



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE
FOLHAS E FLORES DE *Begonia semperflorens*

Gabriela Chilanti

Porto Alegre
Dezembro, 2021

Gabriela Chilanti

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE
FOLHAS E FLORES DE *Begonia semperflorens***

Qualificação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre
Dezembro, 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Chilanti, Gabriela
CARACTERIZACAO QUIMICA, IDENTIFICACAO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIACAO DE ATIVIDADE BIOLOGICA DO
EXTRATO DE FOLHAS E FLORES DE Begonia semperflorens /
Gabriela Chilanti. -- 2021.
150 f.
Orientadora: Simone Hickmann Flores.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. compostos fenolicos. 2. estresse oxidativo. 3.
flores comestiveis. 4. diabetes. I. Hickmann Flores,
Simone, orient. II. Título.

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE
FOLHAS E FLORES DE *Begonia semperflorens***

EXECUTOR: Gabriela Chilanti

Nutricionista – UCS, Mestra em Biotecnologia – UCS, aluna do Curso de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Simone Hickmann Flôres

Doutora em Engenharia de Alimentos

LOCAL DE EXECUÇÃO: Laboratório de Compostos Bioativos (ICTA) – UFRGS

Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante – UCS

Laboratório de Fisiologia – UCS

Dedico este trabalho, com todo meu amor e carinho, à minha mãe, Hilda Renosto Chilanti (in memoriam), que mesmo ausente deste mundo continua me ajudando nas dificuldades e à minha orientadora Simone Hickmann Flôres, um exemplo a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar sempre e por colocar pessoas especiais em meu caminho.

À minha orientadora Simone Hickmann Flôres, pela orientação, pelas palavras amigas, pelo incentivo, pela paciência e por acreditar em mim. Muito obrigada de coração por não desistir de mim. A professora Simone, além de uma profissional maravilhosa, exemplo a ser seguido é uma pessoa muito humana, com um coração enorme.

Aos professores Matheus Parmegiani Jahn, Mirian Salvador, Marli Camassola, pelo apoio dado a este trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

À professora e amiga Cátia dos Santos Branco, pelas palavras amigas e pela disponibilidade em ensinar durante todo o trabalho.

À Luciana B. Andrade pela disponibilidade em ajudar.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo auxílio e ensinamentos durante estes anos.

Às minhas amigas Carin Weirich Gallon e Giovana Rech, pela amizade sincera, carinho, cumplicidade e momentos de descontração.

A todos os colegas dos Laboratórios de Compostos Bioativos (UFRGS), estresse Oxidativo (UCS) e Fisiologia (UCS) pelo companheirismo e troca de experiências.

À minha mãe Hilda Renosto Chilanti (*in memoriam*), por ser tão importante na minha vida, por estar sempre ao meu lado me guiando e incentivando mesmo não estando mais entre nós.

Ao meu pai Jorge Chilanti pela compreensão e incentivo e às minhas irmãs, Rafaela e Daiane, pela amizade e carinho.

À minha avó Nilva Polli Chilanti, pelas orações e torcida.

À banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para esse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Universidade Federal do Rio grande do Sul (UCS), a Universidade de Caxias do Sul (UCS) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) pelo suporte financeiro.

RESUMO

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs) são plantas com uma ou mais partes que podem ser utilizadas na alimentação humana. Dentre as plantas alimentícias destacam-se as flores comestíveis, que são ricas em compostos bioativos, os quais diversos estudos têm investigado seus efeitos na prevenção e tratamento de patologias. No presente estudo, foi obtido e avaliado quimicamente os extratos das folhas (BLE) e flores (BFE) da *Begonia semperflorens* e também foram investigados os efeitos dos extratos nos marcadores metabólicos e hematológicos, modulação do estresse oxidativo, função endotelial e mitocondrial em dois modelos. A identificação dos compostos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para avaliação da viabilidade celular e atividade antioxidante dos extratos, células endoteliais EA.hy926 foram expostas a BFE e BLE juntamente com 35 mM de glicose por 24, 48 e 72 horas. Já para a avaliação dos efeitos biológicos em modelo animal, 24 ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle de ratos saudáveis, um grupo de ratos saudáveis que receberam extrato (250 mg/kg) por gavagem, um grupo controle de diabéticos e um grupo de diabéticos que recebeu extrato (250 mg/kg) por gavagem. Após 30 dias de tratamento, os ratos foram eutanasiados e o soro foi coletado para as avaliações. Os extratos obtidos se mostraram uma boa fonte de polifenóis totais e atividade antioxidante. Em relação aos testes utilizando linhagem celular, os extratos foram capazes de aumentar a viabilidade celular, aumentar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase e manter os níveis basais de óxido nítrico que foram alterados pelo tratamento com excesso de glicose. A atividade do complexo mitocondrial I foi aumentada no tratamento com excesso de glicose, entretanto os extratos foram capazes de evitar essa superativação, mantendo os níveis basais de atividade. Em relação as análises utilizando modelo animal foi possível observar uma redução significativa dos

níveis séricos de triglicérides, a capacidade antioxidante total do plasma foi melhorada nos ratos que receberam BFE, e o BFE foi capaz de reduzir os danos oxidativos a lipídeos e proteínas do grupo de ratos diabéticos. Esses dados sugerem que o extrato das flores e folhas da *B. semperflorens* podem tornar-se uma importante alternativa na prevenção das complicações do *Diabetes Mellitus* (DM) e contribuem para prospectar a utilização da *B. semperflorens*, uma flor comestível, ainda pouco utilizada.

Palavras-chave: compostos fenólicos, estresse oxidativo, flores comestíveis, diabetes.

ABSTRACT

Non-conventional food plants (PANCs) are plants with one or more parts that can be used for human consumption. Among the food plants, edible flowers stand out, which are rich in bioactive compounds, which several studies have investigated their effects in the prevention and treatment of pathologies. In the present study, extracts from the leaves (BLE) and flowers (BFE) of *Begonia semperflorens* were obtained and chemically evaluated and the effects of the extracts on metabolic and hematological markers, modulation of oxidative stress, endothelial and mitochondrial function in two models were investigated as well. The identification of compounds was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In order to evaluate the cell viability and antioxidant activity of the extracts, EA.hy926 endothelial cells were exposed to BFE and BLE together with 35 mM glucose for 24, 48 and 72 hours. For the evaluation of biological effects in an animal model, 24 male Wistar rats were divided into 4 groups, a control group of healthy rats, a group of healthy rats that received extract (250 mg/kg) by gavage, a control group of diabetics and a group of diabetics who received extract (250 mg/kg) by gavage. After 30 days of treatment, the rats were euthanized, and serum was collected for evaluations. The obtained extracts proved to be a good source of total polyphenols and antioxidant activity. Regarding the tests using cell lineage, the extracts were able to increase cell viability, increase the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, and maintain the basal levels of nitric oxide that were altered by the treatment with excess glucose. The activity of mitochondrial complex I was increased in the treatment with excess of glucose, however, the extracts were able to prevent this overactivation, maintaining the basal activity levels. Regarding the analysis using animal model, it was possible to observe a significant reduction in serum

triglyceride levels, the total plasma antioxidant capacity was improved in rats that received BFE, and BFE was able to reduce oxidative damage to lipids and proteins in the group of diabetic rats. This data suggests that the extract from the flowers and leaves of *B. semperflorens* can become an important alternative in the prevention of complications from *Diabetes Mellitus* (DM) and contribute to prospect the use of *B. semperflorens*, an edible flower, which is still not used so much.

Keywords: phenolic compounds, oxidative stress, edible flowers, diabetes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS^{•+} – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

AMPK – AMP-activated protein kinase

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

DM – Diabetes Mellitus

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH[•] – 2,2-difenil 1-picrilhidrazil

EA.hy926 – Células endoteliais humanas

ER – Espécies reativas

HG – High glucose

IDF – International Diabetes Federation

Mn-SOD – Superóxido dismutase manganês

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

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

SIRT 3 – sirtuína 3

SOD – superóxido dismutase

STZ – Estreptozotocina

BFE – Extrato flores *Begonia*

BLE – Extrato folha *Begonia*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA	19
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5 MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA	55
5.2 PREPARO DO EXTRATO	58
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	58
5.3.1 Composição centesimal.....	58
5.3.2 Análise do conteúdo de polifenóis totais.....	58
5.3.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos	59
5.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ABTS E DPPH).....	59
5.4.1 Método ABTS	59
5.4.2 Método DPPH.....	59
5.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA – CULTURA DE CÉLULAS	60
5.5.1 Linhagem celular – desenho experimental.....	60
5.5.2 Determinação da viabilidade celular	60

5.5.3 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	60
5.5.4 Atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase	61
5.7 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICEMIANTE EM RATOS.....	61
5.7.1 Animais e tratamentos	61
5.7.2 Análises Bioquímicas.....	63
5.7.3 Perfil hematológico.....	63
5.7.4 Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo	63
5.7.5 Avaliação da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	64
5.7.6 Determinação da Atividade Antioxidantes do Plasma.....	64
5.7.7 Avaliação do Complexo I da Cadeia de Transporte de Elétrons.....	64
5.7.8 Biossegurança	65
5.7.9 Bioética	65
5.7.10 Análise Estatística	66
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	67
6 RESULTADOS	68
6.1 ARTIGO I.....	69
<i>Begonia semperflorens</i> extracts protect EA.hy926 cells against glucose-induced damage by improving mitochondrial function and redox metabolism.....	69
6.2 ARTIGO II	111
Effect of <i>Begonia semperflorens</i> extract in streptozotocin-induced diabetic rats metabolism.....	111
CAPÍTULO 4: PRODUTO.....	138
7 PRODUTO	139

7.1 PATENTE DEPOSITADA E COMPROVANTE DE ACEITE DA PATENTE 139

CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS 141

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 142

CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS 145

9 PERSPECTIVAS..... 146

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147

1 INTRODUÇÃO

As plantas alimentícias não convencionais (PANC) sempre fizeram parte da vida e do cotidiano humano. Historicamente, além do papel ornamental, as plantas sempre foram utilizadas para fins curativos por diferentes culturas. O termo PANC, criado pelo Biólogo e Professor Valdely Ferreira Kinupp em 2008, se relaciona a todas as plantas que possuem uma ou mais partes comestíveis, podendo serem encontradas por meio de cultivo, de forma nativa ou até mesmo exótica e apresentam aspectos nutricionais importantes para população humana (KINUPP, 2008).

Em virtude de seus compostos bioativos, as PANC são amplamente utilizadas na fitoterapia, medicina popular, e na alimentação, sendo que algumas delas podem ser consideradas alimentos altamente nutritivos com diversidade de vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes. Estima-se que haja cerca de 27 mil espécies de plantas que apresentam potencial alimentar no mundo (PRESCOTT-ALLEN e PRESCOTT-ALLEN, 1990). E no Brasil, de acordo com Kelen et al. (2015), estima-se que 10% da flora seja de plantas alimentícias e existem em torno de 3 mil espécies de PANC conhecidas.

Entre as plantas alimentícias, destacam-se as flores comestíveis, que são ricas em compostos bioativos e apresentam um excelente perfil nutricional devido seu teor de proteínas, fibras, baixo teor lipídico e aminoácidos essenciais. Devido aos seus compostos bioativos, as flores comestíveis podem apresentar importantes atividades biológicas como antitumoral, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana e gastroprotetora, que possuem extrema relevância para promoção e prevenção da saúde, assim como para tratamento de algumas doenças.

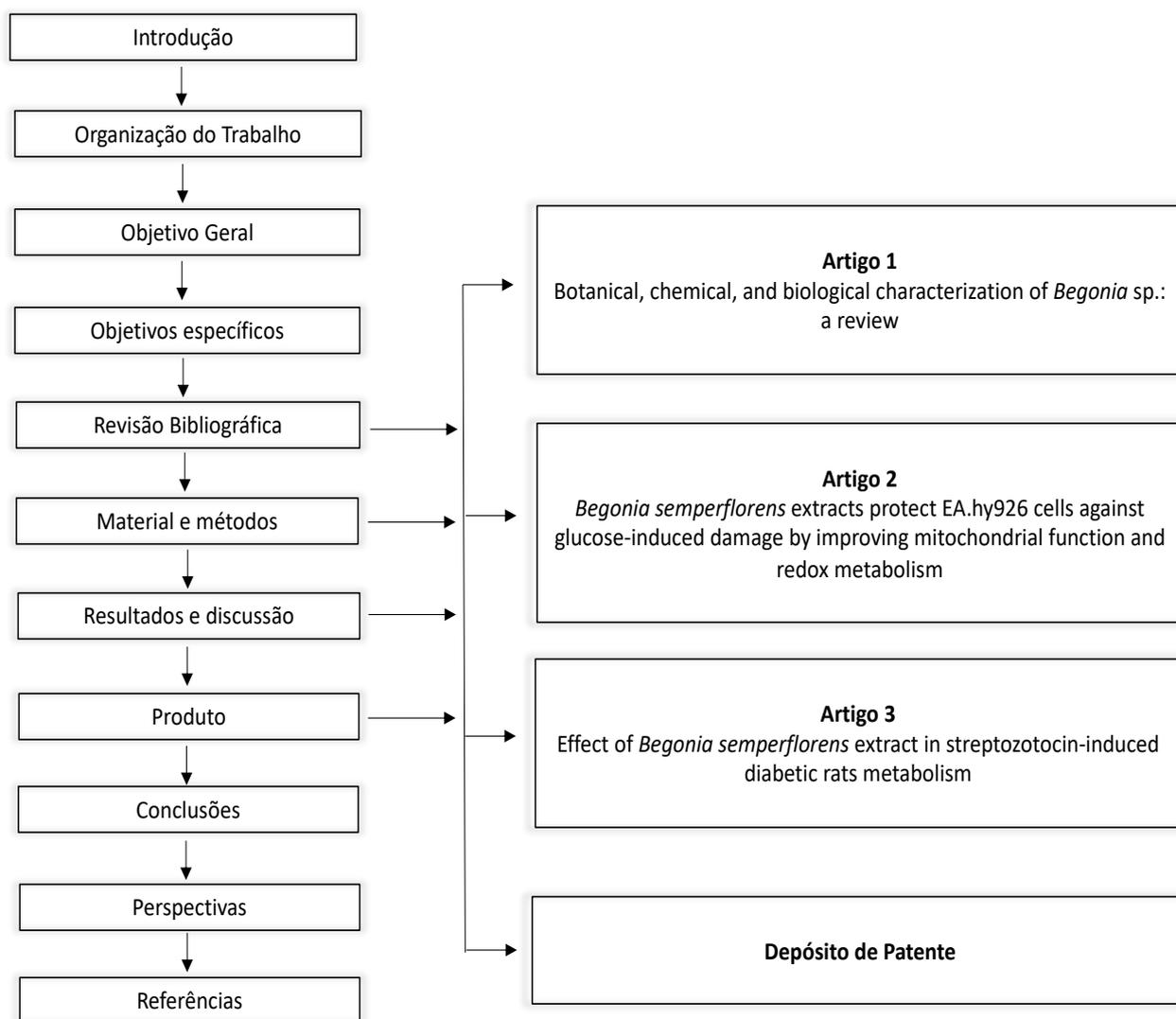
Ressalta-se que as flores utilizadas para consumo humano deverão ser cultivadas seguindo os protocolos da agricultura biológica, e adquiridas em estabelecimentos específicos que garantem o controle biológico destas flores para o consumo. Fato este que

não ocorre em floriculturas ou estabelecimentos afins, que vendem as flores comestíveis para fins ornamentais e utilização produtos químicos prejudiciais para saúde humana.

Entre as flores comestíveis mais consumidas destaca-se a família *Begoniaceae*, cujo o gênero *Begonia* vem sendo amplamente utilizada na alimentação em virtude de seu sabor cítrico, crocância das suas pétalas, diversidade de sua composição nutricional, atividades biológicas e potencial nutracêutico. Antes do ano de 2000, pesquisas sobre flores comestíveis concentravam-se principalmente nos nutrientes, fragrância e óleos voláteis, no entanto, estudos recentes tem dedicado maior atenção aos fitoquímicos, os principais compostos bioativos das flores comestíveis. O potencial medicinal de *Begonia* sp. foi inicialmente explorado pelas populações indígenas. Posteriormente, começou a ser avaliado em diferentes partes do mundo para o tratamento de várias doenças. Contudo, há uma incipiência de estudos que avaliem de forma específica a composição, compostos bioativos e atividade biológicas da *Begonia semperflorens*. Desta forma, a caracterização, o estudo dos compostos fenólicos e seus efeitos/mecanismos antioxidantes e atividades biológicas podem colaborar para a definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças através do uso de extratos das folhas e flores da *B. semperflorens* e também contribui na prospecção da aplicação de flores comestíveis na área alimentícia, nutracêutica e/ou cosmética.

2 ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO

Este trabalho está organizado conforme fluxograma abaixo:



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter, avaliar e caracterizar quimicamente e biologicamente o extrato de folhas e flores de *Begonia semperflorens*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter e caracterizar quimicamente os extratos das folhas e flores da *Begonia semperflorens*;
- ✓ Determinar o teor polifenólico total, identificar os compostos majoritários dos extratos de *Begonia semperflorens* e avaliar a atividade antioxidante *in vitro*;
- ✓ Avaliar o efeito do extrato de *Begonia semperflorens* sobre a viabilidade de células de mamíferos crescidas em cultura através do ensaio de MTT;
- ✓ Investigar o potencial antidiabético do extrato de *Begonia semperflorens* em células endoteliais E.A.hy926 sob alta concentração de glicose;
- ✓ Avaliar da atividade do extrato de *Begonia semperflorens* em modelo *in vivo* de diabetes induzido por estreptozotocina.