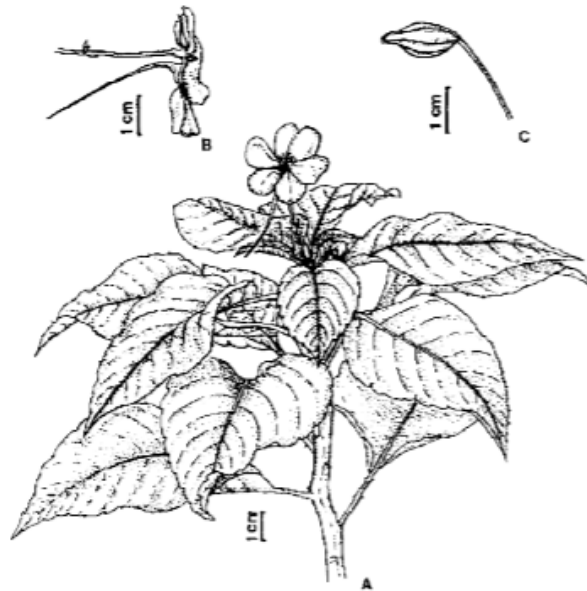


Figura 3. Estrutura da *I. walleriana*. **A:** ramos; **B:** flor; **C:** fruto. (Fonte: Souza, 2002).

Por sua vez, a espécie *Impatiens balsamina* L. (**Figura 4**) é caracterizada como uma planta não endêmica do Brasil, de caule suculento e glabrescente que apresenta folhagem em formato de lâminas lanceoladas e de flores e frutos tomentosos (Hassemer, 2019). Esta herbácea encontra-se em diversas áreas do Brasil, tendo a mata atlântica como seu domínio fitogeográfico e presentes em áreas antrópicas e florestas pluviais. Originária do sul da Ásia, a *I. balsamina* é atualmente cultivada de forma ornamental em todo o mundo. Em certas áreas brasileiras esta planta é classificada como não naturalizada. No entanto, Hassemer & dos Santos (2018) obtiveram os primeiros registros desta planta de forma naturalizada como espécie espontânea no Brasil na região de Itamaraju e em Florianópolis, sendo estas regiões de floresta atlântica.

Alguns estudos relatam a utilização de plantas de *I. balsamina* por povos indígenas no continente Asiático para fins medicinais, direcionadas ao tratamento de patologias como reumatismo, inflamações de unhas e no tratamento de fraturas (Wang, Li & Bi, 2018). Na China, esta planta é popularmente utilizada para o tratamento de diversas doenças (Su, Zeng, Chen, Chen, Guo et al., 2012). Alguns estudos destacam o uso das partes aéreas destas

plantas no tratamento de hematomas, reumatismo articular e beribéri enquanto que as sementes são aplicadas em tratamentos alternativos de combate ao cancro, dores puerperais e para o tratamento de caroços por sua vez as flores estão apontadas como capazes de combater dermatites, lombalgias, neuralgias e queimaduras (Kim et al., 2015).



Figura 4. *Impatiens balsamina*. (Fonte: Autoria própria, 2019).

A presença de compostos como, cumarinas, ácidos fenólicos, antocianinas e outros flavonoides, saponinas, e naftoquinonas, neste gênero de herbácea, tem vindo a justificar as propriedades anti-pruríticas, anti-anafiláticas e anti-inflamatórias descritas (Kim et al., 2015; Chua, 2016).

2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Definem-se como compostos fenólicos, substâncias resultantes do metabolismo secundário, que podem ser encontradas em diversas plantas, como frutas e vegetais e alguns produtos alimentares como as infusões, os vinhos e o mel (Lima, Sousa, Prada, Harel, Dubreuil et al., 2019). Segundo a literatura, os compostos fenólicos formam o maior e mais diverso grupo de metabolitos secundários originários de plantas. Existem mais de 10000 compostos fenólicos descritos estando estes classificados conforme sua origem, função, efeito e estrutura (Koike, 2015b).

Quanto à sua estrutura, os compostos fenólicos são segmentados em: fenóis simples (substâncias dotadas de apenas um anel aromático e que possui no mínimo uma hidroxila) e os polifenóis (substâncias que apresentam mais de um anel aromático) que apresentam diferentes níveis de hidroxilação (Chandrasekara & Shahidi, 2018; Koike, 2015b). Geralmente os fenóis simples e os polifenóis apresentam-se na forma de agliconas (não

conjugadas) ou glicosiladas (conjugadas), que normalmente se ligam a açúcares, ácidos orgânicos, bem como aminoácidos e lípidos. Estas substâncias podem enquadrar-se em quatro categorias principais dependendo do seu arranjo estrutural: ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos e taninos (Kumar et al., 2019b). Os flavonoides e os ácidos fenólicos são apontados como os compostos fenólicos que se encontram distribuídos em maiores proporções na natureza (Koike, 2015b).

Estes compostos possuem propriedades muito importantes para a dieta humana, uma vez que, atuam como antioxidantes sendo capazes de eliminar diversas espécies reativas de oxigénio, azoto e cloro, assim como o anião superóxido, radicais hidroxil e peroxil, ácido hipocloroso e ácido peroxinitroso (Petti & Scully, 2009).

2.2.1 Classificação de compostos fenólicos

Os fitoquímicos podem ser classificados em diversos compostos. Dentre eles destacam-se os compostos fenólicos, que por sua vez são repartidos em ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos e taninos (Ferreira & Abreu, 2007), conforme demonstrado na **Figura 5**.

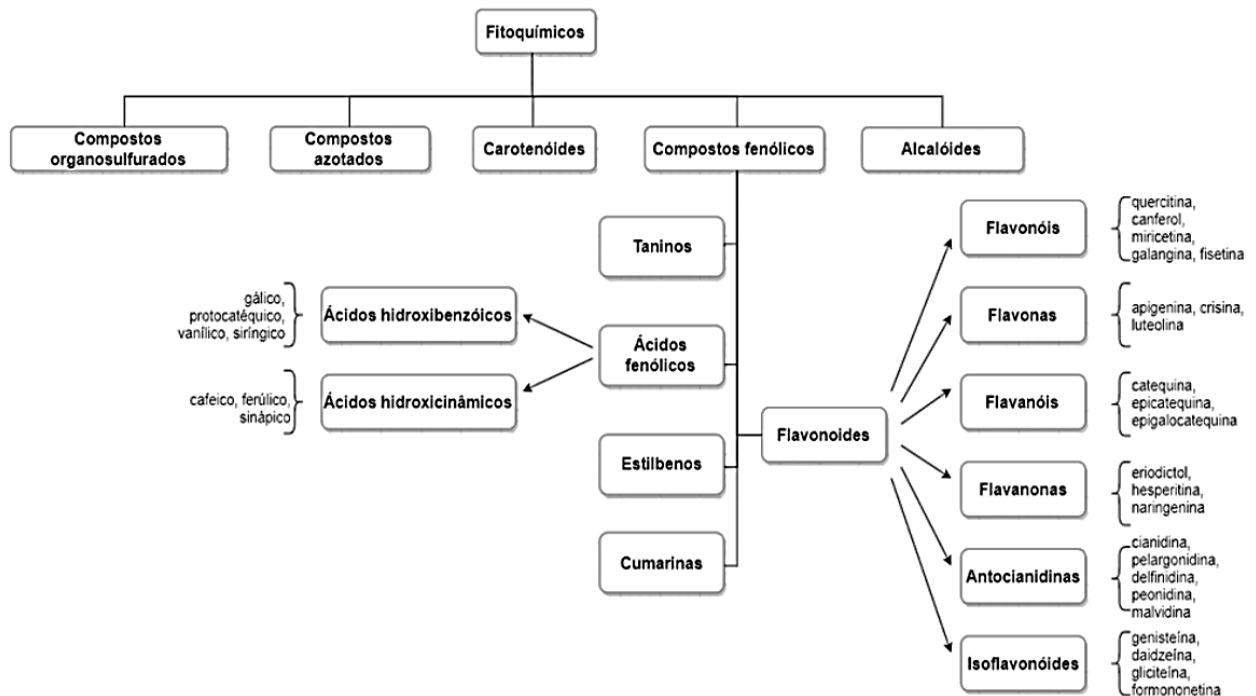


Figura 5. Principais classes de fitoquímicos naturais (Adaptado de Ferreira & Abreu, 2007).

Os ácidos fenólicos são os compostos fenólicos caracterizados por possuírem o ácido

carboxílico na sua estrutura e serem facilmente encontrados numa vasta gama de alimentos à base de frutas, folhas e vegetais (Kumar & Goel, 2019a). Normalmente, são encontrados na forma de amidas, ésteres ou glicosiladas e raramente se apresentam na sua forma livre (Kumar & Goel, 2019a). Estas substâncias podem ser classificadas como ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. Sendo os ácidos hidroxibenzóico (C6-C1) mais frequentes o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e protocatecuico; enquanto, os ácidos hidroxicinâmicos (C6 -C3) mais conhecidos são, o *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, e ácido sinápico (Pereira, Valentão, Pereira & Andrade, 2009).

Por sua vez, os flavonoides são caracterizados por apresentarem uma estrutura química composta por dois anéis benzénicos (A e B), com uma configuração química C6-C3-C6 e conectados através de um anel heterocíclico (C) dotado de um átomo de oxigénio (Olagaray & Bradford, 2019; Wang, Li & Bi, 2018). Estes compostos são agrupados em subclasses conforme a variação do padrão de hidroxilação dos três anéis (A, B e C) (Olagaray & Bradford, 2019). Entre as subclasses dos flavonoides, destacam-se flavonóis, flavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianidinas (em especial as antocianinas) e flavanóis (ou flavan-3-óis) (Kumar & Pandey, 2013). Contudo, o conhecimento sobre as estruturas dos flavonoides e a sua classificação são de extrema importância para o seu estudo, pois muitos dos seus benefícios estão relacionados a estas características estruturais (Balasundram, Sundram & Samman, 2006).

Já os estilbenos, são compostos estruturados através de dois anéis fenólicos, tendo como fórmula básica C6-C2-C6 (Kiselev, Grigorchuk, Ogneva, Suprun & Dubrovina, 2019). São sintetizados a partir dos fenil propanoides, sendo a grande maioria originária da unidade básica *trans*-resveraltrol (Chong, Poutaraud & Hugueney, 2009). Estes compostos podem sofrer modificações de oligomerização, glicosilação, metoxilação e prenilação, podendo originar outros estilbenoides. Nas plantas os estilbenos atuam como metabolitos secundários protetores dos stresses biótico e abióticos (Kiselev et al., 2019).

As cumarinas são identificadas por estruturas 1,2-benzopirona ou benzopiran-2-onas, e caracterizadas como compostos heterocíclicos de oxigénio (de Souza, Rennó & Figueroa-Villar, 2016). Podem ser encontradas em diferentes partes das plantas maioritariamente em frutos, raízes e folhas. Têm despertado crescente interesse científico devido às suas atividades biológicas perante diversas sitomatologias, que motivam o desenvolvimento de fármacos (Thakur, Singla & Jaitak, 2015).

Por último, os taninos são metabolitos secundários que despertam grande interesse económico e ecológico. Possuem habilidades de solubilidade em água e também são capazes de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. Podem ser classificados em taninos condensados (polímeros de flavan-3-óis, cujos monómeros são unidos por uma ligação carbono a carbono) e hidrossolúveis (ésteres de ácido gálico e de ácido elágico e glicose, além de outros polióis). Na natureza, são responsáveis por promover as características de adstringência das plantas, ocasionada pela precipitação das glicoproteínas (Monteiro, de Albuquerque, de Araujo & de Amorim, 2005; Silveira & Lima, 2003).

2.2.2 Antocianinas: aspetos químicos e propriedades bioativas

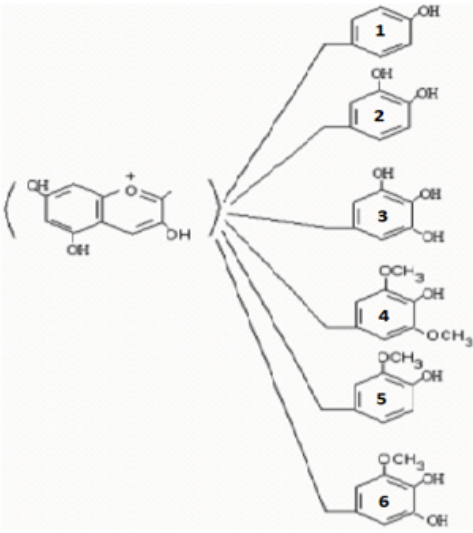
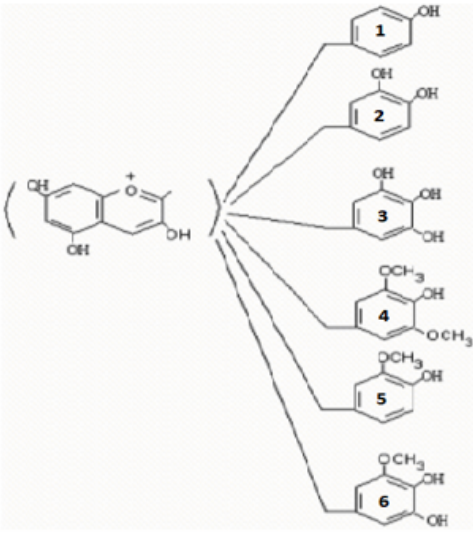
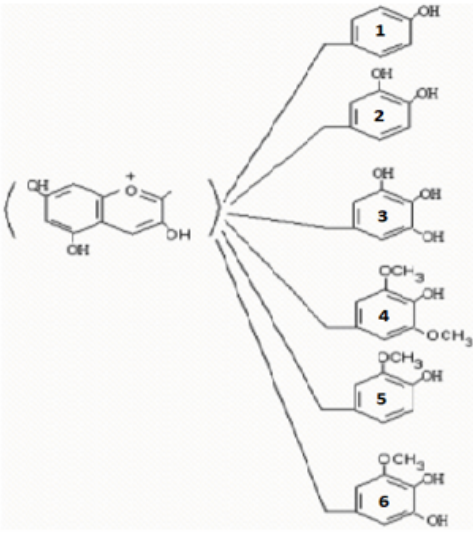
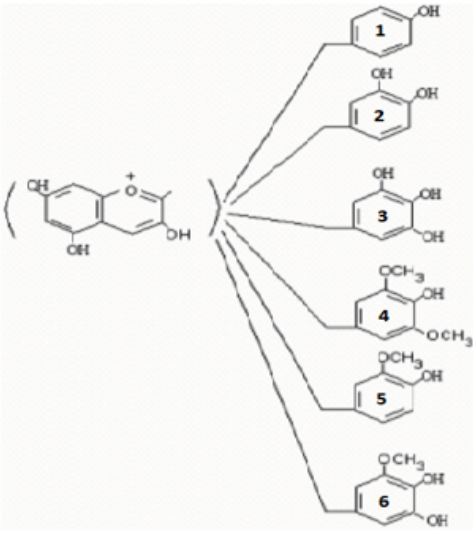
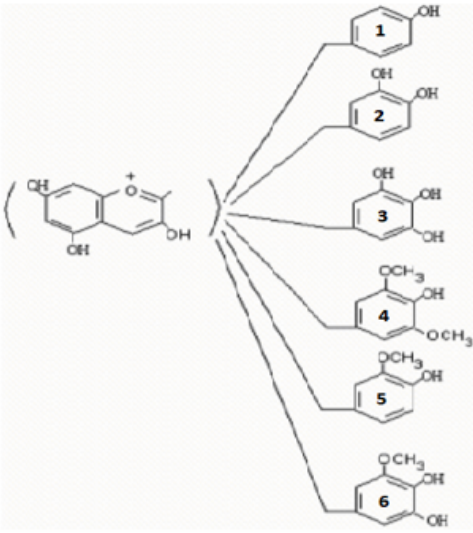
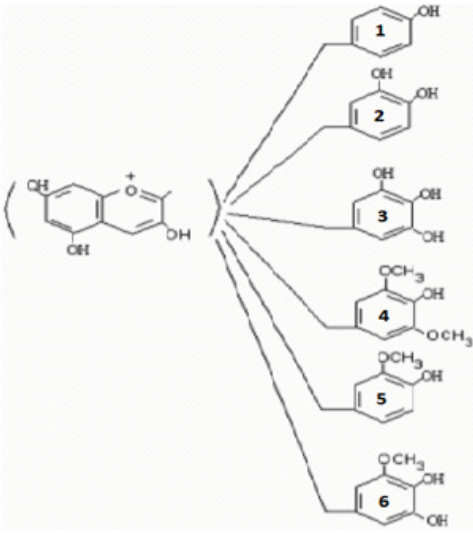
Muitas das cores presentes nas plantas são originadas pela síntese dos seus metabolitos secundários. Diversas flores, frutas e legumes na natureza são dotadas de cores chamativas. Essas colorações, são resultado de pigmentos presentes na sua composição, como, clorofilas (verdes), carotenoides (amarelo-laranja-vermelho), antocianinas (vermelho-azul-roxo) e betalainas (vermelha). Dentre diversas aplicações destinadas a esses grupo, destacam-se os produtos alimentares, sendo diretamente aplicados na composição dos alimentos, ou de maneira indireta através da alimentação dos animais (Rodriguez-Amaya, 2016).

Dentre os principais compostos responsáveis pela coloração dos tecidos vegetais destacam-se as antocianinas. Estes compostos são solúveis em água e apresentam uma importante função na proteção das plantas a condições de stress nomeadamente a baixas temperaturas e radiações, bem como para atração de seus polinizadores (Bunea, Rugină, Sconța, Pop, Pinteá et al., 2013; Dixon, Liu & Jun, 2013; Gu, Wang, Hu & Hao, 2019). Do ponto de vista da saúde humana, as antocianinas são consideradas importantes antioxidantes naturais que atualmente despertam muito interesse na comunidade científica e industrial, devido à infinidade de aplicações, nomeadamente aditivos alimentares, como corantes (López, Caleja, Prieto, Barreiro, Barros et al., 2018).

As antocianinas constituem uma subclasse importante dos flavonoides (Bunea et al., 2013). São originadas através dos metabolitos secundários das plantas e podem ser definidas como compostos polifenólicos, de cores diversas, que variam entre o laranja, vermelho, roxo até azul e podem estar presentes em flores, sementes, bagas, frutas e outros tecidos vegetativos (Gowd, Jia & Chen, 2017; Tanaka & Ohmiya, 2008).

O processo de síntese das antocianinas ocorre a partir da fenilalanina presente nas plantas, através de uma rota conservadora dependente da espécie (Gu et al., 2019). As antocianinas e antocianidinas são substâncias orgânicas atóxicas solúveis à água. São caracterizadas pelo seu arranjo estrutural C15, contendo um esqueleto polifenólico heteroaromático constituído por três anéis. Apesar da infinidade de estruturas naturais das antocianinas, são conhecidas aproximadamente 25 agliconas distintas, sendo as mais comuns em tecidos vegetais e que despertam maior interesse, as pelargonidina (cor laranja), cianidina (cor laranja-vermelho), peonidina (cor laranja-vermelho), delphinidina (cor azul-vermelho), petunidina (cor azul-vermelho) e malvidina (cor azul-vermelho) conforme apresentado na **Tabela 3** (Sinopoli, Calogero & Bartolotta, 2019).

Tabela 3. Estrutura química, nomenclatura e origem das principais antocianinas.

Estrutura: catião flavílico. Estrutura do Anel	Nome	Encontrado em:
	1) Pelargonidina	Morangos, amora vermelha.
	2) Cianidina	Jaboticaba, figos, ameixas, amora, repolho roxo.
	3) Delfinidina	Berinjela, romã e maracujá.
	4) Malvidina	Uva, feijão.
	5) Peonidina	Uva, cereja.
	6) Petunidina	Frutas diversas, petúnias.

Adaptado de Souza (2012).

O nível de hidroxilação e metilação dos compostos antociânicos são fatores determinantes para a coloração e estabilidade desses compostos. A hidroxilação é responsável pelo aumento da tonalidade azul dos compostos e pela redução da sua estabilidade, enquanto a metilação provoca o aumento da tonalidade avermelhada e torna os compostos mais estáveis (Rodriguez-Amaya, 2019).

No segmento dos corantes vegetais, os carotenoides e as antocianinas são os mais utilizados pela indústria alimentar. Apresentando características lipossolúveis e estáveis, os carotenoides são responsáveis por agregar cor aos produtos alimentares em tons de amarelo a vermelho; são obtidos através de vegetais como cenouras, tomates e pimentões. Em contra

partida, as antocianinas são compostos com menor estabilidade (quando comparadas ao carotenoides) que apresentam solubilidade em água, podem fornecer diferentes tonalidades de coloração, desde o vermelho a tons azul e geralmente são extraídas de diversas fontes tais como: uvas, repolho roxo, maçãs, tulipas, rosas, orquídeas, entre outros (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez & Galán-Vidal, 2009).

Alguns estudos relataram a presença de compostos antociânicos em exemplares do gênero *Impatiens*, tal como pode ser verificado na **Tabela 4**. Szewczyk (2018a) afirma que as antocianinas mais frequentes nas *Impatiens* são a pelargonidina e a peonidina, porém outras antocianinas derivadas das classes da malvidina, delfinidina e cianidina também podem ser encontradas. Mais especificamente, Tatsuzawa et al., (2009), identificaram os compostos Malvadin 3-glucoside, Malvadin 3-O-(6''-malonyl)glucoside e Malvidin 3,5-di-O-glucoside em exemplares de *I. textori*, enquanto a peonidina 3-O-glucoside foi identificada por Paun et al., (2018) em extratos de *I. noli tangere*.

Tabela 4. Compostos antociânicos presentes no gênero *Impatiens*.

Nome do Composto	Solvente de Extração	Espécie	Referências
Cianidina	Extração à temperatura ambiente com ácido clorídrico a 1% em álcool etílico a 95% (v / v).	<i>I. balsamina</i> L.	Klein and Hagen, 1961
	Extração com etanol a 50% e posterior banho com sonicação.	<i>I. noli-tangere</i> L.	Paun et al., 2018
	Composto extraído com ácido clorídrico metanólico a 1%.	<i>I. holstii</i> Engl. & Warb.	Klozová and Rokosavá, 1961
	Extrato obtido com ácido clorídrico etanólico a 1%.	<i>I. capensis</i> Meerb	Clevenger, 1958
Cianidina 3-O-glucoside	Extração com 70% de etanol contendo 0,4% de ácido clorídrico (v / v).	<i>I. balsamina</i> L.	Hagen, 1966
	Extração com metanol e ácido clorídrico a 1%.	<i>I. platypetala</i> Lindl.	Thakur et al., 1978
Delfinidina	Extração à temperatura ambiente com ácido clorídrico a 1% em álcool etílico a 95% (v / v).	<i>I. balsamina</i> L.	Alston and Hagen, 1958
Malvidina	Composto extraído com ácido clorídrico metanólico a 1%.	<i>I. hostii</i> Engl. & Warb.	Klozová and Rokosavá, 1961
	Extração com etanol a 50% e posterior banho com sonicação.	<i>I. noli-tangere</i> L.	Paun et al., 2018
	Extrato obtido com ácido clorídrico etanólico a 1%.	<i>I. schlechteri</i> Warb. / <i>I. hawkeri</i> W. Bull.	Clevenger, 1958
Malvidina 3-glucosido	Extração foi realizada com pétalas frescas em	<i>I. textori</i> Miq.	Ueno et al., 1969

Nome do Composto	Solvente de Extração	Espécie	Referências
	ácido clorídrico metanólico a 2%.		
Malvidina 3- <i>O</i> -(6"-malonil)glucósido	Extrato obtido com ácido etanólico a 5% à temperatura ambiente e extraídas durante a noite.	<i>I. textori</i> Miq.	Tatsuzawa et al., 2009
Malvidina 3,5-di- <i>O</i> -glucosido	Extração foi realizada com pétalas frescas em ácido clorídrico metanólico a 2%.	<i>I. textori</i> Miq.	Ueno et al., 1969
Malvidina 3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hidroxi-3-metilglutaril)- β -glucopiranosido]	Extrato obtido com ácido etanólico a 5% à temperatura ambiente e extraídas durante a noite.	<i>I. textori</i> Miq.	Tatsuzawa et al., 2009
Pelargonidina	Extração à temperatura ambiente com ácido clorídrico a 1% em álcool etílico a 95% (v/v).	<i>I. balsamina</i> L.	Alston and Hagen, 1958
Pelargonidina 3-glucosido	Extração à temperatura ambiente com ácido clorídrico a 1% em álcool etílico a 95% (v/v).	<i>I. balsamina</i> L.	Klein and Hagen, 1961
Pelargonidina 3,5-diglucosido	Extração com 70% de etanol contendo 0,4% de ácido clorídrico (v/v).	<i>I. balsamina</i> L.	Hagen, 1966
Pelargonidina 3-glucósido-5-acetilglucosido	Extração com 70% de etanol contendo 0,4% de ácido clorídrico (v/v).	<i>I. balsamina</i> L.	Hagen, 1966
Peonidina	Extração à temperatura ambiente com ácido clorídrico a 1% em álcool etílico a 95% (v/v).	<i>I. balsamina</i> L.	Klein and Hagen, 1961
Peonidina 3- <i>O</i> -glucosido	Extração com etanol a 50% e posterior banho com sonicção.	<i>I. noli-tangere</i> L.	Paun et al., 2018
Leucocianidina	O extrato foi obtido com ácido clorídrico etanólico a 1%. Extração realizada com ácido clorídrico, em tubos de ensaio.	<i>I. capensis</i> Meerb <i>I. glandulifera</i> Royle. / <i>I. parviflora</i> DC.	Clevenger, 1958 Bathe-Smith, 1962
Leucodelfinidina	Extração realizada com ácido clorídrico, em tubos de ensaio.	<i>I. parviflora</i> DC.	Bathe-Smith, 1962

Adaptado de Szewczyk (2018a).

No passado a popularidade das antocianinas remetia apenas aos conceitos de atribuição de coloração e de características sensoriais das suas matrizes de aplicação. No entanto, atualmente, as pesquisas relacionadas com compostos antociânicos concentram-se nos benefícios da saúde atribuídas ao seu consumo, devido a suas atividades biológicas presentes (Fallah, Sarmast, Fatehi & Jafari, 2019).

A literatura apresenta estes fitoquímicos com propriedades antitumorais, anti-inflamatória comprovada sendo capazes de atuar na remoção de radicais livres, bem como de inibir a peroxidação lipídica e a agregação plaquetária, além de atuar na prevenção do diabetes, auxiliar na redução de massa corporal e proteger a visão humana (Ma, Ding, Fei, Liu, Jang & Fang, 2019). Por sua vez, Calderaro et al., (2020) e Tang et al., (2019) apontam diversas contribuições relacionadas com o consumo de antocianinas, nomeadamente atividade antioxidante, prevenção de alguns tipos de cancros, além de proporcionarem melhorias ao sistema neural e cardiovascular.

A eficácia das antocianinas na prevenção e no tratamento de sintomatologias está diretamente ligada à sua biodisponibilidade. Alguns estudos afirmam que a absorção destes compostos em seres humanos ocorre a nível de pequenas frações de pigmentos, acarretando, assim, alguma dificuldade da sua aplicação devido ao seu mecanismo de ação (Ávila, Hidalgo, Moreno, Pelaez, Requena et al., 2009; Braga, Murador, de Souza Mesquita & Rosso, 2018). As antocianinas são compostos considerados muito instáveis que se degradam com facilidade tornando-se compostos incolores ou de cor acastanhada (Kırca, Özkan & Cemeroğlu, 2007).

São vários os fatores que podem influenciar a estabilidade das antocianinas. Dentre esses fatores destacam-se: as condições de processamento e armazenamento (temperatura, luz e oxigénio), as condições físico-químicas (atividade enzimática, pH e teor de açúcares) e a presença de co-pigmentação e alguns metais (Martyntenko & Chen, 2016; Tang et al., 2019). De acordo com Tan, Celli, Selig & Abbaspourrad (2018), a estrutura do núcleo flavílio dos compostos antociânicos é facilmente degradado quando exposto a ambientes nocivos, incluindo temperatura elevada, variações de pH e agentes oxidantes. Desta forma, o estudo sobre os fatores que afetam a estabilidade das antocianinas é de extrema importância para as aplicações industriais.

O pH é considerado um dos principais responsáveis pelas alterações estruturais dos compostos antociânicos. Sabe-se que as antocianinas sofrem transformações estruturais conforme a variação de pH do meio no qual se encontram inseridas, conforme demonstrado pela **Figura 6** (Zhao et al., 2019b). Assim, em condições de pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam uma predominância do catião vermelho de flavilo, enquanto que em condições pH entre 4 a 5, ocorre uma hidratação rápida do catião flavilo em C-2 para formar a pseudobase de carbinol incolor, que pode sofrer abertura do anel para um calcon amarelo quando expostas em condições de pH próximos a 6. Por fim, em condições levemente ácidas

a neutras, a desprotonação do catião flavilo gera a base quinoidal azul (Rodriguez-Amaya, 2016, 2019).

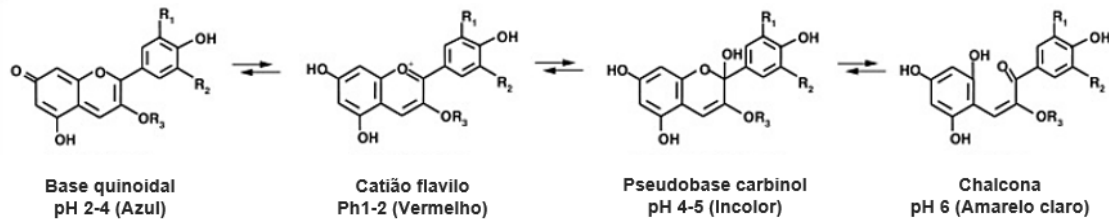


Figura 6. Transformações das antocianinas conforme o pH. (Adaptado de Rodriguez-Amaya, 2016).

A co-pigmentação é outro fator relevante que afeta a estabilidade dos compostos antociânicos. Segundo Chatham, Howard & Juvik (2019), a co-pigmentação define-se pela interação não covalente entre uma antocianina e um pigmento, geralmente da classe dos flavonoides. Este fenômeno ocorre através da ação de um co-pigmento (íons metálicos, compostos fenólicos, e outros flavonoides) em parceria com as antocianinas, nos quais se formam montagens supramoleculares no intuito de atribuir brilho e intensidade às cores presentes nestes compostos (Tan et al., 2018). No entanto, mesmo com a intensificação de cor dessas substâncias, nem sempre a estabilidade das antocianinas sofre melhorias. Tal pode ser justificado pelo facto de os compostos pigmentados serem altamente suscetíveis à degradação com a exposição a diferentes sistemas solventes, temperaturas elevadas ou armazenamento (Boulton, 2001; Eiro & Heinonen, 2002; Míguez, Manzano, Teresa, Bailó, Heredia et al., 2006).

A indústria alimentar recorre frequentemente a tratamentos térmicos como métodos de conservação de forma a prolongar o tempo de prateleira e garantir a segurança dos alimentos (Peron, Fraga & Antelo, 2017). Na maior parte dos casos, os processamentos térmicos são aplicados a temperaturas entre 50 a 150°C, de acordo com as limitações do alimento e do prazo de validade pretendido. No entanto, a estabilidade das antocianinas é altamente influenciada pela temperatura, uma vez que algumas operações unitárias que envolvem calor podem comprometer a cor, o conteúdo antocianico e as suas propriedades antioxidantes (Patras, Brunton, O'Donnell & Tiwari, 2010). Na presença de temperaturas elevadas, as antocianinas são afetadas a níveis estruturais uma vez que ocorre a polimerização dos compostos monoméricos, acarretando um escurecimento indesejável aos

produtos alimentares e, resultando, desta forma, numa rejeição por parte dos consumidores (Sinela et al., 2017).

Por sua vez, a luz é responsável por um papel duplo na estabilidade das antocianinas. Apesar da sua presença ser essencial para a biossíntese deste compostos, a incidência de luz também tem a capacidade de acelerar o seu processo de degradação (Nave, 2014). Estudos constataram uma redução de 86,23% do teor total de antocianinas em bebidas enriquecidas com extratos antociânicos da casca de jabuticaba, conservadas a 25°C na presença de luz. Além disso, o mesmo estudo salienta que os fatores luz e temperatura podem atuar em conjunto causando efeitos deletérios às antocianinas presentes nas bebidas (Valente, 2015).

Por último, o oxigênio é também um fator que apresenta características nocivas para as antocianinas. Este é responsável por acelerar a degradação desses compostos através dos mecanismos de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio, mesmo sem a incidência da luz e em toda a faixa de pH (Saito, 2014). A turbidez e a existência de precipitados nos sumos de frutas podem ser consideradas consequências do processo direto de oxidação da base carbinol encontrada nos compostos antociânicos. Adicionalmente, também a substituição de oxigênio por azoto pode aumentar a estabilidade das antocianinas em sumos (Lopes, Xavier & Quadri, 2007).

2.2.3 Técnicas de extração de antocianinas

Na seleção do método adequado de extração de compostos fenólicos é importante ter em consideração a origem, a natureza dos constituintes da matriz e também o objetivo da extração. No caso particular das antocianinas, é necessário levar em conta também, os fatores que influenciam a estabilidade e a estrutura dos compostos antociânicos, de modo a garantir uma metodologia que não degrade os compostos existentes e que os mantenham o mais próximo possível do seu estado natural. Industrialmente, quando se pretende obter um extrato com finalidade de aplicação corante ou conservante, o rendimento, a resistência e a estabilidade da matéria são fatores importantes na decisão da metodologia a ser aplicada (Houghton & Hendry, 2012).

As implicações ambientais são também um fator importante na escolha da metodologia de extração a utilizar, uma vez que com a crescente procura é necessário garantir uma redução no consumo de solventes, energia e tempo de extração, aliado a um elevado rendimento dos compostos (Duan, Jin, Zhao & Sun, 2015; Garcia-Mendoza et al., 2017, Pires et al., 2019).

A instabilidade das antocianinas a diferentes fatores referidos anteriormente, que podem comprometer a sua extração, análise e tempo de vida útil, implicam que a metodologia implementada para a sua extração deva ser cautelosa em certos aspectos operacionais, ou seja, deverá ter-se em consideração a aplicação de luz moderada, baixas temperaturas e/ou tipo de solvente apropriado, levando-se em consideração o binómio custo e tempo (Guo, Ping-Kou, Jiang, Wang, Niu et al., 2019).

Os solventes mais comumente utilizados nos processos de extração de antocianinas são álcoois (metanol ou etanol), água ou misturas de água e álcoois, acidificada com ácido acético, clorídrico, cítrico entre outros (Pedro, Granato & Rosso, 2016, Pires et al., 2019). A literatura descreve diversas metodologias utilizadas tradicionalmente para a extração de antocianinas a partir de diferentes fontes naturais. A extração assistida por calor (EAC), extração enzimática, extração assistida por ultrassom (EAU) e assistida por micro-ondas (EAM) são algumas das técnicas mais referidas na literatura (Chemat et al., 2017; López et al., 2018).

Alguns autores referem a utilização de solventes acidificados na extração de antocianinas, uma vez que a acidificação tende a facilitar a penetração do solvente nos tecidos vegetais, além de aumentar a estabilidade do extrato, por dificultarem o aparecimento de fungos que degradam as antocianinas (Favaro, 2007). No entanto, a acidificação deve ser uma estratégia adotada com cautela, uma vez que o seu excesso pode proporcionar a formação de antocianidinas e outros flavonoides através processo de hidrólise (Favaro, 2007).

De outro modo, o binómio tempo e temperatura adotado na metodologia de extração também devem ser observados, pois podem afetar a degradação dos compostos antocianínicos presentes no extrato, uma vez que estes compostos são destruídos de forma logarítmica com a elevação da temperatura (Padilha, 2014). Entretanto, alguns estudos relatam que, se o tempo de extração for curto, a extração pode ser executada em temperaturas mais altas, o que é recomendado para promover maior retenção de pigmentos (Oliveira, 2014).

2.3. CORANTES NATURAIS NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

Os aditivos alimentares são essenciais na indústria alimentar, uma vez que exercem benefícios no tempo de prateleira, qualidade, segurança alimentar para além de desempenharem um papel importantíssimo nas características sensoriais dos produtos, como

a cor. O aspeto exterior dos alimentos é determinante para a aceitação ou rejeição de determinado produto por parte do consumidor (Martins, Roriz, Morales, Barros & Ferreira, 2016). Com o passar do tempo e da industrialização dos alimentos, este aspeto ganhou uma maior relevância devido a aplicação de corantes na indústria alimentar (Stich, 2016). A perda de cor durante o seu processamento, realce de cor já existente para manter padrões de produção entre lotes ou a coloração de alimentos desprovidos de cor, motivaram a aplicação de aditivos corantes (Mortensen, 2006). Os corantes alimentares possuem a capacidade de alteração ou atribuição de cores nos alimentos, sendo capazes de estimular o consumidor através do sentido da visão desempenhando, assim, um papel importantíssimo nos aspetos atrativos dos alimentos (Lin, He, Chau, Li, et al., 2018).

Segundo o anexo 1 do Regulamento (CE) N.º 1333/2008 (2008), define-se como corante, as substâncias capazes de conferir e restituir cor a um determinado género alimentar. E mediante o artigo 8º do mesmo, os corantes possuem a finalidade de corrigir a aparência dos alimentos quando afetada pelos processos de transformação, armazenamento, embalagem, bem como promover a atratividade do produto e conferir coloração quando desprovida. Os corantes alimentares podem ser classificados em três grupos: os corantes naturais, os corantes idênticos à natureza e os corantes sintéticos. Os corantes alimentares naturais, referem-se aos compostos sintetizados na natureza, incluindo os pigmentos obtidos pela extração seletiva por solvente, como as antocianinas e os quimicamente modificados após a extração seletiva, sendo um exemplo, as clorofilas cúpricas. Já os corantes idênticos à natureza são aqueles que embora sejam sintetizados industrialmente, se assemelham aos naturais tais como, as riboflavinas e os β -carotenos. Por sua vez, os corantes sintéticos/artificiais são os obtidos através de processos químicos tais como, a tartrazina (Carocho, Morales & Ferreira, 2015a; Chapman, 2011).

Downham e Collins (2000) após um estudo de investimento da indústria alimentar no setor dos aditivos corantes, apresentaram numa visão global de US\$ 940 milhões na aquisição deste aditivos, segmentados da seguinte forma: sintéticos (US\$ 400 milhões), naturais (US\$ 250 milhões), com estruturas idênticas aos naturais (US\$ 189 milhões) e caramelos (US\$ 100 milhões) conforme é apresentado na **Figura 7**. Os mesmos autores apresentaram um aumento dos corantes naturais entre 5 a 10 %, justificados pela crescente preferência dos consumidores por alimentos rotulados como mais saudáveis e mais naturais.

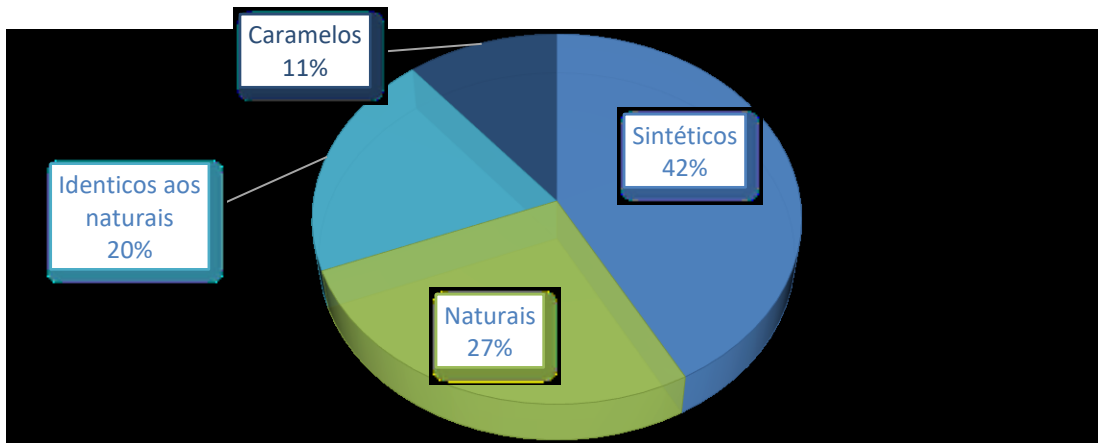


Figura 7. Mercado de corantes alimentares a nível mundial. (Adaptado de Downham & Collins, 2000).

2.3.1 Corantes naturais vs corantes artificiais

Do ponto de vista industrial, a aplicação de aditivos sintéticos apresenta-se favorável, quando comparados aos compostos naturais, pois estes aditivos geralmente apresentam menor custo, alta capacidade de coloração e maior estabilidade a condições de manipulação e tempo de prateleira (Corradini, 2019). No entanto, estudos científicos têm vindo a atribuir alguns efeitos adversos a nível da saúde dos consumidores provocados pelo consumo excessivo de alguns compostos sintéticos. Atualmente, existem algumas dúvidas sobre os efeitos da toxicidade e dos riscos provocados pelo consumo de corantes sintéticos nos alimentos. Alergias e hiperatividade são alguns dos problemas de saúde apontados (Anastácio, Oliveira, Delmaschio, Antunes & Chequer, 2016).

O consumo de alimentos processados é muito frequente em crianças e adolescentes, tornando-os vulneráveis aos impactos ocasionados pela ingestão destes alimentos, devido à sua imaturidade física, cognitiva e maior exposição aos aditivos alimentares, em especial, aos corantes sintéticos. Os mais consumidos por esta classe de consumidores são os caramelos e as carminas, que em vários estudos têm demonstrado potencial alergénico (Rocha, 2015). Um estudo desenvolvido por Bateman et al., (2004) obteve resultados positivos no comportamento hiperativo de crianças de 3 anos durante a fase de abstinência do consumo de corantes sintéticos e conservantes de benzoato.

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), já destacou alguns corantes obtidos pelo processo de síntese como responsáveis por provocar determinados sintomas adversos nomeadamente, Tartrazina (E102), Amarelo de quinoleína (E104), Amarelo-sol (E110), Azorubina (E122), Amarante (E123), Ponceau (E124), Eritrosina

(E127), Vermelho2 (E128), Azul patenteado (E131), Azul-brilhante (E133), Negro brilhante BN (E151), Castanho FK (E154), Castanho HT (E155). Manifestações de urticárias, rinites, alterações da visão, problemas respiratórios, além de afetarem também crianças com hiperatividade, que sofrem frequentemente de eczemas e asma são alguns dos sintomas apontados pelo consumo dos aditivos referidos.

A Eritrosina é um corante sintético legalmente utilizado em bebidas, biscoitos, doces e produtos de pastelaria, em países como Canadá, Brasil e Estados Unidos. Contudo, diversos estudos apontam para o facto de o consumo excessivo deste corante poder causar reações alérgicas nos olhos, irritações, dores de cabeça e náuseas (de Souza, 2012). Alguns efeitos adversos para a saúde do consumidor proporcionados pelo consumo de corantes alimentares, podem ser observados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Corantes artificiais e seus efeitos adversos.

Corantes	Origem	Aplicações	Efeitos adversos
Amarelo Crepúsculo	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azoicas	Cereais, rebuçados, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios, pastilhas elásticas	A tinta azoica, em algumas pessoas, causa alergia, produzindo urticária, angioedema e problemas gástricos.
Azul Brillhante	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, rebuçados, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, sumos	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e asma. Deve ser evitado por pessoas sensíveis às purinas
Amaranto ou Vermelho Bordeaux	Sintetizado a partir do alcatrão de carvão	Cereais, rebuçados, laticínios, geleias, gelados, recheios, xaropes, preparados líquidos	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina. Esse corante apresentou toxicidade quando testado em animais de laboratório, sendo proibido em vários países
Vermelho Eritrosina	Tinta do alcatrão de carvão	Pós para gelatinas, laticínios, sumos, geleias	O consumo excessivo pode causar aumento de hormonas da tireoide no sangue em níveis para ocasionar hipertireoidismo
Indigotina (azul escuro)	Tinta do alcatrão de carvão	Pastilha elástica, iogurte, rebuçados, caramelos, pós para sumos artificiais	Pode causar náuseas, vómitos, hipertensão e ocasionalmente alergia, com prurido e problemas respiratórios
Vermelho Ponceau 4R	Tinta do alcatrão de carvão	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, rebuçados, cereais, sumos e refrigerantes, sobremesas	Deve ser evitado por pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Podem causar anemia e aumento da incidência de glomerulonefrite (doença renal)
Amarelo Tartrazina	Tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas, iogurtes	Reações alérgicas em pessoas sensíveis à aspirina e asmáticos. Recentemente tem-se sugerido que a tartrazina em preparados de frutas causa insónia em crianças. Há também relatos de casos de afeção da flora gastrointestinal

Corantes	Origem	Aplicações	Efeitos adversos
Vermelho 40	Sintetizado quimicamente	Rebuçados, pastilha elástica, refrigerantes, sumos, gelados, gelatinas	Pode causar hiperatividade em crianças, eczema e dificuldades respiratórias

Adaptado de Souza (2012).

A indústria alimentar tem vindo a reduzir a quantidade de corantes artificiais em produtos alimentares, sendo estes substituídos por alternativas naturais inócuas. Além de apresentarem coloração, os pigmentos naturais são responsáveis por contribuir com bioatividades importantes, assim como efeitos benéficos para saúde humana, como mencionado anteriormente. A **Tabela 6** apresenta alguns corantes naturais atualmente aplicados pela indústria alimentar.

Tabela 6. Corantes naturais e suas aplicações.

Corantes Naturais	Utilização em Alimentos e/ou Género Alimentício
Urucum	Bolos, biscoitos, arroz, laticínios, farinha, refrigerantes, petiscos, produtos cárneos.
Carotenoides	Molhos, marinadas, misturas de especiarias, revestimentos, bebidas, leite.
Antocianinas	Refrigerantes, preparados para confeitaria.
Clorofilas	Laticínios, sopas, bebidas, coinfeções de açúcar
Curcumina	Mostarda, iogurtes, assados, laticínios, gelados, molhos para saladas.
Ácido carmínico	Doces, gelatinas, produtos de panificação, laticínios, bebidas não carbonatadas.

Adaptado de Carochó et al., (2015a).

2.3.2 Aplicação das antocianinas como ingredientes na indústria alimentar

Os compostos antociânicos são considerados os pigmentos de maior relevância das plantas vasculares; apresentam caráter inofensivo e proporcionam uma fácil incorporação em meios aquosos. São responsáveis pelas cores laranja, rosa, vermelha e azul, tornando-se, assim, ferramentas importantes para aplicações industriais, tais como corantes naturais solúveis em água (Castañeda-Ovando et al., 2009). As antocianinas podem ser encontradas na natureza na forma de cianureto, delphinidina, malvinidina, pelargonidina, peonidina, e petunidina (Carochó et al., 2015b).

Atualmente a incorporação de antocianinas é uma prática comum na indústria alimentar principalmente em bebidas, refrigerantes, laticínios e produtos de pastelaria (Ávila et al., 2009; Swer, Chauhan, Mukhim, Bashir & Kumar, 2019). Apesar da incorporação de antocianinas ser apresentada como uma solução muito atraente como alternativa aos corantes alimentares artificiais atuando simultaneamente como ingrediente funcional, é ainda

necessário ultrapassar algumas limitações relacionadas com a sua estabilidade e interação com outros constituintes das matrizes alimentares de forma a tornar esta alternativa real (Rodriguez-Amaya, 2019).

Num estudo desenvolvido com bagas *Sambucus nigra* L. (sabugueiro), verificou-se a presença de 3 compostos antocianicos distintos: cianidina-3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-sambubiósido e cianidina-3-*O*-glucósido. A incorporação do extrato aquoso como ingrediente corante em profiteroles, apresentou conservação de 60% da concentração de antocianinas na formulação inicial, comprovando, desta forma, o seu elevado potencial corante (Sousa, Heleno, Barros, Barreira & Ferreira, 2018). Também no estudo realizado por Pires et al., (2018), para testar extratos hidrofílicos de rosa, centúria e dália como alternativa de substituição do corante E163 em iogurtes. Foram sendo analisadas a capacidade de coloração e as possíveis alterações químicas das amostras durante sete dias de armazenamento. No geral, foi possível verificar que, os iogurtes preparados com extratos de flores apresentaram valor nutricional similar aos preparados com E163 e comprovaram a sua capacidade corante em produtos lácteos.

A existência de pigmentação é uma forte característica das pétalas do género *Impatiens* aliada às propriedades funcionais descritas na literatura, sugerem o estudo aprofundado do potencial uso destas flores como fonte de corantes naturais e ingredientes funcionais.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho centrou-se numa primeira fase na caracterização do perfil fenólico e no estudo de bioatividades de pétalas de cor laranja e de cor rosa de duas espécies de flores do género *Impatiens*: *Impatiens balsamina* L. e *Impatiens walleriana* L.. Numa segunda fase do trabalho, foi realizada a caracterização nutricional e química das pétalas de *I. balsamina*. E por fim, o extrato de pétalas rosa desta espécie foi incorporado em recheio de “bombocas”, com vista a estudar o seu potencial corante e funcionalizante ao longo do tempo de prateleira, comparando com as versões normalmente comercializadas. O plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 8**.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Identificação das espécies, através da classificação botânica das amostras colhidas do género *Impatiens*;
- Caracterização do perfil fenólico (compostos antociânicos e não antociânicos) das pétalas das espécies *I. balsamina* e *I. walleriana*;
- Estudo das bioatividades (antioxidante, antimicrobiana, citotoxicidade e anti-inflamatória) das pétalas das espécies *I. balsamina* e *I. walleriana*;
- Caracterização nutricional (gorduras, cinzas, proteínas, hidratos de carbono e energia) das pétalas da espécie *I. balsamina*;
- Caracterização química (teor em açúcares, ácidos gordos e ácidos orgânicos) das pétalas da espécie *I. balsamina*;
- Incorporação do extrato obtido a partir das pétalas cor rosa da espécie *I. balsamina* em recheio de “bombocas”;
- Avaliação dos efeitos dessa incorporação (parâmetros da cor, valor nutricional, composição em açúcares e ácidos gordos e atividade antioxidante) ao longo de 3 tempos de prateleira (0, 3 e 5 dias) em comparação com duas versões (“bombocas” de recheio branco e “bombocas” de recheio rosa) normalmente comercializadas.

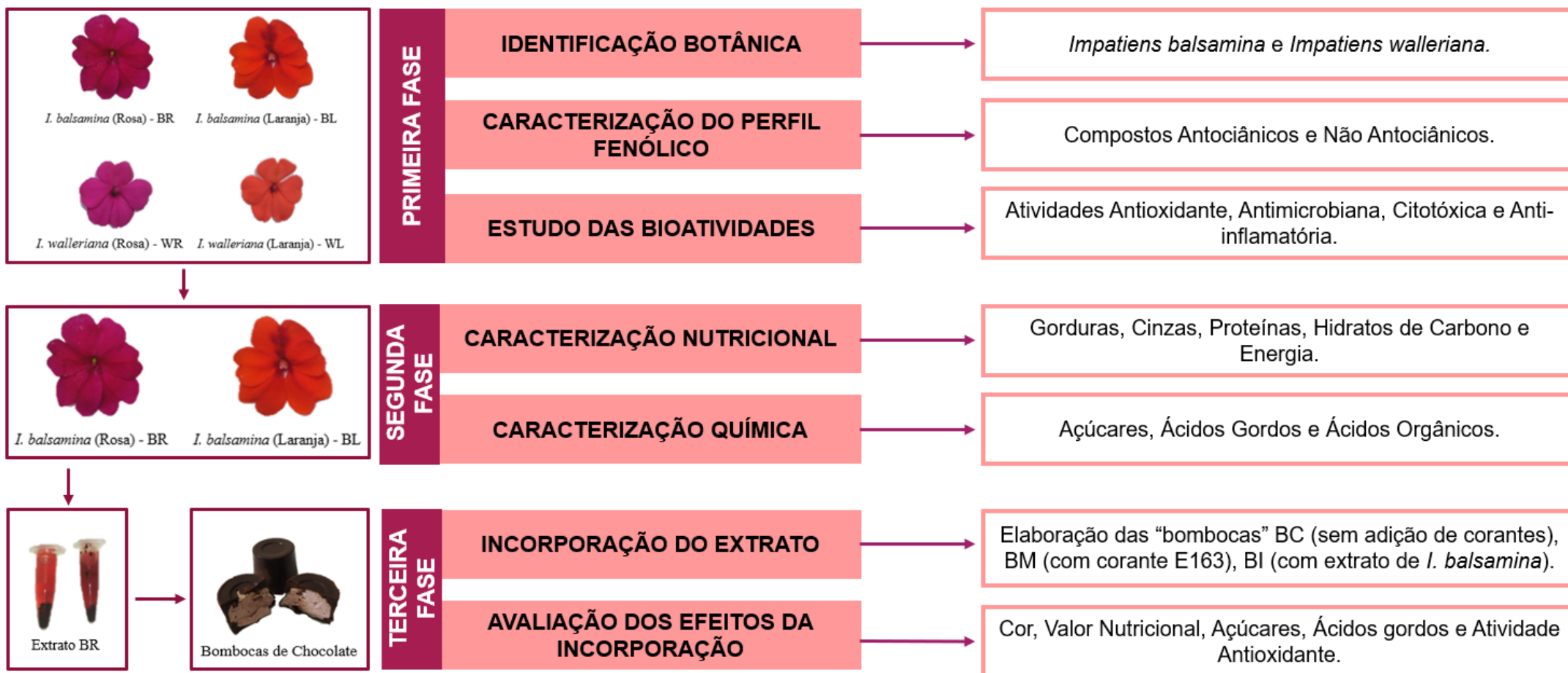


Figura 8. Representação esquemática do objetivo do presente trabalho (Fonte: Autoria própria, 2020).


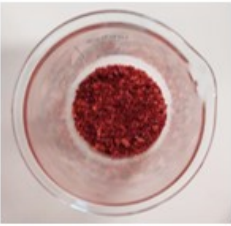
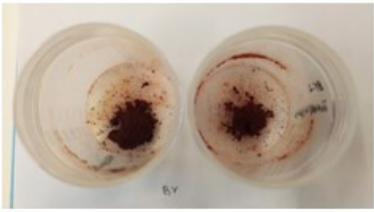


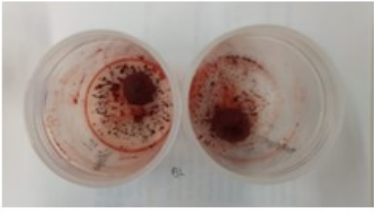


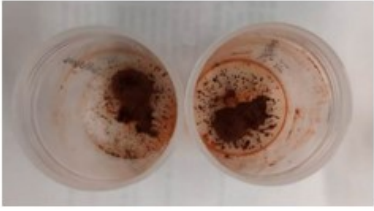

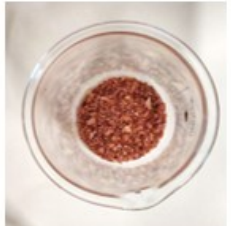
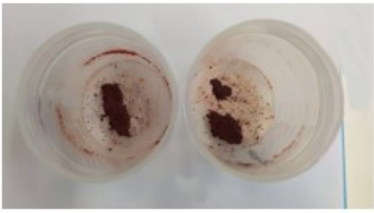
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *IMPATIENS*

Flores das cores laranja e rosa de espécies *Impatiens balsamina* e *Impatiens walleriana* foram colhidas num parque público de área urbana do município de Medianeira (25°17'24.8''S 54°05'19.2''W) e, numa propriedade rural do município de Matelândia (25°15'07.8''S 53°59'16.1''W), no estado do Paraná (Brasil), respetivamente. A colheita foi realizada entre os meses de julho a agosto de 2019. A identificação do material botânico foi realizada no herbário FLOR, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, onde o material testemunho está depositado (Nº de tombo: 67269, 67270 referente a *I. walleriana* e 67271, 67272 referente a *I. balsamina*). Imediatamente após a colheita, as flores foram lavadas três vezes em água corrente e secas com papel absorvente. As pétalas foram cuidadosamente removidas, e armazenadas separadamente pela sua coloração e espécie, em recipientes plásticos e congeladas a uma temperatura entre -12 e -18 °C. De seguida, as pétalas foram liofilizadas (Labconco Freeze Zone 6, EUA) e por fim, trituradas e armazenadas em frascos herméticos protegidas da luz transportadas ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal), conforme apresentado na

Tabela 7.

Tabela 7. Amostras de *Impatiens*, na sua forma fresca, liofilizada e extrato hidroetanólico correspondente.

Espécie Estudada	Pétalas Liofilizadas	Extrato Liofilizado
 <i>I. balsamina</i> (Rosa) - BR		
 <i>I. balsamina</i> (Laranja) - BL		
 <i>I. walleriana</i> (Laranja) - WL		
 <i>I. walleriana</i> (Rosa) - WR		

Autoria própria (2020).

4.2. PADRÕES E REAGENTES

Os solventes n-hexano 95%, acetonitrilo 99% e acetato de etilo 99,98%, de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e o solvente metanol de grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Os restantes solventes usados, igualmente de grau analítico foram os seguintes: éter etílico (Lab-Scan); tolueno e ácido sulfúrico (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EUA). A água foi tratada previamente à sua utilização pelo sistema de purificação Milli-Q-Water (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na empresa Sigma (St. Louis, MO, USA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares ((D(-)-frutose D(+))sacarose,

D(+)-glucose, D(+)-trealose e D(+)-rafinose pentahidratada) e, padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido málico; ácido oxálico; ácido shiquímico; ácido succínico; ácido fumárico e ácido quinico). Relativamente aos padrões dos compostos fenólicos utilizados: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, naringenina, apigenina-7-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-glucósido foram adquiridos nas empresas Sigma-Aldrich, Extrasynthese e Polyphenols.

O soro fetal de bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle) foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

O Mueller-Hinton agar (MHB) foi obtido na Biolab® (Hungria). O composto plodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os antibióticos imipenem e vancomicina foram obtidos da Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina da Janssen farmacêutica (Bélgica).

4.3. ANÁLISE COLOROMÉTRICA

A cor das amostras (frescas) foi medida em triplicado por cada grupo de amostras, em três pontos diferentes recorrendo a um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tóquio, Japão). O iluminar D65 foi usado e angulo de observação a 10 °. Os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho), b^* (azul/amarelo) foram registados utilizando o software de dados " Spectra Magic Nx " (Fernandes et al., 2012), conforme a **Figura 9**.

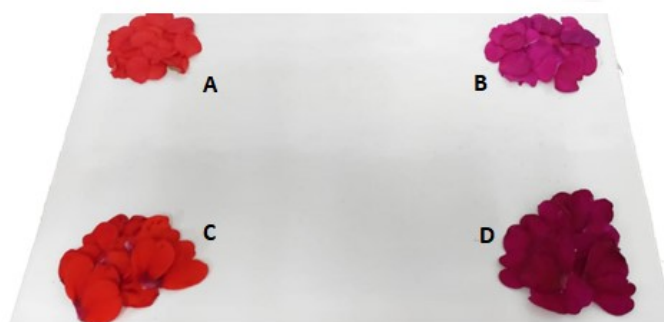


Figura 9. Amostras frescas para análise colorimétrica de *I. walleriana* (A, B); *I. balsamina* (C, D). (Fonte: Autoria própria, 2020).

4.4. DETERMINAÇÃO DE PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA* E *I. WALLERIANA*

Para análise dos compostos fenólicos (antociânicos e não antociânicos) seguiu-se uma metodologia previamente descrita pelos autores Bessada et al., (2016) e Gonçalves et al., (2017).

4.4.1 Compostos fenólicos não antociânicos

As amostras liofilizadas de *Impatiens balsamina* (0,5 g) foram submetidas a maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, com agitação magnética (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman N.º. 4) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça) (**Figura 10**) e liofilizados (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para posteriores análises. Para a análise do perfil fenólico, o extrato descrito, foi redissolvido numa concentração de 10 mg/mL com etanol/água (20:80, v/v).



Figura 10. Evaporação do extrato BL. (Fonte: Autoria própria, 2020).

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um degasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado.

A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos 52 (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS). Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna

Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min; sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min.

O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrómetro de massa (MS). A deteção de MS foi feita utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do tube lens offset foi mantida a -66 V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 m/z. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espetros UV-Vis e espetros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5 – 100 µg/mL): ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0.9939$); ácido *p*-cumárico ($y = 301950x + 6966,7$, $R^2 = 1$); naringenina ($y = 18433x + 78903$, $R^2 = 0.9994$); apigenina-7-*O*-glucósido ($y = 10683x - 45794$, $R^2 = 0.9988$), quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0.9988$) baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.

4.4.2 Compostos fenólicos antociânicos

As amostras liofilizadas (0,5 g) foram submetidas a maceração à temperatura ambiente, com agitação magnética (150 rpm) durante 1 hora com uma solução de etanol/água 53 (80:20, v/v; 30 mL) acidificada com TFA (0,5 %). Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman N.º 4) e o processo foi repetido (**Figura 11**), sendo a amostra reextraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica acidificada.



Figura 11. Filtração do extrato de cor laranja e rosa de *I. balsamina*. (Fonte: Autoria própria, 2020).

Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (evaporador rotativo, Büchi R-210, Flawil, Suíça). Para a purificação da amostra, fez-se passar a fase aquosa resultante da evaporação do etanol, através de uma coluna C18 SepPak® (Vac 3 cm³; Phenomenex, Califórnia, EUA), previamente ativada com 5 mL de metanol e, posteriormente com 5 mL de água. Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidas com 15 mL de água e os compostos antocianínicos foram eluídos com metanol (15 mL). Os extratos foram concentrados, re-dissolvidos numa solução de MeOH/H₂O acidificado com 0,1% de TFA (80:20, v/v, 1 mL) e seguidamente, filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22- μ m para posterior análise em HPLC (Rodrigues et al., 2012), conforme a **Figura 12**.



Figura 12. Material recolhido para análise no HPLC. (Fonte: Autoria própria, 2020).

As antocianinas foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific) descrita na seção 4.4.1.. Para a separação dos compostos recorreu-se a uma coluna de fase reversa AQUA® C18 (5 μ m, 150 mm 4,6 mm i.d., Phenomenex) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram:

(A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: 10% B até 3 min, 10 a 15% B 12 min, 15% B 5 min, 15 a 18% B 5 min, 18 a 30% B 20 min e 30 a 35% B 5 min, a uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. Os solventes utilizados foram 0,1% ácido trifluoroacético (ATF) em água (A) e acetonitrilo (B).

A eluição em modo gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% B por 3 min, de 10 a 15% B por 12 min, 15% B por 5 min, de 15 a 18% B por 10 min, de 18 a 30% B por 20 min, de 30 a 35% B por 5 min e 35 a 10% B por 10 min. O tempo total de análise foi de 60 minutos, seguido do recondicionamento da coluna durante 10 min, a um caudal de 0,5 mL/min.

A deteção foi realizada com um detetor DAD, utilizando como o comprimento de onda principal 520 nm, e com espectroscopia de massa ligada em série através da saída da célula DAD. A deteção MS foi realizada em modo positivo utilizando um espectrómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte ESI. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320 °C e uma tensão capilar de 1454 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de m/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias).

A aquisição de dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan). A caracterização das antocianinas presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao seu espectro UV-Vis e de massa, sendo os seus tempos de retenção comparados com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obteve-se a curva de calibração por injeção de solução-padrão: pelargonidina-3-O-glucósido ($y = 268748x - 71,423$; $R^2 = 0.9986$). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

4.5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOACTIVAS DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA* E *I. WALLERIANA*

4.5.1 Atividade antimicrobiana

4.5.1.1. Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana seguiu-se a metodologia descrita anteriormente por Carocho et al., (2015b). As bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus*

(isolado humano), *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973) e as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311) foram utilizados para determinar a potencial atividade antimicrobiana. Para determinação da atividade antifúngica, as espécies *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrachloron* (ATCC 9112) e *Penicillium verrucosum var. cyclopium* (isolado de alimentos) foi testado quanto à sua suscetibilidade. Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia.

As concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) foram determinadas usando o método de microdiluição. As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotômetro ficando com uma concentração de 1×10^5 CFU/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotômetro a 625 nm. As diluições de inóculos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a validade do inóculo. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para os poços contendo 100 μ L de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10 μ L de inóculo. As microplacas foram incubadas por 24 horas (h) a 37 °C. Para a determinação das CMIs (concentração mínima inibitória; menor concentração que produziu uma inibição significativa (em torno de 50%) do crescimento da bactéria em comparação com o controlo positivo) foram adicionados 40 μ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As CMIs obtidas do teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor INT e comparado com um controlo positivo para cada estirpe bacteriana. A CMB (concentração mínima bactericida) foi determinada por subcultura em série, colocando 10 μ L de cada poço que não apresentou mudança de cor a 100 μ L de TSB. A menor concentração que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. A estreptomicina e a ampicilina foram usadas como controlo positivo, enquanto 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controlo negativo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

4.5.1.2. Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica foi seguido o procedimento descrito anteriormente por Carochi et al., (2015b). Para tal, foram utilizados os microfungos *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrachloron* (ATCC 9112) e *Penicillium verrucosum var. cyclopium* (isolado alimentar). Estes organismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia.

Os micromicetos foram mantidos em malte ágar (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ num volume final de 100 µL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação e a validade do inóculo. A determinação da MIC foi realizada pela técnica de diluição sucessivas em microplacas de 96 poços.

A amostra foi adicionada ao meio de malte com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 h a 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fúngidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72 h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O DMSO a 5 % foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL de extrato hidroetanólico.

4.5.2. Atividade antioxidante

As amostras de sangue foram coletadas de ovelhas saudáveis e centrifugadas a 1000 g (5 min, 10 °C). As camadas de plasma foram descartadas e os eritrócitos foram primeiramente lavados uma vez com NaCl (150 mM) e três vezes com solução salina

tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) (Evans et al., 2013). O sedimento de eritrócitos foi ressuspensão em PBS a 2,8% (v/v). Utilizando uma microplaca de 48 poços, 200 μ L da solução de eritrócitos foram misturados com 400 μ L de solução de PBS (controlo), de amostras antioxidantes dissolvidas em PBS ou água (para hemólise completa). O Trolox foi usado como controlo positivo. Após pré-incubação a 37 °C por 10 min com agitação, AAPH (200 mL, 160 mM em PBS) foi adicionado e a microplaca foi incubada nas mesmas condições, conforme a **Figura 13**.

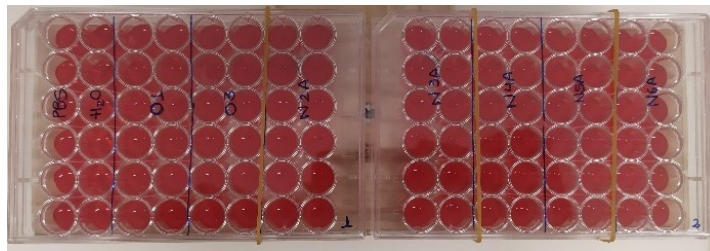


Figura 13. Microplaca após a incubação. (Fonte: Autoria própria, 2020).

A densidade ótica foi então medida a 690 nm a cada 10 minutos (Takebayashi et al., 2012). A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (P) foi calculada recorrendo à **Equação 1**:

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

Equação 1. Percentagem da população de eritrócitos (PE) no ensaio OXHILIA.

Em que, S_t e S_0 correspondem à densidade ótica da amostra em t e 0 min, respetivamente, e CH_0 é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), tendo sido calculado recorrendo à **Equação 2**.

$$\Delta t(\text{min}) = Ht_{50} (\text{amostra}) - Ht_{50} (\text{controlo})$$

Equação 2. Tempo de atraso da hemólise.

Em que, Ht_{50} é o tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra. Os valores de Δt foram correlacionados às diferentes concentrações da amostra (Takebayashi et al., 2012) e, a partir da correlação obtida, a concentração inibitória (IC_{50} , mg/mL) capaz de promover um atraso da Δt hemólise de 60 e 120 min foi calculado.

4.5.3 Avaliação da atividade citotóxica

As células foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% heat-inactivated FBS (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL streptomocina (células HeLa e HepG2), a 37 °C numa incubadora com ar humidificado e 5 % CO₂.

Cada linha celular foi preparada à densidade apropriada ($1,0 \times 10^4$ células/poço) em placas de 96 poços e deixadas a aderir durante 24 h. Após esse tempo as células foram testadas por 48 h com várias concentrações dos extratos.

A seguir a este período de incubação, as células aderentes foram fixadas adicionando ácido tricloroacético 10 % frio (TCA, 100 µL) e deixadas a repousar durante 60 min a 4 °C. As placas foram depois lavadas com água desionizada e secas. A cada poço foram adicionados 100 µL da solução SRB (0,1 % em 1 % de ácido acético) e as placas foram deixadas a incubar à temperatura ambiente, por 30 min. A SRB em excesso foi removida lavando as placas com ácido acético 1 % e foram deixadas a secar ao ar. Depois a SRB ligada foi solubilizada com 10 mM Tris (200 µL) e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx800).

As curvas de dose-resposta foram obtidas para cada extrato e linha celular testadas. Foi também calculado o valor de GI₅₀ que corresponde à concentração de extrato que inibe 50 % do crescimento celular (Abreu et al., 2011). Como controlo positivo foi utilizada a Elipticina.

Para as células não tumorais foi preparada uma cultura celular, a partir de fígado de porco obtido no matadouro local, que foi designada de PLP2. O tecido de fígado foi lavado com Hank's balanced salt solution contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomocina e dividido em 3 explantes de 1 × 1 mm.

Alguns destes explantes foram colocados em frascos de tecido de 25 cm², com meio DMEM suplementado com sêrum fetal de bovino 10 %, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomocina e incubados a 37 °C com atmosfera humidificada e 5 % de CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias.

O cultivo das células foi continuado com monitorização direta a cada 2 ou 3 dias utilizando um microscópio de contraste de fases.

4.5.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória

As células macrófagas RAW 264.7 de rato foram usadas para avaliar a atividade anti-inflamatória de acordo com o procedimento de Jabeur et al., (2016). Foram feitas cultura de células em meio DMEM, suplementado com 10 % de soro bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37 °C com 5 % de CO₂, em ar humidificado. As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a 5×10^5 células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1 %, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Trypan. Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (150000 células/poço) e deixadas a aderir à microplaca durante a noite.

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos durante 1 hora, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 18 horas. Foram preparados controlos sem a adição de LPS de forma a observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO). A presença de óxido nítrico foi determinada utilizando um Kit de Reagentes Griess (Promega) que contem sulfanilamida, hidrócloro de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. O sobrenadante das células (100 µL) foi transferido para a placa e misturado com sulfanilamida e solução NED, 5 a 10 minutos cada, à temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado medindo a absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek) e comparado com a curva de calibração (Jabeur et al., 2016).

4.6. DETERMINAÇÃO DAS PROPIEDADES NUTRICIONAIS DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA*

A composição nutricional das pétalas das flores das espécies *I. balsamina* e *I. walleriana* foi determinada conforme as metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). Deste modo, foram determinados os teores de proteína, gordura, hidratos de carbono, cinzas, humidade e também o valor energético total.

O teor de proteína total (N \times 6,25) foi calculado como teor de azoto pelo método de Kjeldahl (AOAC 991.02). Para tal, adicionou-se ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica (**Figura 14**) e consequente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio (NH₄)₂SO₄, no qual é retido o azoto. De seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que

potencia a libertação de azoto na forma de amoníaco, NH_3 . O amoníaco é, de seguida, destilado e recolhido numa solução de H_2SO_4 (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M), utilizando um indicador de metil vermelho, conforme (AOAC 991.02).

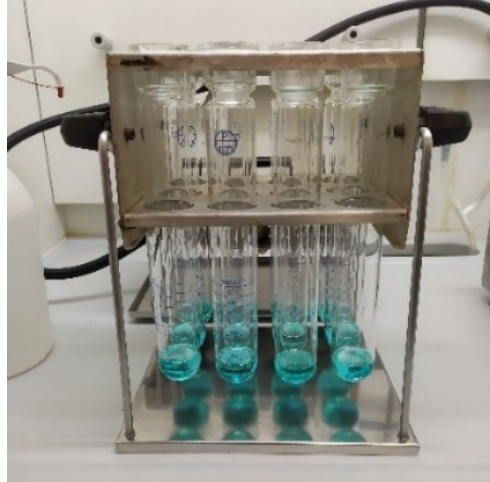


Figura 14. Bloco digestor de matéria orgânica. (Fonte: Autoria própria, 2020).

Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida de amostra (1,5 g), num aparelho de Soxhlet, para a qual se utilizou como solvente de extração o éter de petróleo a uma temperatura de aproximadamente $120\text{ }^\circ\text{C}$, durante 7 h (AOAC 989.05), logo em seguida a solução foi evaporada como demonstrado na **Figura 15**.

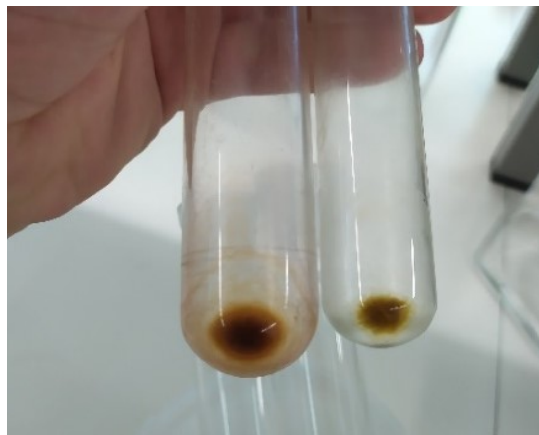


Figura 15. Tubos com a fração lipídica evaporada. (Fonte: Autoria própria, 2020).

Enquanto o teor de cinzas foi determinado a partir da incineração de 250 mg de amostra a $550 \pm 15\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h (AOAC 935.42), conforme demonstrado na **Figura 16**.



Figura 16. Amostras das pétalas após a incineração. (Fonte: Autoria própria, 2020).

Para a determinação da humidade presente na amostra, colocou-se uma quantidade conhecida de amostra (1 g) na estufa (100 °C) até se obter uma massa constante.

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença, enquanto que a energia total foi determinada de acordo com a **Equação 3**, apresentada abaixo.

$$\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (g_{\text{proteínas}} + g_{\text{glúcidos}}) + (9 \times g_{\text{gordura}})$$

Equação 3. Determinação da energia total.

4.7. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA*

4.7.1 Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito anteriormente por Barros et al., (2013a).

A amostra (0,5 g) foi enriquecida com melezitose (utilizada como padrão interno, 25mg/mL) e extraiu-se com 40 mL de etanol (80/20, v/v), num banho a 80 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Germany), durante 1 hora e 30 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 15.000 g durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanoica, recorrendo-se ao evaporador rotativo (Evaporador rotativo Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), tendo sido, seguidamente, os restos do mesmo evaporados. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5

mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, para posterior análise do perfil em açúcares no sistema HPLC.

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4.6 x 250 mm, 5 mm, Knauer), que operou a uma temperatura de 30 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetoneitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2.4 Software (DataApex), a partir do qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca.

4.7.2 Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Pereira et al., (2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (v/v/v) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 rpm) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) adicionou-se éter dietílico (3 mL), ambos os passos com agitação em vórtex.

Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial, para posterior análise em GC.

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detetor de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame column (30 m x 0,25 mm ID x 0,20 µm df; Phenomenex, Lisbon, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 100 °C, durante 2 min; aumentos progressivos da temperatura: 10 °C/min até 140 °C; 3

°C/min até 190 °C; 30 °C/ min até 260 °C que permaneceu durante 2 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 1,1 mL/min, medido a 100 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C, sendo injetada 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software CSW 1,7 (DataApex 1,7, Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detetado.

4.7.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de foto díodos (UFLC-PDA), de acordo com um procedimento previamente descrito por Barros et al., (2013b). A extração foi realizada ao abrigo da luz adicionando 25 mL de ácido metafosfórico (4,5 %) à amostra (0,4 g), mantendo as condições de temperatura de 25 °C e agitação constante (150 rpm) durante 45 minutos. Após extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman N°. 4) e, posteriormente, através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para análise em UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A separação dos mesmos foi obtida através de uma coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C18 (5 µm, 250 mm, 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min.

A deteção dos ácidos orgânicos foi conseguida recorrendo a um sistema DAD, aplicando um comprimento de onda de 215 nm (e 245 nm para o ácido ascórbico). A quantificação dos compostos foi efetuada por comparação da área dos seus picos registados, nos comprimentos de onda referidos anteriormente, com as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

4.8. AVALIAÇÃO DO USO DO EXTRATO EM RECHEIO DE “BOMBOCAS”.

4.8.1. Preparação das amostras de “bombocas”


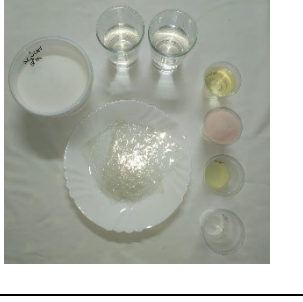

O extrato que apresentou melhores resultados em termos de bioatividades foi incorporado em recheio de “bombocas” de forma a avaliar o potencial corante com vista à

possível aplicação a nível da indústria alimentar. Neste sentido, foram preparados 3 grupos de amostras (**Tabela 8**): a) “Bombocas” controlo (BC) com recheio branco, preparado com gelatina neutra; b) “Bombocas” de morango (BM) com recheio rosa, preparado com gelatina de morango contendo na sua composição o corante E163; c) “Bombocas” *Impatiens* (BI) com recheio preparado com gelatina neutra com incorporação de extrato de pétalas rosa de *I. balsamina* rosa.

A preparação das “bombocas” seguiu uma receita tradicional que se baseia na preparação de um xarope base obtido a partir da diluição de 400 g de açúcar e 80 mL de xarope de glicose em 120 mL de água à temperatura ambiente. Após a diluição, a mistura é colocada em aquecimento a 100 °C até atingir o ponto de fervura após o qual, a temperatura foi elevada a 180 °C e a mistura permaneceu em aquecimento durante 5 minutos.

Simultaneamente, três folhas de gelatina de origem animal (4,2 g) e 80 g de gelatina em pó (sendo gelatina neutra para os grupos de amostras BC e BI e, gelatina de morango contendo o corante E163 para as amostras do grupo BM) foram diluídas em 120 mL de água durante 2 minutos num forno micro-ondas (Eletric Co, MW70017SG, China) na potência de 1200 W. A gelatina diluída ainda quente foi batida com uma batedeira elétrica (BRAUN, HM3135WH, Alemanha) até a formação de espuma espessa. Posteriormente, o xarope base arrefecido foi depositado em contato com a espuma de gelatina e 10 mL de sumo de limão e a mistura foi batida em velocidade máxima com uma potência de 500 W até a obtenção da consistência de *marshmallow*. Para a formulação BM, neste último passo, foi adicionado 600 mg de extrato de *Impatiens*.

Tabela 8. Formulações dos recheios das “bombocas”.

Identificação	Formulações dos Recheios de <i>Marshmallow</i>	
Bomboca Controlo – BC (Sem adição de corantes)	<ul style="list-style-type: none"> • 400 g de açúcar • 80 g de gelatina incolor • 10 mL de sumo de limão • 240 mL de água • 80 mL de xarope de glicose • ¾ de colher de chá de sal • 3 folhas de gelatina incolor (4,2 g) 	
Bomboca Morango – BM (Com adição de corante E163)	<ul style="list-style-type: none"> • 400 g de açúcar • 80 g de gelatina com corante E163 • 10 mL de sumo de limão • 240 mL de água • 80 mL de xarope de glicose • ¾ de colher de chá de sal • 3 folhas de gelatina incolor (4,2g) 	
Bomboca <i>Impatiens</i> – BI (Com extrato de <i>I. balsamina</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 400 g de açúcar • 80 g de gelatina incolor • 10 mL de sumo de limão • 240 mL de água. • 80 mL de xarope de glicose • ¾ de colher de chá de sal • 3 folhas de gelatina incolor (4,2g) • 600 mg de extrato de pétalas de <i>I. balsamina</i> 	

Autoria própria (2020).

Por fim, a massa de *marshmallow* foi dividida por copos de plásticos de 80 cL e levados ao frigorífico a uma temperatura de 6 °C, durante 4 h para solidificação. Todos os grupos de amostras foram preparadas em triplicado de forma a avaliar 3 tempos de prateleira distintos (imediatamente após a confeção e após 3 e 7 dias de armazenamento).

4.8.2. Avaliação da cor do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira

A cor das amostras foi avaliada em triplicado por cada grupo de amostras, em três pontos diferentes da mesma forma que foi descrito na **secção 4.3**.

4.8.3. Avaliação nutricional do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira

As gorduras, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia de todas as amostras de “bombocas”, de todos os tempos, foram determinados seguindo os procedimentos descritos anteriormente na **secção 4.6**.

4.8.4. Avaliação do teor em açúcares e ácidos gordos do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira

O teor em açúcares e ácidos gordos de todas as amostras de “bombocas”, de todos os tempos, foram determinados seguindo os procedimentos descritos anteriormente nas **secções 4.7.1. e 4.7.2**, respetivamente.

4.8.5. Avaliação da atividade antioxidante do recheio de “bombocas” ao longo do tempo de prateleira

A atividade antioxidante de todas as amostras de “bombocas”, de todos os tempos, foi avaliada seguindo a metodologia descrita anteriormente na **secção 4.5.2**.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Ao longo de todo o trabalho, os valores são apresentados por média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados através de ANOVA a 2 fatores, com soma de quadrados do tipo III, recorrendo ao software SPSS, versão 25. Este modelo de análise linear multivariado permite tratar os dois fatores TC (tipo de corante) e IT (intervalo de tempo) de uma forma independente, permitindo entender a contribuição de cada um dos fatores independentemente do outro, oferecendo uma melhor compreensão para o comportamento das várias amostras ao longo do tempo. Se uma interação significativa for registada ($< 0,05$) entre os dois fatores (TC \times IT), estes são avaliados de uma forma simultânea e algumas conclusões são extraídas das médias marginais estimadas (MME). Caso não haja uma interação significativa entre fatores (TC \times IT $> 0,05$), isto é, quando a influência de um fator se sobrepõe à influência do outro para o resultado final, cada fator é avaliado independentemente, usado o teste de Tukey ou Tahmane T2 para classificar os valores de

acordo com a sua homoscedasticidade. O Teste t de Student foi aplicado para avaliar as diferenças significativas somente quando tínhamos resultados entre duas amostras distintas, com $\alpha = 0,05$. Ao longo de todo o trabalho, o nível de significância é de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA COR DAS PÉTALAS DAS FLORES DAS ESPÉCIES *I. BALSAMINA* E *I. WALLERIANA*.

As flores desempenham um papel importante na natureza, pois são capazes de atrair diversos polinizadores através de suas colorações chamativas. Estas colorações, muitas vezes são originárias do metabolismo secundário das plantas, e trazem consigo inúmeros compostos, dentre eles, compostos fenólicos, e em especial as antocianinas. As flores do género *Impatiens* L. apresentam cores atrativas que variam entre os tons de branco, amarelo, laranja até tons mais avermelhados. Desta forma, a análise cromática no espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo) foi realizada nas pétalas de exemplares da espécie *I. balsamina* e *I. walleriana*, em que a proporção de acordo com o parâmetro L^* esteve entre 0 e 100 e a proporção dos parâmetros a^* e b^* apresentaram-se entre -120 e 120, conforme os resultados presentes na **Tabela 9.**

Tabela 9. Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) de amostras das pétalas de *I. balsamina* (cores: laranja_BL e rosa_BR) e de *I. walleriana* (cores: laranja_WL e rosa_WR) (média \pm DP).

Parâmetros de cor	Pétalas Frescas					Valor p
	BL	WL	Valor p	BR	WR	
L^*	46,4 \pm 1,9	47,9 \pm 3,5	0,133	26,8 \pm 1,4	36,6 \pm 0,9*	<0,001
a^*	45,9 \pm 1,9	39,2 \pm 2,2*	<0,001	45,1 \pm 3,4	43,7 \pm 1,6	0,162
b^*	53,1 \pm 3,2	48,9 \pm 3,1*	<0,001	14,1 \pm 1,3	10,7 \pm 0,7*	<0,001
Cor RGB						

L^* luminosidade; a^* eixo cromático de verde (-) a vermelho (+); b^* , eixo cromático de azul (-) a amarelo (+).

Os resultados obtidos no colorímetro foram comparados entre as diferentes espécies com a cor semelhante, tal como é possível observar na **Tabela 9.** Relativamente às pétalas de cor laranja foi possível verificar que apenas os valores obtidos para L^* não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Por sua vez, as diferenças nos parâmetros a^* e b^* resultaram em valores superiores para a *I. balsamina* comparativamente com a *I. walleriana* justificado pela cor mais brilhante de BL observada e registada na **Tabela 7.** Relativamente às flores rosa, estas apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os valores de L^* e de b^* justificado pela tonalidade ligeiramente mais escura e brilhante de BR e que foi observado e registado na **Tabela 7.**

Na literatura não existem trabalhos relativamente à colorimetria das flores do género *Impatiens* L. No entanto, Hagen Jr (1966), afirmou por análise cromatográfica que as flores

de *I. balsamina*, apresentam maior homogeneidade de pigmentos do que suas hastes e sépalas, além de também exibirem maior composição de núcleos aromáticos em sua coloração, de modo a indicar possíveis compostos bioativos.

5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS PÉTALAS DAS FLORES DAS ESPÉCIES *I. BALSAMINA* E *I. WALLERIANA*

Entre os vários compostos biologicamente ativos existentes nos vegetais, os compostos fenólicos destacam-se devido à sua estrutura química constituída por hidroxilos e anéis aromáticos, mas, principalmente pelas suas propriedades bioativas (Szewczyk et al., 2016; Angelo & Jorge, 2007). A literatura destaca a presença deste tipo de compostos nas flores, e justifica o seu potencial antioxidante com a presença de flavonóides na composição de seus tecidos (Rop et al., 2012). É por isso relevante para este estudo a determinação do perfil fenólico detalhado dos extratos hidroetanólicos das pétalas de ambas as espécies de flores estudadas (*I. balsamina* e *I. walleriana*), estando descrito na **Tabela 10** a composição em compostos fenólicos antociânicos e não antociânicos. Para a identificação dos compostos foram utilizados os dados cromatográficos de cada pico em termos de tempos de retenção (Tr), comprimento de onda de absorção máxima na região de UV-Vis (λ_{max}), íão pseudomolecular ($[M-H]^-$) e a fragmentação do íão molecular (MSn), precedido de uma tentativa de identificação com base nestes dados e comparação com a literatura.

Relativamente aos compostos fenólicos não antociânicos, foram tentativamente identificados 14 picos, dos quais 6 ácidos fenólicos (derivados do ácido cafeico e *p*-cumárico), 1 flavanona (derivado *O*-glicosilado de eriodictiol) e 7 flavonóides (derivados *O*-glicosilados de apigenina, quercetina e kaempferol). A identificação do pico **13** (kaempferol-3-*O*-glucósido) foi efetuada por comparação do tempo de retenção e espectro UV-vis com o composto padrão disponível. As restantes tentativas de identificação, e uma vez que todos os compostos foram já previamente descritos por outros autores, foram efetuadas por comparação com dados da literatura. Os picos **1** ($[M-H]^-$ a *m/z* 341) e **2/3/4** ($[M-H]^-$ a *m/z* 325) foram tentativamente identificados como hexósido do ácido cafeico e hexósido do ácido *p*-cumárico, respetivamente, como previamente descrito em extratos de *Rhinacanthus nasutus* L. (Huang, Lu, Inbaraj & Chen, 2015), *Taraxacum sect. Ruderalia* (Dias et al., 2014) e amostras de *Solanum*

lycopersicum L. (Pinela et al., 2019). Os picos **5** e **7** ($[M-H]^-$ a m/z 325), apresentaram um espectro de UV-Vis muito característicos do ácido *p*-coumárico, com λ_{max} entre 308 nm até 325 nm, tendo sido tentavemente identificados como *O-p*-Coumaroil- α -hexósido e *O-p*-Coumaroil- β -hexósido, respetivamente, seguindo as características cromatográficas previamente descritas por Jaiswal & Kuhnert (2014) em frutos de *Lagenaria siceraria* Stand. Estes picos foram somente encontrados nas amostras de *I. balsamina*.

O grupo dos ácidos fenólicos prevaleceram nas amostras de *I. walleriana*. Relativamente à única flavanona glicosilada identificada, o pico **6** ($[M-H]^-$ a m/z 449, eriodictiol-*O*-hexósido), apresentou um espectro UV-vis caraterístico a λ_{max} 310 nm, tendo sido a sua identificação já previamente descrita por Fetni, Bertella & Ouahab (2020) em *Rosa canina* L. Relativamente aos flavonóides detetados, somente um *O*-glicosilado de apigenina foi identificado (pico **8**, $[M-H]^-$ a m/z 517, apigenina-*O*-malonil-hexósido), apresentando fragmentos de MS^2 a m/z 311 (206 mu) e m/z 269, e do qual foi confirmado a sua tentativa de identificação por comparação com o previamente descrito em *Cynara cardunculus* var. *Altilis* (Mandim et al., 2020). Dois derivados *O*-glicosilados de quercetina foram também detectados nas amostras de *I. balsamina*, picos **10** ($[M-H]^-$ a m/z 667) e **11** ($[M-H]^-$ a m/z 595), e tentativamente identificados como quercetina-acetil-*O*-hexósido-*O*-hexósido e quercetina-*O*-hexósido-pentósido, respetivamente (Anjos et al., 2019). A aglicona mais representativa do grupo dos flavonóides é a do kaempferol, do qual foram tentativamente identificados 3 derivados *O*-glicosilados (o pico **13** foi já previamente descrito tendo sido identificado como padrão), pico **9** ($[M-H]^-$ a m/z 609), **12** ($[M-H]^-$ a m/z 651) e **14** ($[M-H]^-$ a m/z 543), kaempferol-*O*-hexósido-*O*-hexósido, kaempferol-acetil-*O*-hexósido-*O*-hexósido e kaempferol-*O*-hexósido-*O*-rhamnósido, respetivamente, previamente descritos por Sut et al. (2019) e Ning et al. (2019).

Como é possível verificar na **Tabela 10** o perfil fenólico de *I. balsamina* e *I. walleriana* é muito distinto. *I. balsamina* apresenta um perfil marcadamente distinto com a presença de uma grande quantidade de flavonóides *O*-glicosilados e apenas dois ácidos fenólicos derivados do ácido *p*-coumárico, sendo o kaempferol-acetil-*O*-hexósido-*O*-hexósido (pico **12**) o composto maioritário desta amostra ($2,23 \pm 0,03$ e $4,014 \pm 0,004$ mg/g extracto, em BL e BR, respetivamente). Por outro lado *I. walleriana* apresentou um número muito mais reduzido de compostos fenólicos não antociânicos, marcados pela presença de derivados de ácido cafeico e ácido *p*-coumárico (composto maioritário, pico **3** em WL e pico **4** em WR), e uma flavanona. As variedades rosa de ambas as amostras

(BR e WR) foram as que revelaram maior conteúdo em compostos fenólicos, $18,6 \pm 0,3$ e $18,5 \pm 0,3$ mg/g de extrato, respectivamente, devido sobretudo ao conteúdo em flavonóides e ácidos fenólicos, respectivamente.

Finalmente, foram tentativamente identificados 16 compostos fenólicos antociânicos nas amostras de *I. balsamina* e *I. walleriana*, 6 derivados glicosilados de pelargonidina, 6 derivados de malvidina, e 4 derivados de peonidina. Os picos **5a** a **16a** encontram-se também ligados a resíduos de ácidos fenólicos, aumentando a sua polaridade e, conseqüentemente, o seu tempo de retenção. Os derivados de pelargonidina são, sem dúvida, aqueles que se encontram com maior expressão numérica nas amostras. A tentativa de identificação do pico **1a** ($[M]^+$ a m/z 595), Pelargonidina-*O*-dihexoside foi realizada de acordo com o previamente descrito por Pires et al. (2020) em *Vaccinium myrtillus* L. Também a tentativa de identificação dos **3a/4a** ($[M]^+$ a m/z 741) como pelargonidina-*O*-hexósido-*O*-deoxyhexósido-hexósido foi efetuada com o previamente descrito por Li et al. (2012). Para a tentativa de identificação dos picos **9a** e **11a** ($[M]^+$ a m/z 783), como pelargonidin-*O*-*p*-coumaroyl-hexósido-*O*-acetil-hexósido, recorreu-se ao previamente descrito por Hosokawa et al. (1995). Para o pico **2a**, também derivado glicosilado de pelargonidina, não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica com a sua caracterização, pelo que a identificação foi realizada pela presença de um ião pseudo molecular a $[M]^+$ a m/z 637, com perdas subsequentes de fragmentos MS^2 a m/z 475 (162 u) e 271 (aglicona de pelargonidina, 162 u + 42 u) correspondentes a perda de um resíduo de hexose e resíduos de acetil e hexose, respetivamente, tendo sido por isso tentativamente identificado como pelargonidina-*O*-hexósido-*O*-acetilhexósido. Relativamente aos derivados de malvidina, os picos **5a/6a/8a** ($[M]^+$ a m/z 801), tentativamente identificados como malvidina-3-*O*-coumaroylhexósido-*O*-hexósido, foram já devidamente caracterizados e identificados por outros autores (Oliveira et al., 2015). Assim como o pico **15a**, malvidin-*O*-coumaroylhexósido ($[M]^+$ a m/z 639), que também foi já descrito pelos mesmos autores (Oliveira et al., 2015). Para os picos **12a/16a** a tentativa de identificação foi efetuada apenas pelos dados cromatográficos obtidos, no qual ambos apresentam um ião pseudomolecular a $[M]^+$ a m/z 843, com perdas subsequentes de fragmentos MS^2 a m/z 639 (perda de um resíduo acetil e uma hexose) e m/z 331 (perda de um resíduo de ácido *p*-coumárico e uma hexose), tendo sido por isso tentativamente identificados com malvidin-*O*-acetilhexósido-*O*-coumaroylhexósido. Finalmente, para os derivados de peonidina também não foram encontradas referências bibliográficas que suportem a tentativa de identificação destes picos, pelo que foram

usados os dados cromatográficos obtidos. O pico **4a**, apresentou um ião pseudo molecular a $[M]^+$ a m/z 771, com um fragmento MS^2 a m/z 609, correspondente a perda de uma hexose e um outro fragmento MS^2 a m/z 301, correspondente à aglicona de peonidina, mas também à perda de um resíduo de ácido *p*-coumárico e uma hexose, tendo sido por isso tentativamente identificado como peonidina-*O*-hexóximo-*O*-coumaroylhexóximo. Os picos **10a/12a/14a**, foram tentivamente identificados como peonidina-*O*-acetilhexóximo-*O*-coumaroylhexóximo, apresentando um ião pseudo molecular a $[M]^+$ a m/z 813, com perdas subsequentes de fragmentos MS^2 a m/z 609 (162 u + 42 u, resíduos de acetil e hexose) e 301 (146 u + 162 u, resíduos de ácido *p*-coumárico e hexose), aglicona de peonidina.

Ao contrário do que foi observado para os compostos fenólicos não antociânicos, observou-se que a nível de antocianinas as amostras apresentaram um perfil qualitativo e quantitativo muito semelhante (à exceção da amostra WR que revelou apenas 4 antocianinas na sua composição). No entanto, a par do que foi observado para os compostos fenólicos não antociânicos, é novamente nas variedades rosa, BR e WR, das plantas em estudo que obteve-se a maior concentração de compostos antociânicos (18,9±1,3 e 17,4±1,1 mg/g extracto, respectivamente), devido sobretudo à presença de derivados de malvidina, malvidina-*O*-acetilhexóximo-*O*-coumaroylhexóximo (pico **16a**) e malvidina-3-*O*-coumaroylhexóximo-*O*-hexóximo, respectivamente (pico **8a**).

Tabela 10. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de máxima absorção na região UV-Vis (λ_{\max}), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos dos extratos de pétalas de *I. balsamina* L. (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de *I. walleriana* L. (cor laranja_WL e cor rosa_WR) (média \pm DP).

Compostos fenólicos não-antociânicos									
Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)			
						BL	BR	WL	WR
1	5,15	325	341	179(100),135(7)	Hexósido de ácido cafeico	n.d.	n.d.	0,52 \pm 0,01*	1,74 \pm 0,08*
2	7,11	315	325	163(100),145(71),119(11)	Hexósido de ácido <i>p</i> -cumárico	n.d.	n.d.	2,92 \pm 0,08*	5,0 \pm 0,2*
3	7,29	315	325	163(100),145(73),119(15)	Hexósido de ácido <i>p</i> -cumárico	n.d.	n.d.	2,688 \pm 0,004*	9,21 \pm 0,01*
4	7,92	311	325	163(40),145(51),119(5)	Hexósido de ácido <i>p</i> -cumárico	n.d.	n.d.	1,09 \pm 0,03	n.d.
5	7,99	309	325	307(5),265(76), 235(100),205(5),163(5)	<i>O-p</i> -Coumaroil- α -hexósido	0,52 \pm 0,02*	1,32 \pm 0,05*	n.d.	n.d.
6	9,21	310	449	287(49),269(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido	n.d.	n.d.	1,088 \pm 0,003*	2,57 \pm 0,01*
7	9,13	308	325	307(5),265(82), 235(100),205(5),163(5)	<i>O-p</i> -Coumaroil- β -hexósido	0,43 \pm 0,02*	1,04 \pm 0,01*	n.d.	n.d.
8	10,15	324	517	311(15),269(100)	Apigenina- <i>O</i> -malonil-hexósido	1,175 \pm 0,005*	0,98 \pm 0,02*	n.d.	n.d.
9	16,07	346	609	447(21),285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -hexósido	1,92 \pm 0,04*	3,48 \pm 0,02*	n.d.	n.d.
10	17,13	348	667	625(100),463(10),301(20)	Quercetina-acetil- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -hexósido	0,9997 \pm 0,0002*	1,105 \pm 0,003*	n.d.	n.d.
11	17,93	342	595	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido-pentósido	1,27 \pm 0,01*	2,02 \pm 0,01*	n.d.	n.d.
12	20,3	346	651	609(100),447(8),285(53)	Kaempferol-acetil- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -hexósido	2,23 \pm 0,03*	4,014 \pm 0,004*	n.d.	n.d.
13	21,94	451	447	285(110)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	1,325 \pm 0,005*	1,804 \pm 0,002*	n.d.	n.d.
14	23,82	342	593	431(28),285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -rhamnósido	1,484 \pm 0,002*	1,43 \pm 0,02*	n.d.	n.d.
AFT						0,98 \pm 0,05^a	2,6 \pm 0,1^b	7,22 \pm 0,09^d	15,9 \pm 0,3^c
FlavT						n.d.	n.d.	1,088 \pm 0,01	2,57 \pm 0,01
FT						10,7 \pm 0,2^b	16,03 \pm 0,20^d	n.d.	n.d.
CFNAT						11,7 \pm 0,3^b	18,6 \pm 0,3^c	8,3 \pm 0,1^a	18,6 \pm 0,3^c

Compostos fenólicos antociânicos									
Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M] ⁺	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)			
						BL	BR	WL	WR
1a	14.62	500	595	271(100)	Pelargonidina- <i>O</i> -dihexósido	7,4±0,5*	1,2±0,1*	nd	nd
2a	21.01	501	637	475(30),271(100)	Pelargonidina- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -acetilhexósido	0,82±0,01*	0,29±0,02*	nd	nd
3a	34.04	506	741	579(100),271(12)	Pelargonidina- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -deoxyhexósido-hexósido	0,38±0,02 ^c	0,62±0,03 ^b	1,04±0,04 ^a	nd
4a	35.83	511	771	609(100),301(10)	Peonidina- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	nd	nd	0,72±0,03	nd
5a	36.62	510	801	639(25),331(100)	Malvidina-3- <i>O</i> -coumaroylhexósido- <i>O</i> -hexósido	0,25±0,01 ^c	0,96±0,11 ^b	nd	1,43±0,01 ^a
6a	37.56	511	801	639(25),331(100)	Malvidina-3- <i>O</i> -coumaroylhexósido- <i>O</i> -hexósido	0,26±0,03*	0,73±0,09*	nd	nd
7a	38.48	504	741	579(100),271(15)	Pelargonidina- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -deoxyhexósido-hexósido	0,8±0,1 ^b	0,0001±0,00003 ^c	2,7±0,2 ^a	nd
8a	39.73	510	801	331(100)	Malvidina-3- <i>O</i> -coumaroylhexósido- <i>O</i> -hexósido	0,57±0,02 ^c	2,65±0,29 ^b	nd	11,5±0,8 ^a
9a	40.28	509	783	579(100),475(34),271(25)	Pelargonidina- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl-hexósido- <i>O</i> -acetil-hexósido	0,89±0,09 ^c	1,3±0,2 ^b	1,3±0,1 ^a	nd
10a	41.11	511	813	609(100),301(14)	Peonidina- <i>O</i> -acetilhexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	0,43±0,09 ^c	0,92±0,15 ^a	0,8±0,2 ^b	nd
11a	41.71	504	783	579(100),475(34),271(35)	Pelargonidina- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl-hexósido- <i>O</i> -acetil-hexósido	2,51±0,17 ^b	1,49±0,13 ^c	4,39±0,17 ^a	1,2±0,1 ^d
12a	42.48	511	813	609(100),301(12)	Peonidina- <i>O</i> -acetilhexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	nd	nd	3,5±0,2	nd
13a	42.7	511	843	639(100),331(34)	Malvidina- <i>O</i> -acetilhexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	nd	2,3±0,1*	nd	3,4±0,3*
14a	43.12	511	813	609(100),301(17)	Peonidina- <i>O</i> -acetilhexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	0,7±0,1	nd	nd	nd
15a	43.35	511	639	331(100)	Malvidin- <i>O</i> -coumaroylhexósido	0,8±0,2	nd	nd	nd
16a	44.14	515	843	639(61),331(23)	Malvidina- <i>O</i> -acetilhexósido- <i>O</i> -coumaroylhexósido	nd	6,4±0,5	nd	nd
CFAT						15,7±0,7^c	18,9±1,3^a	14,4±0,8^d	17,4±1,1^{a,b}

Amostras das pétalas de *I. balsamina* laranja (BL) e rosa (BR) e de *I. walleriana* laranja (WL) e rosa (WR) AFT - Ácidos fenólicos totais; FlavT - Flavanonas Totais; FT - Flavonóides totais; CFNAT - Compostos fenólicos não antociânicos totais; CFAT - Compostos fenólicos antociânicos totais; TPC - compostos fenólicos totais; n.d. - não detetado (abaixo do limite de detecção). Curvas de calibração: ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0.9939$, LOD = 0,78 µg/mL e LOQ = 1,97 µg/mL, pico 1), ácido *p*-cumárico ($y = 301950x + 6966,7$, $R^2 = 1$, LOD = 0,68 µg/mL e LOQ = 1,61 µg/mL, picos 2, 3, 4, 5 e 7), apigenina-7-*O*-glucósido ($y = 10683x - 45794$, $R^2 = 0.996$, LOD = 0,10 µg/mL e LOQ = 0,53 µg/mL, pico 8), naringenina ($y = 18433x + 78903$, $R^2 = 0.9994$, LOD = 0,17 µg/mL e LOQ = 0,81 µg/mL, pico 6), pelargonidina-3-*O*-glucósido ($y = 268748x - 71,423$; $R^2 = 0.9986$, LOD = 0,24 µg/mL e LOQ = 0,76 µg/mL, picos 1a - 17a) e quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0.9998$, LOD = 0,21 µg/mL e LOQ = 0,71 µg/mL, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). ANOVA - Em cada linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$). *t*-Student - * valor de $p < 0,05$ - significa diferenças significativas entre as amostras.

A literatura apresenta diversos estudos sobre o perfil fenólico das diferentes partes de espécies de *Impatiens*. Szewczyk et al. (2016), analisou os polifenóis existentes nas partes aéreas de seis espécies de *Impatiens* (*I. balfourii* Hook.f, *I. balsamina* L., *I. walleriana* Hook. F., *I. glandulifera* Royle, *I. noli-tangere* L. e *I. parviflora* Dc.) e verificou uma grande quantidade de compostos fenólicos, em especial, flavonoides e ácidos fenólicos. Por sua vez, Chua (2016), ao determinar perfil fenólico do extrato metanólico das folhas e caules da espécie *I. balsamina*, constatou que as folhas possuíam o dobro do teor fenólico e de flavonóides, quando comparadas com os seus talos. O autor apontou que os valores divergentes encontrados para os diferentes órgãos poderiam ser justificados pela função protetora presente nas folhas que atuam contra ação oxidativa provocada pela maior exposição a luz solar. Num estudo mais recente, Haider & Ullah (2019), estudaram a influência de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos a partir de *I. walleriana* e verificaram que o extrato metanólico apresentou teor mais elevado de compostos fenólicos totais em comparação com extratos a base de hexano e clorofórmio. Os estudos comprovam que a composição de fenólicos pode variar conforme a parte da planta estudada e com a metodologia adotada na extração.

Em estudos iniciais sobre a composição fenólica em flores de *I. balsamina*, o kaempferol, a quercetina, e a mericitina foram descritos como os principais compostos (Clevenger, 1958). Tal, vai de encontro aos dados apresentados na **Tabela 10** na qual quantidades expressivas dos derivados de quercetina e kaempferol para ambos os extratos de *I. balsamina* podem ser observados. Contrariamente, os extratos de *I. walleriana* analisados apresentaram as maiores proporções para os derivados do ácido cumárico e ácido cafeico. Em trabalho mais recente, Rop et al. (2012) descrevem uma quantidade notória de flavonoides e seus derivados nas flores de *Impatiens*.

No estudo de Kim et al. (2015), foram identificados a partir do extrato metanólico (80:20, v/v) cerca de treze compostos fenólicos distintos presentes nas flores brancas de *Impatiens balsamina* L. Dentre eles, dois apresentavam-se desconhecidos até ao momento, e os demais foram nomeados como 2-metoxi-1,4-naftoquinona, (3S,4R)-3,4-di-hidroxi-3,4-di-hidronaftaleno-1(2H)-ona, hidroquinona, *trans*-(3S,4S)-3,4-di-hidroxi-1 tetralona, ácido *p*-hidroxibenzóico, éster metílico do ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatecúico, ácido vanílico, tirosol, ácido *trans-p*-carmárico e ácido *trans*-fulúlico. Apesar da diferença no perfil fenólico, os compostos identificados na literatura se enquadram no segmento dos flavonóides e ácidos fenólicos.

É importante salientar que os compostos fenólicos são amplamente distribuídos e podem ser encontrados nos mais diversos formatos, como ácidos fenólicos simples, flavonoides, moléculas complexas com numerosos grupos fenólicos, ou até mesmo taninos hidrolisáveis oligoméricos (Barros et al., 2012), o que pode justificar a diferença entre os perfis da literatura e o perfil presente neste estudo.

5.3. AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DAS PÉTALAS DE FLORES DE DAS ESPÉCIES *I. BALSAMINA* E *I. WALLERIANA*

5.3.1 Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos etanólicos obtidos a partir das flores de *I. balsamina* e *I. walleriana*, foi testada contra um painel de seis bactérias, dentre as quais, três bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*). A **Tabela 11** apresenta os resultados obtidos para cada extrato em Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).

Tabela 11. Atividade antibacteriana (CMI e CMB em mg/mL) das amostras de pétalas de *I. balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de *I. walleriana* (cor laranja_WL e cor rosa_WR).

Amostra		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
BL	CIM	0,10	0,20	0,20	0,05	0,10	0,20
	CMB	0,20	0,40	0,40	0,10	0,20	0,40
BR	CIM	0,05	0,20	0,20	0,075	0,20	0,20
	CMB	0,10	0,40	0,40	0,10	0,40	0,40
WL	CIM	0,10	0,20	0,20	0,075	0,20	0,20
	CMB	0,20	0,40	0,40	0,10	0,40	0,40
WR	CIM	0,05	0,10	0,15	0,075	0,20	0,20
	CMB	0,10	0,20	0,20	0,10	0,40	0,40

B. cereus: *Bacillus cereus*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*. CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida.

Os resultados de CMI e CMB foram notórios para todas as culturas bacterianas analisadas. *B. cereus* e *E. coli* foram as bactérias que surgiram como as mais sensíveis para todos os extratos analisados com valores de CMI mais baixos, de 0,05 mg/mL (para as variedades rosa de ambas as espécies, BR e WR) e 0,10 mg/mL (para as variedades laranja, BL e WL) para *B. cereus*, e 0,05 mg/mL (BL) e 0,075 mg/mL (BR, WL e WR)

para *E.coli*. Relativamente ao desempenho bactericida, verificou-se que *E. coli*, foi a estirpe mais suscetível, apresentando um CMB de 0,10 mg/mL para todos os extratos analisados. Através da **Tabela 11** é também possível constatar que a amostra WR expressou um maior caráter inibitório e bactericida para todas as estirpes analisadas com exceção de *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*, apresentando valores de CMI, entre 0,05 mg/mL e 0,20 mg/mL, e valores de CMB, entre 0,10 mg/mL e 0,20 mg/mL.

As propriedades de diversos órgãos vegetais do género *Impatiens* estão descritos em alguns trabalhos da literatura. Kim et al., (2015) relatou que apesar de o extrato metanólico (80:20, v/v) de *Impatiens balsamina* L. ter desempenhado atividade antibacteriana notória para estirpes Gram-positivas, não influenciou de maneira significativa o crescimento de bactérias Gram-negativas. Esses resultados não são condizentes com os obtidos no presente estudo, uma vez que, a bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* surgiu como a mais sensível para todos os extratos. Por sua vez, Manikandan et al., (2016), testou a atividade antibacteriana dos extratos de hexano de sementes de *I. balsamina* e verificou resultados de CMI e CMB idênticos entre si, mas com proporções distintas entre as estirpes testadas, destacando valores de 25 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, 50 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*, 75 mg/mL para *Proteus vulgaris* e 100mg/mL para *Serratia marcescens*. Szewczyk et al., (2016), testou a atividade antibacteriana das partes aéreas de seis espécies do género *Impatiens* L. (*I. balfourii*, *I. balsamina*, *I. glandulifera*, *I. noli-tangere*, *I. parviflora* e *I. walleriana*), tendo obtido para *I. balsamina* L. os menores valores de concentração mínima inibitória de 0,125 mg/mL para o *Staphylococcus epidermidis*, seguidos dos valores de 0,250 mg/mL (*Micrococcus luteus*) e 0,500 mg/mL (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*). Já para a espécie *I.walleriana* L., os menores valores encontrados foram de 0,500 mg/mL para *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*.

No estudo desenvolvido por Haider & Ullah (2019), verificou-se que o extrato metanólico de *I. walleriana* apresentou maior atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* relativamente a *I. balsamina*. O mesmo estudo justifica que a variação obtida entre os extratos estudados pode ser atribuída a diferentes fatores, nomeadamente a diferença entre espécies, sazonalidade e a localização geográfica das plantas.

5.3.2 Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica dos diferentes extratos de *Impatiens* foi testada contra um painel de seis fungos (*Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus versicolor*; *Aspergillus niger*; *Penicillium funiculosum*; *Penicillium ochrachloron*; *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*), e os resultados expressos em concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas fungicidas (CMF), que encontram-se reunidos na **Tabela 12**.

Através da análise dos resultados apresentados verificou-se que o extrato de *I. balsamina* variedade laranja (BL) apresentou o maior potencial inibitório, quando comparado com os restantes extratos, uma vez que os seus valores de CMI foram os menores para todos os seis fungos estudados: 0,006 mg/mL (*P. ochrachloron*); 0,012 mg/mL (*A. fumigatus*, *A. niger*, *P. funiculosum*) e 0,025 mg/mL (*A. versicolor* e *P.v. cyclopium*) e CMF, 0,012 mg/mL (*P. ochrachloron*); 0,025 mg/mL (*A. fumigatus*, *A. niger*, *P. funiculosum*) e 0,05 mg/mL (*A. versicolor* e *P.v. cyclopium*). Apesar de numa visão geral, nenhum fungo se ter destacado como mais sensível para todos os extratos, notou-se que *P. ochrachloron* foi levemente mais suscetível aos extratos BL e BR, apresentando os menores valores de CMI (0,006 mg/mL (BL); 0,012 mg/mL (BR)) e CMF (0,012 mg/mL (BL); 0,025 mg/mL (BR)).

Tabela 12. Atividade antifúngica (CMI e CMF mg/mL) das amostras de pétalas de *I. balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de *I. walleriana* (cor laranja_WL e cor rosa_WR).

Amostra		<i>A. fumigatus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>P. ochrochloron</i>	<i>P.v. cyclopium</i>
BL	CMI	0,012	0,025	0,012	0,012	0,006	0,025
	CMF	0,025	0,05	0,025	0,025	0,012	0,05
BR	CMI	0,025	0,025	0,025	0,025	0,012	0,025
	CMF	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,05
WL	CMI	0,025	0,025	0,05	0,025	0,025	0,025
	CMF	0,05	0,05	0,10	0,05	0,020	0,050
WR	CMI	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,05
	CMF	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*; *A. versicolor*: *Aspergillus versicolor*; *A. niger*: *Aspergillus niger*; *P. funiculosum*: *Penicillium funiculosum*; *P. ochrachloron*: *Penicillium ochrachloron*; *P.v. cyclopium*: *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*. CMI: Concentração mínima inibitória; CMF: Concentração mínima fungicida.

Dos poucos trabalhos sobre a atividade antifúngica apresentados na literatura, pode-se destacar o estudo de Nisar et al., (2010), que testou *in vitro* a capacidade de diferentes extratos (n-hexano; diclorometano; acetato de etila e n-butanol (aquoso e bruto)) das partes aéreas de *I. bicolor* Royle contra um painel de seis fungos

(*Trichophyton longifusus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Fusarium solani* e *Candida glabrata*), verificando atividade antifúngica moderada contra todas as linhagens estudadas. Por sua vez, Yang et al., (2001), após isolar o composto bioativo, 2-metoxi-1,4-naftoquinona (MNQ) a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *I. balsamina* L., testou a sua capacidade antifúngica contra um painel de 8 fungos e verificou que todos os microrganismos foram altamente sensíveis. Mais recentemente, Haider & Ullah (2019) afirmaram que, devido à elevada atividade antibacteriana e antifúngica do extrato de *I. walleriana*, este apresenta um potencial auspicioso como antioxidante natural na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética.

5.3.3 Atividade Antioxidante, Citotóxica e Anti-inflamatória

A atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Impatiens* foi avaliada através do método de Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA) e os resultados foram expressos em termos de EC₅₀ (valor que representa a concentração de uma amostra que fornece 50% de atividade antioxidante) e estão apresentados na **Tabela 13**.

Todos os extratos analisados apresentaram excelente atividade antioxidante. No entanto, considerando que quanto menor o valor de EC₅₀ maior a sua capacidade antioxidante, é possível verificar que as variedades rosa (BR e WR) apresentaram maior atividade antioxidante ($29 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ e $34 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, respetivamente) relativamente às variedades laranja (BL e WL).

O potencial antioxidante de 5 tipos de extratos de caules de *I. balsamina* L. foi avaliado anteriormente por Su et al., (2012) que constatou que o extrato de éter dietílico (EC₅₀ = 2,94 mg/mL) conteve um poder antioxidante maior, em comparação com outros solventes testados (extratos de metanol (EC₅₀ = 3,29 mg/mL), clorofórmio (EC₅₀ = 4,84 mg/mL), água (EC₅₀ = 5,53 mg/mL) e éter de petróleo (EC₅₀ = 13,72 mg/mL)).

Por sua vez, Delgado-Rodriguez et al., (2017), investigou a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico (80:20, v/v) de plantas inteiras das espécies *I. balsamina*, *I. hawkeri* e *I. walleriana*, destacando o seu excelente desempenho com valores de EC₅₀ de 0,41 mg/mL, 0,10 mg/mL e 0,44 mg/mL, respetivamente.

Szewczyk & Olech (2017), afirmou que a atividade antioxidante das *Impatiens* L. pode variar conforme a parte estudada e metodologia de extração utilizada. Tal, pode justificar os resultados mais eficazes obtidos no presente trabalho quando comparados com estudos da literatura.

Numa visão geral, é possível notar que o potencial antioxidante apresentado no estudo está diretamente relacionado com a composição fenólica das flores estudadas, uma vez que, a quantidade de compostos fenólicos influencia diretamente a atividade antioxidante do extrato (Szewczyk & Olech, 2017).

Através dos estudos apresentados, observa-se que as plantas do género *Impatiens* L., podem apresentar dupla capacidade bioativa, ou seja, atividade antioxidante e antimicrobiana afirma Kim et al., (2015), o que também foi observado em nossas investigações, sendo uma característica interessante para a indústria farmacêutica e de alimentos.

A ausência de toxicidade foi comprovada em todos os extratos analisados até à concentração máxima testada numa cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). A atividade antitumoral foi avaliada em quatro linhas de células tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) sendo os resultados apresentados em GI₅₀, conforme a **Tabela 13**.

Os resultados obtidos destacam o extrato BR como o que teve um melhor desempenho mediante todas as linhas celulares testadas comparativamente com os restantes extratos analisados. Adicionalmente, pode-se observar que todos os resultados obtidos das células tumorais se enquadraram em proporções satisfatórias de GI₅₀, com exceção do extrato WR que apresentou um valor > 400 µg/mL, quando posta a prova com a célula tumoral NCI-H460.

Wang et al., (2012), investigaram o comportamento do composto 2-metoxi-1,4-naftoquinona (MeONQ) isolado das partes aéreas da *I. balsamina* L. (Balsaminaceae), contra o adenocarcinoma (cancro gastrointestinal maligno) de linhagem celular MKN45, e observou que a atividade citotóxica das células foi comparável à amoxicilina, com um valor de IC₅₀ de 4,52 µg/mL.

Por sua vez, Grabowska et al. (2017), desenvolveu um ensaio citotóxico a partir de extrato com isolamento de saponinas (CHCl₃ e MeOH) da matéria vegetal de *I. parviflora* DC., contra linhas celulares de cancro de próstata (DU145 e PC3), melanomas (A375, WM793 e HTB140) e células normais de controlo (BJ e PNT2). Os autores observaram que os extratos não apresentaram potencial mutagénico para todas as linhagens celulares, e que a saponina (IPS-1) apresentou melhores resultados de citotoxicidade para a linha celular A375 (melanoma).

Ding et al., (2008) avaliou a atividade antitumoral do composto 2-metoxi-1,4-naftoquinona (MNQ) extraído com etanol e clorofórmio a partir de flores de *I. balsamina*,

quando expostos a linha tumoral HePG2, sendo constatada inibição do tumor correspondente a $IC_{50} 6,08 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$.

De um modo geral, pode-se observar que a atividade antitumoral encontrada nesse estudo foi semelhante aos resultados obtidos na literatura, uma vez que os resultados não apresentaram níveis de toxicidade para células não tumorais. Além disso, os estudos da literatura reforçam de maneira positiva que o extrato do género *Impatiens* é capaz de atuar contra diversas linhas celulares, dentre elas HePG2, linhagem celular que também foi testada neste estudo (Grabowska et al., 2017).

A avaliação do potencial anti-inflamatório dos diferentes extratos de *Impatiens*, que foi obtido por medição *in vitro*, com adoção de células de macrófago RAW264,7, e valores expressos em termos de GI_{50} (concentrações que causam 50 % da inibição do crescimento celular) são apresentados na **Tabela 13**.

Numa visão geral todos os extratos analisados apresentaram resultados satisfatórios para atividade anti-inflamatória sendo os resultados mais promissores obtidos para *I. balsamina* relativamente a *I. walleriana* e onde, mais uma vez o extrato BR se destacou como o mais eficiente apresentando um valor de GI_{50} de $163,5 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$.

Paun et al., (2018), avaliou a atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato etanólico (50:50, v/v) de folhas secas e hastes da *Impatiens noli-tangere*, contra as enzimas inflamatórias lipoxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX-1 e COX-2). Os valores de IC_{50} encontrados foram de $5,73 \mu\text{g/mL}$ (LOX), $42,3 \mu\text{g/mL}$ (COX-1) e $6,2 \mu\text{g/mL}$ (COX-2) para fração microfiltrada (MF) e $2,46 \mu\text{g/mL}$ (LOX), $18,4 \mu\text{g/mL}$ (COX-1), $1,9 \mu\text{g/mL}$ (COX-2) para fração nanofiltrada (NF). Os autores afirmaram que os extratos bioativos encontrados podem ser destinados para o tratamento de doenças inflamatórias.

A diferença observada entre a atividade anti-inflamatória presente nas amostras e os dados fornecidos pela literatura poderiam ser questionados pelo facto de que os dados foram obtidos de partes diferentes das plantas, pela divergência de metodologia aplicada, pela proporções distintas de solventes adotados, mas também por se tratarem de espécies diferentes encontradas no mesmo género.

Tabela 13. Resultados do ensaio de inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA), atividade citotóxica, hepatotóxica e anti-inflamatória das amostras de pétalas de *Impatiens balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) e de *Impatiens walleriana* (cor laranja_WL e cor rosa_WR) (média ± DP).

	BL	BR	WL	WR	p-value
Atividade Antioxidante (Valores Ec₅₀; µg/mL)					
Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)	42 ± 2 ^b	29 ± 2 ^a	59 ± 7 ^c	34 ± 2 ^d	<0,01
Linhas celulares não tumorais (Valores GI₅₀; µg/mL)					
PLP2	>400	>400	>400	>400	<0,01
Linhas de células tumorais (Valores GI₅₀; µg/mL)					
HeLa	120,6 ± 3,1 ^b	90,4 ± 5,5 ^a	177,3 ± 9,9 ^c	215,6 ± 8,8 ^d	<0,01
HepG2	200,9 ± 6,2 ^b	134,9 ± 9,2 ^a	207,1 ± 16,6 ^b	277,9 ± 9,2 ^c	<0,01
MCF7	252,7 ± 8,9 ^b	154,9 ± 14,5 ^a	290,9 ± 9,4 ^c	307,72 ± 14,9 ^d	<0,01
NCI-H460	293,2 ± 11,7 ^b	167,2 ± 12,5 ^a	333,4 ± 10,5 ^c	>400	<0,01
Anti-inflamatória (Valores GI₅₀; µg/mL)					
RAW264,7	280,8 ± 12,4 ^b	163,5 ± 6,8 ^a	312,1 ± 5,5 ^c	349,21 ± 12,8 ^d	<0,01

Valores de EC₅₀: Concentração de extrato correspondente a 50 % da atividade antioxidante. GI₅₀: concentração que inibe 50 % do crescimento celular. Valores de GI₅₀ de Ellipticin (controlo positivo): 1,21 µg/mL (MCF-7), 1,03 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,10 µg/mL (HepG2) e 2,29 µg/mL (PLP2). GI₅₀ > 400 µg/mL - não possui atividade. A análise estatística utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey HSD em cada coluna, diferentes letras significam diferenças significativas (p < 0,005).

5.4. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA*

Os resultados da composição nutricional das pétalas de *Impatiens balsamina* L. nas variedades rosa e laranja estão representados na **Tabela 14**. A água destaca-se como o componente principal para as ambas as colorações (BL e BR), de modo que seu percentual registado foi superior a 90 % da composição total. Apenas o conteúdo em cinzas surgiu como similar entre as duas amostras. As pétalas cor laranja (BL), apresentaram uma quantidade maior de proteínas e gorduras enquanto que, as pétalas rosa (BR) se destacaram em termos de hidratos de carbono, além de também apresentarem um maior valor energético (21,1 kcal/100 g pf (BR) e 19,2 kcal/100 g pf (BL)). Relativamente ao teor em açúcares, verificou-se a presença de frutose e glucose em ambas as variedades, sendo o último o açúcar maioritário, e a quantidade ser superior na variedade BR comparativamente com BL.

Tabela 14. Composição nutricional (g/100 g peso fresco) das amostras de pétalas de *I. balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média ± DP).

	BL	BR	p-value
Cinzas (g/ 100 g pf)	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,976
Proteínas (g/ 100 g pf)	0,33 ± 0,01	0,315 ± 0,001	0,001
Gordura (g/ 100 g pf)	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	<0,001
Hidratos de carbono (g/ 100 g pf)	4,2 ± 0,1	4,76 ± 0,02	<0,001
Energia (kcal/ 100 g pf)	19,2 ± 0,4	21,145 ± 0,003	<0,001
Energia (kJ/ 100 g pf)	80,4 ± 1,7	88,53 ± 0,01	<0,001
Açúcares Totais (g/ 100 g pf)	1,2 ± 0,02	1,34 ± 0,01	<0,001
Frutose (g/ 100 g pf)	0,866 ± 0,003	0,933 ± 0,001	<0,001
Glucose (g/ 100 g pf)	1,23 ± 0,02	1,34 ± 0,01	<0,001

Segundo alguns estudos, os conteúdos de componentes comumente presentes nas flores comestíveis, no geral, não diferem muito da composição nutricional encontrada em outros órgãos vegetais (Fernades et al., 2017; Mlcek e Rop, 2011). Além disso, são raros os estudos que reportam o perfil nutricional do género *Impatiens* na atualidade.

Dentre os poucos estudos existentes, Szewczyk et al., (2018b), investigou a presença de polissacarídeos solúveis em água de quatro espécies distintas de *Impatiens* (*I. glandulifera* Royle, *I. parviflora* DC., *I. balsamina* L. e *I. noli-tangere* L.). Dos aspetos observados, foi demonstrado que os principais açúcares presentes são a arabinose,

raminose, galactose, manose, xilose e glicose, que variaram suas proporções conforme a espécie. Enquanto que para composição proteica, foram relatadas quantidades de 3,1 g/100 g ps (Fernandes et al., 2017) e 4,60 g/Kg pf (Rop et al., 2012) presentes na espécie *I. walleriana*.

Na revisão bibliográfica de Fernandes et al., (2017), os perfis nutricionais de mais de trinta espécies de flores comestíveis foram agrupados. Foram tabelados resultados para umidade (71,6 à 93,4%), hidratos de carbono totais (10,00 à 90,20 g/100 g ps), proteínas (2,00 à 52,3 g/100 g ps), gorduras (1,3 à 6,1 g/100 g ps), cinzas (2,6 à 15,9 g/100 g ps) e energia (75 à 465 kJ/100 g ps). De um modo geral, pode-se notar que os valores encontrados na composição nutricional das pétalas estudadas corresponderam aos valores obtidos para flores comestíveis na literatura.

5.5. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS DAS PÉATALAS DE *I. BALSAMINA*

Os ácidos gordos individuais, saturados, monoinsaturados e polinsaturados presentes nas amostras BL e BR encontram-se discriminados na **Tabela 15**.

Foram identificados 24 ácidos gordos individuais nas amostras de BL e BR, tendo-se destacado como maioritários os ácidos esteárico (C18:0; $31,65 \pm 0,09$ %), linoleico (C18:2n6; $20,8 \pm 0,6$ %) e γ -linoleico (C18:3n6; $14,4 \pm 0,1$ %) para BL, e o ácido linoleico (C18:2n6; $26,1 \pm 0,3$ %), esteárico (C18:0; $24,2 \pm 0,2$ %) e o γ -linoleico (C18:3n6; $21,4 \pm 0,4$ % ácido) para BR. No entanto, algumas divergências foram observadas na composição de ácidos gordos nas variedades analisadas, pois os ácidos gordos saturados apresentaram-se maioritariamente em BL, enquanto que os polinsaturados se destacaram em BR, conforme as seguintes proporções: $44,9 \pm 0,5$ % (BL) e $34,37 \pm 0,06$ % (BR) de ácidos gordos saturados, $14,13 \pm 0,08$ % (BL) e $12,9 \pm 0,5$ % (BR) de monoinsaturados e $40,9 \pm 0,6$ % (BL), e $52,7 \pm 0,5$ % (BR) para polinsaturados.

Tabela 15. Percentagem de ácidos gordos individuais e ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados das pétalas de *I. balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média ± DP).

	BL	BR	t-Students test p-value
C8:0	0,25 ± 0,01	0,11 ± 0,01	<0,001
C10:0	0,65 ± 0,02	0,26 ± 0,01	<0,001
C11:0	2,87 ± 0,04	0,90 ± 0,03	<0,001
C12:0	0,77 ± 0,03	0,38 ± 0,02	<0,001
C13:0	0,061 ± 0,002	0,048 ± 0,002	<0,001
C14:0	2,29 ± 0,06	1,28 ± 0,06	<0,001
C14:1	0,97 ± 0,04	0,59 ± 0,03	<0,001
C15:1	9,8 ± 0,1	9,2 ± 0,3	<0,001
C16:0	1,66 ± 0,07	1,04 ± 0,02	<0,001
C16:1	0,51 ± 0,01	0,43 ± 0,02	<0,001
C17:1	2,54 ± 0,06	2,4 ± 0,1	<0,001
C18:0	31,65 ± 0,09	24,2 ± 0,2	<0,001
C18:2n6	20,8 ± 0,6	26,1 ± 0,3	<0,001
C18:3n6	14,4 ± 0,1	21,4 ± 0,4	<0,001
C18:3n3	0,56 ± 0,01	0,62 ± 0,01	<0,001
C20:0	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,01	<0,001
C20:1	0,169 ± 0,002	0,15 ± 0,01	<0,001
C20:2	0,31 ± 0,01	0,217 ± 0,008	<0,001
C20:3n6	0,073 ± 0,001	0,202 ± 0,003	<0,001
C20:3n3	3,9 ± 0,1	3,6 ± 0,2	<0,001
C22:0	0,396 ± 0,004	2,18 ± 0,01	<0,001
C23:0	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	<0,001
C24:0	0,491 ± 0,005	0,31 ± 0,01	<0,001
C24:1	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	<0,001
SFA	44,9 ± 0,5	34,37 ± 0,06	<0,001
MUFA	14,13 ± 0,08	12,9 ± 0,5	<0,001
PUFA	40,9 ± 0,6	52,7 ± 0,5	<0,001

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido undecílico (C11:0); Ácido Laurico (C12:0); Ácido tridecílico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido Miristoléico (C14:1); Ácido Pentadecenóico (C15:1); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido cis-10-heptadecenóico (C17:1); Ácido esteárico (C18:0); Ácido linoleico (C18:2n6); Ácido γ -linoleico (C18:3n6); Ácido linolenico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido eicosenóico (C20:1); Ácido eicosadienóico (C20:2); Ácido eicosatrienóico (C20:3n3); Ácido dihomog-linolênico (C20:3n6); Ácido Beénico (C22:0); Ácido tricosanóico (C23:0); Ácido tetracosanóico (C24:0); Ácido tetracosenóico (C24:1); SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

Szewczyk et al., (2018d), estudou composição lipofílica do extrato de hexanóico das folhas, raízes e sementes das espécies de *Impatiens glandulifera* Royle e *Impatiens noli-tangere* L. Dos resultados obtidos, foram observados dez ácidos gordos distintos:

Caprílico (C8:0); Cáprico (C10:0); Azelaico (C9:0); Palmítico (C16:0); Esteárico (C18:0); Oleico (C18:1); Linoleico (C18:2) ω -6; α -linolênico (C18:3) ω -3; γ -linolênico (C18:3) e Araquidônico (C20: 4). Além do mais, para todas as amostras, os ácidos gordos polinsaturados apresentaram-se em maior percentagem, seguido dos monoinsaturados (exceto para as amostras de sementes e folhas de *I. glandulifera*) e os saturados (12,2 à 27,2 % de ácidos gordos saturados, 16,9 à 34,1 % para monoinsaturados, e entre 40,3 à 55,8 % de ácidos gordos polinsaturados). Para mais, também foi observado que os ácidos α -linolênico, oleico e palmítico destacaram-se como predominantes, e que os ácidos graxos saturados das folhas e sementes de ambas as espécies apresentaram quantidades superiores a das raízes.

Com base na literatura citada, diferenças acerca do perfil de ácidos gordos presentes nas flores da espécie *I. balsamina*, por apresentar maior diversidade de ácidos gordos individuais, além de também apresentar ácidos gordos maioritários diferentes e de divergir nos percentuais entre ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Estes factos podem ser justificados pela diferença entre os órgãos estudados, pelas condições ambientais e também pela divergência entre as espécies.

Por sua vez, a composição de ácidos orgânicos foi determinada para as variedades laranja (BL) e rosa (BR) da espécie *I. balsamina*, a qual está registada na **Tabela 16**. Foi possível verificar a presença de cinco ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido quínico, ácido málico, ácido succínico, ácido ascórbico) em ambas as amostras analisadas.

Tabela 16. Ácidos orgânicos (g/100 g dw) das amostras de pétalas de *Impatiens balsamina* (cor laranja_BL e cor rosa_BR) (média \pm DP).

	BL	BR	p-valor
Ácido oxálico	8,1 \pm 0,7	6,13 \pm 0,03	<0,001
Ácido quínico	13,4 \pm 0,2	11,6 \pm 0,2	<0,001
Ácido málico	16,7 \pm 0,1	15,1 \pm 0,3	0,336
Ácido succínico	43,9 \pm 0,9	59,8 \pm 0,9	<0,001
Ácido ascórbico	40,4 \pm 0,3	41,3 \pm 0,5	0.002
Total	122,6 \pm 2,1	134,0 \pm 0,4	<0,001

Entre os ácidos orgânicos identificados, o ácido succínico foi o maioritário em ambas as amostras, numa quantidade de 59,8 \pm 0,9 g/100 g dw na amostra BR e 43,9 \pm 0,9 g/100 g dw na variedade BL. Entretanto, os ácidos oxálico, quínico e málico tiveram maior proporção para amostras BL, enquanto que os ácidos succínico e ascórbico foram

mais evidentes na amostra BR. Ainda assim, a amostra BR ($134,0 \pm 0,4$ g/100 g) demonstrou um total de ácidos orgânicos superior a amostra BL ($122,6 \pm 2,1$ g/100 g).










Chua (2016), pesquisou pequenos metabolitos oriundos do extrato metanólico (50:50, v/v) de caules de *I. balsamina* L. tendo identificado treze ácidos orgânicos distintos (ácido hidroxibutírico, ácido glicérico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartrônico, ácido málico, ácido citramálico, ácido desidrossiquímico, ácido hidroxiterpenílico, ácido quínico, ácido glucônico, ácido laurico, ácido trihidroxil cafeico), porém estes não foram quantificados. No entanto, para fins de comparação, pode-se observar que dentre os treze ácidos encontrados na literatura citada, três correspondiam aos ácidos orgânicos quantificados (ácido quínico, ácido málico, ácido succínico) pelo nosso estudo. Deste modo, estudos mais aprofundados a respeito da quantificação de ácidos orgânicos presentes no gênero *Impatiens* fazem-se necessários devido a escassez de informações na literatura atual.

5.6. INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DAS PÉTALAS DE *I. BALSAMINA* COMO ALTERNATIVA CORANTE PARA UM PRODUTO DE PASTELARIA.

A pastelaria é um segmento culinário essencialmente ligado à produção de doces, nomeadamente pasteis, bolos, tartes e afins. Geralmente, os produtos desse segmento são atrativos, principalmente em termos de coloração, devido ao uso de ingredientes corantes na composição das receitas. Neste segmento, o *marshmallow* destaca-se como um produto areado e macio, formulado a partir da junção de gelatina, açúcar, xarope de glicose e ingredientes aromatizantes, e de um processo de batidura que promove incorporação de ar na mistura (Mardani et al., 2019; Magalhães, 1996).

No presente trabalho, pretendeu-se analisar o potencial corante do extrato obtido a partir de flores de cor rosa de *I. balsamina* (BR) em recheio de *marshmallow* (BI) comparativamente com 2 formulações tradicionais confeccionadas, o recheio branco (BC) e o recheio com gelatina de morango (BM), conforme a **Tabela 17**.

Tabela 17. Grupos de “bombocas” confeccionados.

Formulações	1º Dia Após Confeção	3º Dia Após Confeção	7º Dia Após Confeção
Bomboca Controlo (Sem adição de corantes)	 BC-T0	 BC-T3	 BC-T7
Bomboca Morango (Adição de corante E163)	 BM-T0	 BM-T3	 BM-T7
Bomboca <i>Impatiens</i> (Com extrato de <i>I. balsamina</i>)	 BI-T0	 BI-T3	 BI-T7

De seguida, a avaliação da influência da incorporação do extrato hidroetanólico de *I. balsamina* (BI), bem como o tempo de prateleira das “bombocas” e o perfil nutricional do *marshmallow* foi avaliado comparativamente com as outras formulações (BC e BM), como é apresentada na **Tabela 18**.

Tabela 18. Perfil nutricional das “bombocas”, expresso em g/100 g de massa fresca.

		Humidade (g/100 g)	Cinza (g/100 g)	Proteínas (g/100 g)	Gordura (g/100 g)	Hidratos de Carbono (g/100 g)	Energia (kcal)	Energia (kJ)
Tipo Corante (TC)	Controlo	27 ± 2	0,174 ± 0,004	2,9 ± 0,2	0,066 ± 0,004	69 ± 2	290 ± 7	1214 ± 30
	Morango	20 ± 1	0,191 ± 0,002	2,2 ± 0,2	0,067 ± 0,003	77 ± 2	319 ± 5	1337 ± 23
	<i>Impatiens</i>	24 ± 3	0,182 ± 0,006	4,4 ± 0,1	0,06 ± 0,04	74 ± 2	311 ± 5	1301 ± 19
<i>p</i> -value (n=27)	Teste Tukey	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Intervalo de Tempo (IT)	0 Dias	25 ± 2	0,181 ± 0,006	3 ± 1	0,062 ± 0,003	74 ± 2	308 ± 8	1289 ± 33
	3 Dias	22 ± 3	0,187 ± 0,008	3 ± 1	0,069 ± 0,003	74 ± 4	310 ± 14	1296 ± 59
	7 Dias	25 ± 4	0,180 ± 0,001	3 ± 1	0,066 ± 0,003	73 ± 5	305 ± 18	1276 ± 75
<i>p</i> -value (n=3)	Teste Tukey	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,009	0,177	0,178
TC×IT (n=81)	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Os desvios padrão apresentados foram calculados de resultados obtidos em diferentes condições. Assim, não devem ser considerados como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

No que concerne ao valor nutricional das “bombocas” (**Tabela 18**), confirma-se que o nutriente mais abundante são os hidratos de carbono, seguido da humidade e proteínas. Relativamente ao tratamento estatístico, os resultados foram tratados usando ANOVA a dois fatores, permitindo compreensão individualizada de cada um dos fatores, tipo de corante (TC) ou intervalo de tempo (IT). Após análise da interação entre os 2 fatores (TC × IT) menores que 0,001 confirma-se que a interação é significativa, ou seja, não se consegue perceber se terá sido o tipo de corante ou o intervalo de tempo que terá tido maior influência nas alterações verificadas. Ainda assim, foram extraídas algumas conclusões das médias marginais estimadas (MME) que permitem obter algumas tendências do comportamento das amostras. No caso do perfil nutricional, as MME em relação aos hidratos de carbono e proteínas são mostradas na **Figura 17**. Assim é possível perceber que o extrato de *Impatiens* fez aumentar a quantidade de proteínas comparativamente com o extrato comercial de morango e o controlo. Inversamente, os hidratos de carbono foram mais abundantes nas “bombocas” de morangos, seguido das “bombocas” com *Impatiens* e finalmente as “bombocas” controlo. Ainda que estas variações ligeiras tenham sido registadas, o perfil nutricional não se alterou significativamente com a adição do extrato natural de *Impatiens*.

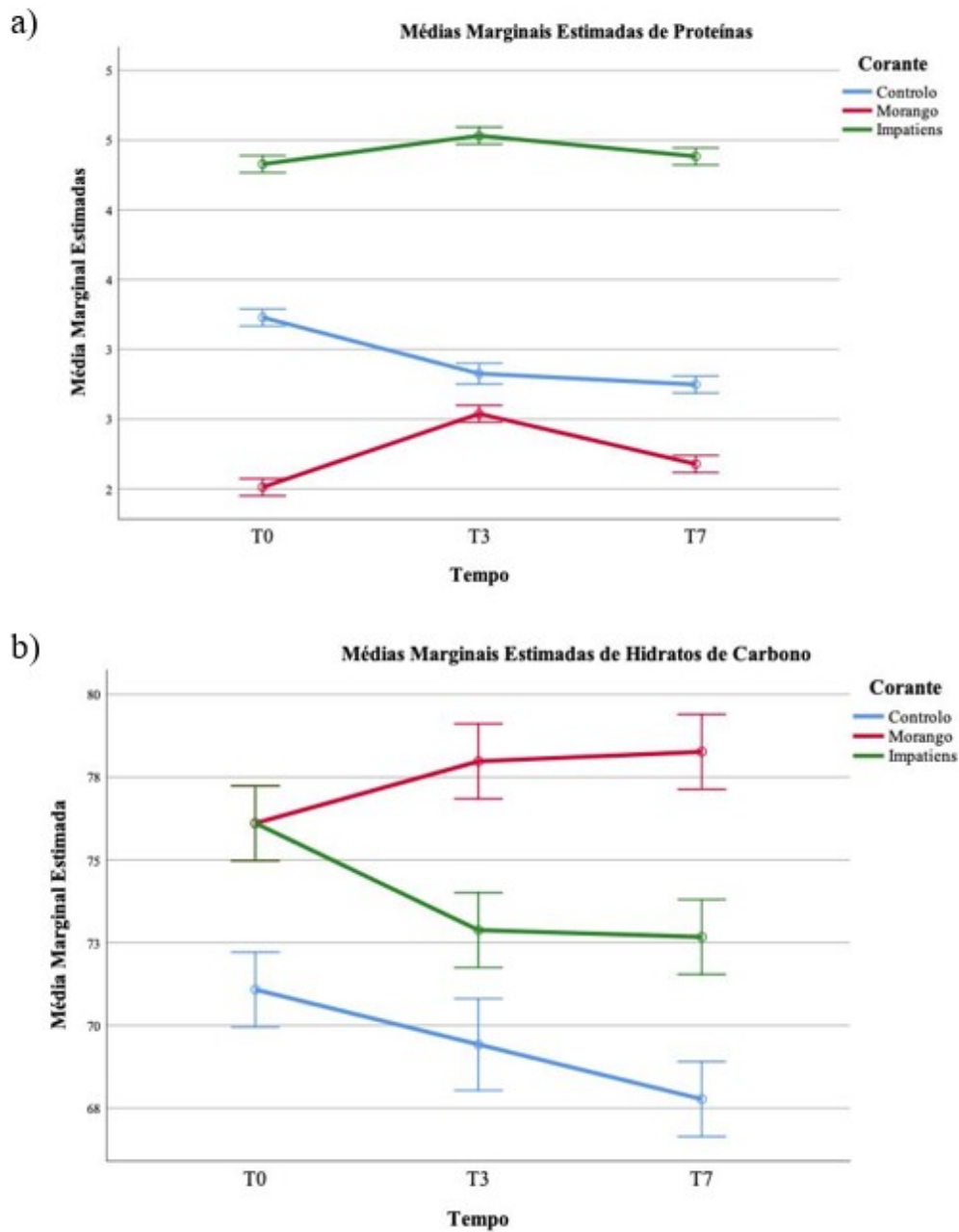


Figura 17. MME das “bombocas” referente as proteínas (a) e hidratos de carbono (b).

Até ao presente momento existem poucos estudos na literatura que reportam o perfil nutricional de *marshmallows*. Entretanto, Periche, Heredia, Escriche, Andrés & Castelló (2015), estudou a substituição da isomaltulose em *marshmallows*, e afirmaram que a faixa recomendada de humidade para essa classe de produtos tende a variar entre 15-22 g de água/100 g. Por sua vez, Yudhistira, Affandi & Nusantari (2018), observaram os efeitos da adição de espinafre (*Amaranthus tricolor L.*) e tomate (*Solanum lycopersicum*) nas propriedades físicas, químicas e sensoriais de *marshmallows*, relatando valores de humidade entre 11,71 e 17,56 % e valores de cinzas entre 0,22 e 0,44 %. Deste

modo, observou-se através de nossas investigações que a humidade dos *marshmallows* confeccionados foram mais elevados que os valores apontados pela literatura citada. No entanto, notou-se uma certa similaridade quanto aos teores de cinzas encontrados por nós e por investigações anteriores.

Estudo recente realizado por Oliveira Melo et al., (2020) pretendeu desenvolver gomas de gelatina de morango enriquecidas com extrato de *Hibiscus sabdarifa* L., sendo verificado que a substituição da polpa de morango pelo extrato antociânico do hibisco não influenciou de forma geral o perfil nutricional (teor em proteínas, lipídios, gordura total e hidratos de carbono) do produto. No entanto, notou-se que o enriquecimento com hibisco foi capaz de promover alterações no pH, acidez, no teor em sólidos totais, cinzas e humidade. No entanto um fenómeno diferente foi observado em nosso estudo, tal como é possível observar através da **Figura 17**, pois a adição do extrato de flores de *Impatiens* no recheio de bombocas foi capaz de provocar algumas alterações no teor de hidratos de carbono e proteínas conforme demonstrado nas médias marginais estimadas.

A **Tabela 19** encerra os ácidos gordos individuais mais abundantes detetados no recheio das “bombocas”, bem como os açúcares solúveis que foram detetados. Em relação aos ácidos gordos, cuja representação é em percentagem relativa, consegue-se perceber que o ácido palmítico é o ácido gordo mais abundante, seguido do ácido oleico. Os outros dois ácidos gordos mais abundantes são o ácido esteárico e o ácido linoleico. No que concerne os açúcares solúveis, foram detetados três, nomeadamente frutose, glucose e sacarose, sendo este último o mais abundante. Mais uma vez, foi detetada uma interação entre ambos os fatores TC e IC não sendo possível classificar os resultados de forma independente. Assim, apenas para a frutose foi possível extrair algumas conclusões genéricas das MME (**Figura 18**).

Assim, verificou-se que o corante artificial de morango aportou maior quantidade de frutose ao recheio das “bombocas”. A amostra controlo e a amostra com *Impatiens* mostraram valores semelhantes com uma progressão semelhante ao longo do tempo. Mais uma vez, ainda que estas pequenas alterações tenham sido verificadas no perfil em ácidos gordos e açúcares solúveis, as alterações nestes perfis foram residuais.

Tabela 19. Representação dos ácidos gordos mais abundantes, bem como os o total de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), expressos em percentagem relativa, bem como os açúcares solúveis, expressos em g/100 g de massa fresca.

		C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	Frutose	Glucose	Sacarose
Tipo Corante (TC)	Controlo	55 ± 4	16 ± 2	18 ± 2	10,7 ± 0,5	71 ± 2	18 ± 2	10,7 ± 0,5	12,8 ± 0,4	13,8 ± 0,3	33 ± 1
	Morango	49 ± 2	16,3 ± 0,7	25 ± 2	9 ± 1	65 ± 1	25 ± 2	10 ± 1	16,1 ± 0,6	16,8 ± 0,6	31 ± 1
	<i>Impatiens</i>	56 ± 5	16 ± 2	18 ± 2	10 ± 1	72 ± 3	18 ± 2	10 ± 1	13,9 ± 0,7	15 ± 1	35 ± 2
<i>p</i> -value (n=27)	Teste Tukey	<0,001	0,008	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Intervalo de Tempo (IT)	0 Dias	56 ± 4	14,6 ± 0,9	19 ± 3	10,1 ± 0,9	71 ± 3	19 ± 3	10,1 ± 0,9	14 ± 1	14 ± 1	32 ± 2
	3 Dias	55 ± 4	15,9 ± 0,4	20 ± 4	9,2 ± 0,7	65 ± 1	20 ± 4	9,2 ± 0,7	14 ± 2	15 ± 1	33 ± 3
	7 Dias	48 ± 2	18,2 ± 0,9	23 ± 3	10 ± 1	72 ± 3	23 ± 3	10 ± 1	15 ± 2	16 ± 1	34 ± 1
<i>p</i> -value (n=3)	Teste Tukey	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TC×IT (n=81)	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	0,007

Os desvios padrão apresentados foram calculados de resultados obtidos em diferentes condições. Assim, não devem ser considerados como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores. Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1); Ácido linoleico (C18:2); SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

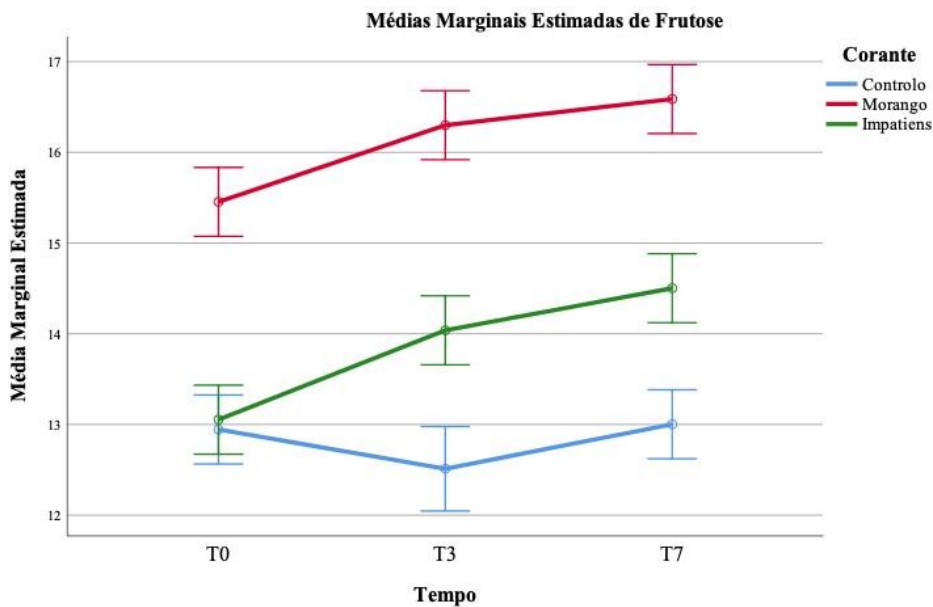


Figura 18. MME de frutose no recheio das “bombocas”.

A **Tabela 20** apresenta as coordenadas de cor do recheio das diferentes “bombocas” ao longo dos 7 dias de armazenamento. Mais uma vez, houve interação significativa entre o tipo de corante e o intervalo de tempo do ensaio. Desta forma, conseguiram-se obter algumas conclusões graças às MME representadas na **Figura 19**.

Com isso, foi possível verificar que o recheio contendo o extrato de *Impatiens* foi a amostra mais intensa, revelando menor valor de L^* , menor brilho, enquanto que a amostra controlo foi a que apresentou maior luminosidade, pois estava bastante perto do valor máximo (100). Ainda, na **Figura 19 b)**, para as coordenadas a^* , foi possível verificar que o nível de intensidade da cor vermelha foi maior para o recheio com morango, ainda que o recheio contendo extrato de *Impatiens* revele tonalidade vermelha um pouco menor, perdendo intensidade dos 3 aos 7 dias. Finalmente, para as coordenadas b^* (**Figura 19c)**, é possível verificar que o extrato de *Impatiens* confere uma maior intensidade amarela ao recheio, tonalidade que vai subindo ao longo dos 7 dias de armazenamento. As coordenadas de cor, quando compostas formam a cor final do recheio que está representado na **Figura 20**, onde percebe-se que o morango confere intensidade rosa viva ao recheio das “bombocas”, enquanto que o extrato de *Impatiens* confere cor mais suave que se integra bastante bem com a tonalidade do chocolate que recobre as “bombocas” e que poderá agradar aos consumidores que atualmente tendem a rejeitar produtos alimentares com cores muito fortes por serem associadas a produtos menos saudáveis.

Tabela 20. Representação das coordenadas de cor L^* , a^* e b^* para as diferentes “bombocas”.

		L^*	a^*	b^*
Tipo Corante (TC)	Controlo	96 ± 1	-0,36 ± 0,03	2,7 ± 0,1
	Morango	90,0 ± 0,4	11,0 ± 0,3	2,3 ± 0,2
	<i>Impatiens</i>	76 ± 1	8,0 ± 0,9	9,5 ± 0,9
p -value (n=27)	Teste Tukey	<0,001	<0,001	<0,001
Intervalo de Tempo (IT)	0 Dias	87 ± 8	6 ± 5	4 ± 3
	3 Dias	86 ± 9	8 ± 5	5 ± 4
	7 Dias	87 ± 9	6 ± 5	5 ± 4
p -value (n=3)	Teste Tukey	0,182	<0,001	<0,001
TC×IT (n=81)	p -value	0,007	<0,001	<0,001

Os desvios padrão apresentados foram calculados de resultados obtidos em diferentes condições. Assim, não devem ser considerados como uma medida de precisão, mas sim um intervalo de valores.

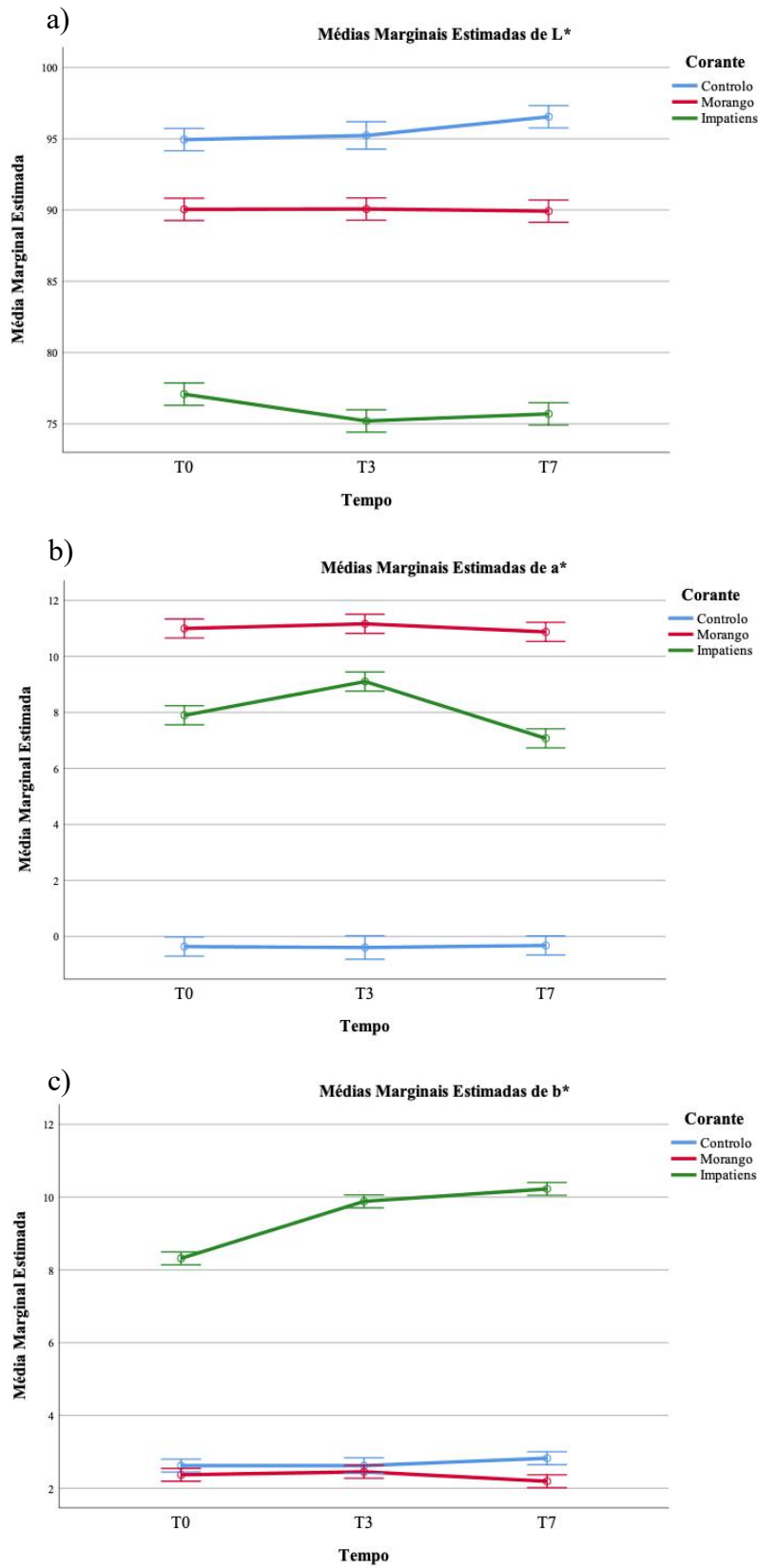


Figura 19. MME das coordenadas de cores para os recheios das “bombocas”, onde a) L^* - luminosidade; b) a^* - verde-vermelho; e c) b^* - azul-amarelo.

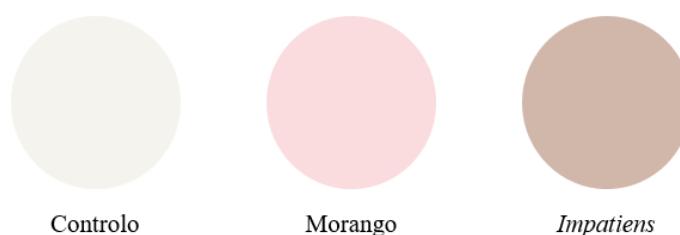


Figura 20. Cor dos recheios das “bombocas” com os diferentes extratos obtidos através das coordenadas de cor L^* , a^* e b^* .

Estudo recente que testou o enriquecimento de gomas de gelatina com extrato de flores de *Hibiscus sabdarifa* L. constatou que o sabor e a textura não foram alterados quando comparadas com a formulação original, contrariamente à cor, que ficou mais acentuada comprovando o potencial corante do extrato (de Oliveira & Melo et al., 2020).

A **Tabela 21** expressa os valores obtidos através do ensaio de inibição de hemólise oxidativa (OxHLIA), no qual os resultados foram expressos como valores de IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a um Δt de 30 min, que traduz a concentração do extrato necessária para manter 50 % da população de eritrócitos intacta por 30 min. Através dos resultados obtidos pode-se constatar que as amostras BI apresentou atividade antioxidante de maior permanência, quando comparadas às amostras BC e BM, em relação ao passar do dias. Além disso, os valores de IC_{50} foram de maior impacto logo após a confeção dos produtos, e o extrato de *I. balsamina* rosa (BR) demonstrou atividade antioxidante para o recheio de *marshmallow*, que variou com o tempo de prateleira.

Tabela 21. Atividade antioxidante das amostras de “bombocas”.

	OxHLIA (Valores de IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	T0	T3	T7
BC	n.a.	n.a.	n.a.
BI	212 ± 29^a	2067 ± 222^c	486 ± 57^b
BM	124 ± 8	n.a.	n.a.
Trolox	8.8 ± 0.5	-	-

n.a. - não apresentou atividade.

Al-Askalany & Ghandor (2017), avaliaram o potencial corante do sumo de amora dourada (*Physalis peruviana*) e da raiz de beterraba (*Beta vulgaris rubra*) para a elaboração de *marshmallows*. Dentre os resultados encontrados, foi observado que o uso

dos corantes antociânicos resultou num aumento da atividade antioxidante em 32,76 % e 44,87 % relativamente às amostras com adição de corantes artificiais e amostras sem corante, respetivamente. A literatura citada reforça as características antioxidantes proporcionadas pela adição de extratos na composição de *marshmallows*, fator que vai de acordo com as expectativas de nossa pesquisa, uma vez que o extrato das pétalas apresentou capacidade antioxidante quando da sua introdução no recheio das bombocas.

Artamonova et al., (2017), investigou as propriedades organoléticas, físico-químicas e antioxidantes de seis amostras distintas de *marshmallow* de acordo com o tipo de agente estruturante e tipo de corante (água, extrato hidroetanólicos de rosa sudanesa ou chokeberry negro). O valor da capacidade antioxidante encontrado nas amostras com corante natural, foram de 2 a 2,5 vezes maiores do que resultados para as amostras feitas sem os corantes. Além disso, os *marshmallows* elaborados com corantes naturais resistiram armazenados por dois dias sem nenhum material de embalagem, e permaneceram estáveis por um longo prazo, de trinta dias em embalagem hermética de polietileno e caixa de papelão, com altos índices de qualidade e estabilidade de cor. Pode-se notar que o extrato de *Impatiens* apresentou uma dupla funcionalidade no recheio do *marshmallow* pois, além de proporcionar cor, ele também foi responsável por garantir uma menor oxidação do recheio ao longo do tempo de prateleira estudado (sete dias), indicando que esse extrato pode ser explorado como alternativa para formulações para obtenção de aditivos alimentares como corantes e conservantes.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo foram identificados catorze compostos não antociânicos e onze antocianinas dos extratos obtidos a partir das pétalas de cor rosa e laranja das espécies *I. balsamina* (BL e BR) e *I. walleriana* (WL e WR). Pode-se observar que o extrato de coloração rosada para ambas as espécies apresentou maiores concentrações fenólicas, e que a *I. balsamina* apresentou maior diversidade de compostos relativamente à espécie *I. walleriana*.

Verificou-se que todos os extratos apresentavam excelente atividade antioxidante, fator relacionado à presença de flavonoides e ácidos fenólicos previamente identificados. Os extratos de coloração rosada (BR e WR) obtiveram maior desempenho quando comparados aos extratos de cor laranja (WL e WR). Os extratos testados foram capazes de promover ações bactericidas e bacteriostáticas satisfatórias para todos os microrganismos presentes no painel, especialmente para as estirpes de *B.cereus* e *E.coli*. Ótimo desempenho também foi observado para o potencial antifúngico, uma vez que os números de concentração mínima fungicida (CMF) encontrados foram muito baixos, especialmente para o extrato de *I. balsamina* laranja (BL). A ausência de toxicidade foi comprovada em todos os extratos com relação a linha celular não tumoral (PLP2), e os resultados de citotoxicidade apontaram que extrato BR apresentou melhor desempenho mediante todas as linhagens celulares tumorais testadas. A atividade anti-inflamatória dos extratos obtidos a partir *I. balsamina* apresentaram os resultados mais promissores, sendo o extrato BR o mais eficiente.

A água destacou-se como o componente principal (90 %) dos extratos da espécie *I. balsamina*, sendo que BL apresentou maior teor proteico, enquanto BR apresentou maior quantidade de hidratos de carbono e valor energético. Foram identificados 24 ácidos gordos individuais nas amostras, no qual ácido esteárico (C18:0), linoleico (C18:2n) e γ -linoleico (C18:3n6) se destacaram como maioritários, sendo os ácidos gordos saturados os maioritários para BL e os polinsaturados os maioritários para BR. Entre os ácidos orgânicos identificados, o ácido succínico foi o maioritário para as duas amostra estudadas. Relativamente ao teor em açúcares, verificou-se a presença de frutose e glucose em ambas as variedades.

A adição de extrato de *Impatiens* ao recheio de “bombocas” proporcionou aumento da quantidade de proteínas quando comparado com BC e BM, enquanto que os

hidratos de carbono foram mais abundantes em BM, seguido de BI e BC. Entretanto, as características nutricionais não se alteraram de modo significativo com a adição do extrato natural de *Impatiens* aos *marshmallows*, assim como os ácidos gordos identificados. Adicionalmente, a cor mais suave obtida com o corante de *Impatiens* pode promover maior atratividade ao consumidor devido ao apelo natural apresentado.

Por não apresentarem consumo em larga escala destinados à alimentação humana, as flores do género *Impatiens*, classificadas muitas vezes como (PANCs), apresentam característica auspiciosas como fonte de compostos bioativos, particularmente antocianinas, que podem ser exploradas futuramente pela indústria alimentar como corante natural. Entretanto, para que isso seja possível, é necessário um estudo aprofundando relativamente às melhores metodologias de extração, bem como condições ótimas de rendimento da matéria corante e estudos de estabilização dos compostos antociânicos presente nas pétalas dessas flores.

7. REFERÊNCIAS

- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegá, F., Chaves, R. & Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5800-5806.
- Acuña, A. M., Caso, L., Aliphath, M. M., & Vergara, C. H. (2011). Edible Insects as Part of the Traditional Food System of the Popoloca Town of Los Reyes Metzontla, Mexico. *Journal of Ethnobiology*, 31(1), 150–169. <https://doi.org/10.2993/0278-0771-31.1.150>
- Al-Askalany, S., & Ghandor, H. (2017). Evaluation of Sensory, Physicochemical Changes of Marshmallow (Children Candy) by Addition Natural colors. *Bulletin of the National Nutrition Institute of the Arab Republic of Egypt*, 50(1), 219-243.
- Alston, R. E., & Hagen Jr, C. W. (1958). Chemical aspects of the inheritance of flower color in *Impatiens balsamina* L. *Genetics*, 43(1), 35.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*, 15(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0217-2>
- Anastácio, L. B., Oliveira, D. A., Delmaschio, C. R., Antunes, L. M. G., & Chequer, F. M. D. (2016). Corantes alimentícios amarantho, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficis à saúde humana. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences - JAPHAC*, 2(3), 16–30.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01-09.
- AOAC. (2016, September 14). Correct Citation of AOAC (Official Methods of Analysis of AOAC International). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20883.89125>

Artamonova, M., Piliugina, I., Samokhvalova, O., Murlykina, N., Kravchenko, O., Fomina, I., & Grigorenko, A. (2017). Study of the properties of marshmallow with the Sudanese rose and black chokeberry dyes upon storage. *EUREKA: Life Sciences*, (3), 15-23.

ASAE. (2019, December 12) Correct Citation of ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). <https://www.asae.gov.pt/politica-de-privacidade.aspx>

Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & Pascual-Teresa, S. de. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*, 42(10), 1453–1461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.026>

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

Barreira, T. F., Paula Filho, G. X., Rodrigues, V. C. C., Andrade, F. M. C., Santos, R. H. S., Priore, S. E., Pinheiro-Sant’ana, H. M. (2015). Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 964–974. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_100

Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013a). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6, 309– 316.

Barros, L., Pereira, E., Calhella, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013b). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.

Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1576-1582.

Bateman, B., Warner, J. O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., Stevenson, J. (2004). The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*, 89(6), 506–511. <https://doi.org/10.1136/adc.2003.031435>

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87. Recuperado de Scopus.

Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>

Britannica Academic. Enciclopedia Britânica. 2017. Acesso em: 07 de dezembro 2019. <https://bit.ly/36dsY5Y>

Bunea, A., Rugină, D., Sconța, Z., Pop, R. M., Pinte, A., Socaciu, C., VanCamp, J. (2013). Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*, 95, 436-444. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.018>

Calderaro, A., Barreca, D., Bellocco, E., Smeriglio, A., Trombetta, D., & Laganà, G. (2020). Chapter Eight - Colored phytonutrients: Role and applications in the functional foods of anthocyanins. In S. M. Nabavi, I. Sunter, D. Barreca, & H. Khan (Orgs.),

Phytonutrients in Food (p. 177–195). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815354-3.00011-3>

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015a). Natural food additives: Quo vadis? Trends in Food Science & Technology, 45(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>

Carocho, M., Barros, L., Calhella, R.C., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). Melissa officinalis L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. Food & Function, 6, 2240–2248.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma. de L., Páez-Hernández, Ma. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113(4), 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 8(4), 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>

Chapman, S. (2011). Guidelines on approaches to the replacement of Tartrazine, Allura Red, Ponceau 4R, Quinoline Yellow, Sunset Yellow and Carmoisine in food and beverages. Recuperado de <https://www.reading.ac.uk/foodlaw/pdf/uk-11026-removing-colours-guidance.pdf>

Chatham, L. A., Howard, J. E., & Juvik, J. A. (2019). A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. Food Chemistry, 125734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125734>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chen, L., Gnanaraj, C., Arulselvan, P., El-Seedi, H., & Teng, H. (2019). A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic

compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.026>

Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012>

Chua, L. S. (2016). Untargeted MS-based small metabolite identification from the plant leaves and stems of *Impatiens balsamina*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.040>

Cimmino, A., Mathieu, V., Evidente, M., Ferderin, M., Banuls, L. M. Y., Masi, M., ... & Evidente, A. (2016). Glanduliferins A and B, two new glucosylated steroids from *Impatiens glandulifera*, with in vitro growth inhibitory activity in human cancer cells. *Fitoterapia*, 109, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.12.016>

Clevenger, S. (1958). The flavonols of *Impatiens balsamina* L. *Archives of biochemistry and biophysics*, 76(1), 131-138. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90127-9)

Corradini, M. G. (2019). Synthetic Food Colors. In L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Orgs.), *Encyclopedia of Food Chemistry* (p. 291–296). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21606-5>

Cunningham, E. (2015). What Nutritional Contribution Do Edible Flowers Make? *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(5), 856. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.03.002>

Delgado-Rodriguez, F. V., Hidalgo, O., Loría-Gutiérrez, A., & Weng-Huang, N. T. (2017). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts from whole plants of three *Impatiens* species (balsaminaceae). *Ancient Science of Life*, 37(1), 16.

de Oliveira Melo, F., Nascimento, R. S., dos Santos, T. G., de França Andrade, S., Leite, K. S., Neto, J. H., ... & Constant, P. B. L. (2020). Desenvolvimento de balas de gelatina de morango enriquecida com extrato de hibisco (*Hibiscus Sabdarifa* L.). *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 47561-47571.

de Souza, L. G., Rennó, M. N., & Figueroa-Villar, J. D. (2016). Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.001>

de Souza, R. M. (2012). Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde.

Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Cámara, M., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Wild *Fragaria vesca* L. fruits: a rich source of bioactive phytochemicals. *Food & Function*, 7, 4523–4532. <https://doi.org/10.1039/c6fo01042c>

Ding, Z. S., Jiang, F. S., Chen, N. P., Lv, G. Y., & Zhu, C. G. (2008). Isolation and identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules*, 13(2), 220-229. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules13020220>

Dixon, R. A., Liu, C., & Jun, J. H. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.07.004>

Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 5–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>

Duan, W., Jin, S., Zhao, G., & Sun, P. (2015). Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability. *Food Science and Technology*, 35(3), 524–530. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6731>

Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461–7466. <https://doi.org/10.1021/jf0258306>

Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D. & Duvall, C.L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* e50166.

Fallah, A. A., Sarmast, E., Fatehi, P., & Jafari, T. (2019). Impact of dietary anthocyanins on systemic and vascular inflammation: Systematic review and meta-analysis on randomised clinical trials. *Food and Chemical Toxicology*, 110922. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110922>

Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.017>

Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2016). Uma perspetiva nutricional sobre flores comestíveis. *Acta Portuguesa de Nutrição*, (6), 32–37. <https://doi.org/10.21011/apn.2016.0606>

Fernandes, Â., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Effects of gamma irradiation on physical parameters of *Lactarius deliciosus* wild edible mushrooms. *Postharvest Biology and Technology*, 74, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.019>

Ferreira, I. C., & Abreu, R. M. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. 8.

Food and Agriculture Organization of The United Nations. (2012). Diets must become sustainable say FAO and bioversity. Recuperado 19 de novembro de 2019, de Food and Agriculture Organization of the United Nations website: <http://www.fao.org/news/story/en/item/153694/icode/>

Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>

Ge, Q., & Ma, X. (2013). Composition and antioxidant activity of anthocyanins isolated from Yunnan edible rose. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.04.001>

Gioxari, A., Kogiannou, D. A. A., Kalogeropoulos, N., & Kaliora, A. C. (2016). Phenolic Compounds: Bioavailability and Health Effects. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Orgs.), *Encyclopedia of Food and Health* (p. 339–345). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00774-1>.

Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C. G., Barros, L., Haminiuk, C. W. I., Peralta, R. M., & Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408–418.

Gowd, V., Jia, Z., & Chen, W. (2017). Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes – A review of recent advances. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.015>

Grabowska, K., Podolak, I., Galanty, A., Żmudzki, P., Koczurkiewicz, P., Piska, K., ... & Janeczko, Z. (2017). Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Impatiens parviflora* DC. and their cytotoxic activity. *Industrial Crops and Products*, 96, 71-79. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901630766X>

Grey-Wilson, C. (1980). *Impatiens* of Africa. CRC Press.

Gu, K.-D., Wang, C.-K., Hu, D.-G., & Hao, Y.-J. (2019). How do anthocyanins paint our horticultural products? *Scientia Horticulturae*, 249, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.034>

Guo, N., Ping-Kou, Jiang, Y.-W., Wang, L.-T., Niu, L.-J., Liu, Z.-M., & Fu, Y.-J. (2019). Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction. *Food Chemistry*, 296, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.196>

Hagen Jr, C. W. (1966). The differentiation of pigmentation in flower parts. I. The flavonoid pigments of *Impatiens balsamina*, genotype IIHHPPrPr, and their distribution within the plant. *American Journal of Botany*, 53(1), 46-54.

Haider, F., & Ullah, N. (2019). Antioxidant and Antimicrobial activity of *Impatiens walleriana* local to Malaysia. *Moroccan Journal of Chemistry*, 7(3), 7-3.

Hartmann, C., Shi, J., Giusto, A., & Siegrist, M. (2015). The psychology of eating insects: A cross-cultural comparison between Germany and China. *Food Quality and Preference*, 44, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.04.013>

Hassemer, G. (2019). Balsaminaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. *Impatiens balsamina* L. Recuperado de <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB604409>

Hassemer, G., & dos Santos, AP. (2018). New records of naturalised *Impatiens* (Balsaminaceae) in Brazil. *Novos registros de Impatiens naturalizados (Balsaminaceae) no Brasil*, 29(1), 98–105.

Hosokawa, K., Fukunaga, Y., Fukushi, E., & Kawabata, J. (1995). Five acylated pelargonidin glucosides in the red flowers of *Hyacinthus orientalis*. *Phytochemistry*, 40(2), 567-571.

Houghton, J. D., & Hendry, G. A. F. (2012). *Natural Food Colorants*. Springer Science & Business Media.

Imam, M. Z., Nahar, N., Akter, S., & Rana, Md. S. (2012). Antinociceptive activity of methanol extract of flowers of *Impatiens balsamina*. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.004>

Iwaoka, E., Oku, H., Inuma, M., & Ishiguro, K. (2010). Allergy-preventive effects of the flowers of *Impatiens textori*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(4), 714-716. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.714>

Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Soković, M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International*, 100, 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073>

Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422-431.

Jaiswal, R., & Kuhnert, N. (2014). Identification and characterization of the phenolic glycosides of *Lagenaria siceraria* Stand. (bottle gourd) fruit by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(6), 1261-1271. <https://doi.org/10.1021/jf4053989>

Kim, C. S., Subedi, L., Kim, S. Y., Choi, S. U., Choi, S. Z., Son, M. W., Lee, K. R. (2015). Two new phenolic compounds from the white flower of *Impatiens balsamina*. *Phytochemistry Letters*, 14, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.10.014>

Kinupp, V.F., L., H. J. (2014). Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspetos nutricionais e receitas ilustradas. https://scholar.google.com/scholar?cluster=17003104817806033640&hl=pt-BR&as_sdt=2005&scioldt=0,5

Kinupp, V. F. (2007). Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. Recuperado de <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>

Kinupp, V. F. (2004). Levantamento De Dados E Divulgação Do Potencial Das Plantas Alimentícias Alternativas No Brasil. 22(2), 4.

Kırca, A., Özkan, M., & Cemeroğlu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101(1), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.019>

Kiselev, K. V., Grigorichuk, V. P., Ogneva, Z. V., Suprun, A. R., & Dubrovina, A. S. (2019). The effect of ultraviolet-C and precursor feeding on stilbene biosynthesis in spruce *Picea jezoensis*. *Journal of Plant Physiology*, 234–235, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.02.002>

Klein, A. O., & Hagen Jr, C. W. (1961). Anthocyanin production in detached petals of *Impatiens balsamina* L. *Plant Physiology*, 36(1), 1. <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.36.1.1>

Klozová, E., & Rokosová, K. (1961). Anthocyanins of *Impatiens holstii*. *Biologia Plantarum*, 3(4), 291.

Koike, A., Antonio, A. L., Ferreira, I. C. F. R., & Villavicencio, A. L. C. H. (2014). Flores comestíveis: Múltiplas utilizações do mais belo da natureza. *Vida Rural*, (1801), 40–42.

Koike, A., Barreira, J. C. M., Barros, L., Santos-Buelga, C., Villavicencio, A. L. C. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2015a). Edible flowers of *Viola tricolor* L. as a new functional food: Antioxidant activity, individual phenolics and effects of gamma and electron-beam irradiation. *Food Chemistry*, 179, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.123>

Koike, A. C. R. (2015b). Compostos bioativos em flores comestíveis processadas por radiação. (Dissertação de doutorado). Universidade de São Paulo.

Kumar, N., & Goel, N. (2019a). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>

Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S. K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R., ... Thukral, A. K. (2019b). Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.03.001>

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Li, Q., Cao, J., Yuan, W., Li, M., Yang, L., Sun, Y., ... & Zhao, Y. (2017). New triterpene saponins from flowers of *Impatiens balsamina* L. and their anti-hepatic fibrosis activity. *Journal of Functional Foods*, 33, 188-193. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.033>

Li, Q., Zhang, X., Cao, J., Guo, Z., Lou, Y., Ding, M., & Zhao, Y. (2015). Depside derivatives with anti-hepatic fibrosis and anti-diabetic activities from *Impatiens balsamina* L. flowers. *Fitoterapia*, 105, 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.007>

Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J. C., & Tsao, R. (2012). Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food research international*, 46(1), 250-259.

Lima, M. C., Sousa, C. P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., & de Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>

Lin, W.-S., He, P. H., Chau, C.-F., Liou, B.-K., Li, S., & Pan, M.-H. (2018). The feasibility study of natural pigments as food colorants and seasonings pigments safety on dried tofu coloring. *Food Science and Human Wellness*, 7(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.002>

Lockowandt L., Pinela, J., Roriz, C.L., Pereira, C., Abreu, R.M.V., Calhelha, R.C., Alves, M.J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496-503.

Lopes, T., Xavier, M., & Quadri, M. G. (2007). Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. 3(3).

López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits. *Food Chemistry*, 264, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.103>

Lu, B., Li, M., & Yin, R. (2016). Phytochemical Content, Health Benefits, and Toxicology of Common Edible Flowers: A Review (2000–2015). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(sup1), S130–S148. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1078276>

Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., & Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, 106, 106712. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>

Magalhães, A. L. T. D. (1996). Efeito de substitutos da sacarose nas características reológicas e sensoriais de doce aerado tipo "*marshmallow*", formulado com suco de goiaba (*Psidium guajava* L.).

Mahyun, F., Kusuma, A. P., & Anshory, H. (2018). Formulation peel-off gel mask of *Impatiens balsamina* L. as an antibacterium against *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 9(3), 168-174.

Manikandan, A., Rajendran, R., Abirami, M., & Kongarasi, K. (2016). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Impatiens balsamina* Seed (Kaci-T-Tumpai) collected from Coimbatore District, Tamil Nadu, India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(12), 5039.

Mardani, M., Yeganehzad, S., Ptichkina, N., Kodatsky, Y., Kliukina, O., Nepovinnykh, N., & Naji-Tabasi, S. (2019). Study on foaming, rheological and thermal properties of gelatin-free *marshmallow*. *Food Hydrocolloids*, 93, 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.033>

Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>

Martynenko, A., & Chen, Y. (2016). Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. *Journal of Food Engineering*, 171, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.008>

Matyjaszczyk, E., & Śmiechowska, M. (2019). Edible flowers. Benefits and risks pertaining to their consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.017>

Míguez, M. G., Manzano, S. G., Bailó, N. M. T. E., Heredia, F. J., & Buelga, C. S. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5422–5429. <https://doi.org/10.1021/jf0604586>

Mlcek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.006>

Modelski, V. (2015). Explorando jardins comestíveis via plantas alimentícias não convencionais com mulheres do Movimento dos Trabalhadores Rurais Sem Terra do Assentamento Filhos de Sepé. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10183/142164>

Monteiro, J. M., de Albuquerque, U. P., de Araujo, E., & de Amorim, E. L. C. (2005). Taninos: Uma Abordagem Da Química À Ecologia. *Química Nova*, 28(5), 892.

Morgan R. J. *Impatiens: the vibrant world of busy lizzies, balsams, and touch-me-nots*. Timber Press, Portland, OR; EUA, 2007.

Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>

Motz, V. A., Bowers, C. P., Kneubehl, A. R., Lendrum, E. C., Young, L. M., & Kinder, D. H. (2015). Efficacy of the saponin component of *Impatiens capensis* Meerb. in preventing urushiol-induced contact dermatitis. *Journal of ethnopharmacology*, 162, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.024>

Nave, F. (2014). Caracterização estrutural de novos pigmentos responsáveis pela cor de vinhos do Porto envelhecidos.

Newman, S. E., & O'Connor, A. S. (2009). Edible flowers. Colorado State University Extension. Fact sheet no. 7.237.

Nisar, M., Qayum, M., Shah, M. R., Kaleem, W. A., Ali, I. H. S. A. N., & Zia-Ul-Haq, M. (2010). Antimicrobial screening of *Impatiens bicolor* Royle. *Pak. J. Bot*, 42(1), 523-526. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42\(1\)/PJB42\(1\)523.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(1)/PJB42(1)523.pdf)

Olagaray, K. E., & Bradford, B. J. (2019). Plant flavonoids to improve productivity of ruminants - A review. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.02.004>

Oliveira, J., Alinho da Silva, M., Teixeira, N., De Freitas, V., & Salas, E. (2015). Screening of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments in red wine grape pomace

using LC-DAD/MS and MALDI-TOF techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7636-7644.

Oliveira, M. F. (2014). Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) num modelo de Artrite Reumatóide (Doctoral dissertation).

Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. (1992). *Productos forestales no madereros: Posibilidades futuras*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Oyeyemi, S. D., Arowosegbe, S., & Famosa, M. A. (2017). Phytochemical constituents and nutritional evaluation of three selected edible flowers in Ado-Ekiti, Nigeria. *Chemical Search Journal*, 8(1), 41–48. Recuperado de Scopus.

Padilha, C. V. D. S. (2014). Efeito do tempo e da temperatura de aquecimento na concentração de compostos de compostos fenólicos e antocianina em sucos de uva após o processo de engarrafamento.

Patel, S. U., Osborn, R., Rees, S., & Thornton, J. M. (1998). Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*, 37(4), 983-990. <https://doi.org/10.1021/bi971747d>

Patras, A., Brunton, Nigel. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>

Paun, G., Neagu, E., Moroceanu, V., Albu, C., Ursu, T. M., Zanfirescu, A., ... & Radu, G. L. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant activities of the *Impatiens noli-tangere* and *Stachys officinalis* polyphenolic-rich extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.008>

Pedro, A. C., Granato, D., & Rosso, N. D. (2016). Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, 191, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.045>

Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130, 394–403.

Pereira, DM., Valentão, P., Pereira, JA, & Andrade, PB. (2009). Fenólicos: Da Química à Biologia. 14(6) <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>.

Periche, A., Heredia, A., Escriche, I., Andrés, A., & Castelló, M. L. (2015). Potential use of isomaltulose to produce healthier marshmallows. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.024>

Peron, D. V., Fraga, S., & Antelo, F. (2017). Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from juçara (*Euterpe edulis* Martius) and “Italia” grapes (*Vitis vinifera* L.), and the effect of heating on the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 232, 836–840. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.088>

Petti, S., & Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37(6), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.003>

Pinakin, D. J., Kumar, V., Suri, S., Sharma, R., & Kaushal, M. (2020). Nutraceutical potential of tree flowers: A comprehensive review on biochemical profile, health benefits, and utilization. *Food Research International*, 127, 108724. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108724>

Pires, T. C., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., & Barros, L. (2020). Development of new bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) based snacks: Nutritional, chemical and bioactive features. *Food Chemistry*, 334, 127511.

Pires, T. C. S. P., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Edible flowers: Emerging components in the diet. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.020>

Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>

Qureshi, S., Adil, S., El-Hack, M. E. A., Alagawany, M., & Farag, M. R. (2017). Beneficial uses of dandelion herb (*Taraxacum officinale*) in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 591–602. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000459>

Rachkeeree, A., Kantadoung, K., Suksathan, R., Puangpradab, R., Page, P. A., & Sommano, S. R. (2018). Nutritional Compositions and Phytochemical Properties of the Edible Flowers from Selected Zingiberaceae Found in Thailand. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00003>

Regulamento (CE) no 1333/2008. Regulamento (CE) no 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, sobre aditivos alimentares, *Jornal Oficial da União Europeia* § (2008).

Rocha, A. P. N. D. (2015). A presença de corantes na alimentação de crianças e adolescentes e implicações na saúde pública. (Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra).

Rodrigues, H., Cielo, D. P., Gómez-Corona, C., Silveira, A. A. S., Marchesan, T. A., Galmarini, M. V., & Richards, N. S. P. S. (2017). Eating flowers? Exploring attitudes and consumers' representation of edible flowers. *Food Research International*, 100, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.018>

Rodrigues, S., Calhelha, R. C., Barreira, J. C. M., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M. V., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, 49, 516–523.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2019). Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>

Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., & Vabkova, J. (2012). Edible flowers A new promising source of mineral elements in human nutrition. *Molecules*, 17(6), 6672–6683. <https://doi.org/10.3390/molecules17066684>

Saito, T. (2014). Efeito Da Adição De Extrato De Casca De Jabuticaba Nas Características Físico-Químicas E Sensoriais De Queijo Petit Suisse (Dissertação de Mestrado). Alegre - ES.

Silveira, A. C. T., & Lima, M. V. (2003). Determinação De Tanino Em Pedúnculo De Caju: Método Da Vanilina Versus Método Do Butanol Ácido. *Química Nova*, 26(5), 763–765.

Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>

Sinopoli, A., Calogero, G., & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 297, 124898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.172>

Sousa, A. C. R., Heleno, S. A., Barros, L., Barreira, J. C. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Utilização de subprodutos de bagas de sabugueiro como fonte de corantes naturais.

Souza, V. C. Balsaminaceae. In: Wanderley, M. G. L., Shepherd, G. J., Giulietti, A. M., Melhem, T. S., Bittrich, V., & Kameyama, C. (2002). *Flora Fanerogâmica Do Estado De São Paulo (Vol. 2)*. <https://bit.ly/2P2P8Cd>

Stich, E. (2016). 1 - Food Color and Coloring Food: Quality, Differentiation and Regulatory Requirements in the European Union and the United States. In R. Carle & R. M. Schweiggert (Orgs.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (p. 3–27). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00001-4>

Stradley, L. (2015, agosto 25). Edible Flowers Chart. Recuperado 17 de novembro de 2019, de What's Cooking America website: <https://whatscookingamerica.net/EdibleFlowers/EdibleFlowersMain.htm>

Su, B.-L., Zeng, R., Chen, J.-Y., Chen, C.-Y., Guo, J.-H., & Huang, C.-G. (2012). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Various Solvent Extracts from *Impatiens*

balsamina L. Stems. Journal of Food Science, 77(6), C614–C619. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02709.x>

Swier, T. L., Chauhan, K., Mukhim, C., Bashir, K., & Kumar, A. (2019). Application of anthocyanins extracted from Sohiong (*Prunus nepalensis* L.) in food processing. LWT, 114, 108360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108360>.

Szewczyk, K. (2018a). Phytochemistry of the genus *Impatiens* (Balsaminaceae): A review. Biochemical Systematics and Ecology, 80, 94–121. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.07.001>

Szewczyk, K., Heise, E. M., & Piwowarski, J. P. (2018b). Preliminary characterization and bioactivities of some *Impatiens* L. water-soluble polysaccharides. Molecules, 23(3), 631.

Szewczyk, K., Orzelska-Gorka, J., Polakowska, M., & Biala, G. (2018c). Atividade antinociceptiva e antianxiedade de extratos hidroetanólicos de três espécies de *Impatiens* em camundongos. Acta Poloniae Pharmaceutica, 75 (4), 989-1001.

Szewczyk, K., Bonikowski, R., Maciąg-Krajewska, A., Abramek, J., & Bogucka-Kocka, A. (2018d). Lipophilic components and evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of *Impatiens glandulifera* Royle and *Impatiens noli-tangere* L.(Balsaminaceae). Grasas y Aceites, 69(3), 270.

Szewczyk, K., Zidorn, C., Biernasiuk, A., Komsta, Ł., & Granica, S. (2016). Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. Industrial Crops and Products, 86, 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.053>

Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y. & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). Food Chemistry 134, 606–610.

Tan, C., Celli, G. B., Selig, M. J., & Abbaspourrad, A. (2018). Catechin modulates the copigmentation and encapsulation of anthocyanins in polyelectrolyte complexes (PECs) for natural colorant stabilization. Food Chemistry, 264, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.018>

Tanaka, Y., & Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.015>

Tang, B., He, Y., Liu, J., Zhang, J., Li, J., Zhou, J., Wang, X. (2019). Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. *Dyes and Pigments*, 170, 107643. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107643>

Tatsuzawa, F., Saito, N., Mikanagi, Y., Shinoda, K., Toki, K., Shigihara, A., & Honda, T. (2009). An unusual acylated malvidin 3-glucoside from flowers of *Impatiens textori* Miq.(Balsaminaceae). *Phytochemistry*, 70(5), 672-674. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.03.005>

Thakur, A., Singla, R., & Jaitak, V. (2015). Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 476–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.010>

Thakur, M., & Nozzolillo, C. (1978). Anthocyanin pigmentation in roots of *Impatiens* species. *Canadian Journal of Botany*, 56(22), 2898-2903. <https://doi.org/10.1139/b78-347>

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>

Trinh, L. T. P., Choi, Y.-S., & Bae, H.-J. (2018). Production of phenolic compounds and biosugars from flower resources via several extraction processes. *Industrial Crops and Products*, 125, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.008>

Toledo, B. A., Galetto, L., & Colantonio, S. (2009). Ethnobotanical knowledge in rural communities of Cordoba (Argentina): The importance of cultural and biogeographical factors. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-5-40>

Ueda, Y., Oku, H., Iinuma, M., & Ishiguro, K. (2005). Antianaphylactic and Antipruritic Effects of the Flowers of *Impatiens textori* M IQ. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1786-1790 <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1786>

Ueda, Y., Oku, H., Inuma, M., & Ishiguro, K. (2003). Effects on Blood Pressure Decrease in Response to PAF of *Impatiens textori* M IQ. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(10), 1505-1507. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1505>

Ueno, N., Takemura, E. I., & Hayashi, K. (1969). Additional data of the paper-chromatographic survey of anthocyanins in the flora of Japan (IV). Studies on anthocyanins, LXI. *Bot. Mag. Tokyo*82, 155-161.

Valente, J. A. S. (2015). Bebida a base de permeado adicionado de extrato antociânianico da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticabavell.* Berg): Elaboração e caracterização. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>

Wang, Y. C., & Lin, Y. H. (2012). Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-Methoxy-1, 4-naphthoquinone, an anti-*Helicobacter pylori* compound from *Impatiens balsamina* L. *Fitoterapia*, 83(8), 1336-1344. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X12000950>

Wang, Y. C., Li, W. Y., Wu, D. C., Wang, J. J., Wu, C. H., Liao, J. J., & Lin, C. K. (2011). In Vitro Activity of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone and Stigmasta-7, 22-diene-3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fecam%2Fnep147>

Youssef, H. M. K. E., & Mousa, R. M. A. (2012). Nutritional assessment of low-calorie baladi rose petals jam. *Food and Public Health*, 2(6), 197–201. Recuperado de Scopus.

Yudhistira, B., Affandi, D. R., & Nusantari, P. N. (2018). Effect of green spinach (*Amaranthus tricolor* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum*) addition in physical, chemical, and sensory properties of marshmallow as an alternative prevention of iron

deficiency anemia. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing.

Zhang, N., He, Z., He, S., & Jing, P. (2019). Insights into the importance of dietary chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* cv. Hangju)-wolfberry (*Lycium barbarum* fruit) combination in antioxidant and anti-inflammatory properties. *Food Research International*, 116, 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.015>

Zhao, L., Fan, H., Zhang, M., Chitrakar, B., Bhandari, B., & Wang, B. (2019a). Edible flowers: Review of flower processing and extraction of bioactive compounds by novel technologies. *Food Research International*, 126, 108660. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108660>

Zhao, S., Park, C. H., Yang, J., Yeo, H. J., Kim, T. J., Kim, J. K., & Park, S. U. (2019b). Molecular characterization of anthocyanin and betulinic acid biosynthesis in red and white mulberry fruits using high-throughput sequencing. *Food Chemistry*, 279, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.101>

Zheng, J., Meenu, M., & Xu, B. (2019). A systematic investigation on free phenolic acids and flavonoids profiles of commonly consumed edible flowers in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.007>