

NICOLE MARINA ALMEIDA MAIA

**Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas
de pétalas de *Clitoria ternatea* por meio de solvente eutético
natural profundo e estudo da estabilidade colorimétrica e de
compostos bioativos dos extratos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof. Érica Nascif Rufino Vieira

Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira
Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M217o
2024

Maia, Nicole Marina Almeida, 2024-

Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas de pétalas de *Clitoria ternatea* por meio de solvente eutético natural profundo e estudo da estabilidade colorimétrica e de composto bioativos dos extratos / Nicole Marina Almeida Maia. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (79 f.): il.

Orientador: Érica Nascif Rufino Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.174>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Extração por solventes. 2. *Clitoria ternatea*.
3. Antioxidantes. 4. Polifenóis. 5. Corantes. I. Vieira, Érica Nascif Rufino, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
III. Título.

CDD 22. ed. 660.284248

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


NICOLE MARINA ALMEIDA MAIA

Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas de *Clitoria ternatea* por meio de solvente eutético natural profundo e estudo da estabilidade colorimétrica e de compostos bioativos dos extratos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM: 19/02/2024  Documento assinado digitalmente
NICOLE MARINA ALMEIDA MAIA
Data: 15/07/2024 17:36:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nicole Marina Almeida Maia
Autora

 Documento assinado digitalmente
ERICA NASCIF RUFINO VIEIRA
Data: 12/07/2024 12:41:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa Érica Nascif Rufino Vieira
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me concedeu à vida e à saúde necessárias para realizar este sonho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

À orientadora, Profª. Érica Nascif Rufino Vieira e a coorientadores Eduardo Basílio de Oliveira e Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, por me acompanharem ao longo desses 2 anos de mestrado, por todo apoio, paciência, confiança e por todos os aprendizados ao longo da condução deste trabalho.

Às Prof. Edimar Aparecida Filomeno Fontes e Nataly de Almeida Costa pela disponibilidade e por aceitarem o convite de participação na banca de defesa.

Aos estudantes de iniciação científica Gabriela, Bruna, Julia e Monique por toda ajuda durante a execução dos experimentos. Agradeço por todo o trabalho exercido!

Aos amigos do Laboratório de Inovação no Processamento de Alimentos (LIPA), em especial a Maria José, Vanessa, Fábio, Irene, Jeferson, Thaís, Gabriella, Mirielle e Lorena por todo apoio e amizade dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários da fábrica, Ademir e Elvécio, por toda as prozas boas e por toda ajuda durante os experimentos na fábrica.

Ao Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos, coordenado pelo Prof. Paulo César Stringheta e todos os seus orientados pela parceria durante esse projeto.

Os meus sinceros votos de gratidão à minha família com quem eu sempre posso contar: a minha mãe Silvia por ser rede de apoio em qualquer hora do dia, ao meu pai Carlos Roberto, aos meus irmãos Nayara, Carlos Eduardo e Ana Júlia e à minha madrinha Tininha, vocês, e todos os outros não aqui citados, são laranjas raras em minha vida! Gratidão Analu e Alyce, minha família viçosense. Obrigada, minha filha Valentina, por ser a mais tenra e valente companhia nessa caminhada. Em memória às minhas avós, que tanto me ensinaram sobre amor à vida e a transformação dos alimentos em delícias afetuosas.

RESUMO

MAIA, Nicole Marina Almeida, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2024. **Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas de pétalas de *Clitoria ternatea* por meio de solvente eutético natural profundo e estudo da estabilidade colorimétrica e de compostos bioativos dos extratos.** Orientadora: Érica Nascif Rufino Vieira. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira e Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior.

A otimização da extração de biocompostos de plantas medicinais, assim como a utilização de solventes verdes, possui relevância para variados setores, como indústrias alimentícias, farmacêuticas ou cosméticas. O objetivo desse estudo foi otimizar o tempo de extração (15-50 minutos), a temperatura (40-80°C) e a razão mássica pétala solvente (2,5-7%) da extração assistida por ultrassom de antocianinas de *Clitoria ternatea* utilizando um solvente eutético natural profundo composto de cloreto de colina, glicerol e água (ChCl:Gly) e comparar a eficiência de extração e a estabilidade desses extratos com a extração aquosa. O delineamento em Box-Behnken foi estruturado para a otimização do processo e foram realizadas as análises de antocianinas totais, capacidade antioxidante (DPPH) e estabilidade colorimétrica dos extratos armazenados sob diferentes condições por 21 dias. A condição ótima de extração foi 80°C, 50 minutos e pétala:solvente de 7% e observou-se que todas as variáveis estudadas influenciaram no conteúdo total de antocianinas extraídas sendo que o solvente ChCl:Gly extraiu maiores teores de antocianinas (374,65 mg/L) do que o solvente água (211,63 mg/L). O extrato com o solvente ChCl:Gly mantido à 5°C apresentou menor perda de antocianinas (16%) em relação à sua concentração no tempo zero enquanto o extrato com o solvente água armazenado nas mesmas condições, houve degradação de 38% do conteúdo de antocianinas totais em relação ao tempo zero. O extrato com solvente ChCl:Gly também apresentou maior capacidade antioxidante (156,43 $\mu\text{mol/mL}$) em comparação ao extrato aquoso (93,01 $\mu\text{mol/mL}$), no entanto, houve maior perda da capacidade antioxidante nos extratos do solvente eutético (78%) do que nos extratos do solvente água (70%), durante os 21 dias de estocagem sob diferentes condições. Para os atributos de cor, as variações de saturação do solvente eutético entre as condições de armazenamento foram ligeiramente menores, com aumento de saturação de 31,6% na condição luz e de 9,6% na condição ambiente, após 21 dias de armazenamento. Os resultados apontam a eficiência da extração assistida por ultrassom de pétalas de *Clitoria ternatea* utilizando solvente eutético natural profundo para obter extratos ricos em antocianinas com padrões colorimétricos estáveis.

Palavras chave: *Clitoria ternatea*, capacidade antioxidante, polifenóis, corante natural.

ABSTRACT

MAIA, Nicole Marina Almeida, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2024.
Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals using deep natural eutectic solvent and study of the extracts' colorimetric stability and bioactive compounds. Adviser: Érica Nascif Rufino Vieira.
Co-advisers: Eduardo Basílio de Oliveira e Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior.

Optimization of the extraction of compounds from medicinal plants and using green solvents is relevant to various sectors, such as the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Therefore, the objective of this study was to optimize the extraction time (15-50 minutes), temperature (40-80°C), and solvent petal mass ratio (2.5-7%) of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins of *Clitoria ternatea* using a deep natural eutectic solvent composed of choline chloride, glycerol, and water (ChCl: Gly) and compare extraction efficiency and stability of these extracts with aqueous extraction. The Box-Behnken design was structured to optimize the process, and analyses of total anthocyanins, antioxidant capacity (DPPH), and colorimetric stability of extracts stored under different conditions for 21 days were carried out. The optimal extraction condition was 80°C, 50 minutes, and 7% petal: solvent, and it was observed that all variables studied influenced the total content of anthocyanins extracted, with the ChCl: Gly solvent extracting higher levels of anthocyanins (374, 65 mg/L) than the solvent water (211.63 mg/L). The extract with the solvent ChCl: Gly kept at 5°C showed less loss of anthocyanins (16%) about their concentration at time zero, while the extract with the solvent water stored under the same conditions, there was a degradation of 38% of the content of total anthocyanins about time zero. The ChCl: Gly solvent extract also showed greater antioxidant capacity (156.43 µmol/mL) than the aqueous extract (93.01 µmol/mL). However, there was a more significant loss of antioxidant capacity in the eutectic solvent extracts (78 %) than in water solvent extracts (70%) during the 21 days of storage under different conditions. For color attributes, the saturation variations of the eutectic solvent between storage conditions were slightly more minor, with an increase in saturation of 31.6% in the light condition and 9.6% in the ambient condition after 21 days of storage. These results demonstrate the efficiency of optimizing the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals using eutectic solvents of choline chloride and glycerol to produce extracts with colorimetric stability and conservation of the bioactive compounds of interest.

Keywords: green solvent, antioxidant capacity, polyphenols, natural dye.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Flores *Clitoria ternatea* azul escuro com pétalas bilaterias (A) e flores *Double blue* com pétalas radiais (B)15
- Figura 2-** Estrutura básica do cátion flavilium18
- Figura 3-** Mudanças de tonalidade das seis principais antocianidinas encontradas em alimentos.19
- Figura 4-** Estrutura química da delphinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos e suas cadeias laterais R e R₁20
- Figura 5-** Ilustração simplificada dos mecanismos de copigmentação (A), auto-associação (B) e copigmentação intramolecular (C).....22

CAPÍTULO 2

- Figure 1-** Contour graph of 2² combinations with the cut at the central points (0)60
- Figure 2.** Variation of total anthocyanins and antioxidant capacity of *Clitoria ternatea* petal powder extracts using water and ChCl: Gly solvents under different storage conditions for 21 days.....63
- Figure 3.** - Photographic records of extracts on days 0 and 21 of storage under different storage conditions.....67
- Figure 4.** Variation of color attributes of *Clitoria ternatea* petal powder extracts using water and ChCl: Gly under different storage conditions for 21 days.....70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Estruturas de seis antocianidinas naturalmente frequente em alimentos.....	19
Tabela 2 – Ternatinas encontradas em <i>Clitoria ternatea</i> e suas derivações de cadeias laterais alternadas.....	21
Tabela 3 – Alguns componentes utilizados em misturas de solventes eutéticos naturais profundos, estrutura molecular, massa molar, ponto de fusão e características importantes.....	24
Tabela 4- Combinações de sistemas NADEs e a sua razão molar.....	25
Tabela 5 – Classificação de acordo com a frequência e intensidade do equipamento de ultrassom.	27

CAPÍTULO 2

Table 1 - Experimental model of the levels of selected variables.....	52
Table 2 – Box-Behnken design for independent variables of time, temperature, and powder: solvent ratio and experimental and response anthocyanin content.....	56
Table 3 - Analysis of the isolated and combined effects of the independent variables of the extraction process.....	57
Table 4 – Analysis of variance (ANOVA) of the linear model for the extraction of anthocyanin content.....	58
Table 5 – Mean values \pm standard deviation for measuring antioxidant capacity and total anthocyanin content extracted using ChCl: Gly and solvent water under different storage conditions for 21 days.....	62
Table 6 – Mean values \pm standard deviation for color attribute values using ChCl: Gly and solvent water under different storage conditions for 21 days.....	68

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1. Consumo, mercado e processamento de flores comestíveis.....	13
2. Matriz vegetal: <i>Clitoria ternatea</i>	14
2.1. Alegações de propriedade funcional e de saúde.....	15
2.2. Utilização tecnológica das pétalas de <i>Clitoria ternatea</i>	17
2.3. Antocianinas responsáveis pela coloração azul.....	18
3. Métodos de extração de compostos naturais	22
3.1. Extração com solventes eutéticos profundos naturais e solventes orgânicos.....	23
3.2. Extração assistida com a tecnologia de ultrassom.....	26
4. Otimização de processo de extração.....	28
5. Referências	29
CAPÍTULO 2	46
1. INTRODUCTION.....	49
2. MATERIAL AND METHODS.....	51
2.1 Drying and grinding petals <i>Clitoria ternatea</i>	51
2.2 Preparation of deep natural eutectic solvent using choline chloride and glycerol ...	51
2.3 Experimental design	52
2.4 Evaluation of storage stability	53
2.4.1 Determination of total anthocyanins in extracts using the single-pH method.....	53
2.4.2 DPPH antioxidant capacity.....	54
2.4.3 Objective color analysis and total color difference (ΔE).....	54

2.5 Statistical evaluation.....	55
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.1 Optimized ultrasound-assisted extraction of <i>Clitoria ternatea</i> petals powder and effects of independent variables on total anthocyanin content extracted with NADEs solvents.	56
3.2 Evaluation of the stability of the extracts	61
3.2.1 Total anthocyanin content and antioxidant capacity	61
3.2.2 Objective color analysis and total color difference (ΔE).....	67
4. CONCLUSION	71
5. DECLARATIONS.....	74
FINANCING/SUPPORT AGENCY:.....	74
FINANCIAL INTERESTS:	74
6. REFERENCES	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de flores comestíveis na alimentação está relacionada a práticas culturais, geralmente associadas aos efeitos benéficos para a saúde. Fato é que na culinária as flores comestíveis são utilizadas como forma de diversificar o sabor, aroma e cor das preparações, além de proporcionar uma nova experiência gastronômica. Além disso, a indústria de alimentos tem demonstrado a empregabilidade dos extratos de flores comestíveis por suas propriedades tecnológicas como potencial conservante e corante.

As flores comestíveis são consideradas Plantas Alimentícias não Convencionais (PANCs) e tem potencial nicho de mercado para os produtores destacando-se entre elas a *Clitoria ternatea* por seu potencial como aditivo corante azul (EMBRAPA, 2019; KINUPP; LORENZI, 2019).

A *Clitoria ternatea*, tradicionalmente conhecida como cunhã ou ervilha borboleta, é uma leguminosa herbácea perene, originária da Indonésia, atinge de 2 a 3 metros de altura, encontrada em áreas equatoriais tropicais sendo as plantas bem adaptáveis às diversas condições de temperatura e umidade (KUMAR, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2008). Pesquisadores atestaram que os compostos bioativos extraídos de sementes, raízes, flores e folhas de *Clitoria ternatea*, possuem potencial ação antioxidante (KAMKAEN; WILKINSON, 2009; MEHMOOD *et al.*, 2019), ação antimicrobiana (JAMIL; PA'EE, 2002; KAMILLA *et al.*, 2009) e atividade hepatoprotetora (NITHIANANTHAM *et al.*, 2013).

As flores de *Clitoria ternatea* são amplamente utilizadas devido as diversas antocianinas que lhe conferem a coloração azul. Dentre essas antocianinas, as ternatinas, presentes nas flores de *Clitoria ternatea*, constituem um grupo de 15 antocianinas poliaciladas responsáveis pela estabilidade em diferentes condições de pH e sua aplicação tecnológica como corante. Sob a ótica dos mecanismos de copigmentação e auto-associação, a estabilidade das ternatinas ocorre devido ao empilhamento molecular (copigmentação intramolecular) entre resíduos acilados aromáticos sobre o cromóforo antocianidina por ligações hidrofóbicas sendo que o empilhamento pode ocorrer em ambos os lados do cromóforo antocianidina (TROUILLAS *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas de extração de antocianinas o emprego de solventes orgânicos, como o metanol e o etanol, é a metodologia mais utilizada. No entanto, os solventes orgânicos são voláteis, inflamáveis, tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente e

o seu uso vem sendo desencorajado nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (IVANOVIĆ *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2022; PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Sendo assim, um grupo alternativo de solventes, denominados solventes eutéticos profundos naturais estão sendo desenvolvidos com intuito de promover a extração sustentável seguindo os princípios básicos da Química Verde (TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017). Além da sustentabilidade no processo de extração, a utilização de desses solventes contribui para produção de novos alimentos funcionais ou nutracêuticos utilizando corantes e conservantes naturais (PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Dentre as vantagens de utilização dos solventes eutéticos naturais profundos encontram-se a viscosidade ajustável, biodegradabilidade, extração de compostos polares e apolares, métodos de separação simples e diversas oportunidades de projetar e personalizar abordagens de extração (IVANOVIĆ *et al.*, 2018).

A aplicação da tecnologia emergente de extração assistida por ultrassom (EAU) para otimizar processos, reduzir custos e melhorar o produto final vem sendo explorada com sucesso na extração de compostos naturais para utilização como aditivo na indústria alimentícia (RASPE; DA SILVA; DA COSTA, 2022). Com tal abordagem, é possível obter produtos com rótulo *clean label*, com a redução considerável da quantidade de solventes e, possivelmente, melhorar o rendimento de extração dos componentes naturais, desde que sejam determinadas as condições ótimas de processo.

Devido a métodos estatísticos de design de experimentos é possível analisar diferentes combinações de variáveis de processo, como temperatura e tempo de exposição, e calcular computacionalmente, a partir de dados experimentais, os valores ótimos dessas variáveis, que proporcionem extratos com melhores rendimentos mássicos. A metodologia de superfície resposta (MSR) é uma abordagem estatística e matemática reconhecida como eficaz para a otimização de processos por meio de dados empíricos e, portanto, um método adequado para avaliar o efeito das variáveis independentes nas variáveis respostas deste estudo (AMEER *et al.*, 2017).

Até o presente momento, dentre as pesquisas desenvolvidas, nenhum trabalho utilizou a extração assistida de ultrassom combinada com solventes eutéticos profundos naturais para a extração de antocianinas em pétalas de *Clitoria ternatea*, comprovando o caráter inovador deste experimento para a obtenção de extratos de pétalas de *Clitoria ternatea* ricos em antocianinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar a extração de antocianinas de flores de *Clitoria ternatea* utilizando solvente eutético profundo natural (NADE) assistida por ultrassom.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a extração das pétalas de *Clitoria ternatea* utilizando solvente eutético natural profundo de cloreto de colina e glicerol assistida por ultrassom de acordo com as combinações geradas pelo delineamento experimental em Box-Behnken.
- Mensurar o conteúdo total de antocianinas (CTA) nos extratos de *Clitoria ternatea*.
- Realizar a extração assistida por ultrassom para obter o máximo de extração de antocianinas totais de acordo com a equação predita pelo delineamento experimental Box-Behnken e verificar se a extração de antocianinas nos extratos de *Clitoria ternatea* está de acordo com o modelo predito.
- Realizar a extração assistida por ultrassom utilizando água como solvente e os mesmos parâmetros preditos pela equação predita anteriormente e mensurar o teor de antocianinas nos extratos aquosos de *Clitoria ternatea*.
- Avaliar a estabilidade das antocianinas, atividade antioxidante e parâmetros colorimétricos presentes nos extratos NADE e extratos aquosos durante 21 dias em duas temperaturas de armazenamento (5°C e 25°C) e com e sem exposição à luz (claro e escuro).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. Consumo, mercado e processamento de flores comestíveis

Tradicionalmente a utilização de flores na alimentação está associada a práticas culturais e efeitos benéficos para a saúde, mas o consumo de flores na gastronomia vem se popularizando e sua incorporação em diversas preparações confere sabor, aroma, cor e novas experiências sensoriais (SHANTAMMA *et al.*, 2021). Outros fatores que incentivam o mercado e o consumo de flores na alimentação são os aspectos nutricionais e nutracêuticos das flores comestíveis demonstrados em pesquisas tal como a presença de compostos bioativos potencialmente funcionais (PUROHIT *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2018).

A preferência dos consumidores por alimentos e aditivos (corantes, aromatizantes) de origem natural se justifica pelos efeitos negativos para a saúde dos aditivos artificiais (SHANTAMMA *et al.*, 2021). Afim verificar o conhecimento e a compreensão dos brasileiros quanto aos iogurtes feitos com plantas comestíveis, Rodrigues *et al.* (2017) identificaram que o uso de flores na alimentação denota a ideia de “cuidado com a saúde”, representada pelo elemento central “saudável”.

Ainda que esteja em expansão, o mercado de flores comestíveis carece de dados sobre produção, exportação e importação, e dentre os maiores desafios dos produtores estão a sazonalidade e a perecibilidade que inviabilizam o seu cultivo exclusivo (FERNANDES *et al.*, 2020). Diante desses desafios, os agricultores optam por consórcios com flores de corte, ervas aromáticas e alfaces para agregar valor aos seus produtos finais (ANCA *et al.*, 2013). Além disso, o alto nível de seleção e descarte de flores, devido aos padrões de qualidade para consumo, impõe um manejo que exige altos investimentos para os produtores.

As flores comestíveis são altamente perecíveis devido ao alto teor de água, compostos voláteis e condições ambientais que as tornam propícias para o crescimento microbiano (DEMASI *et al.*, 2021). Durante o armazenamento pós-colheita, o manuseio incorreto pode acarretar escurecimento dos tecidos, desidratação e descoloração das pétalas e abscisão devido a efeitos catabólicos e enzimáticos das células vegetais. Por isso, as flores comestíveis frescas devem ser armazenadas em ambientes com baixas temperaturas, aumentando assim, os custos de armazenamento e transporte (SHANTAMMA *et al.*, 2021).

Não existem listas oficiais sobre flores comestíveis e não comestíveis publicadas pelos órgãos regulamentares mundiais como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) (FERNANDES *et al.*, 2020). No site oficial da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora brasileira, não há legislação, documentos ou orientações sobre flores comestíveis. No entanto, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pesquisa e cita as flores comestíveis, dentro da cadeia produtiva das hortaliças PANC (plantas alimentícias não convencionais), e menciona a sua produção como um nicho de mercado em potencial (EMBRAPA, 2021). Kinupp e Lorenzi (2014) definem as PANC como espécies vegetais que possuem uma ou mais partes alimentícias que não são corriqueiras, que não fazem parte do dia a dia, sendo espontâneas ou cultivadas, nativas ou exóticas, incluindo partes comestíveis de espécies convencionais como o “umbigo” da bananeira, as flores brotos e sementes de abóbora. Dentre as plantas exóticas utilizadas como alimentícias no Brasil, destaca-se a *Clitoria ternatea* e seu potencial como corante natural.

2. Matriz vegetal: *Clitoria ternatea*

Clitoria ternatea pertence à família Fabaceae, também conhecida como ervilha borboleta. É uma leguminosa herbácea perene, com até 2-3 metros de altura, encontrada em áreas equatoriais tropicais sendo as plantas bem adaptáveis às diversas condições de temperatura e umidade (KUMAR, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2008). A planta é originária do arquipélago de Molluca (Indonésia), tendo o primeiro registro de espécie na ilha de Ternate e, atualmente, está amplamente distribuída na América do Sul e Central, regiões da Ásia tropical como Índia, China, Filipinas e em outros países de clima equatorial tropical (ZINGARE *et al.*, 2013), inclusive no Brasil onde é popularmente conhecida como Cunhã.

Existem diferentes linhagens com diversas colorações de flores de *Clitoria ternatea*: azul escuro, azul claro, lilás e branco. A variedade de cores está relacionada, principalmente, com as estruturas químicas das diversas antocianinas presentes nas pétalas (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). Na figura 1 está representada a flor de *Clitoria ternatea* selvagem (A) e um exemplar do cultivar *Double blue* (B) no qual as pétalas radiais possuem coloração azul escuro.



Figura 1- Flores de *Clitoria ternatea* azul escuro com pétalas bilaterias (A) e flores *Double blue* com pétalas radiais (B).

Fonte: autora.

2.1. Alegações de propriedade funcional e de saúde

A *Clitoria ternatea* tem sido tradicionalmente utilizada pela medicina clássica indiana ayurvédica como tratamento para diversas doenças e estudos atestam a ampla gama de atividades farmacológicas de compostos bioativos presentes nos extratos desta planta (MUKHERJEE *et al.*, 2008). Compostos bioativos extraídos de sementes, raízes, flores e folhas de *Clitoria ternatea*, são estudados como potencial ação antioxidante (MEHMOOD *et al.*, 2019; VIDANA GAMAGE; LIM; CHOO, 2021), ação antimicrobiana (HA; LE, 2022; MUSHTAQ *et al.*, 2021; VIDANA GAMAGE; LIM; CHOO, 2021) e atividade hepatoprotetora (NITHIANANTHAM *et al.*, 2013).

Nas flores da ervilha borboleta, os compostos fenólicos são os mais abundantes, principalmente as antocianinas ternatinas e derivados da delphinidina que são responsáveis pela coloração azul das pétalas (ESCHER *et al.*, 2020a). Quimicamente, os compostos fenólicos apresentam anéis aromáticos contendo grupos hidroxilados (SWANSON, 2003). Esses compostos são resultado do metabolismo secundário das plantas que desempenham não somente funções de defesa contra agentes externos (luz, temperatura, insetos, umidade) mas também contribuindo em fatores internos como diferenciação genética, nutrientes e síntese de hormônios (LIMA *et al.*, 2012).

No organismo humano, os compostos fenólicos são responsáveis por efeitos fisiológicos benéficos como redução do risco de doenças cardiometabólicas e prevenção de danos oxidativos de lipídios e lipoproteínas. Os compostos agem inibindo a agregação plaquetária, eliminando radicais livres ou agindo como quelante de metais (ESCHER *et al.*, 2020b; MUKHERJEE *et al.*, 2008; ZINGARE *et al.*, 2013).

Daisy e Rajathi (2009) observaram efeitos hipoglicêmicos sobre diabetes induzida em ratos com a utilização de extratos de *Clitoria ternatea*. Em outro estudo *in*

vivo, notou-se que a mistura do pó de flores de *Clitoria ternatea* e de *Punica granatum* apresentou potencial anti-hiperglicêmico, análogo ao medicamento metformina, sobre diabetes mellitus induzida em ratos, (BORIKAR *et al.*, 2018). Pesquisas com extratos etanólico, clorofórmio e butanólico das sementes, flores e folhas de *Clitoria ternatea* sugerem atividade de regeneração pancreática, atividade anti-hiperlipidêmica e antidiabética. Os resultados são demonstrados pelo aumento dos níveis do colesterol HDL, da enzima glicolítica glucoquinase e do conteúdo de glicogênio (hepático e muscular esquelético) e diminuição dos níveis de glicose sérica, hemoglobina glicosilada, colesterol total e triglicerídeos. A prevenção de danos renais e hepáticos também foi sugerida devido a modulação dos níveis de ureia, creatinina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (BHOSALE *et al.*, 2013; DAISY; SANTOSH; RAJATHI, 2009; VENKATA KALYAN *et al.*, 2011; VERMA; ITANKAR; ARORA, 2013). O possível mecanismo de ação para esses resultados são o aumento da secreção de insulina e o aprimoramento da glicogênese (síntese de glicogênio no fígado e músculos) induzidas pelos fitoquímicos presentes nas plantas de *Clitoria ternatea* (DAISY; RAJATHI, 2009).

A glicação de proteínas, ocorre pela reação não enzimática entre açúcares redutores (glicose e frutose) e grupos aminos livres presentes nas moléculas biológicas tendo como uma das causas o aumento persistente de glicose sanguínea (RHEE; KIM, 2018). Essa reação contribui para a formação de produtos finais de glicação avançada que acumulam no organismo e modificam funcionalmente proteínas contribuindo assim para o envelhecimento e patogênese de doenças como a diabetes e Alzheimer. (PRASAD, et al., 2019). Foi relatado que a flor de *Clitoria ternatea* possui propriedades antiglicantes e antioxidantes em modelos *in vitro* (CHAYARATANASIN; ADISAKWATTANA; THILAVECH, 2021).

O extrato parcialmente purificado das flores de *Clitoria ternatea* também apresentou atividade antimicrobiana, efeito protetor contra hemólise de eritrócitos, inibição da α -amilase e α -glucosidase e conversora da angiotensina-I, inibição da peroxidação lipídica, capacidade de absorção de radicais livres, inibição da cisão da fita de DNA, inibição da oxidação do colesterol LDL e atividade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio em ensaios *in vitro* (ESCHER et al., 2020b). Os autores relataram que os efeitos antioxidantes intracelulares dos extratos brutos de *Clitoria ternatea* são devido à natureza complexa de sua composição, ou seja, as antocianinas presentes são

capazes de auto associar, interagir com flavonoides de estrutura semelhante e reagir com muitas outras substâncias como resultado de sua carga positiva (cátions) na estrutura do anel central (HOU *et al.*, 2004)

Dentre os compostos bioativos citados nos estudos anteriores, Chusak et al. (2018) atribuíram os efeitos hipoglicêmicos, ao *pool* de compostos fenólicos presentes em flores de *Clitoria ternatea* tais como kaempferol, delfidina (ternatinas), ácido *p*-coumárico e quercetina que agem sobre as enzimas α -amilase pancreática e a α -glucosidase durante a digestão *in vitro* do amido.

2.2. Utilização tecnológica das pétalas de *Clitoria ternatea*

As flores de *Clitoria ternatea* são utilizadas em preparações culinárias típicas da Malásia, como o *Nasi Kerabu*, em que as flores da planta são utilizadas para tingir o arroz de azul (LIJON *et al.*, 2017). O emprego das flores para melhorar a composição nutricional na gastronomia também tem se destacado (KINUPP; LORENZI, 2019).

Para a indústria alimentícia, na formulação de um produto é importante que a cor seja atrativa e estável e para isso são utilizados aditivos como os corantes. Ainda que os corantes sintéticos possuam melhor estabilidade em relação aos corantes naturais, os pigmentos artificiais tem a sua seguridade questionada (DEY; NAGABABU, 2022). Além disso, existe uma tendência mundial para a utilização de produtos naturais com benefícios à saúde, o que impulsiona a busca por novas fontes de corantes naturais, seguros para o consumo e com maior estabilidade (BARROS; STRINGHETA, 2006). Considerando esses fatos, as flores de *Clitoria ternatea* podem ser utilizadas como corante natural azul na formulação de produtos alimentícios processados.

O potencial das antocianinas de *Clitoria ternatea* como corante natural tem sido explorado em diversos estudos porque as antocianinas apresentam estabilidade térmica para suportar altas temperaturas de processamento de diversos produtos alimentícios (LEE; ABDULLAH, 2011).

Em panificação o extrato de *Clitoria ternatea* reduziu significativamente o índice de hidrólise, o índice glicêmico previsto e a digestibilidade do amido através da inibição de enzimas digestivas de carboidratos em ensaios *in vitro* (CHUSAK *et al.*, 2018). As propriedades anti-biofilme de extratos ricos em antocianina de *Clitoria ternatea* foram eficientes contra bactérias formadoras de carie dental e *Pseudomonas aeruginosa* (JEYARAJ *et al.*, 2022; YANTI; SETIAWAN; LAY, 2021). Antocianinas de

ervilha borboleta também foram incorporadas com sucesso em embalagens colorimétricas para monitorar a conservação de carne de porco (KOSHY *et al.*, 2021).

2.3. Antocianinas responsáveis pela coloração azul

As antocianinas pertencem a classe de compostos fenólicos, na subclasse dos polifenóis, e são caracterizadas pelo esqueleto de carbono com a configuração C6 – C3 – C6 e contém 15 átomos de carbono (HARBORNE, 1964; MAZZA; BROUILLARD, 1987). As moléculas de antocianinas absorvem fortemente na região UV-visível do espectro eletromagnético conferindo diversas cores em flores, folhas, sementes e tubérculos, raízes, caules e frutos que vão do vermelho ao violeta e azul (BROUILLARD, 1983). As antocianinas desempenham diversos papéis no metabolismo do corpo humano sendo a função antioxidante a mais significativa, para a indústria alimentícia o seu potencial como corante também é uma propriedade tecnológica de interesse (SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019).

O cátion flavilium, que está representado na Figura 2, é a estrutura básica das antocianinas e por ser deficiente em elétrons é muito reativo. As estruturas básicas do cátion flavilium são geralmente moléculas glicosiladas que absorvem luz em torno de 500 nm (SCHIOZER; BARATA, 2007)

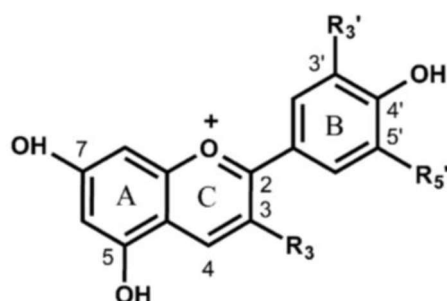


Figura 2- Estrutura básica do cátion flavilium

Fonte: Trouillas *et al.*, 2016, p. 4939.

Quando não glicosiladas as antocianinas são chamadas de antocianidinas ou agliconas. São conhecidas em torno de 22 a 25 antocianidinas mas apenas seis representam maior importância em alimentos porque caracterizam cerca de 90% das antocianinas relatadas até o momento (ZHAO, Zhenlei *et al.*, 2017). As seis antocianidinas encontradas em alimentos, o comprimento de onda (nm) e a substituição dos radicais nas ligações C-3' e C-5' do anel B estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Estruturas de seis antocianidinas naturalmente frequente em alimentos.

Antocianidina	R' ₃	R' ₅	Absorção max (nm) em MeOH-HCL
cianidina	OH	H	535
delfinidina	OH	OH	546
malvidina	OCH ₃	OCH ₃	542
pelargonidina	H	H	520
peonidina	OCH ₃	H	532
petunidina	OCH ₃	OH	543

Fonte: Bakowska, 2005, p. 107.

Os parâmetros colorimétricos (tonalidade e saturação) e estabilidade das antocianinas são muito influenciados pelos substituintes na antocianidina. Grupamentos hidroxila (-OH) diminuem a sua estabilidade enquanto grupamentos metoxila (-CH₃) aumentam a estabilidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Algumas modificações na estrutura principal das antocianinas também podem modificar a cor visível. Como por exemplo, o aumento no número de substituições hidroxila e metoxi que estão associadas com tons azuis e vermelhos, respectivamente, enquanto tons arroxeados estão relacionados com a substituição na posição R'₅ ou acilados com ácidos cinâmicos. Na Figura 3 estão relacionadas as colorações típicas das seis antocianidinas encontradas em alimentos.

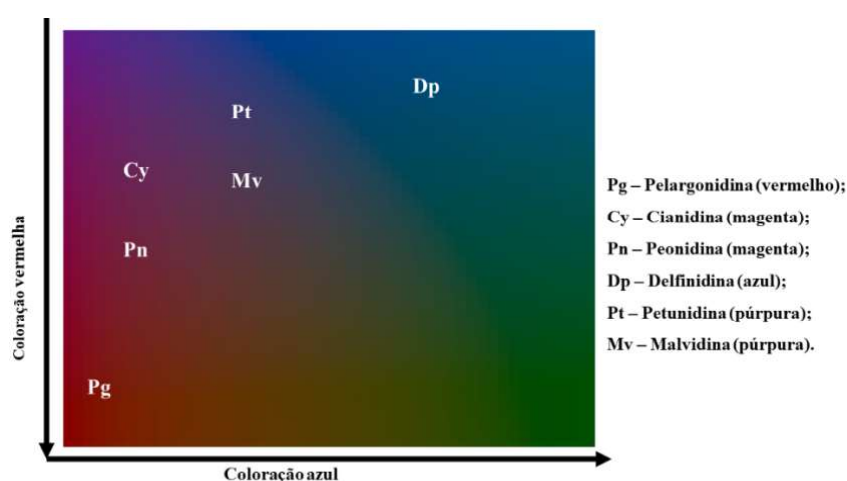


Figura 3- Tonalidade das seis principais antocianidinas encontradas em alimentos

Fonte: autora.

Nas antocianinas, os resíduos de açúcar podem ser acilados com ácidos cinâmicos ou com ácidos alifáticos que são ácidos orgânicos presentes nas estruturas celulares dos vegetais. As antocianinas podem ser classificadas de acordo com a quantidade de grupos acilas em: antocianinas não acetiladas, monoaciladas e poliaciladas (MARPAUNG *et al.*, 2017).

A poliacilação é caracterizada por duas ou mais acilações na mesma molécula (BAKOWSKA, 2005). A poliacilação com grupos acilas aromáticos proporciona a copigmentação intramolecular com as antocianidinas. Essa copigmentação é responsável pelas colorações azuladas das flores mesmo em condições de pH fisiológico e sendo, portanto, o fenômeno que evidencia a coloração azul em flores de *Clitoria ternatea* (HONDA *et al.*, 2005).

As antocianinas poliaciladas possuem maior potencial corante devido a sua maior estabilidade em uma ampla faixa de pH (FENGER *et al.*, 2021). E a *Clitoria ternatea* acumula em suas pétalas antocianinas poliaciladas denominadas ternatinas (ternatins): A1, A2, A3, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, C5, D1, D2 e D3 (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003a). As ternatinas são definidas como um grupo de 15 antocianinas poliaciladas derivadas da delphinidina 3-O-(6''-O-malonil)- β -glicosídeo. A derivação ocorre pela substituição dos grupos OH das posições 3' e 5' (anel B da antocianidina) por uma cadeia de unidades alternadas de D-glucosil e p-coumoroil, conforme demonstrado na Tabela 2 (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003b). As preternatinas (preternatins) C1-C5 e D3 são prováveis precursoras das ternatinas A3 e C4 e, segundo esses autores, para cada ternatina poderia haver uma preternatina correspondente (TERAHARA *et al.*, 1998).

Na Figura 4 está exposta a estrutura da delphinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos e demonstra as cadeias laterais alternadas (R e R₁) encontradas nas flores de *Clitoria ternatea*.

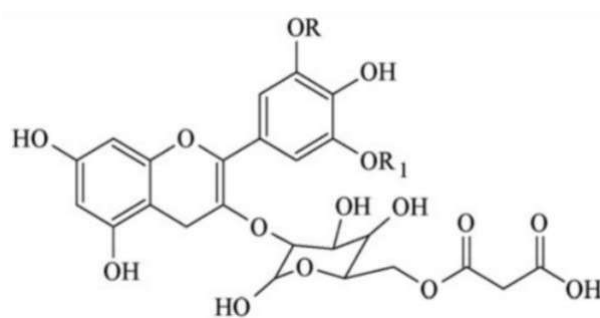


Figura 4- Estrutura química da delphinidina malonilada 3,3',5'-triglicosídeos e suas cadeias laterais R e R₁

Fonte: Mukherjee *et al.*, 2008.

Tabela 2 – Ternatinas encontradas em *Clitoria ternatea* e suas derivações de cadeias laterais alternadas.

TERNATINA	R	R1
TERNATINA A1	GCGCG	GCGCG
TERNATINA A2	GCGCG	GCG
TERNATINA A3	GCG	GCG
TERNATINA B1	GCGCG	GCGC
TERNATINA B2	GCGC	GCG
TERNATINA B3	GCGCG	GC
TERNATINA B4	GCG	GC
TERNATINA C1	GCGC	G
TERNATINA C2	GCGCG	G
TERNATINA C3	GC	G
TERNATINA C4	GCG	G
TERNATINA C5	G	G
TERNATINA D1	GCGC	GCGC
TERNATINA D2	GCGC	GC
TERNATINA D3	GC	GC

Fonte: Mukherjee et al., 2008.

A teoria do empilhamento molecular é uma abordagem química dos mecanismos de copigmentação e auto-associação. De acordo com essa teoria, ambos os mecanismos ocorrem por interações hidrofóbicas entre anéis aromáticos de antocianinas com anéis aromáticos de copigmentos (Figura 5-A) ou por interações de anéis aromáticos de mais de uma antocianina, chamada de auto-associação (Figura 5-B). Além disso, pode ocorrer o empilhamento intramolecular conhecido como copigmentação intramolecular (Figura 5-C) (TROUILLAS *et al.*, 2016).

A copigmentação intramolecular, ou empilhamento tipo sanduíche, ocorre em antocianinas poliaciladas como ocorre nas ternatinas presentes nas flores de *Clitoria ternatea*. Nas antocianinas poliaciladas, os resíduos aromáticos de grupos acil empilham sobre o cromóforo antocianidina por ligações hidrofóbicas e o empilhamento pode ocorrer em ambos os lados do cromóforo antocianidina (TROUILLAS *et al.*, 2016).

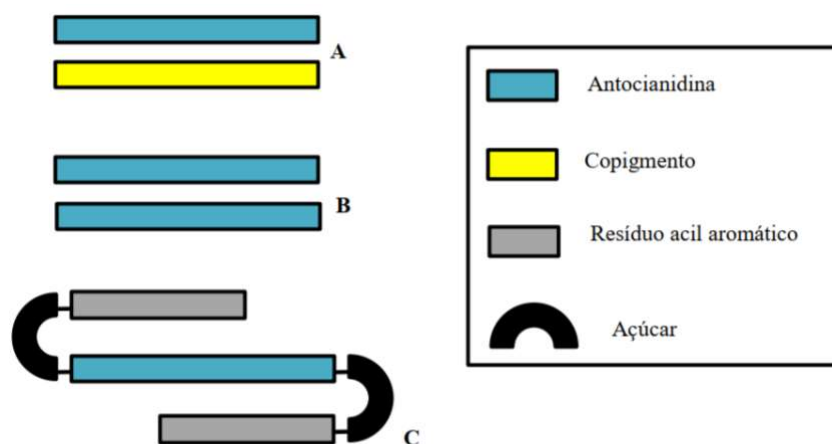


Figura 5- Ilustração simplificada dos mecanismos de copigmentação (A), auto-associação (B) e copigmentação intramolecular (C).

Fonte: Trouillas et al., 2016.

A estabilidade de cor das antocianinas pode ser descrita em termos colorimétricos ou em estabilidade química. A estabilidade de cor está relacionada ao equilíbrio reversível entre formas coloridas e incolores sendo influenciadas principalmente pelo pH e também com a degradação química irreversível de pigmentos, principalmente dos cromóforos (MARPAUNG *et al.*, 2017).

3. Métodos de extração de compostos naturais

A extração e recuperação de compostos naturais constitui etapa fundamental para recuperação de moléculas de interesse específico, como por exemplo, os compostos bioativos. Dentre os processos tradicionais de extração de compostos naturais estão a enfloração (*enflourage*), hidrodestilação, destilação a vapor, prensagem a frio e extração com solventes orgânicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Recentemente, a aplicação de tecnologias emergentes vem sendo estudada como método alternativo para otimizar e substituir processos tradicionais de extração de compostos naturais. Dessa forma, a extração assistida por ultrassom, assistida por microondas e/ou utilizando CO₂ supercrítico são objetos de pesquisa para remoção eficiente de compostos naturais de interesse (RASPE; DA SILVA; DA COSTA, 2022).

Outra abordagem atualmente aplicada, é a utilização de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) para a extração de compostos ativos em oposição aos solventes orgânicos (LIN *et al.*, 2022).

O método tradicional de extração com solventes orgânicos é utilizado neste trabalho, mas a abordagem principal é a combinação dos métodos de extração de

antocianinas utilizando NADES com a tecnologia de extração assistida por ultrassom. Por isso, somente essas duas metodologias serão revisadas neste item.

3.1. Extração com solventes eutéticos profundos naturais (NADES) e solventes orgânicos

A utilização de solventes orgânicos, como o etanol e metanol, é o principal método de extração de compostos bioativos, mas geralmente eles são voláteis e tóxicos, então o seu uso vem sendo desencorajado nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (IVANOVIĆ *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2022; PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Desde os princípios adotados pela Química Verde em 1998, cresceu a demanda por solventes não tóxicos, sustentáveis, de baixo custo e não poluentes para a extração de compostos (KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015). Sendo assim, um grupo alternativo de solventes, denominados solventes eutéticos profundos naturais (NADES) estão sendo testados com intuito de promover a extração sustentável seguindo os princípios básicos da Química Verde (TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017). Além da sustentabilidade no processo de extração, a utilização de NADES contribuí para produção de novos alimentos funcionais ou nutraceuticos utilizando corantes e conservantes naturais (PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Os NADES são metabolitos presentes em todos os tipos de células e organismos que atuam como aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio (CHOI *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2013). Sendo assim, os NADES podem construir uma rede de ligações de hidrogênio intermoleculares que reduzem o ponto de fusão da mistura e formam sistemas líquidos viscosos com excelentes propriedades solubilizantes (XING *et al.*, 2022). O acceptor de hidrogênio comumente usado é o cloreto de colina (sal de amônio quaternário não tóxico) que possui ponto de fusão em 302°C. Por outro lado, os doadores de ligações de hidrogênio são ácidos orgânicos, poli álcoois, açucars e ureia. A mistura de um acceptor com um doador de ligações de hidrogênio em condições ótimas de temperatura e tempo de agitação leva à formação de uma mistura eutética, líquida à temperatura ambiente e com propriedades solventes. Na Tabela 3 estão apresentados alguns componentes dos NADES e suas respectivas estruturas químicas, massa molar e ponto de fusão.

Tabela 3 – Alguns componentes utilizados em misturas de solventes eutéticos naturais profundos, estrutura molecular, massa molar, ponto de fusão e características importantes.

Componente	Estrutura	Massa molar	Ponto de fusão	Características
Cloreto de colina		139,62 Da	305°C	Cristais, altamente higroscópico.
Ácido Cítrico		192,12 Da	153°C	Pó cristalino
Ácido Láctico		90,08 Da	52-54°C	-
Sacarose		342,3 Da	96-190°C	Hidrofílica e solúvel
Glicose		180,15 Da	150-153°C	Pó branco e cristalino

Fonte: Adaptado de Savi, 2019, p 28.

Dentre as vantagens de utilização de NADEs estão a viscosidade ajustável, biodegradabilidade, extração de compostos polares e apolares, métodos de separação simples e diversas oportunidades de projetar e personalizar abordagens de extração (IVANOVIĆ *et al.*, 2018). Na tabela 4 estão detalhadas algumas possibilidades de sistema de acceptor e doador de hidrogênio em sistemas NADEs.

Tabela 4- Combinações de sistemas NADEs e a sua razão molar

Combinação de sistemas NADEs	Razão Molar
ácido cítrico: cloreto de colina	1:2, 1:3
glicose: cloreto de colina: água	1:1:1
frutose: cloreto de colina: água	1:1:1
ácido cítrico: glicose	2:1
glicose: frutose	1:1
ácido maleico: glicose	4:1
ácido cítrico: trealose	2:1

Fonte: adaptado Choi *et al.*, 2011

Lin *et al.* (2022) testaram 8 misturas eutéticas contendo cloreto de colina como acceptor de hidrogênio, e o NADEs cloreto de colina: glicerol: na razão molar 1:2 foi capaz de extrair maiores teores de antocianinas de *Aronia meloncarpia*. Tais resultados foram atribuídos à correlação entre viscosidade do solvente e o rendimento de antocianinas. A alta viscosidade dos solventes NADEs é decorrente principalmente às ligações de hidrogênio e os principais grupos funcionais que participam nas ligações de hidrogênio são os grupos carboxila, carbonila, hidroxila e amino (YANG, 2019). Sendo assim, o aumento do número de ligações de hidrogênio aumenta a viscosidade do NADES e entre os diferentes doadores de ligação de hidrogênio, o glicerol contém o menor número de grupos hidroxila (LIN *et al.*, 2022).

A colina é um cátion pertencente à família das vitaminas do complexo B sendo encontrada na composição da molécula de lecitina de soja, em conjunto com fosfolípidos e glicerol. A forma mais utilizada é o cloreto de colina: um material não tóxico e biodegradável utilizado para suplementação animal e em formulas infantis na forma de outros sais de colina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; SAVI, 2019). O cloreto de colina é constituído por um cátion colina e o ânion cloreto sendo que a colina

31 é uma substância estável que apresenta poucas perdas no armazenamento, processamento,
32 manipulação ou preparação de alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA,
33 2010).

34 A água é capaz de alterar as estruturas dos sistemas NADES sendo que um baixo
35 teor de água aumenta a viscosidade e acarreta a uma estrutura molecular mais compacta
36 o que dificulta o contato entre o solvente e as moléculas de antocianinas (DAI *et al.*,
37 2015). Estudos anteriores comprovaram que para o a mistura de cloreto de colina:glicerol,
38 o teor de água eficiente para extração de antocianinas é 30% (v/v) e que valores maiores
39 que 50% (v/v) afetam a extração de antocianinas (LIN *et al.*, 2022).

40

41 **3.2. Extração assistida com a tecnologia de ultrassom**

42 A extração sólido-líquido é uma etapa do processo, na qual obtém-se os
43 compostos bioativos de origem vegetal, como as antocianinas. A técnica de extração
44 assistida por ultrassom, considerada uma técnica verde, tem demonstrado eficiência na
45 obtenção de compostos vegetais devido aos bons rendimentos de extração utilizando
46 temperaturas mais baixas e tempos de processo menores e redução no consumo de
47 solventes (VERNÈS; VIAN; CHEMAT, 2020). As frequências de ultrassom variam de
48 20 kHz a 10 MHz sendo consideramos acima do limiar para a detecção auditiva humana.
49 A energia propagada pelo meio pode ser expressa em potência ultrassônica (W), a
50 intensidade ultrassônica (W/cm²) ou densidade de potência ultrassônica (W/cm³ ou
51 W/mL). As medidas calorimétricas para avaliar a potência absoluta do ultrassom de banho
52 P (W) são calculadas pela seguinte equação:

53

$$54 \quad P = mC_p \times \frac{dT}{dt}$$

55

Equação 1

56

57 Onde P é a potência ultrassônica absoluta (W), C_p é a capacidade calorífica do
58 solvente a pressão constante (para água $C_p = 4180 \text{ J K}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), m é a massa do solvente
59 (kg) e dT/dt é a taxa de mudança de temperatura durante a sonicação, que foi determinada
60 pela curva polinomial ajustada ao aumento da temperatura versus tempo sob condições
61 adiabáticas usando um termopar padrão.

62 Em seguida, a potência volumétrica real (AVP) é determinada dividindo a
63 potência absoluta do ultrassom (P) pelo volume (V) do meio de acordo com a equação 2:

64

$$AVP = \frac{P}{V}$$

65

Equação 2

66

67 Onde AVP é a potência volumétrica real (W/L), P é a potência do ultrassom (W)
68 e V é o volume (L) do meio.

69 O equipamento pode ser classificado em ultrassom de diagnóstico e ultrassom
70 de potência de acordo com a frequência e intensidade utilizadas conforme está descrito
71 na tabela 5.

72

73 **Tabela 5** – Classificação de acordo com a frequência e intensidade do equipamento de ultrassom.

74

	Ultrassom diagnóstico	Ultrassom de potência
Configuração	Baixa potência e alta frequência	Alta potência e baixa frequência
Frequência:	1 e 10 MHz	20 kHz e 80 kHz
Intensidade	< 1 W cm ⁻²	> 1 W cm ⁻²
Aplicação	Ferramenta de controle processual ou diagnóstico médico.	Efeitos químicos e físicos no meio para a sonoquímica (aceleração da reação química)

75 Fonte: Rutkowska; Namieśnik;Koniczka, 2017. (RUTKOWSKA; NAMIEŚNIK;
76 KONIECZKA, 2017).

77

78 Quando configurado em ultrassom de alta potência, a energia aplicada pelo
79 equipamento ultrassônico ocasiona vibração das moléculas do tecido vegetal e também
80 gera o fenômeno de cavitação, no qual pode ser definido como a formação de bolhas de
81 gás que crescem, oscilam e colapsam em um fluido (SHAHIDIAN *et al.*, 2016). Esses
82 efeitos proporcionam o aumento da superfície de contato do solvente com o soluto
83 ocasionando maior difusão do conteúdo intracelular da célula vegetal para o solvente
84 (RASPE *et al.*, 2021; ROSELLÓ-SOTO *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da
85 temperatura local aumenta a solubilidade dos analitos no solvente e facilita a difusão da
86 matriz sólida para o líquido solvente (DRANCA; OROIAN, 2016).

87 A alta viscosidade do sistema NADES leva à desaceleração na transferência de
88 massa reduz a extração de compostos de interesse. Sendo assim, os NADES são
89 integradas às técnicas extração aceleradas como a extração assistida por ultrassom pois o
90 forte efeito de cisalhamento e a alta temperatura reduzem a viscosidade do solvente e

91 contribuem para a fragmentação do material vegetal facilitando a penetração do solvente
92 (JOVANOVIĆ *et al.*, 2022). Portanto, a combinação dos métodos emergentes de extração
93 com as misturas eutéticas podem fornecer uma alternativa para a extração sustentável de
94 compostos bioativos de fontes vegetais (CHANIOTI; TZIA, 2018).

95 Diversos pesquisadores atestaram a eficiência da extração assistida por
96 ultrassom para extração de compostos bioativos de *Clitoria ternatea* utilizando diferentes
97 solventes. Os resultados são favoráveis para a extração de fenólicos totais, flavonoides e
98 atividade antioxidante em comparação com os métodos de extração tradicionais
99 (MEHMOOD *et al.*, 2019). No entanto, a eficiência da recuperação dos compostos de
100 *Clitoria ternatea* extraídos por ultrassom pode ser influenciada pela polaridade do
101 solvente, tamanho da partícula, tempo e potência. Santos & Martins (2023) utilizaram a
102 extração assistida por ultrassom e relataram que o tempo foi a variável de processo que
103 mais influenciou o rendimento de recuperação do teor de compostos fenólicos e
104 flavonóides, enquanto a extração de antocianinas foi mais influenciada pela temperatura.
105 Sendo assim, é importante que o efeito de diferentes tratamentos no rendimento dos
106 extratos seja avaliado.

107 **4. Otimização de processo de extração**

108 A otimização da extração de compostos de compostos bioativos é recomendada
109 com o objetivo de reduzir o tempo de processo, economizar materiais e também obter um
110 máximo rendimento mássico e conseqüentemente um extrato com melhor perfil de
111 compostos ativos. Considerando que as diversas etapas do processo de extração podem
112 influenciar ou relacionar-se com as variáveis do estudo é possível adotar um experimento
113 fatorial, no qual se estudam simultaneamente dois ou mais fatores (tempo, temperatura e
114 razão entre soluto e solvente), cada um deles com dois ou mais níveis. Assim, no esquema
115 fatorial, os tratamentos são obtidos pelas combinações dos níveis dos fatores (FREUND;
116 WILSON; MOHR, 2010).

117 O delineamento em Box Behnker (DBB) é um tipo de design de superfície de
118 resposta que prevê coeficientes de primeira e segunda ordem e a metodologia de
119 superfície resposta (MSR) consiste em técnicas estatísticas e matemáticas para otimização
120 e modelagem de processos empíricos e, portanto, um método adequado para avaliar o
121 efeito das variáveis independentes (fatores) nas variáveis respostas (AMEER *et al.*, 2017;
122 MULAY; RATHOD, 2022)

123 As flores de *Clitoria ternatea* apresentam benefícios antioxidantes por serem
124 fontes de compostos fenólicos e antocianinas e esses compostos podem ser melhor
125 explorados pela indústria alimentícia para melhorar o perfil nutricional de produtos
126 alimentícios, ou para aplicações tecnológicas como conservante, corante natural e em
127 embalagens inteligentes. No entanto, os estudos de desenvolvimento de novos produtos
128 alimentícios, análise sensorial e extração utilizando solventes biodegradáveis assim como
129 a análise de diferentes combinações de variáveis de processo para otimizar processos
130 ainda são incipientes na literatura. Portanto, essa revisão objetivou estudar a aplicação da
131 tecnologia de ultrassom combinada com solventes biodegradáveis propondo que o
132 delineamento de superfície de resposta é eficaz para maximizar extração de compostos
133 de interesse.

134

135 5. Referências

136

137 ABDULLAH, R.; LEE, P. M.; LEE, K. H. Multiple color and pH stability of floral
138 anthocyanin extract: *Clitoria ternatea*. 2010. **CSSR 2010 - 2010 International**
139 **Conference on Science and Social Research** [...]. Kuala Lumpur: IEEE Computer
140 Society, 2010. p. 254–258. Disponível em:
141 <<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5773778>>. Acesso em 12 mai. 2023. doi:
142 10.1109/CSSR.2010.5773778.

143 AMEER, K.; BAE, S. W.; JO, Y.; CHUNG, N.; GAO, Y.; KWON, J. H. Optimization
144 and modeling for heat reflux extraction of total yield, stevioside and rebaudioside-A from
145 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves. **Separation Science and Technology**
146 **(Philadelphia)**, vol. 52, no. 7, p. 1193–1205, 3 May 2017. Disponível em:
147 <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496395.2017.1285313>>. Acesso em
148 09 abr. 2023. doi: 10.1080/01496395.2017.1285313.

149 ANCA, H.; CANTOR, M.; BUTA, E.; HORTȚ, D. Current Trends of Using Ornamental
150 Plants in Culinary Arts. **ProEnvironment**, vol. 6, p. 52–58, 2013. Disponível em:
151 <<https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A8%3A895272/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A93385782&cr=c>>. Acesso em 01 mai. 2023.

153 BAKOWSKA, A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants : A review.
154 **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, vol. 14, no. 2, p. 107–116, 2005.

155 Disponível em: <
156 [https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=daa5738b361ae0d98](https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=daa5738b361ae0d984e18a897932620570b9fa17)
157 [4e18a897932620570b9fa17](https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=daa5738b361ae0d984e18a897932620570b9fa17)>. Acesso em 11 mai. 2023.

158 BHOSALE, U.; ZAMBARE, M.; SOMANI, R.; TALPATE, K. Antihyperglycemic and
159 antioxidant activity of *Clitorea ternatea* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats.
160 **AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)**, vol. 34, no. 4,
161 p. 433, 2013. Disponível em:
162 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968710/>>. Acesso em 21 mai. 2023.
163 doi: 10.4103/0974-8520.127730.

164 BORDIM, J.; MARQUES, C.; CALEGARI, M. A.; OLDONI, T. L. C.; MITTERER-
165 DALTOÉ, M. L. Potential effect of naturally colored antioxidants from *Moringa oleifera*,
166 propolis, and grape pomace - Evaluation of color and shelf life of chicken paté. **Food**
167 **Chemistry Advances**, vol. 3, p. 100409, 1 Dec. 2023. Disponível em: <
168 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772753X23002307>> Acesso em 13
169 jan. 2024. doi: 10.1016/J.FOCHA.2023.100409.

170 BORIKAR, S. P.; KALLEWAR, N. G.; MAHAPATRA, D. K.; DUMORE, N. G. A
171 Dried flower powder combination of *Clitoria ternatea* and *Punica granatum* demonstrated
172 analogous anti-hyperglycemic potential as compared with the standard drug metformin:
173 An in vivo study in Sprague Dawley rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**,
174 vol. 8, no. 11, p. 75–79, 1 Nov. 2018. Disponível em:
175 <https://japsonline.com/abstract.php?article_id=2765> Acesso em 09 jun. 2023. doi:
176 10.7324/JAPS.2018.81111.

177 BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. .
178 **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**. Curitiba.: Appris., v. 141, 2015.

179 BOX, A. G. E. P.; BEHNKEN, A. & D. W. Some New Three Level Designs for the Study
180 of Quantitative Variables. **Technometrics**, vol. 2, no. 4, p. 455–475, 1960. Disponível
181 em: < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00401706.1960.10489912>> Acesso
182 em 16 set. 2023. doi: 10.1080/00401706.1960.10489912.

183 BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin color in plants.
184 **Phytochemistry**, vol. 22, no. 6, p. 1311–1323, 1 Jan. 1983. Disponível em:

185 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194220084008X>>. Acesso
186 em 25 mai. 2023. doi: 10.1016/S0031-9422(00)84008-X.

187 CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using
188 natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food
189 Science & Emerging Technologies**, vol. 48, p. 228–239, 1 Aug. 2018. Disponível em:
190 < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856418303333>> Acesso
191 em 04 jun. 2023. doi: 10.1016/J.IFSET.2018.07.001.

192 Chayaratasin, P.; Adisakattana, S.; Thilvech, T. The Protective Role of *Clitoria ternatea*
193 L. Flower Extract on methylglyoxal-induced Protein Glycation and Oxidative Damage to
194 DNA. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 21, no. 1, 2021. Disponível
195 em: < [https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-
196 021-03255-9](https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-021-03255-9)>. Acesso em 28 Jun. 2023. doi: 10.1186/s12906-021-03255-9.

197 CHOI, Y. H.; VAN SPRONSEN, J.; DAI, Y.; VERBERNE, M.; HOLLMANN, F.;
198 ARENDS, I. W. C. E.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R. Are natural deep eutectic
199 solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant
200 Physiology**, vol. 156, no. 4, p. 1701–1705, 2011. Disponível em: <
201 <https://academic.oup.com/plphys/article/156/4/1701/6108881?login=false>> Acesso em
202 13 jan. 2023. doi: 10.1104/pp.111.178426.

203 CHUSAK, C.; HENRY, C. J.; CHANTARASINLAPIN, P.; TECHASUKTHAVORN,
204 V.; ADISAKWATTANA, S. Influence of *Clitoria ternatea* flower extract on the in vitro
205 enzymatic digestibility of starch and its application in bread. **Foods**, vol. 7, no. 7, 1 Jul.
206 2018. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/7/102>>. Acesso em 01 mai.
207 2023. doi: 10.3390/foods7070102.

208 DAI, Y.; VAN SPRONSEN, J.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.
209 Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica
210 Chimica Acta**, vol. 766, p. 61–68, 5 Mar. 2013. Disponível em: <
211 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267012018260>>. Acesso
212 em 23 abr. 2023. doi: 10.1016/J.ACA.2012.12.019.

213 DAI, Y.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Tailoring properties of
214 natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**,

215 vol. 187, p. 14–19, 15 Nov. 2015. Disponível em: <
216 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814615004951>>. Acesso
217 em 21 abr. 2023. doi 10.1016/j.foodchem.2015.03.123.

218 DAISY, P.; RAJATHI, M. Hypoglycemic effects of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae)
219 in alloxan-induced diabetes in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol.
220 8, no. 5, p. 393–398, 2009. Disponível em: <
221 <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/48082>> Acesso em 05 mai. 2023. doi:
222 10.4314/tjpr.v8i5.48082.

223 DAISY, P.; SANTOSH, K.; RAJATHI, M. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic
224 effects of *Clitoria ternatea* Linn. in alloxan-induced diabetic rats. **African Journal of**
225 **Microbiology Research**, vol. 3, no. 5, p. 287–291, 2009. Disponível em: <
226 https://academicjournals.org/article/article1380187166_Daisy%20et%20al.pdf>. Acesso
227 em 12 jun. 2023.

228 DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de**
229 **Fennema**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

230 DE FREITAS, T. S. M.; DE MENEZES, G. R.; FAKHOURI, F. M.; DA SILVA, C.;
231 CARDOSO, A. C. L.; VELASCO, J. I.; TOSTES FILGUEIRAS, C.; DOS SANTOS
232 GARCIA, V. A. Application of the Box–Behnken experimental design for the extraction
233 of phenolic compounds from araçá-roxo (*Psidium myrtoides*). **Journal of Food**
234 **Processing and Preservation**, vol. 45, no. 3, 1 Mar. 2021. Disponível em: <
235 <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.15260>>. Acesso em 11 abr.
236 2023. doi: 10.1111/jfpp.15260.

237 DE OLIVEIRA, P. F.; MACHADO, R. A. F.; BOLZAN, A.; BARTH, D. Supercritical
238 fluid extraction of hernandulcin from *Lippia dulcis* Trev. **The Journal of Supercritical**
239 **Fluids**, vol. 63, p. 161–168, 1 Mar. 2012. Disponível em:
240 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896844611005249>> Acesso
241 em: 01 abr. 2023. doi: 10.1016/J.SUPFLU.2011.12.003.

242 DEMASI, S.; MELLANO, M. G.; FALLA, N. M.; CASER, M.; SCARIOT, V. Sensory
243 profile, shelf life, and dynamics of bioactive compounds during cold storage of 17 edible
244 flowers. **Horticulturae**, vol. 7, no. 7, 1 Jul. 2021. Disponível em:

245 <<https://www.mdpi.com/2311-7524/7/7/166>>. Acesso em: 21 mai. 2023. doi:
246 10.3390/horticulturae7070166.

247 DEY, S.; NAGABABU, B. H. Applications of food color and bio-preservatives in the
248 food and its effect on the human health. **Food Chemistry Advances**, vol. 1, p. 100019, 1
249 Oct. 2022. Disponível em: <
250 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772753X2200003X>>. Acesso em
251 08 Jan. 2023. doi: 10.1016/J.FOCHA.2022.100019.

252 DING, Y.; ZHENG, J.; XIA, X.; REN, T.; KAN, J. Box–Behnken design for the
253 optimization of nanoscale retrograded starch formation by high-power ultrasonication.
254 **LWT - Food Science and Technology**, vol. 67, p. 206–213, 1 Apr. 2016. Disponível em:
255 < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815303133>>. Acesso
256 em 10 abr. 2023. doi: 10.1016/J.LWT.2015.11.022.

257 DO NASCIMENTO, J. V.; SILVA, K. A.; GIULIANGELI, V. C.; MENDES, A. L. D.;
258 PIAI, L. P.; MICHELS, R. N.; DAL BOSCO, T. C.; STRÖHER, G. R.; SHIRAI, M. A.
259 Starch-PVA based films with *Clitoria ternatea* flower extract: Characterization, phenolic
260 compounds release and compostability. **International Journal of Biological**
261 **Macromolecules**, vol. 255, p. 128232, 2024. Disponível em: <
262 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813023051310>>. Acesso
263 em 13 Jan. 2024. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2023.128232.

264 DRANCA, F.; OROIAN, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total
265 monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant
266 (*Solanum melongena* L.) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 31, p. 637–646, 1 Jul.
267 2016. Disponível em: <
268 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417715300742>>. Acesso em 10
269 jan. 2024. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2015.11.008.

270 PROGRAMA DE RÁDIO PROSA RURAL. PRODUÇÃO de flores comestíveis para
271 nicho de mercado gourmet: programa 3: Nordeste/Vale do Jequitinhonha. Produção:
272 Embrapa. Brasília, 2019. Disponível em:
273 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1105123>. Acesso em 08 abr. 2023.

274 ESCHER, G. B.; MARQUES, M. B.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.;
275 FURTADO, M. M.; SANT'ANA, A. S.; DA SILVA, M. C.; GENOVESE, M. I.; WEN,
276 M.; ZHANG, L.; OH, W. Y.; SHAHIDI, F.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. *Clitoria*
277 *ternatea* L. petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and
278 antihypertensive effects, inhibit α -amylase and α -glucosidase activities and reduce human
279 LDL cholesterol and DNA induced oxidation. **Food Research International**, vol. 128,
280 p. 108763, 1 Feb. 2020a. Disponível em: <
281 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919306490>>. Acesso
282 em 18 abr. 2023. doi: 10.1016/J.FOODRES.2019.108763.

283 ESCHER, G. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Phenolic
284 composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria*
285 *ternatea* L. (butterfly pea) blue petals. **Food Chemistry**, vol. 331, p. 127341, 30 Nov.
286 2020b. Disponível em: <
287 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620312036>>. Acesso
288 em 13 abr. 2023. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.127341.

289 FENGER, J. A.; ROUX, H.; ROBBINS, R. J.; COLLINS, T. M.; DANGLES, O. The
290 influence of phenolic acyl groups on the color of purple sweet potato anthocyanins and
291 their metal complexes. **Dyes and Pigments**, vol. 185, p. 108792, 1 Feb. 2021. Disponível
292 em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143720820314893>>.
293 Acesso em: 07 jul. 2023. doi: 10.1016/J.DYEPIG.2020.108792.

294 FERNANDES, L.; CASAL, S.; PEREIRA, J. A.; SARAIVA, J. A.; RAMALHOSA, E.
295 An Overview on the Market of Edible Flowers. **Food Reviews International**, vol. 36,
296 no. 3, p. 258–275, 2 Apr. 2020. Disponível em: <
297 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2019.1639727>>. Acesso em 22
298 jul. 2023. doi: 10.1080/87559129.2019.1639727.

299 FREUND, R. J.; WILSON, W. J.; MOHR, D. L. Factorial Experiments. **Statistical**
300 **Methods**, p. 473–520, 1 Jan. 2010. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374970-3.00009-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374970-3.00009-3)
301 3.

302 HA, V. T. N.; LE, N. T. H. Extraction of anthocyanins from *Clitoria ternatea* L. petals in
303 Vietnam and determination of its antioxidant and antimicrobial activities. **Jordan**
304 **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 15, no. 2, p. 145–157, 2022. Disponível em:

305 < <https://journals.ju.edu.jo/index.php/jjps/article/view/302>> Acesso em: 22 dez. 2023.
306 doi:10.35516/jjps.v15i2.302.

307 HARBORNE, J. Plant polyphenols. XI. Structure of acylated anthocyanins.
308 **Phytochemistry**, vol. 3, p. 151–160, 1964. Disponível em: <
309 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200880358>> Acesso
310 em: 14 jun. 2023. doi:10.1016/S0031-9422(00)88035-8

311 HONDA, T.; TATSUZAWA, F.; KOBAYASHI, N.; KASAI, H.; NAGUMO, S.;
312 SHIGIHARA, A.; SAITO, N. Acylated anthocyanins from the violet-blue flowers of
313 *Orychophragmus violaceus*. **Phytochemistry**, vol. 66, no. 15, p. 1844–1851, Aug. 2005.
314 Disponível em: <
315 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942205002505>>. Acesso
316 em 11 Jun. 2023. doi 10.1016/j.phytochem.2005.05.026.

317 HOU, D. X.; FUJII, M.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M. Molecular mechanisms
318 behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and**
319 **Biotechnology**, vol. 2004, no. 5, p. 321–325, 2004. Disponível em: <
320 <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20053057076>> Acesso em 24 jul.
321 2023. doi 10.1155/S1110724304403040.

322 IVANOVIĆ, M.; ALAÑÓN, M. E.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO,
323 A. Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by
324 tailor-made natural deep eutectic solvents. **Food Research International**, vol. 111, p.
325 67–76, 1 Sep. 2018. Disponível em: <
326 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918303703>>. Acesso
327 em 19 abr. 2023. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.05.014.

328 JAMIL, N.; PA'EE, F. Antimicrobial activity from leaf, flower, stem, and root of *Clitoria*
329 *ternatea* - A review. 2002. In: **AIP Conference Proceedings** [S. l.]: American Institute
330 of Physics Inc., 2018. Disponível em: <
331 [https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2002/1/020044/791053/Antimicrobial-activity-from-](https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2002/1/020044/791053/Antimicrobial-activity-from-leaf-flower-stem-and)
332 [leaf-flower-stem-and](https://pubs.aip.org/aip/acp/article/2002/1/020044/791053/Antimicrobial-activity-from-leaf-flower-stem-and)>. Acesso em 13 set. 2023. doi: 10.1063/1.5050140.

333 JEYARAJ, E. J.; NATHAN, S.; LIM, Y. Y.; CHOO, W. S. Antibiofilm properties of
334 *Clitoria ternatea* flower anthocyanin-rich fraction towards *Pseudomonas aeruginosa*.

335 **Access Microbiology**, vol. 4, no. 4, 26 Apr. 2022. Disponível em: <
336 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9260092/>> Acesso em 22 mai. 2023.
337 doi: 10.1099/acmi.0.000343.

338 JOVANOVIĆ, M. S.; KRGOVIĆ, N.; ŽIVKOVIĆ, J.; STEVIĆ, T.; ZDUNIĆ, G.;
339 BIGOVIĆ, D.; ŠAVIKIN, K. Ultrasound-Assisted Natural Deep Eutectic Solvents
340 Extraction of Bilberry Anthocyanins: Optimization, Bioactivities, and Storage Stability.
341 **Plants**, vol. 11, no. 20, 1 Oct. 2022. Disponível em: < [https://www.mdpi.com/2223-](https://www.mdpi.com/2223-7747/11/20/2680)
342 [7747/11/20/2680](https://www.mdpi.com/2223-7747/11/20/2680)>. Acesso em: 23 mai. 2023. doi: 10.3390/plants11202680.

343 KAMILLA, L.; MNSOR, S. M.; RAMANATHAN, S.; SASIDHARAN, S. Antimicrobial
344 activity of *Clitoria ternatea* (L.) extracts. **Pharmacologyonline**, vol. 1, p. 731–738, 2009.
345 Disponível em: <
346 <https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2009/vol1/074.Kamilla.pdf>> Acesso
347 em 01 fev. 2023.

348 KAMKAEN, N.; WILKINSON, J. The antioxidant activity of *Clitoria ternatea* flower
349 petal extracts and eye gel. **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, vol. 23, no. 1, p. 1624–
350 1625, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2832>>.
351 Acesso em 06 mai. 2023.

352 KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Flavonoid composition related to petal color in
353 different lines of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, vol. 64, no. 6, p. 1133–1139, 1 Nov.
354 2003a. Disponível em: <
355 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942203005041>> Acesso em
356 22 ago. 2023. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00504-1.

357 KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the
358 petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, vol. 62, no. 2, p. 229–237, Jan. 2003b.
359 Disponível em: <
360 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942202004867>>. Acesso
361 em 17 mai. 2023. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00486-7.

362 KINUPP, V. F. e; LORENZI, H. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no
363 Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. **Instituto**
364 **Plantarum De Estudos Da Flora Ltda**, , p. 767, 2019.

365 KOSHY, R. R.; KOSHY, J. T.; MARY, S. K.; SADANANDAN, S.; JISHA, S.;
366 POTHAN, L. A. Preparation of pH-sensitive film based on starch/carbon nanodots
367 incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. **Food Control**, vol. 126, 1
368 Aug. 2021. Disponível em: <
369 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713521001778> >. Acesso
370 em: 22 mai. 2023. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108039.

371 KUDŁAK, B.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Selected issues related to the toxicity
372 of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. **Environmental Science and**
373 **Pollution Research**, vol. 22, no. 16, p. 11975–11992, 27 Aug. 2015. Disponível em: <
374 <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4794-y> > Acesso em 04 jun. 2023.
375 doi: 10.1007/s11356-015-4794-y.

376 KUMAR, R. Phytochemical and antibacterial activities of crude leaf and root extracts of
377 *Clitoria ternatea* varieties (Fabaceae). **Journal of Pharmacognosy and**
378 **Phytochemistry**, vol. 6, no. 6, p. 1104–1108, 2017. Disponível em: <
379 <https://www.phytojournal.com/archives?year=2017&vol=6&issue=6&ArticleId=2204>>.
380 Acesso em 03 jul. 2023.

381 LEE, P. M.; ABDULLAH, R. Thermal Degradation of Blue Anthocyanin Extract of
382 *Clitoria ternatea* Flower. **Ipcbee**, vol. 7, p. 49–53, 2011. Disponível em: <
383 <http://ipcbee.com/vol7/12-ICBFS2011S035.pdf>>. Acesso em 14 Jan. 2023.

384 LIJON, M. B.; MEGHLA, N. S.; JAHEDI, E.; RAHMAN, M. A.; HOSSAIN, I.
385 Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Clitoria ternatea*. **International**
386 **Journal of Natural and Social Sciences**, vol. 4, no. 1, p. 01–10, 2017. Disponível em: <
387 [https://executingreality.com/books/Daemon's_Collection/unsorted/IJNSS-V4I1-01-pp-](https://executingreality.com/books/Daemon's_Collection/unsorted/IJNSS-V4I1-01-pp-01-10.pdf)
388 [01-10.pdf](https://executingreality.com/books/Daemon's_Collection/unsorted/IJNSS-V4I1-01-pp-01-10.pdf)>. Acesso em 12 jan. 2023.

389 LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.;
390 YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. Polyphenolic content and antioxidant capacity of
391 fruits of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) palm tree. **Revista Brasileira de Plantas**
392 **Medicinais**, vol. 14, no. 2, 2012. Disponível em:
393 <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/hfLYGGT8BzkDzcbcB7dbtzt/?format=pdf&lang=pt>>
394 Acesso em 22 fev. 2023. doi: 10.1590/S1516-05722012000200011.

395 LIN, S.; MENG, X.; TAN, C.; TONG, Y.; WAN, M.; WANG, M.; ZHAO, Y.; DENG,
396 H.; KONG, Y.; MA, Y. Composition and antioxidant activity of anthocyanins from
397 *Aronia melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep
398 eutectic solvent extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 89, p. 106102, 1
399 Sep. 2022. Disponível em: <
400 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417722001973>> Acesso em 04
401 jul. 2023. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2022.106102.

402 ARPAUNG, A. M.; ANDARWULAN, N.; HARIYADI, P.; NUR FARIDAH, D. The
403 color degradation of anthocyanin-rich extract from butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.)
404 petal in various solvents at pH 7. **Natural Product Research**, vol. 31, no. 19, p. 2273–
405 2280, 2017. Disponível em: <
406 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2017.1303689>> Acesso em 03
407 mai. 2023. doi: 10.1080/14786419.2017.1303689.

408 MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of
409 anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, vol. 25, no. 3, p. 207–225, 1987.
410 [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90147-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90147-6).

411 MCGUIRE, R. G. Reporting of Objective Color Measurements. **HortScience**, vol. 27,
412 no. 12, p. 1254–1255, 1 Feb. 1992.
413 <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254>.

414 MEHMOOD, A.; ISHAQ, M.; ZHAO, L.; YAQOUB, S.; SAFDAR, B.; NADESEM, M.;
415 MUNIR, M.; WANG, C. Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on
416 bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria*
417 *ternatea* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 51, p. 12–19, 1 Mar. 2019. Disponível em:
418 < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1350417718313774>> Acesso
419 em 23 jul. 2023. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2018.10.013.

420 MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V.; KUMAR, N. S.; HEINRICH, M. The Ayurvedic
421 medicine *Clitoria ternatea*: From traditional use to scientific assessment. *Journal of*
422 *Ethnopharmacology*, vol. 120, no. 3, pp. 291–301, 8 Dec. 2008. Disponível em: <
423 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874108004911>>. Acesso
424 em 23 ago. 2023. doi: 10.1016/J.JEP.2008.09.009.

425 MULAY, A.; RATHOD, V. K. Ultrasound-assisted synthesis of ethyl hexanoate using
426 heterogeneous catalyst: Optimization using Box-Behnken design. **Journal of the Indian**
427 **Chemical Society**, vol. 99, no. 8, p. 100573, 1 Aug. 2022. Disponível em: < Ultrasound-
428 assisted synthesis of ethyl hexanoate using heterogeneous catalyst: Optimization using
429 Box-Behnken design.> Acesso em: 05 mai. 2023. doi: 10.1016/J.JICS.2022.100573.

430 MUSHTAQ, Z.; KHAN, U.; SEHER, N.; SHAHID, M.; SHAHZAD, M. T.; BHATTI,
431 A. A.; SIKANDER, T. Evaluation of the antimicrobial, antioxidant, and enzyme
432 inhibition roles of polar and nonpolar extracts of *Clitoria ternatea* seeds. *Journal of*
433 *Animal and Plant Sciences*, vol. 31, no. 5, pp. 1405–1418, 1 Oct. 2021. Disponível em: <
434 <https://thejaps.org.pk/docs/2021/05/22.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2023.
435 doi: 10.36899/JAPS.2021.5.0342.

436 NITHIANANTHAM, K.; PING, K. Y.; LATHA, L. Y.; JOTHY, S. L.; DARAH, I.;
437 CHEN, Y.; CHEW, A. L.; SASIDHARAN, S. Evaluation of hepatoprotective effect of
438 methanolic extract of *Clitoria ternatea* (Linn.) flower against acetaminophen-induced
439 liver damage. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, vol. 3, no. 4, p. 314–319, 1
440 Aug. 2013. Disponível em:
441 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2222180813600754>>. Acesso
442 em 27 Mai. 2023. doi: 10.1016/S2222-1808(13)60075-4.

443 NITHIANANTHAM, K.; SHYAMALA, M.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; JOTHY, S. L.;
444 SASIDHARAN, S. Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract against
445 paracetamol-induced damage in mice. **Molecules**, vol. 16, no. 12, p. 10134–10145, Dec.
446 2011. Disponível em: < Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract
447 against paracetamol induced damage in mice.>. Acesso em 09 ago, 2023. doi:
448 10.3390/molecules161210134.

449 PALOS-HERNÁNDEZ, A.; GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, M. Y.; ESCUADRA
450 BURRIEZA, J.; PÉREZ-IGLESIAS, J. L.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. Obtaining
451 green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using
452 natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. **Sustainable Chemistry**
453 **and Pharmacy**, vol. 29, p. 100773, 1 Oct. 2022. Disponível em:
454 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352554122001772>. Acesso em: 5 ago.
455 2022. doi: 10.1016/J.SCP.2022.100773.

456 PRASAD, C.; DAVIS, K. E.; IMRHAN, V.; JUMA, S.; VIJAYAGOPAL, P. Advanced
457 Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle
458 Modification. **American Journal of Lifestyle Medicine**, vol. 13, no. 4, p. 384–404, 1
459 Jul. 2019. disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600625/> >.
460 Acesso em 22 out. 2022. doi: 10.1177/1559827617708991.

461 PUROHIT, S. R.; RANA, S. S.; IDRISHI, R.; SHARMA, V.; GHOSH, P. A review on
462 nutritional, bioactive, toxicological properties and preservation of edible flowers. **Future**
463 **Foods**, vol. 4, p. 100078, 1 Dec. 2021. Disponível em: <
464 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266683352100068X> >. Acesso em:
465 12 dez. 2022. doi: 10.1016/J.FUFO.2021.100078.

466 RASPE, D. T.; CIOTTA, S. R.; ZORZENON, M. R. T.; DACOME, A. S.; DA SILVA,
467 C.; MILANI, P. G.; DA COSTA, S. C. Ultrasound-assisted extraction of compounds from
468 Stevia leaf pretreated with ethanol. **Industrial Crops and Products**, vol. 172, p. 114035,
469 15 Nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114035>.

470 RASPE, D. T.; DA SILVA, C.; DA COSTA, S. C. Compounds from Stevia rebaudiana
471 Bertoni leaves: An overview of non-conventional extraction methods and challenges.
472 **Food Bioscience**, vol. 46, p. 101593, 1 Apr. 2022. Disponível em: <
473 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669021008001>>. Acesso
474 em 23 dez. 2022. doi: 10.1016/J.FBIO.2022.101593.

475 RHEE, S. Y.; KIM, Y. S. The role of advanced glycation end products in diabetic vascular
476 complications. **Diabetes and Metabolism Journal**, vol. 42, no. 3, p. 188–195, 1 Jun.
477 2018. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/articles/1142287>>. Acesso em 22
478 mai, 2023. doi: 10.4093/dmj.2017.0105

479 RIBEIRO, B. D.; FLORINDO, C.; C. IFF, L.; A. Z. COELHO, M.; M. MARRUCHO, I.
480 Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. **ACS**
481 **Sustainable Chemistry & Engineering**, vol. 3, no. 10, p. 2469–2477, 24 Sep.
482 2015. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssuschemeng.5b00532> >
483 Acesso em 03 jun. 2023. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00532.

484 RIGOLON, T. C. B.; OLIVEIRA, I. R. N. de; STRINGHETA, P. C. Antocianinas. *In*:
485 STRINGHETA, P. C.; DE FREITAS, P. A. V. (eds.). **Corantes Naturais: da**
486 **diversidade da natureza as aplicações e benefícios**. 1st ed. Viçosa: [s. n.], 2021. p. 475.

487 ROSELLÓ-SOTO, E.; GALANAKIS, C. M.; BRNČIĆ, M.; ORLIEN, V.; TRUJILLO,
488 F. J.; MAWSON, R.; KNOERZER, K.; TIWARI, B. K.; BARBA, F. J. Clean recovery
489 of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by
490 ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. **Trends**
491 **in Food Science & Technology**, vol. 42, no. 2, p. 134–149, 1 Apr. 2015. Disponível em:
492 < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415000035>>. Acesso
493 em 12 jan. 2023. doi: 10.1016/J.TIFS.2015.01.002.

494 RUTKOWSKA, M.; NAMIEŚNIK, J.; KONIECZKA, P. Ultrasound-Assisted
495 Extraction. **The Application of Green Solvents in Separation Processes**, p. 301–324, 1
496 Jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3>.

497 SANTOS, L. G.; MARTINS, V. G. Optimization of the green extraction of polyphenols
498 from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: A comparative study
499 with conventional extraction techniques. **Journal of Applied Research on Medicinal**
500 **and Aromatic Plants**, vol. 34, 1 Apr. 2023. Disponível em: <
501 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214786123000025>>. Acesso
502 em 12 mai. 2023. doi: 10.1016/j.jarmap.2023.100458.

503 SAVI, L. K. **DESENVOLVIMENTO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS**
504 **PROFUNDOS (NADEs) E O ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-**
505 **QUÍMICAS, TÉRMICAS E REOLÓGICAS**. 2019. Universidade Federal do Paraná,
506 2019.

507 SAVI, L. K.; DIAS, M. C. G. C.; CARPINE, D.; WASZCZYNSKYJ, N.; RIBANI, R.
508 H.; HAMINIUK, C. W. I. Natural deep eutectic solvents (NADEs) based on citric acid
509 and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion
510 and its effect on thermal, physical and rheological properties. **International Journal of**
511 **Food Science and Technology**, vol. 54, no. 3, p. 898–907, 1 Mar. 2019. Disponível em:
512 < <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14013>>. Acesso em 13 jun,
513 2022. doi: 10.1111/ijfs.14013.

514 SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Stability of Natural Pigments and Dyes. **Revista**
515 **Fitos**, vol. 3, p. 6–24, 2007. Disponível em:
516 <http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/71>. Acesso em
517 22 mar, 2022.

518 SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages,
519 and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional**
520 **Foods**, vol. 18, p. 820–897, 1 Oct. 2015. Disponível em: <
521 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615003023>>. Acesso em 23
522 nov. 2022. doi: 10.1016/J.JFF.2015.06.018.

523 SHAHIDIAN, A.; AFSHAR, H.; HABIBI, M. R.; GHASSEMI, M. Therapeutic
524 Nanostructures: Application of Mechanical Engineering in Drug Delivery.
525 **Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting**, p. 3–34, 1 Jan. 2016.
526 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47347-7.00001-X>.

527 SHANTAMMA, S.; VASIKARAN, E. M.; WAGHMARE, R.; NIMBKAR, S.; MOSES,
528 J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Emerging techniques for the processing and
529 preservation of edible flowers. **Future Foods**, vol. 4, p. 100094, 1 Dec. 2021. Disponível
530 em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666833521000848>> Acesso
531 em 19 mar, 2023. doi: 10.1016/J.FUFO.2021.100094.

532 SINOPOLI, A.; CALOGERO, G.; BARTOLOTTA, A. Computational aspects of
533 anthocyanidins and anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, vol. 297, p. 124898, 1
534 Nov. 2019. Disponível em: <
535 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619309860>> Acesso em
536 23 jul, 2023. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.05.172.

537 Sun, J.; Mei, Z.; Tang, Y.; Ding, L.; Jiang, G.; ZHANG, C.; Sun, A.; Bai, W. Stability,
538 antioxidant capacity, and degradation kinetics of pelargonidin-3-glucoside exposed to
539 ultrasound power at low temperature. *Molecules*, vol. 21, no. 9, 1 Sep. 2016. Disponível
540 em: < <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1109>> Acesso em: 22 jan, 2023. doi:
541 10.3390/molecules21091109.

542 SWANSON, B. G. TANNINS AND POLYPHENOLS. **Encyclopedia of Food Sciences**
543 **and Nutrition**, p. 5729–5733, 1 Jan. 2003. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055->
544 [X/01178-0](https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01178-0).

545 TERAHARA, N.; TOKI, K.; SAITO, N.; HONDA, T.; MATSUI, T.; OSAJIMA, Y.
546 Eight new anthocyanins, ternatins C1-C5 and D3 and preternatins A3 and C4 from young
547 *Clitoria ternatea* flowers. **Journal of Natural Products**, vol. 61, no. 11, p. 1361–1367,
548 Nov. 1998. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np980160c> >. Acesso
549 em 05 fev. 2022. doi: 10.1021/np980160c.

550 TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry.
551 **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, vol. 5, p. 1–4, 1 Jun. 2017.
552 Disponível em: <
553 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S245222361630075X>> Acesso
554 em: 22 nov, 202. doi: 10.1016/J.COGSC.2017.03.002.

555 TROUILLAS, P.; SANCHO-GARCÍA, J. C.; DE FREITAS, V.; GIERSCHNER, J.;
556 OTYEPKA, M.; DANGLES, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation:
557 Insights from Theory and Experiment. **Chemical Reviews**, vol. 116, no. 9, p. 4937–4982,
558 11 May 2016. Disponível em:
559 <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.5b00507>>. Acesso em 03 mar. 2023.
560 doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00507.

561 VENKATA KALYAN, B.; KOTHANDAM, H.; PALANIYAPPAN, V.; PRAVEEN, A.
562 R. Hypoglycaemic Activity of Seed Extract of *Clitoria ternatea* Linn in Streptozotocin-
563 Induced Diabetic Rats. **Pharmacognosy Journal**, vol. 3, no. 19, p. 45–47, 1 Jan. 2011.
564 Disponível em: <
565 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S097535751180009X>>. Acesso
566 em 02 mar, 2023. doi: 10.5530/PJ.2011.19.9.

567 VERMA, P. R.; ITANKAR, P. R.; ARORA, S. K. Evaluation of the antidiabetic,
568 antihyperlipidemic, and pancreatic regeneration potential of aerial parts of *Clitoria*
569 *ternatea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 23, no. 5, p. 819–829, 2013.
570 Disponível em: <
571 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X13701108>> . Acesso em
572 03 mar, 2023. doi: 10.1590/S0102-695X2013000500015.

573 VERNÈS, L.; VIAN, M.; CHEMAT, F. Ultrasound and Microwave as Green Tools for
574 Solid-Liquid Extraction. **Liquid-Phase Extraction**, p. 355–374, 1 Jan. 2020. Disponível
575 em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128169117000128>>.
576 Acesso em 17 mar, 2023. doi: 10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8.

577 VIDANA GAMAGE, G. C.; LIM, Y. Y.; CHOO, W. S. Anthocyanins From *Clitoria*
578 *ternatea* Flower: Biosynthesis, Extraction, Stability, Antioxidant Activity, and
579 Applications. **Frontiers in Plant Science**, vol. 12, 17 Dec. 2021. Disponível em: <
580 [https://www.frontiersin.org/journals/plant-](https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.792303/full)
581 [science/articles/10.3389/fpls.2021.792303/full](https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.792303/full) > Acesso em: 23 abr. 2022. doi:
582 10.3389/fpls.2021.792303.

583 XING, C.; CUI, W. Q.; ZHANG, Y.; ZOU, X. S.; HAO, J. Y.; ZHENG, S. Di; WANG,
584 T. T.; WANG, X. Z.; WU, T.; LIU, Y. Y.; CHEN, X. Y.; YUAN, S. G.; ZHANG, Z. Y.;
585 LI, Y. H. Ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction of glabridin and
586 isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza glabra*: Optimization, extraction mechanism and in
587 vitro bioactivities. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 83, p. 105946, 1 Feb. 2022.
588 Disponível em: <
589 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417722000396>>. Acesso em 27
590 dez. 2022. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2022.105946.

591 YANG, Z. Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology.
592 **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [S. l.]: Springer Science and
593 Business Media Deutschland GmbH, 2019. vol. 168, p. 31–59.
594 https://doi.org/10.1007/10_2018_67.

595 YANTI; SETIAWAN, T.; LAY, B. W. *Clitoria ternatea* ethanolic extract prevents dental
596 caries via inhibiting *Streptococcus mutans* growth and quorum sensing. **Food Research**,
597 vol. 5, no. 2, p. 492–497, 2021. Disponível em: <
598 <https://agris.fao.org/search/en/providers/122640/records/6511acdc401e7bb65a2b5d2b>>
599 Acesso em 22 jan. 2022. doi: 10.26656/fr.2017.5(2).508.

600 YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO, T. Blue flower color development by anthocyanins:
601 From chemical structure to cell physiology. **Natural Product Reports**, vol. 26, no. 7, p.
602 884–915, Jul. 2009. Disponível em: <

603 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/np/b800165k>>. Acesso em 03 abr. 2023.
604 doi: 10.1039/b800165k.

605 ZHAO, Z.; WU, M.; ZHAN, Y.; ZHAN, K.; CHANG, X.; YANG, H.; LI, Z.
606 Characterization and purification of anthocyanins from black peanut (*Arachis hypogaea*
607 L.) skin by combined column chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol.
608 1519, p. 74–82, 13 Oct. 2017. Disponível em: <
609 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967317312724>>. Acesso
610 em 03 fev. 2023. doi: 10.1016/J.CHROMA.2017.08.078.

611 ZINGARE, M. L.; ZINGARE, P. L.; DUBEY, A. K.; ANSARI, A. *Clitoria ternatea*
612 (APARAJITA): A review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials.
613 **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, vol. 3, no. 1, p. 203–213,
614 2013. Disponível em: <www.ijpbs.com or www.ijpbsonline.com>. Acesso 27 Mar 2022.

615

616

CAPÍTULO 2

617

618

619 **Manuscript: Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from**
620 **butterfly pea petals using natural deep eutectic solvents and study stability of the**
621 **extracts.**

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

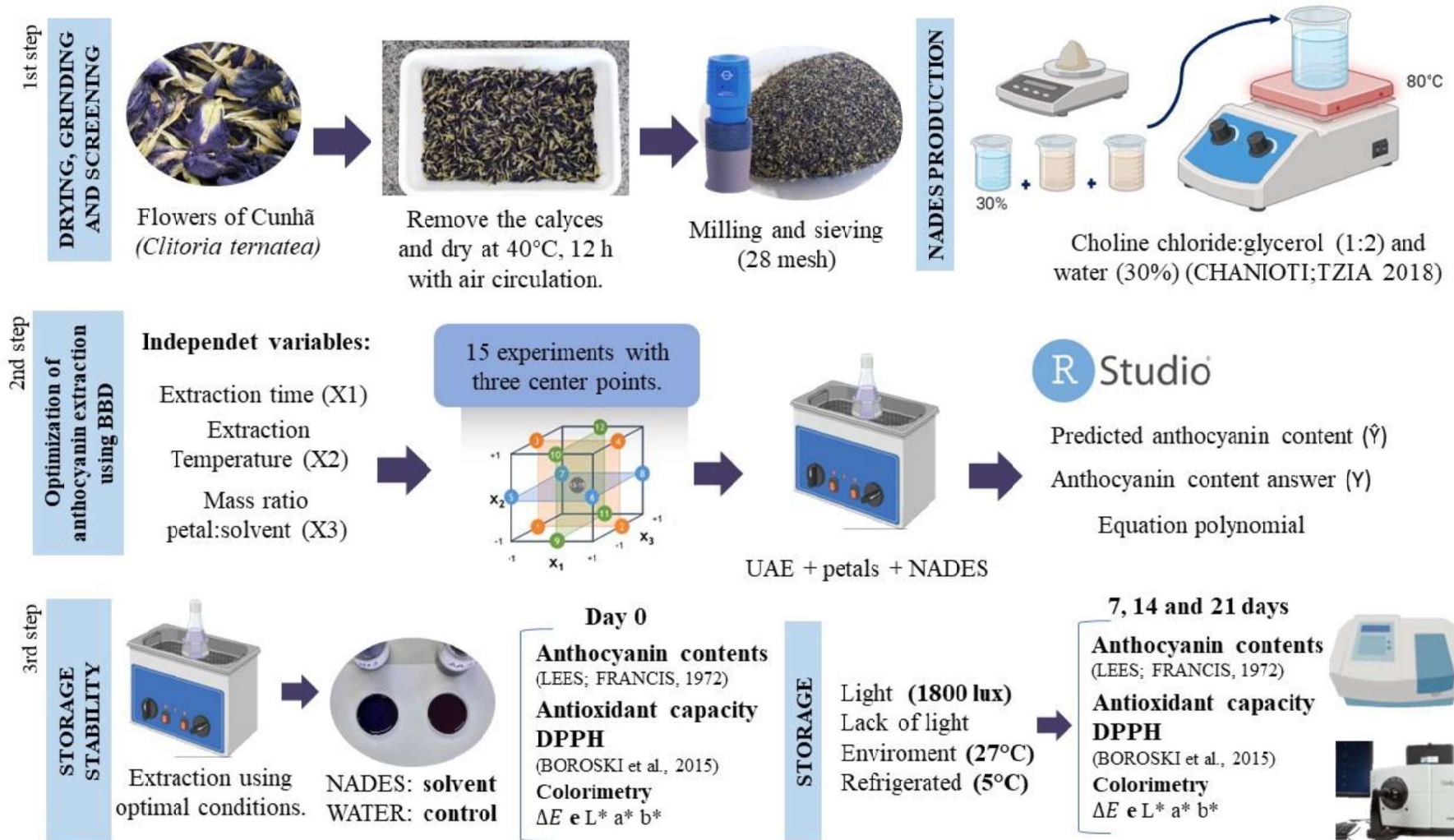
636 **Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from butterfly-pea**
637 **powder using natural deep eutectic solvents: impact on anthocyanin content,**
638 **antioxidant capacity and colorimetric stability of the extracts.**

639 ABSTRACT: Optimization of the extraction of compounds from medicinal plants, also
640 using green solvents, is relevant to various sectors, such as the food, pharmaceutical, and
641 cosmetic industries. Therefore, this study aimed to optimize the time (15-50 min),
642 temperature (40-80 °C), and solvent petal mass ratio (2,5-7%) of the ultrasound-assisted
643 extraction of anthocyanins from *Clitoria ternatea* by applying a natural deep eutectic
644 solvent of choline chloride: glycerol (1:2) with 30% water added (ChCl: Gly) and
645 compare the extraction efficiency and stability of these extracts with aqueous extraction.
646 To evaluate the stability of biocompounds from stored extracts anthocyanin content,
647 antioxidant capacity (DPPH) and colorimetric analysis of the extracts were carried out
648 every week for 21 days. The optimal extraction condition was 80°C, 50 minutes, and 7%
649 petal: solvent, and it was observed that all variables studied influenced the total content
650 of anthocyanins extracted, with the ChCl: Gly solvent extracting higher levels of
651 anthocyanins (374, 65 mg/L) than the solvent water (211.63 mg/L). The extract with the
652 solvent ChCl: Gly kept at 5°C showed less loss of anthocyanins (16%) about their
653 concentration at time zero, while the extract with the solvent water stored under the same
654 conditions, there was a degradation of 38% of the content of total anthocyanins about
655 time zero. The ChCl: Gly solvent extract also showed greater antioxidant capacity (156.43
656 µmol/mL) than the aqueous extract (93.01 µmol/mL). However, there was a more
657 significant loss of antioxidant capacity in the eutectic solvent extracts (78 %) than in water
658 solvent extracts (70%) during the 21 days of storage under different conditions. For color
659 attributes, the saturation variations of the eutectic solvent between storage conditions
660 were slightly more minor, with an increase in saturation of 31.6% in the light condition
661 and 9.6% in the ambient condition after 21 days of storage. These results demonstrate the
662 efficiency of optimizing the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Clitoria*
663 *ternatea* petals using eutectic solvents of choline chloride and glycerol to produce extracts
664 with colorimetric stability and conservation of the bioactive compounds of interest.

665

666 Keywords: antioxidant capacity, green solvent, phenolic compounds, polyphenols,
667 natural dye

Graphical abstract



1 1. INTRODUCTION

2 The use of edible flowers in food relates to cultural practices, generally associated
3 with beneficial effects on health. In addition to sensory attributes, edible flower extract
4 aims to improve technological properties such as preservative and coloring potential and
5 the nutritional profile of products (ZHAO *et al.*, 2019).

6 *Clitoria ternatea* is a perennial herbaceous plant originating in Indonesia. It can
7 grow up to 2-3 meters and is found in tropical equatorial areas (MUKHERJEE *et al.*,
8 2008). The plant is adaptable to different temperature and humidity conditions.
9 (KUMAR, 2017). Studies have proven that bioactive compounds extracted from seeds,
10 roots, flowers, and leaves of *Clitoria ternatea* have potential antioxidant action
11 (MEHMOOD *et al.*, 2019), antimicrobial action (ESCHER *et al.*, 2020) and
12 hepatoprotective activity (NITHIANANTHAM *et al.*, 2013).

13 In addition to the properties mentioned, the flowers of *Clitoria ternatea* are widely
14 used due to the various anthocyanins that give them their blue color (FU *et al.*, 2021).
15 Ternatins are anthocyanins present in the flowers of *Clitoria ternatea* and constitute a
16 group of 15 polyacylated anthocyanins responsible for stability in a diverse range of pH
17 and their technological application as dyes (VIDANA GAMAGE; LIM; CHOO, 2021).

18 Among the techniques for extracting anthocyanins, organic solvents, such as
19 methanol and ethanol, are the most used methodology (TENA; ASUERO, 2022).
20 However, organic solvents are volatile, flammable, and toxic, and their use has been
21 discouraged in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries (IVANOVIĆ *et al.*,
22 2018; LIN *et al.*, 2022; PALOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Therefore, an alternative
23 group of solvents, called natural deep eutectic solvents (NADES), are being developed to
24 promote sustainable extraction following the basic principles of Green Chemistry

25 (TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017). NADES offer several benefits, including
26 adjustable viscosity, biodegradability, polar and nonpolar compound extraction, simple
27 separation methods, and numerous opportunities to design and customize extraction
28 approaches. (IVANOVIĆ *et al.*, 2018).

29 Ultrasound-assisted extraction technology has been successfully explored in
30 extracting natural compounds. This approach helps optimize processes, reduce costs, and
31 improve the final product (RASPE; DA SILVA; DA COSTA, 2022). This method allows
32 for the obtaining of clean-label products with a significant reduction in the amount of
33 solvents used. Additionally, it may improve the extraction yield of natural components,
34 provided that the optimal process variables are determined.

35 Statistical experimental design methods can analyze different combinations of
36 process variables like ultrasound power and temperature. From the experimental data, it's
37 possible to compute the optimal values of these variables that provide extracts with better
38 mass yields. (AMEER *et al.*, 2017). The optimization for design Box-Behnken has the
39 main advantage of reducing the number of trials needed to study a large number of factors
40 (BOX; BEHNKEN, 1960).

41 Jovanović *et al.* 2022 studies extracted anthocyanins from blueberries using
42 natural deep eutectic solvents (NADES) integrated with ultrasound-assisted extraction to
43 define extraction conditions that will prevent decomposition of the anthocyanins or loss
44 of bioactivity. The extraction of polyphenols from tart cherry pomace with NADES
45 combined with ultrasound and microwaves demonstrated that an extract based on the
46 choline chloride: fructose eutectic system was 62.33% more efficient for extracting
47 anthocyanins compared to conventional solvent. It is worth mentioning that there is no
48 optimization study on the extraction of *Clitoria ternatea* petals using NADES.

49 Therefore, the objective of this study was to optimize the ultrasound-assisted
50 extraction of anthocyanins present in *Clitoria ternatea* petals powered using NADES
51 choline chloride: glycerol and evaluate the anthocyanin content, antioxidant capacity, and
52 colorimetric stability of these extracts under different storage conditions for twenty-one
53 days.

54 **2. MATERIAL AND METHODS**

55 **2.1 Drying and grinding petals *Clitoria ternatea***

56 *Clitoria ternatea* flowers were purchased dehydrated (Flor Fada Azul, Mato
57 Grosso do Sul, Brazil). The petals were separated and then dried in an oven with air
58 circulation, which was of the brand (Sinergia Científica® SSDcr, 220 V, 1100 W,
59 Campinas, Brazil) for 12 hours at 40°C. After drying, the petals were grounded using a
60 primary analysis mill (IKA® A11 B S32, 180 W, São Paulo, Brazil) and sieved with an
61 opening of 0.590 mm. The sieved petals were then classified based on the standard series
62 of sieves, and the powder retained on the average diameter of 28 mesh (Telastem Peneiras
63 LTDA, São Paulo, Brazil) was used for the experiments.

64 **2.2 Preparation of deep natural eutectic solvent using choline chloride and glycerol**

65 Natural deep eutectic solvent (NADES) choline chloride glycerol (1:2) with the
66 addition of 30% water was prepared according to the preparation protocol described by
67 Chanioti & Tzia (2018). The solution was prepared by heating the two components at
68 80 °C under constant stirring until a homogeneous liquid formed. Then, 30% (v/v) water
69 was added, and the choline chloride glycerol water mixture was used in the extraction
70 experiments and referred to throughout the article as ChCl: Gly.

71 2.3 Experimental design

72 Powder petals of *Clitoria ternatea* were subjected to ultrasound-assisted
73 extraction of biocompounds. The process involved ultrasound-assisted extraction with
74 deep natural eutectic solvents choline chloride: glycerol (1:2) with 30% water added
75 (ChCl: Gly) and ultrasound-assisted extraction with distilled water. Extractions were
76 conducted in the center of an ultrasonic bath with heating control and a nominal capacity
77 of 9.5 L (Unique, model USC 2800 A, Indaiatuba, Brazil).

78 For the process with ChCl: Gly, a Box—Behnken (DBB) design combined the
79 extraction process variables, including time (15-50 min), temperature (40-80 °C), and
80 powder petals solvent mass ratio (2.5-7%) at low, medium, and high concentrations (table
81 1).

82 **Table 1:** Experimental model of the levels of selected variables.

Variable	Factor	Level		
	X	Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
Time (min)	X1	15	32,5	50
Temperature (°C)	X2	40	60	80
Petals: solvent mass ratio (m/v)	X3	2%	4,5%	7%

83

84 Therefore, 15 combinations of the three variables at three levels, including three
85 central points, were made. This was done to identify the best conditions of the combined
86 controllable variables process to extract total anthocyanins from *Clitoria ternatea*
87 simultaneously.

88 The best conditions of the combined controllable variables process to extract
89 total anthocyanins from *Clitoria ternatea* simultaneously (80°C, 60 min, 7%) were
90 applied in the aqueous extraction of the petals.

91 The study compared the extraction of total anthocyanins, antioxidant activity,
92 and colorimetric stability in extraction with ChCl: Gly and water.

93 **2.4 Evaluation of storage stability**

94 The stability of extracts of *Clitoria ternatea* powder petals was determined by
95 measuring the total anthocyanin content, antioxidant capacity, and colorimetric values
96 every seven days during 21 days of storage, according to the methodologies mentioned
97 below. For light stability, samples of *Clitoria ternatea* powder petal extracts were placed
98 in glass vials in a temperature-controlled room (27 ± 2 °C) and monitored until reaching
99 1800 lux, corresponding to daylight, while part of the extracts remained protected from
100 light in a temperature-controlled room (27 ± 2 °C). For temperature, samples of *Clitoria*
101 *ternatea* petal powder extracts were placed in amber glass bottles, protected from light,
102 in a temperature-controlled refrigerator (5 ± 2 °C), and the other part remained in amber
103 glass bottles in a BOD incubator with a temperature of 27 ± 2 °C.

104 **2.4.1 Determination of total anthocyanins in extracts using the single-pH method**

105 The total anthocyanin content was quantitatively determined by
106 spectrophotometric technique (Shimadzu UV-VIS 1800) using the single-pH method and
107 the molar absorptivity coefficient of 29000 L/mol.cm of delphinidin-3-glucoside, with
108 reading at 535 nm, diluted in ethanol H: Cl 1.5 mol L⁻¹ (85:15) (FULEKI; FRANCIS,
109 1968). Results were expressed as mg of delphinidin-3-glucoside per L of extract (mg /L).
110 The absorbance of the diluted sample was calculated according to Equation 1.

111 Total anthocyanin content (mg/L) = $\frac{A \times MM \times FD \times 1000}{e \times l}$ (1)

112 Where MM is the molecular weight of anthocyanin equivalent delphinidin-3-
113 glucoside = 500.8 g/mol, dilution factor (FD) = 10, and the molar absorbance of
114 delphinidin-3-glucoside $e = 29000$ L/mol.cm. The anthocyanin content was calculated
115 from the delphinidin-3-glucoside equivalent.

116 **2.4.2 DPPH antioxidant capacity**

117 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay using the DPPH radical,
118 with absorbance measurements taken at 517 nm (Shimadzu spectrophotometer model
119 UV-VIS 1800). The results will be expressed in μmol of Trolox per gram of sample
120 (BOROSKI et al., 2015).

121 **2.4.3 Objective color analysis and total color difference (ΔE)**

122 The objective analysis of the color of the extracts was determined using a
123 colorimeter ColorQuest[®] XE (Hunterlab, Reston, VA) in reflectance mode and on the
124 CIE Lab scale, using D65/10° illuminant. The hue (h^*) and saturation (C^*) parameters
125 will be calculated from a^* and b^* . The total color difference (ΔE), equation 2, was used
126 to verify the colorimetric stability of extracts about the storage period under controlled
127 light and temperature conditions.

128
$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$
 (2)

129

130 **2.5 Statistical evaluation**

131 RStudio[®] software 4.3.0 was used to obtain the experimental Box-Behnken
132 design. The experimental responses were fitted with a polynomial model, and analysis of
133 variance (ANOVA) was applied to determine the linear, quadratic, and interacting
134 regression coefficients of the model at a 95% significance ($p < 0,05$). The adjustment of
135 the experimental data to the polynomial model was evaluated by the coefficient of
136 determination (R^2), and the significance of the coefficients was analyzed by the *F*-value
137 ($p < 0,05$).

138 The stability experiment was designed using a subdivided plot scheme, with a
139 2x4 factorial and the storage time in the subplot. Three replications produced 24 samples
140 and 72 experimental units.

141

142

143

144

145

146

147

148 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

149 **3.1 Optimized ultrasound-assisted extraction of *Clitoria ternatea* petals powder and**
 150 **effects of independent variables on total anthocyanin content extracted with**
 151 **ChCl: Gly solvents.**

152 The response total anthocyanin ranged from 12.95 to 85.48 mg/L, and the
 153 predicted anthocyanin levels ranged from 12.97 to 82.94 mg/L (Table 2).

154 **Table 2:** Box-Behnken design for independent variables of time, temperature, and
 155 powder: solvent ratio and experimental and response anthocyanin content (TAC).

156

Run	X1 °C	X2 min	X3 %	Time (min)	Temperature (°C)	Powder: solvent (%)	TAC Response (mg DGE/L)	TAC Predicted (mg DGE/L)
1	-1	-1	0	15	40	4,5%	23.31	16.70
2	+1	-1	0	50	40	4,5%	40.80	43.25
3	-1	+1	0	15	80	4,5%	49.54	38.52
4	+1	+1	0	50	80	4,5%	51.48	65.07
5	-1	0	-1	15	60	2%	12.95	22.37
6	+1	0	-1	50	60	2%	32.81	25.39
7	-1	0	+1	15	60	7%	18.56	32.86
8	+1	0	+1	50	60	7%	85.48	82.94
9	0	-1	-1	32,5	40	2%	19.64	12.97
10	0	+1	-1	32,5	80	2%	29.31	34.79
11	0	-1	+1	32,5	40	7%	43.04	46.99
12	0	+1	+1	32,5	80	7%	83.72	68.81
13	0	0	0	32,5	60	4,5%	41.28	40.89
14	0	0	0	32,5	60	4,5%	37.45	40.89
15	0	0	0	32,5	60	4,5%	43.93	40.89

157 X1=temperature; X2=time; X3 powder: solvent ratio. TAC = total anthocyanin content.
 158 DGE – equivalent of delphinidin-3-glucoside.

159

160 The Shapiro-Wilk Residual Normality Test ($p < 0.05$) demonstrated p -value =
 161 0.9037, and the data for this analysis are from a normally distributed population. The
 162 linear effects of temperature, time, and petal/solvent ratio were significant, as was the
 163 interaction between time and powder: solvent ratio (Table 3)

164 **Table 3:** Analysis of the isolated and combined effects of the independent variables of
 165 the extraction process.
 166

Variables	Estimate	Std. Error	t value	p-value
Intercept	40.8869	6.6250	6.1717	0.0016
X1 (L)	13.2755	4.0569	3.2723	0.0221
X2 (L)	10.9085	4.0569	2.6889	0.0433
X3 (L)	17.0096	4.0569	4.1927	0.0086
X1*X2	-3.8855	5.7374	-0.6772	0.5283
X1*X3	11.7645	5.7374	2.0505	0.0955
X2*X3	7.7560	5.7374	1.3518	0.2344
X1 ² (Q)	-3.0381	5.9717	-0.5087	0.6326
X2 ² (Q)	3.4348	5.9717	0.5752	0.5901
X3 ² (Q)	-0.3968	5.9717	-0.0664	0.9496
Intercept	40.8869	2.6383	15.4974	2.554 ⁻⁸
X1 (L)	13.2755	3.6127	3.6747	0.0043
X2 (L)	10.9085	3.6127	3.0195	0.0120
X3 (L)	17.0096	3.6127	4.7083	0.0008
X1*X3	11.7645	5.1091	2.3027	0.0441

167 ^a Statistical significance $p < 0.05$; X1 = Time; X2 = Temperature; X3 = powder:solvent mass ratio;
 168 L= Linear effect; Q = Quadratic effect.

169
 170 The ANOVA analysis used to validate the data fit to the linear model also
 171 evaluated the influence of the factors on the response variables (Table 4). The coefficient
 172 of determination of this experiment was 83.36 %, so the predicted and response
 173 anthocyanin values fit the regression model found. The coefficient of determination R^2
 174 greater than 80% indicates that the equation found describes the experimental values. (DE
 175 FREITAS et al., 2021).

176 **Table 4:** Analysis of variance (ANOVA) of the linear model for the extraction of
 177 anthocyanin content.
 178

	DF	SS	MS	F-value	p-value
X1;X2;X3 (L)	3	4676.50	1558.83	14.9299	0.0005
X*X3	1	553.60	553.61	5.3023	0.0441
Residuals	10	1044.10	104.41		
Lack of fit	8	1 022.90	127.86	12.0712	0.0787
Pure error	2	21.20	10.59		
R ² = 0.8336					

179 ^a Statistical significance $p < 0.05$; SS = Sum of squares; DF = Degrees of freedom; MS = Mean square;
 180 X1 = Time; X2 = Temperature; X3 = powder:solvent mass ratio; L = Linear effect.

181

182 ANOVA validated the predictive equation with the model fit and pure error lower
 183 than the F_Ttab value. The model fit was not significant ($p > 0.05$); therefore, the predicted
 184 equation was validated (equation 7).

$$185 \quad Y = 40,88687 + (13,27552 * X1) + (10,90853 * X2) + (17,00963 * X3) + (11,7645 * X1 * X3)$$

$$186 \quad \text{(Eq. 3)}$$

187 Where:

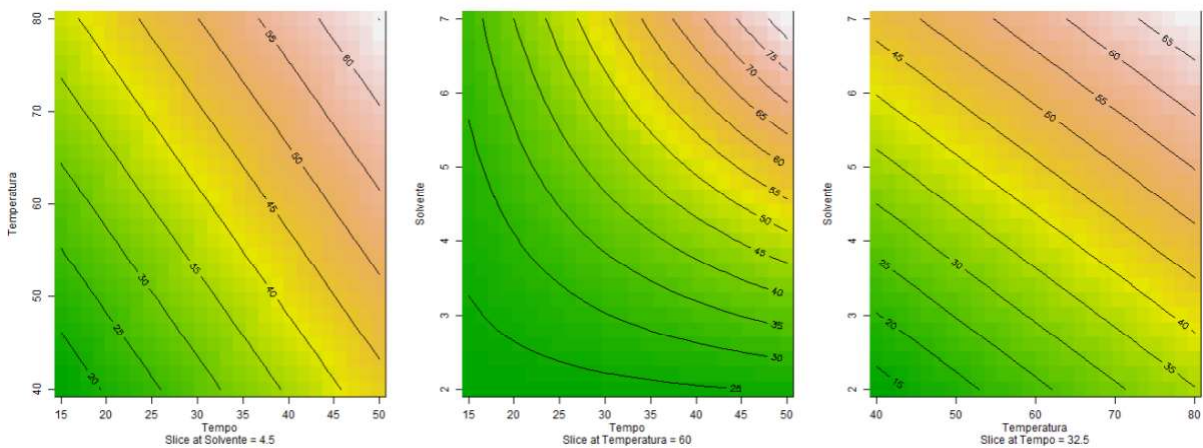
188 Y = total anthocyanin content (mg/L), X1 = temperature, X2 = time, and X3 is the solvent
 189 petal powder mass ratio.

190 According to the predicted equation, for the highest extraction of anthocyanins
 191 ($Y_{\max} = 93.85$ mg/L), the coded values of the variables X1, X2, and X3 are the maximum
 192 coded points (+1).

193 About Y, the variable X1 (temperature), the model demonstrated an optimal
 194 temperature of 80°C to extract anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals powder. This
 195 is because, for extraction using NADEs to be efficient, the solvent must penetrate the
 196 pores of the solid matrix, and its viscosity must be low enough to flow easily, and this

197 only occurs at lower temperatures. However, the high temperature did not seem to hinder
198 the extraction of anthocyanins using the NADES mixture. It is worth mentioning that
199 NADES solvents generally have a high decomposition temperature, and to optimize these
200 alternative solvents, temperatures must be below the decomposition temperature of the
201 eutectic mixture (RIBEIRO *et al.*, 2015). Chong & Gwee (2015) used 50°C to extract
202 anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals using ethanol. According to Santos & Martins
203 (2023), increasing temperature reduces the intensity of the cavitation phenomenon
204 generated by ultrasonic waves and causes the degradation of anthocyanins. These same
205 authors attested that temperature considerably influences the extraction process of
206 anthocyanins from *Clitoria ternatea*. The variable X2 (time) indicates that 50 minutes is
207 an efficient time to extract anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals using NADES.
208 However, 50 minutes may degrade or extract fewer anthocyanins using water. This is
209 because prolonged exposure to ultrasonic waves promotes the disruption of the cell wall
210 and vacuoles and allows the permeation of the solvent and the diffusion of biocompounds,
211 but can also decompose the biocompounds of interest (SUN *et al.*, 2016). The increase in
212 internal energy of the system caused by long extraction processes can cause the rupture
213 of several compounds, such as the structure of the central ring of anthocyanins, generating
214 unstable oxidized compounds (anhydrous and chalcones) (SANTOS; MARTINS, 2023).
215 The variable X3 indicated that the petal/solvent ratio of 7% provides the best total
216 anthocyanin content. NADES have high viscosity due to robust hydrogen interactions,
217 resulting in lower molecule mobility (SAVI *et al.*, 2019). This statement justifies the
218 interaction between variables X1 and X3 in the model. In other words, the temperature
219 favored the depletion of the solvent's viscosity and increased the mobility of the
220 molecules, resulting in better extraction of the compounds. The linear polynomial model
221 demonstrates the effects of temperature, time, and petal /solvent ratio and their

222 interactions on the extraction of anthocyanins from *Clitoria ternatea* petals powder at the
 223 central point of the experiment (Figure 1). The linear effect that time and temperature
 224 have on the response variable with the main point fixed on the variable petal/solvent ratio
 225 (4.5%), that is, the higher the temperature, the greater the extraction of anthocyanins
 226 (Figure 1A). In Figure 1(C), the linear effect on the solvent and temperature variables
 227 with the central point in time is visible (32.5 min). Figure 1(B) shows the interaction
 228 effect between the variables time and petal/solvent ratio in extraction with a central point
 229 fixed at temperature (60°C). Nhut Pham et al. (2019) optimized the extraction of
 230 anthocyanins from *Clitoria ternatea* using 50° ethanol as solvent. They found 132.756
 231 mg/L of total anthocyanins at a solid-liquid ratio of 23:1, extraction time of 46 minutes,
 232 and temperature of 60.6°C. Santos & Martins (2023) observed optimal extraction
 233 conditions at 45°C, 30 minutes, and 300 W of high-power ultrasound power, where
 234 343.18 equivalents of cyanidin-3-glucoside/100 g -1 were extracted in ethanol solvent.



235 **Figure 1-** Contour graph of 2² combinations with the cut at the central points (0)

236 **3.2 Evaluation of the stability of the extracts**

237 **3.2.1 Total anthocyanin content and antioxidant capacity**

238 Table 5 and Figure 2 represent the total anthocyanin content, equivalent to
239 delphinidin-3-glucoside, and antioxidant capacity extracted using solvent water and
240 ChCl: Gly under different storage conditions for 21 days.

241

242

243

244

245

246

247 **Table 5** – Mean values ± standard deviation for measuring antioxidant capacity and total anthocyanin (TAC) content extracted using ChCl: Gly
 248 and solvent water under different storage conditions for 21 days.

Factors/interactions	levels	Antioxidant capacity		P >F ¹	TAC (mg/L)		P>F ¹
		(µmol of Trolox equivalent/mL extract)					
Extracting solvent	ChCl: Gly	156.43 ± 85.52 ^a		<.0001	374.65 ± 47.21 ^a		<.0001
	Water	93.01 ± 37.53 ^b			211.63 ± 56.67 ^b		
Storage conditions	Illumination	101.08 ± 59.05 ^d		<.0001	279.73 ± 106.0 ^c		<.0001
	Lack of light	135.47 ± 80.89 ^b			292.44 ± 97.50 ^b		
	Refrigerated	140.23 ± 80.14 ^a			307.60 ± 89.95 ^a		
	Environment	121.91 ± 67.82 ^c			292.79 ± 98.05 ^b		
Extracting solvent * Storage conditions	Illumination	ChCl: Gly solvent	Water solvent	<.0001	ChCl: Gly solvent	Water solvent	<.0001
		114.81 ± 73.28 ^{A,d}	87.35 ± 38.84 ^{B,c}		365.29 ± 63.47 ^{A,d}	194.18 ± 59.01 ^{B,d}	
		172.43 ± 93.84 ^{A,b}	98.50 ± 43.50 ^{B, a}		367.65 ± 55.94 ^{A,c}	217.23 ± 66.36 ^{B,b}	
		188.93 ± 84.89 ^{A,a}	92.31 ± 35.19 ^{B, ab}		389.41 ± 27.49 ^{A,a}	225.96 ± 40.26 ^{B, a}	
Environment	149.93 ± 81.20 ^{A,c}	93.88 ± 36.19 ^{B, ab}	376.41 ± 35.00 ^{A,b}	209.16 ± 60.13 ^{B,c}			

249 ¹ Significant probabilities (P<0.05) by F test.
 250 For independent factors, means followed by different lowercase letters in the column differ using the t or Tukey tests (P<0.05).
 251 In the interaction, for the same storage condition, in the row, means followed by different capital letters differ from each other using the t-test (P<0.05). For the same extracting
 252 solvent, the means followed by different lowercase letters in the column differ using the Tukey test (P<0.05).

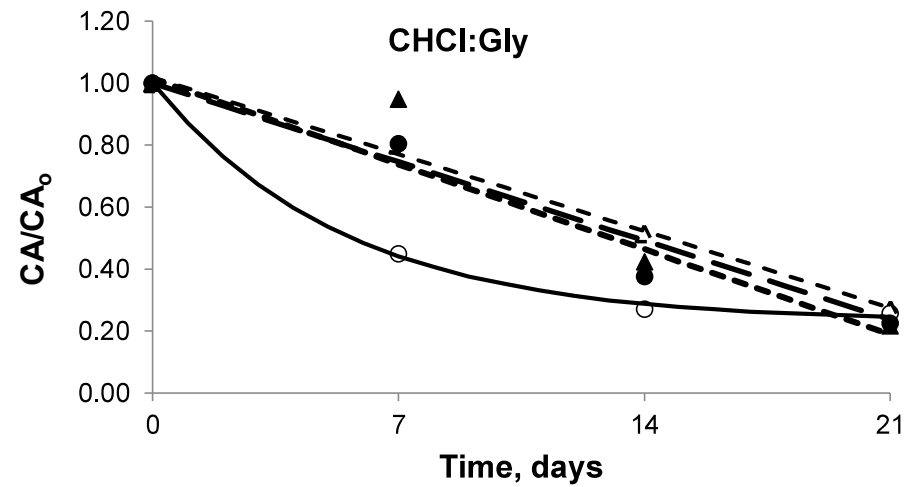
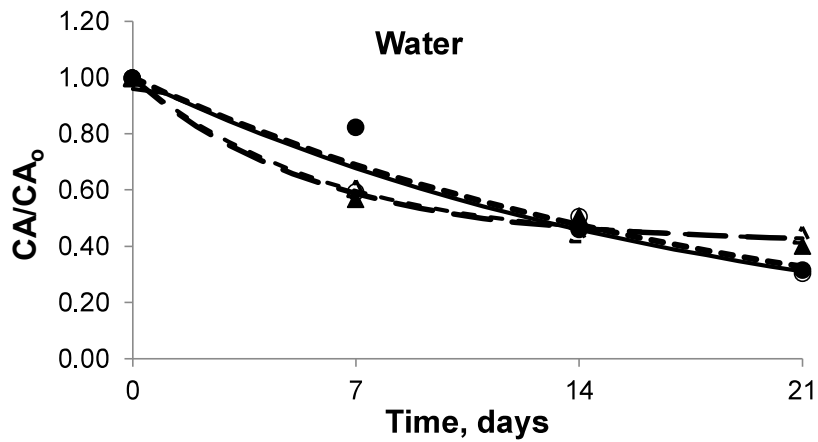
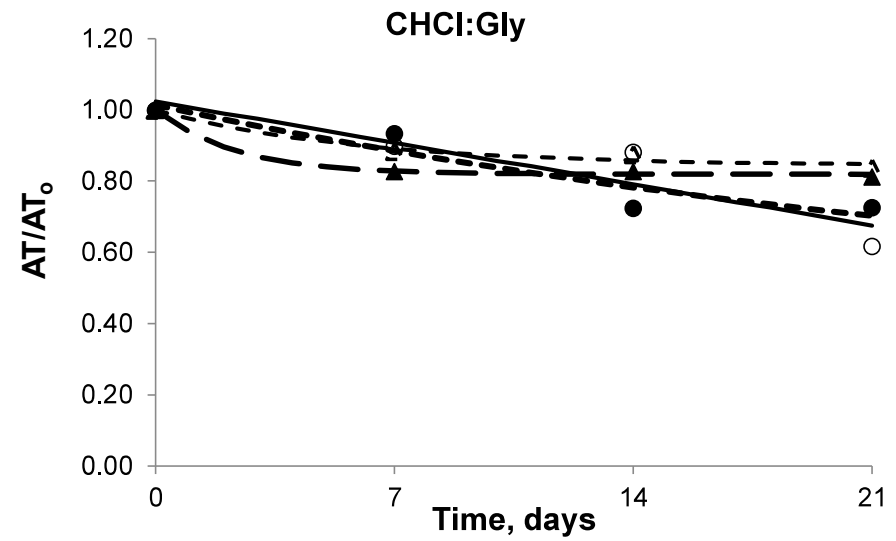
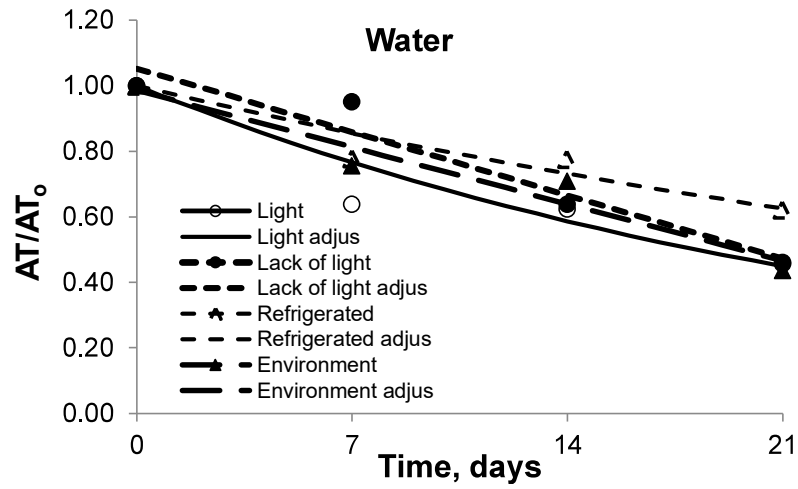


Figure 2 – Variation of total anthocyanins and antioxidant capacity of *Clitoria ternatea* petal powder extracts using water and ChCl: Gly solvents under different storage conditions for 21 days

254 The means of the extracts prepared with the ChCl: Gly solvent showed a higher total
255 anthocyanin (374,65 DGE mg/L) than the averages of the aqueous extracts (211,63 DGE
256 mg/L). These results confirm that, even under the same extraction conditions, ChCl: Gly
257 solvents extracted a higher level of total anthocyanins. It observed that the water solvent
258 extracts had a considerable change in anthocyanins during the 21 days of storage
259 compared to the ChCl: Gly solvent ($P < 0.05$). In the water solvent, there is a decrease in
260 the concentration of anthocyanins, which is less pronounced in the refrigerated storage
261 condition. This showed a loss of 38.0% of the total anthocyanin content at about time
262 zero. For the ChCl: Gly solvent, the loss was 16.3% of the total anthocyanin content with
263 its concentration at time zero. These results indicate that refrigerated ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) treatment
264 is the best condition for storing the extracts and that light can degrade the anthocyanins
265 extracted by the two solvents.

266 The stability of anthocyanins is relevant for their application as a natural colorant and
267 for exerting their beneficial health potential, but several factors can alter their
268 bioavailability. Copigmentation intermolecular analysis of polyacrylate anthocyanin
269 alternatives is responsible for the bluish color of *Clitoria ternatea* petals and also
270 contributes to the stability of anthocyanins since the weak bonds between the molecules
271 result in a hydrophobic and protective effect against degradation reactions (ESCHER;
272 WEN; *et al.*, 2020). According to Araújo (2019), the hydrolysis of the 3-glycosidic bond
273 of anthocyanins only occurs at temperatures above 60°C . Still, the extraction temperature
274 of 80°C using ChCl: Gly solvent was efficient because the stability of the anthocyanins
275 is due to the strong hydrogen bonding interactions between target metabolites, ChCl: Gly
276 molecules, and water, leading to space structure further holding the anthocyanins and
277 protecting from environmental factors (BI *et al.*, 2020). Another factor that may have
278 contributed to the degradation of anthocyanins is light. According to Patras *et al.* (2010),

279 the degradation of anthocyanin molecules can occur through the action of light and is
280 enhanced by the presence of oxygen. In this sense, treatments exposed to the presence of
281 light had significant losses because there was photodegradation of anthocyanins due to
282 light. It is worth noting that the anthocyanins present in the ChCl: Gly extracts but
283 subjected to light were better preserved than the aqueous extracts subjected to the same
284 condition because the low water activity of the solvent stabilizes the anthocyanins since
285 the water molecule is capable of carrying out an attack nucleophilic in the C-2 position
286 of anthocyanin forming a colorless carbinol base (RIGOLON; OLIVEIRA;
287 STRINGHETA, 2021). Due to the low degradation of anthocyanins, ChCl: Gly extracts
288 can have a photoprotective effect as the formation of intermolecular interactions can exert
289 a protective effect against photodegradation. Escher et al. (2020) proved that adding
290 fructooligosaccharides in aqueous extract of *Clitoria ternatea* provided a photoprotective
291 impact against the degradation of anthocyanins.

292 Therefore, the best conditions for removing and storing the anthocyanins of *Clitoria*
293 *ternatea* petal powder extracts are extraction with the solvent ChCl: Gly stored at
294 refrigerated temperatures (5°C) and without light.

295 The means of the extracts prepared with the ChCl: Gly solvent showed a larger
296 antioxidant capacity (156,43 µmol/mL) than the averages of the aqueous extracts (93,01
297 µmol/mL). Although, during storage, the treatments decreased the antioxidant capacity
298 similarly, there was a substantial loss of antioxidant capacity in ChCl: Gly solvent extracts
299 than in aqueous solvent extracts during the 21 days of storage under different conditions.
300 In the aqueous solvent extracts, there was a loss of antioxidant capacity of 55.8%
301 compared to 73.0% in the extracts obtained with the ChCl: Gly solvent about its

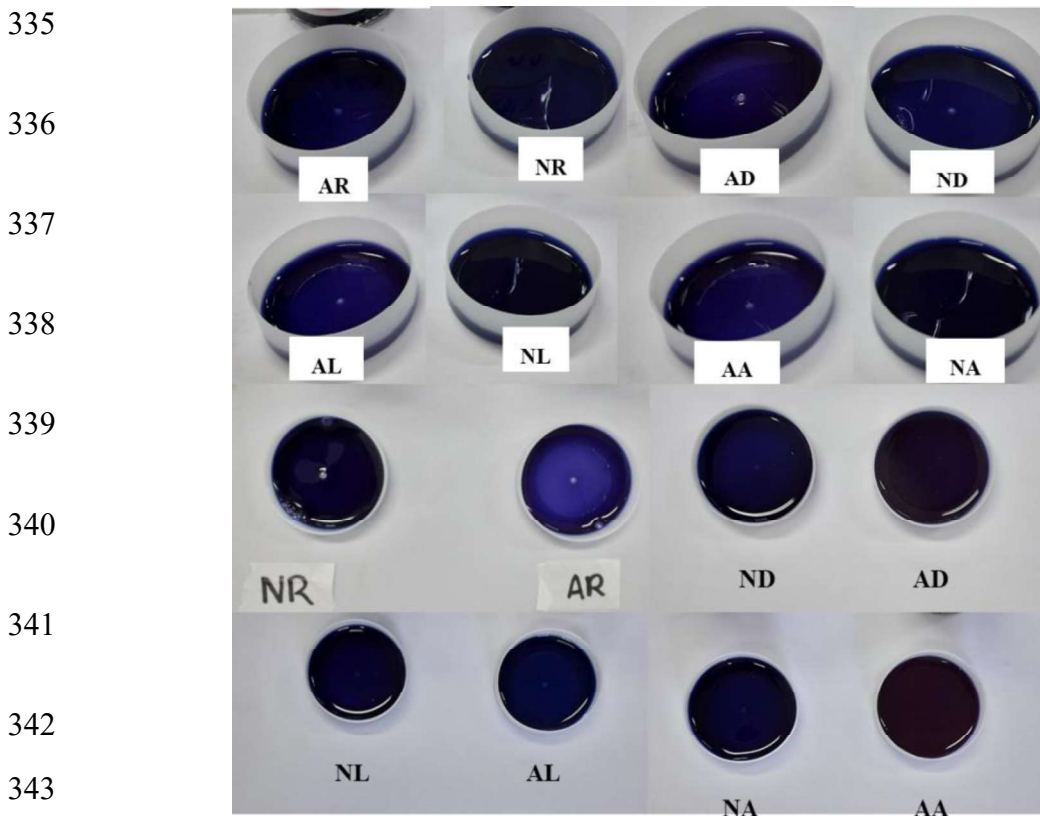
302 concentration at time zero. The ideal treatment to preserve the antioxidant capacity of
303 extracts is to keep them refrigerated (5°C) and in the absence of light.

304 Mehmoode et al. (2019) found 931.46 and 11,720.33 µmol of Trolox /g dry weight
305 of freeze-dried extracts of *Clitoria ternatea* petals using high-power ultrasound.
306 According to these same authors, ultrasound enabled greater efficiency in the extraction
307 of bioactive compounds than conventional extraction, resulting in more significant
308 antioxidant potential. Shahidi & Ambigaipalan (2015) reported an antioxidant capacity
309 of only 4.16 µmol of Trolox /g and 0.76 mg/mL (ABTS and DPPH, respectively) in
310 lyophilized extracts of *Clitoria ternatea* extracted conventionally. It is worth adding that
311 the antioxidant capacity found in each research depends on many variables, such as
312 extraction time, raw material, and solvent used. Even though there is a significant
313 correlation between antioxidant activity and anthocyanin content, as demonstrated by
314 Escher et al. (2020), antioxidant compounds, which are highly unstable free radicals, were
315 degraded. The different chemical structures of phenolic antioxidants stabilize free
316 radicals by donating hydrogen atoms and electrons to the chelating power of metal ions
317 due to the rearrangement of hydroxy/ methoxy and carbonyl groups. Therefore, phenolic
318 compounds are primary oxidants that eliminate free radicals, delay the initiation stage, or
319 otherwise interrupt the propagation stage of lipid oxidation. (SHAHIDI;
320 AMBIGAIPALAN, 2015). This property appeals to the food industry because the
321 decomposition of volatile compounds (aldehydes and ketones) causes “rancidity.” Due to
322 its high levels of phenolic compounds, *Clitoria ternatea* petal extract is a potential
323 oxidizing agent for the food industry and the development of potentially functional food
324 products. Since phenolic antioxidants also provide antioxidant activity, they are a
325 potential oxidizing agent for the food industry and the development of potentially
326 applicable food products. Also, phenolic antioxidants provide antioxidant activity against

327 free radicals in cellular metabolism, as reported using *Clitoria ternatea* extracts in vivo
328 studies. (ESCHER; MARQUES; *et al.*, 2020; VERMA; ITANKAR; ARORA, 2013).

329 3.2.2 Objective color analysis and total color difference (ΔE)

330 Photographs were recorded of the extracts on the day of extraction and the twenty-
331 first day of storage (Figure 3). On day 0, the extracts appear to have the same bluish color.
332 However, the visual records from day 21 demonstrate the different colors the water
333 solvent extracts acquired and the apparent homogeneity in the color of the ChCl: Gly
334 extracts.



344 **Figure 3.** Photographic records of extracts on days 0 and 21 of storage under different
345 storage conditions.

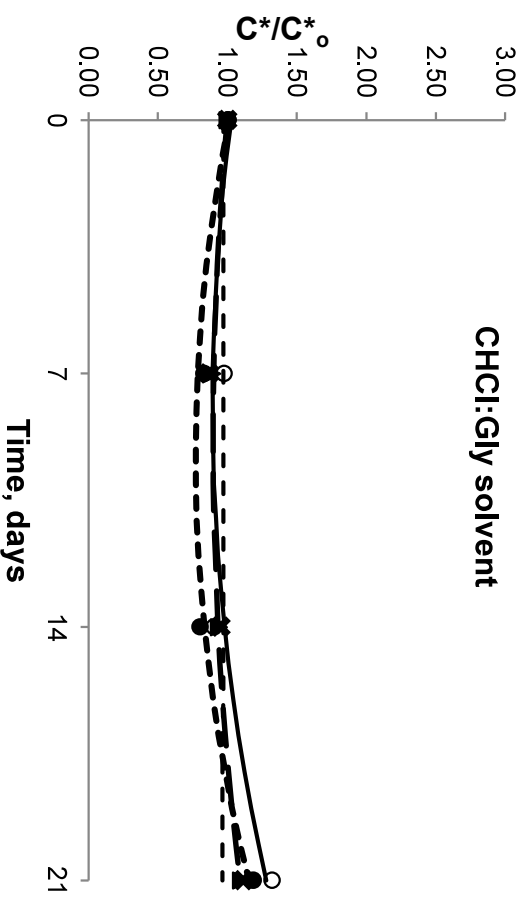
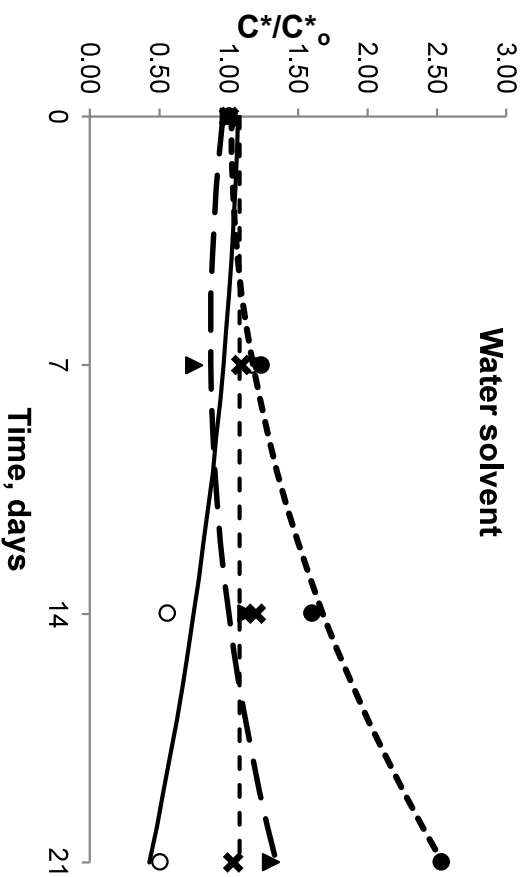
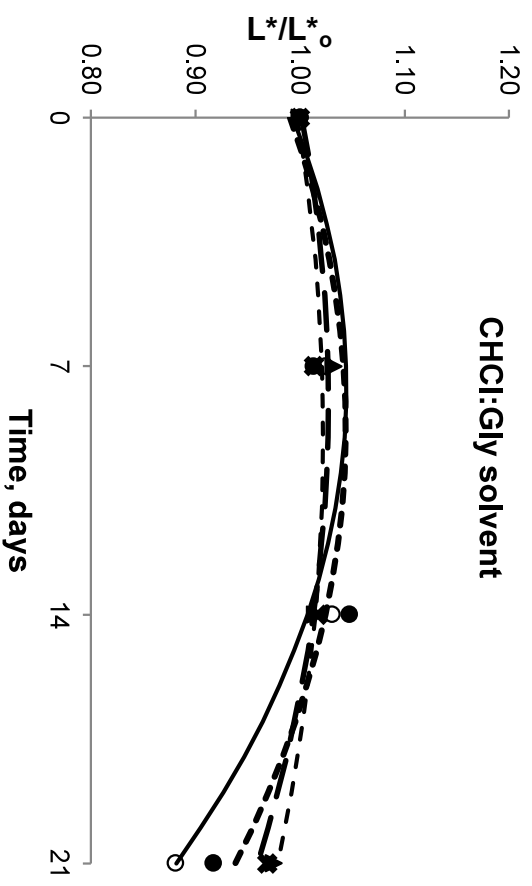
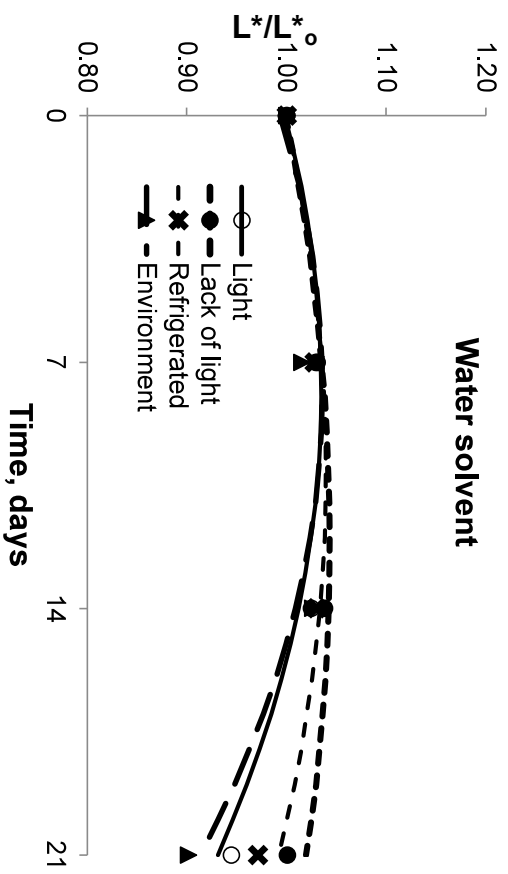
346

347 The attributes of color: L^* , C^* , h^* , and overall color variation (ΔE^*) obtained using
348 solvents water and ChCl: Gly under different storage conditions for 21 days are
349 represented in Table 6 and Figure 3.

350 **Table 6** –Mean values \pm standard deviation for color attribute values using ChCl: Gly and solvent water under different storage conditions
 351 for 21 days.

Factors/interactions	Levels	Color attribute		P > F ¹	Color attribute		P > F ¹
		L* value		c* value			
Extracting solvent	ChCl: Gly	25.55 \pm 1.09 ^a		<.0001	1.36 \pm 0.18 ^a		<.0001
	Water	26.25 \pm 0.91 ^b			2.13 \pm 0.90 ^b		
Storage conditions	Illumination	25.77 \pm 1.37 ^c		<.0001	1.53 \pm 0.48 ^c		<.0001
	Lack of light	25.93 \pm 1.13 ^b			2.25 \pm 1.30 ^a		
	Refrigerated	26.00 \pm 0.67 ^a			1.66 \pm 0.34 ^b		
	Environment	25.90 \pm 1.02 ^b			1.53 \pm 0.35 ^c		
Extracting solvent * Storage conditions	Illumination	ChCl: Gly	Water solvent	<.0001	ChCl: Gly	Water solvent	<.0001
		25.37 \pm 1.64 ^{B,c}	26.18 \pm 0.93 ^{A,c}		1.39 \pm 0.24 ^B	1.67 \pm 0.62 ^{A,d}	
		25.31 \pm 1.27 ^{B,c}	26.54 \pm 0.46 ^{A,a}		1.38 \pm 0.24 ^B	3.12 \pm 1.20 ^{A,a}	
		25.68 \pm 0.52 ^{B,b}	26.33 \pm 0.66 ^{A,b}		1.36 \pm 0.13 ^B	1.95 \pm 0.16 ^{A,b}	
Environment	25.84 \pm 0.56 ^{B,a}	25.96 \pm 1.36 ^{A,d}	1.30 \pm 0.12 ^B	1.77 \pm 0.36 ^{A,c}			
		h* value, in degrees		Delta E			
Extracting solvent	ChCl: Gly	343.33 \pm 4.42 ^a		<.0001	0.76 \pm 0.82 ^b		<.0001
	Water	346.50 \pm 13.52 ^b			1.05 \pm 0.91 ^a		
Storage conditions	Illumination	342.71 \pm 14.4 ^b		<.0001	1.09 \pm 1.01 ^a		<.0001
	Lack of light	350.08 \pm 6.90 ^a			1.16 \pm 1.01 ^a		
	Refrigerated	343.75 \pm 10.4 ^b			0.60 \pm 0.46 ^c		
	Environment	343.11 \pm 4.77 ^b			0.76 \pm 0.81 ^b		
Extracting solvent * Storage conditions	Illumination	ChCl: Gly solvent	Water solvent	<.0001	ChCl: Gly	Water solvent	<.0001
		342.20 \pm 4.24	343.21 \pm 20.4 ^b		1.15 \pm 1.23 ^{A,a}	1.03 \pm 0.78 ^{B,b}	
		344.07 \pm 4.10 ^B	356.08 \pm 1.99 ^{A,a}		0.96 \pm 0.86 ^{B,b}	1.37 \pm 1.15 ^{A,a}	
		344.22 \pm 5.57	343.28 \pm 13.9 ^b		0.45 \pm 0.35 ^{B,c}	0.75 \pm 0.53 ^{A,c}	
Environment	342.81 \pm 3.79	343.41 \pm 5.74 ^b	0.49 \pm 0.35 ^{B,c}	1.03 \pm 1.04 ^{A,b}			

352 ¹ Significant probabilities (P<0.05) by F test.
 353 For independent factors, means followed by different lowercase letters in the column differ using the t or Tukey tests (P<0.05).
 354 In the interaction, for the same storage condition, in the row, means followed by different capital letters differ from each other using the t-test (P<0.05). For the same
 355 extracting solvent, the means followed by different lowercase letters in the column differ using the Tukey test (P<0.05).
 356



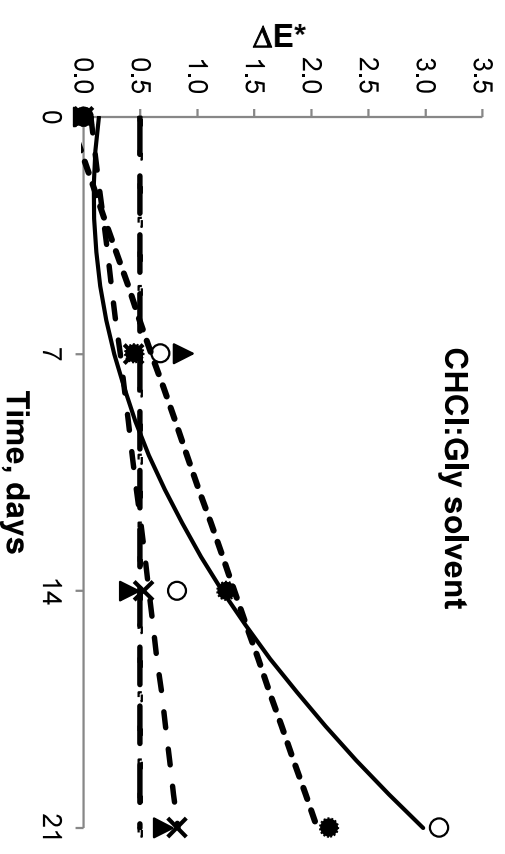
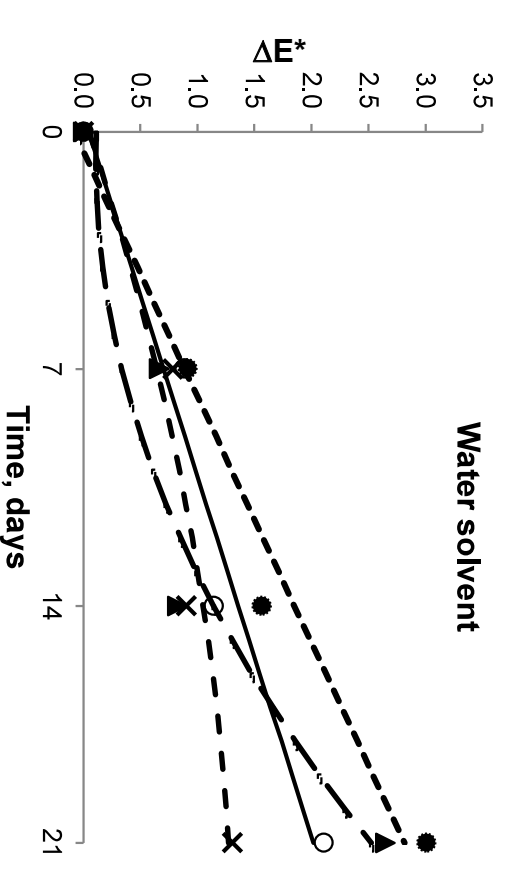
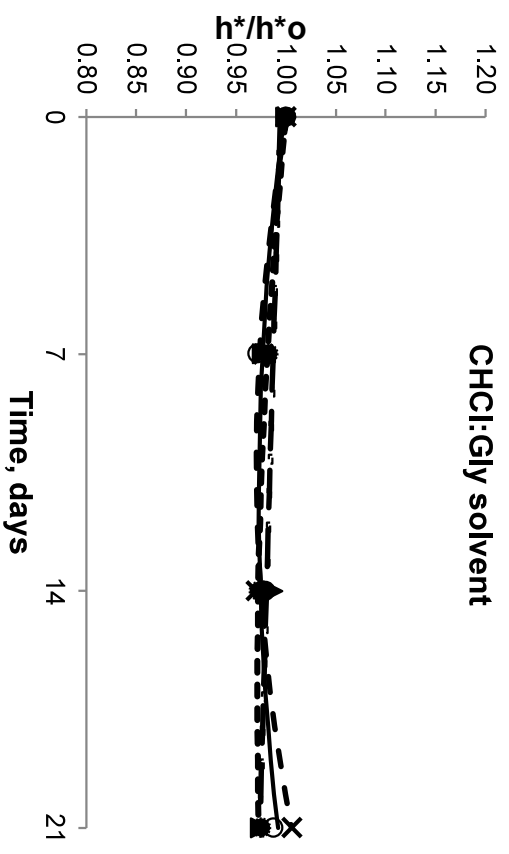
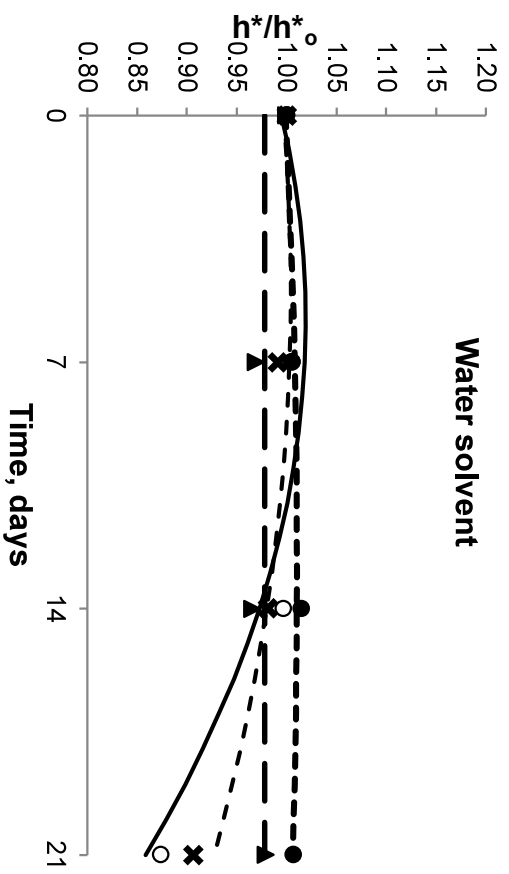


Figure 4 – Variation of color attributes of *Clitoria ternatea* petal powder extracts using water and CHCl₃:Gly under different storage conditions for 21 days.

358 It is possible to perceive the effect of storage time of *Clitoria ternatea* petal
359 powder extracts using water and CHCl: Gly solvents during 21 days of storage under
360 different storage conditions ($p < 0.05$) (Figure 4).

361 The water solvent extracts showed a 9.8% change in luminosity (L^* value) after 21 days
362 of storage in the light storage condition, indicating that the extracts in this condition were
363 slightly lighter ($p < 0.05$). However, in the lack of light condition, there was no change in
364 the luminosity of the extracts ($p < 0.05$). For the extracts obtained from the ChCl: Gly
365 solvent, there was a change of 2.5% in the environment condition and 12.0% in the
366 illumination treatment. The storage conditions changed the luminosity of the two extracts
367 a little.

368 For the tonality attribute (h^* value), there was no change in the environment and
369 lack of light conditions for the extracts obtained with the solvent water ($p < 0.05$), with a
370 loss of 12.7% of this attribute in the illumination condition after 21 days of storage. From
371 Figure 4, for the extracts obtained with the ChCl: Gly solvent, the variations between
372 storage conditions were slightly more minor, with an increase in tone of 0.6% in the
373 refrigerated condition and a loss of 2.6% in the ambient condition after 21 days of storage.
374 Therefore, the tone was very little affected between the extracts obtained by the two
375 extracting solvents.

376 In the case of saturation, c^* value, in the lack of light condition, there was an
377 increase of 152.7% and a loss of 49.8% of this attribute in the light condition for the
378 extracts obtained with the solvent water. From Figure 2, the variations between storage
379 conditions were slightly smaller for the extracts obtained with the ChCl: Gly solvent, with
380 an increase in saturation of 31.6% in the light condition and 9.6% in the environment
381 condition after 21 days of storage.

382 According to the overall color variation (ΔE^*) with storage time, there were more
383 significant changes with storage time for the water solvent for the four conditions, less
384 pronounced in the refrigerated condition ($\Delta E^*=0.75$). For the extracts obtained with the
385 ChCl: Gly solvent, there was no variation in the ΔE^* value in the environment condition.
386 For the light and lack of light conditions, there were more significant changes in the color
387 impression of the extracts, with storage time (211.7% and 115.1%, respectively) being
388 smaller for the refrigerated condition (18,1%).

389 Due to the treatment's total color difference, it is possible to study the color
390 analysis better than just observing the L^* a^* b^* parameters in isolation (BORDIM et al.,
391 2023). It is worth mentioning that color changes occur due to oxidation reactions and
392 physical changes that may occur during storage, such as exposure to light or temperature.
393 According to Escher et al. (2020), the medium's pH is another factor that can interfere
394 with the color stability of the extracts, with the violet-to-blue color of the *Clitoria ternatea*
395 extract occurring between pH 3.21 and 7.19. Between pH 3 and 5, the red flavyl cation
396 and two tautomers of the neutral blue quinonoid species in equilibrium produce the violet
397 color in the *Clitoria ternatea* extract, and between pH 5 and 7, the extract contains
398 predominantly blue neutral (ABDULLAH; LEE; LEE, 2010).

399 Santos & Martins (2023) found lower values for a^* (5.0) and higher values for b^*
400 (-10.32) in extracts of *Clitoria ternatea* petals extracted by reflux compared to extracts
401 obtained by ultrasound. According to these same authors, the results indicate that the
402 extract obtained by reflux tends to bring forward a yellowish-green color because of the
403 chalcone compounds and anhydrous bases formed by the degradation of anthocyanins by
404 temperature. In this study, extracts obtained using water as solvent also showed higher a^*
405 values; however, the analysis of variance where used the color space parameters L^* C^*

406 h* because analysis of variance of the L* a* b* parameters is not indicated separately
407 (MCGUIRE, 1992).

408 The main areas of food technology consider the study of color to be a principal aspect of
409 the appearance of products because if a food does not have a good appearance, the
410 consumer will not evaluate factors such as flavor and texture (DO NASCIMENTO et al.,
411 2024). Monitoring food quality is essential for maintaining colorimetric standards and
412 detecting changes in product colors using the L*a*b* or L* c* h* scales.

413

414 **4. CONCLUSION**

415 A Box-Behnken design evaluated the effects of variables on ultrasound-assisted
416 extraction of anthocyanin content extracted by the natural deep eutectic solvent of choline
417 chloride, glycerol, and water (ChCl: Gly). According to the polynomial model found, all
418 process variables influenced the extraction of anthocyanins. The results showed that for
419 anthocyanin extraction, the optimal conditions were obtained at 80°C, 60 minutes, and a
420 petal/solvent ratio of 7%. ChCl: Gly solvents extracted higher levels of total
421 anthocyanins. During storage, all treatments showed losses of anthocyanins, changes in
422 antioxidant activity, and total color difference. ChCl: GLy extract kept under refrigeration
423 degraded only 16% of the anthocyanin content, and the ChCl: Gly extracts visually
424 preserved the bluish color during 21 days of storage. Optimizing the ultrasonographic
425 extraction process of *Clitoria ternatea* petals using the green solvent of ChCl: Gly is an
426 effective alternative to produce extracts with high levels of anthocyanins and bioactive
427 compounds advantages for the food, pharmaceutical, and cosmetic industries.

428 **5. DECLARATIONS**

429 **FINANCING/SUPPORT AGENCY:**

430 The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education
431 Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001, the Minas Gerais Research
432 Foundation (FAPEMIG, Brazil) for funding the project) [APQ-02737-18] and the
433 Coordination for the Improvement of Personnel Higher Education - Brazil (CAPES) -
434 Financing Code 001.

435 **FINANCIAL INTERESTS:**

436 The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

437 **6. REFERENCES**

- 438 Abdullah, R., Lee, P. M., & Lee, K. H. (2010). Multiple color and pH stability of floral
439 anthocyanin extract: *Clitoria ternatea*. In IEEE (Ed.), *CSSR 2010 - 2010 International*
440 *Conference on Science and Social Research* (pp. 254–258). IEEE Computer Society.
441 <https://doi.org/10.1109/CSSR.2010.5773778>.
- 442 Ameer, K., Bae, S. W., Jo, Y., Chung, N., Gao, Y., & Kwon, J. H. (2017). Optimization
443 and modeling for heat reflux extraction of total yield, stevioside, and rebaudioside-A from
444 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leave. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*,
445 52(7), 1193–1205. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1285313>.
- 446 Bordim, J., Marques, C., Calegari, M. A., Oldoni, T. L. C., & Mitterer-Daltoé, M. L.
447 (2023). Potential effect of naturally colored antioxidants from *Moringa oleifera*, propolis,
448 and grape pomace - Evaluation of color and shelf life of chicken paté. *Food Chemistry*
449 *Advances*, 3, 100409. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2023.100409>.

450 Boroski, M., Visentainer, J. V., Cottica, S. M., & Morais, D. R. (2015). Antioxidantes
451 Princípios e Métodos Analíticos. In *Appris* (Issue 1st).

452 Box, A. G. E. P., & Behnken, A. & D. W. (1960). Some New Three-Level Designs for
453 the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 2 (4), 455–475.
454 <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>

455 de Freitas, T. S. M., de Menezes, G. R., Fakhouri, F. M., da Silva, C., Cardoso, A. C. L.,
456 Velasco, J. I., Tostes Filgueiras, C., & dos Santos Garcia, V. A. (2021). Application of
457 the Box–Behnken experimental design for the extraction of phenolic compounds from
458 araçá-roxo (*Psidium myrtoides*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3).
459 <https://doi.org/10.1111/jfpp.15260>.

460 Ding, Y., Zheng, J., Xia, X., Ren, T., & Kan, J. (2016). Box–Behnken design for the
461 optimization of nanoscale retrograded starch formation by high-power ultrasonication.
462 *LWT - Food Science and Technology*, 67, 206–213.
463 <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.11.022>.

464 do Nascimento, J. V., Silva, K. A., Giuliangeli, V. C., Mendes, A. L. D., Piai, L. P.,
465 Michels, R. N., Dal Bosco, T. C., Ströher, G. R., & Shirai, M. A. (2024). Starch-PVA
466 based films with *Clitoria ternatea* flower extract: Characterization, phenolic compounds
467 release and compostability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 255,
468 128232. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.128232>.

469 Escher, G. B., Marques, M. B., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Furtado, M. M.,
470 Sant’Ana, A. S., da Silva, M. C., Genovese, M. I., Wen, M., Zhang, L., Oh, W. Y.,
471 Shahidi, F., Rosso, N. D., & Granato, D. (2020). *Clitoria ternatea* L. petal bioactive
472 compounds display antioxidant, antihemolytic, and antihypertensive effects, inhibit α -

473 amylase and α -glucosidase activities, and reduce human LDL cholesterol and DNA-
474 induced oxidation. *Food Research International*, 128, 108763.
475 <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108763>.

476 Escher, G. B., Wen, M., Zhang, L., Rosso, N. D., & Granato, D. (2020). Phenolic
477 composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria*
478 *ternatea* L. (butterfly pea) blue petals. *Food Chemistry*, 331, 127341.
479 <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127341>.

480 Ivanović, M., Alañón, M. E., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2018).
481 Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-
482 made natural deep eutectic solvents. *Food Research International*, 111, 67–76.
483 <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.05.014>.

484 Kumar, R. (2017). Phytochemical and antibacterial activities of crude leaf and root
485 extracts of *Clitoria ternatea* varieties (Fabaceae). *Journal of Pharmacognosy and*
486 *Phytochemistry*, 6(6), 1104–1108.

487 Lin, S., Meng, X., Tan, C., Tong, Y., Wan, M., Wang, M., Zhao, Y., Deng, H., Kong, Y.,
488 & Ma, Y. (2022). Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia*
489 *melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep eutectic
490 solvent extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 89, 106102.
491 <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.106102>.

492 McGuire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*,
493 27(12), 1254–1255. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254>.

494 Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., Yaqoob, S., Safdar, B., NADEsem, M., Munir, M., &
495 Wang, C. (2019). Impact of ultrasound and conventional extraction techniques on

496 bioactive compounds and biological activities of blue butterfly pea flower (*Clitoria*
497 *ternatea* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 12–19.
498 <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.10.013>.

499 Nithianantham, K., Shyamala, M., Chen, Y., Latha, L. Y., Jothy, S. L., & Sasidharan, S.
500 (2011). Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract against paracetamol-
501 induced damage in mice. *Molecules*, 16 (12), 10134–10145.
502 <https://doi.org/10.3390/molecules161210134>.

503 Palos-Hernández, A., Gutiérrez Fernández, M. Y., Escuadra Burrieza, J., Pérez-Iglesias,
504 J. L., & González-Paramás, A. M. (2022). Green extracts rich in phenolic compounds
505 from underexploited food by-products can be obtained using natural deep eutectic
506 solvents. Opportunities and challenges. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29,
507 100773. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2022.100773>.

508 Raspe, D. T., Ciotta, S. R., Zorzenon, M. R. T., Dacome, A. S., da Silva, C., Milani, P.
509 G., & da Costa, S. C. (2021). Ultrasound-assisted extraction of compounds from Stevia
510 leaf pretreated with ethanol. *Industrial Crops and Products*, 172, 114035.
511 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114035>.

512 Raspe, D. T., da Silva, C., & da Costa, S. C. (2022). Compounds from *Stevia Rebaudiana*
513 *Bertoni's* leaves: An overview of non-conventional extraction methods and challenges.
514 *Food Bioscience*, 46, 101593. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101593>.

515 Ribeiro, B. D., Florindo, C., C. Iff, L., A. Z. Coelho, M., & M. Marrucho, I. (2015).
516 Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *ACS*
517 *Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(10), 2469–2477.
518 <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>.

519 Rigolon, T. C. B., Oliveira, I. R. N. de, & Stringheta, P. C. (2021). Antocianinas. In P. C.
520 Stringheta & P. A. V. de Freitas (Eds.), *Corantes Naturais: da diversidade da natureza*
521 *as aplicações e benefícios* (1st ed., p. 475).

522 Santos, L. G., & Martins, V. G. (2023). Optimization of the green extraction of
523 polyphenols from the edible flower *Clitoria ternatea* by high-power ultrasound: A
524 comparative study with conventional extraction techniques. *Journal of Applied Research*
525 *on Medicinal and Aromatic Plants*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100458>.

526 Savi, L. K., Dias, M. C. G. C., Carpine, D., Waszczyński, N., Ribani, R. H., & Haminiuk,
527 C. W. I. (2019). Natural deep eutectic solvents (NADEs) based on citric acid and sucrose
528 as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect
529 on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science*
530 *and Technology*, 54(3), 898–907. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14013>.

531 Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages,
532 and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional*
533 *Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.018>.

534 Sun, J., Mei, Z., Tang, Y., Ding, L., Jiang, G., Zhang, C., Sun, A., & Bai, W. (2016).
535 Stability, antioxidant capacity, and degradation kinetics of pelargonidin-3-glucoside
536 exposed to ultrasound power at low temperature. *Molecules*, 21(9).
537 <https://doi.org/10.3390/molecules21091109>.

538 Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2017). Greener organic solvents in analytical
539 chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 1–4.
540 <https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2017.03.002>.

541 Verma, P. R., Itankar, P. R., & Arora, S. K. (2013). Evaluation of antidiabetic
542 antihyperlipidemic and pancreatic regeneration, potential of aerial parts of *Clitoria*
543 *ternatea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 819–829.
544 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500015>.