

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ÉRIKA DE FÁTIMA DOS SANTOS

Citotoxicidade, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral de extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] com alta concentração de antocianinas

Juiz de Fora

2025

Érika de Fátima dos Santos

Citotoxicidade, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral de extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] com alta concentração de antocianinas

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Campolina Machado

Coorientadoras: Prof^a Dr^a Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti e Prof^a Dr^a Jacy Gameiro

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Érika de Fátima dos .

Citotoxicidade, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral de extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumacher.) Morrone] com alta concentração de antocianinas / Érika de Fátima dos Santos. – 2025.

82 p.

Orientador: Juarez Campolina Machado

Coorientadora: Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. Compostos bioativos. 2. Efeitos biológicos. 3. Estresse oxidativo. 4. Flavonoides. 5. Citocinas. I. Machado, Juarez Campolina, orient. II. Potente Dutra Luquetti, Sheila Cristina, coorient. III. Título.

Érika de Fátima dos Santos

Citotoxicidade, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral de extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] com alta concentração de antocianinas

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de Agosto de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nicolas Pinto - Titular

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcelo Porto Bemquerer - Titular

Embrapa Gado de Leite

Dr^a Lívia Bordalo Tonucci - Suplente

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a Lisiane Lopes da Conceição - Suplente

Universidade Federal de Uberlândia

Agradeço a Deus, por me conceder força nos momentos difíceis, sabedoria para seguir em frente e bênçãos que permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, expresso minha mais profunda gratidão por terem me guiado com amor e apoio em cada etapa dos meus estudos e por terem investido com dedicação incondicional na minha formação.

À minha irmã, pelas palavras de carinho e apoio durante essa jornada, que foram fundamentais para que eu seguisse em frente. Sou imensamente grata por tê-la como irmã e por tê-la ao meu lado.

Ao meu esposo, minha gratidão mais profunda. Durante todo este processo, ele foi apoio, equilíbrio e presença, mesmo nas minhas ausências. Esteve ao meu lado com paciência, carinho e compreensão. Sua calma, seu amor e seu incentivo foram fundamentais para que eu seguisse firme.

À minha sogra, que, como professora, sempre valorizou a educação e soube reconhecer, com sensibilidade, a afinidade que eu tinha com a vida acadêmica. Agradeço pelo apoio e pelas palavras de encorajamento.

Aos meus queridos amigos e familiares que estiveram ao meu lado durante toda a minha jornada acadêmica, obrigada por me apoiarem e compreenderem quando não pude estar presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juarez Campolina Machado, minha sincera gratidão. Sua orientação foi marcada não apenas pelo conhecimento e compromisso com a pesquisa, mas também pela generosidade, empatia e humanidade com que conduz cada etapa do processo. Sempre solícito, educado e disposto a ajudar, fez com que eu me sentisse acolhida e confiante ao longo desta jornada. É uma alegria e uma honra tê-lo como orientador, e sou imensamente grata por tê-lo encontrado no meu caminho acadêmico.

À minha microbiologista favorita, Prof^a Dr^a Alessandra Barbosa Ferreira Machado, minha profunda gratidão por sua presença e apoio ao longo de todo o processo, que foram fundamentais. Alessandra é o exemplo de mulher que inspira não só pelo conhecimento, mas principalmente pela humanidade com que exerce seus papéis: professora, pesquisadora, microbiologista, nutricionista, atleta e mãe. Sempre acolhedora, sensível, forte e disposta a ajudar, é uma mulher de garra e coragem, que acredita no potencial dos seus alunos. Tê-la por perto foi um presente e uma inspiração. Sou imensamente grata por tudo o que ela representa e pelo impacto tão positivo que teve na minha caminhada. Além de ter disponibilizado o laboratório CEMIC para as análises desta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti, minha eterna gratidão. Foi ela quem plantou em mim a semente da curiosidade científica, e foi através dela que tive a oportunidade de conhecer outros profissionais incríveis, como o professor Juarez e a professora Alessandra. A Sheila é uma professora admirável, generosa, animada...uma inspiração. Sua simplicidade, força e dedicação à docência e à pesquisa fazem dela uma referência para todos ao seu redor. Sou imensamente grata por tê-la no meu caminho, por todo apoio e assistência, e por cada oportunidade que me proporcionou, além de ter disponibilizado seu laboratório de Nutrição Experimental para as análises desta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a Jacy Gameiro, agradeço sinceramente por toda a colaboração e apoio durante esta trajetória. Sua generosidade em compartilhar seu conhecimento e por ter disponibilizado seu laboratório de Imunologia para a realização das minhas análises foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sou grata pela receptividade, dedicação e confiança durante esse processo.

À Gabriela Alpino, minha sincera gratidão pela parceria e amizade ao longo desta jornada. A sua companhia nos momentos de cansaço e dificuldade fez toda a diferença. Agradeço pelas conversas, pelo apoio emocional nas horas de fragilidade

e pelos momentos de descontração nos cafezinhos e sessões de escrita até tarde no laboratório. Sua presença tornou essa caminhada mais leve e inspiradora.

Ao pesquisador Humberto Brandão, pela parceria com o Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite e por todo o seu conhecimento compartilhado. À pesquisadora Michelle Loures, minha sincera gratidão pela parceria, que possibilitou a realização das análises por UPLC-MS/MS. Sua dedicação, atenção e disponibilidade foram cruciais. Ao pesquisador Marcelo Bemquerer, agradeço pela disponibilidade, atenção e apoio. Estendo meus agradecimentos a todos do Laboratório de Nanotecnologia pela colaboração generosa, sempre marcada por cordialidade, profissionalismo e grande comprometimento.

À pesquisadora Cecília Nogueira, agradeço pela disponibilidade em compartilhar seu conhecimento e pelo apoio prestado. Estendo meu agradecimento à pesquisadora Julieta de Jesus, por ter disponibilizado o Laboratório de Antocianinas para a realização das análises.

Ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen, da Embrapa Gado de Leite, agradeço por ter disponibilizado o ultrafreezer para o armazenamento das amostras e pelos demais materiais fornecidos.

À Lívia Gamarrano e à Letícia Gomes, minha gratidão pelo conhecimento compartilhado e pelo apoio prestado, que foram importantes ao longo desta trajetória.

Ao João Pablo, técnico do Laboratório de Análise Instrumental em Nutrição; à Brenda, técnica do Laboratório de Composição Nutricional; e ao Rogério, técnico do LIP, deixo minha sincera gratidão por toda a assistência, atenção e prestatividade ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Henrique Teixeira, agradeço por ter disponibilizado seu equipamento para a realização das análises de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Gilson Macedo, pela gentileza em disponibilizar seu equipamento durante as análises do protocolo INFOGEST.

À banca examinadora, pelo aceite do convite.

Agradeço à CAPES, FAPEMIG, CNPq, UNIPASTO e à Embrapa Gado de Leite pelo apoio institucional e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, pela oportunidade de especialização e de obtenção do título.

RESUMO

A busca por compostos bioativos de origem natural tem impulsionado a pesquisa por fontes promissoras, como o capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone], especificamente o genótipo T_44.1, que se destaca pelo seu alto teor de antocianinas. Este estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade e as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral do extrato de capim-elefante, bem como sua bioacessibilidade após digestão simulada. Os extratos foram obtidos por extração aquosa e hidroalcoólica (etanol:água, 70:30 v/v), seguidas de rotaevaporação a 30 °C e 40 °C, e posterior liofilização. A cianidina-3-glicosídeo foi identificada e quantificada por UPLC-MS/MS. A citotoxicidade foi avaliada em células (WI-38) e em macrófagos (RAW 264.7) por meio do ensaio de viabilidade celular (MTT). As atividades antioxidante e antitumoral (em células MCF-7) também foram investigadas, assim como a capacidade anti-inflamatória em macrófagos. No ensaio MTT, o extrato apresentou viabilidade celular $\geq 70\%$ nas linhagens WI-38 e RAW 264.7 até a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro*, indicando potencial segurança. Os extratos apresentaram atividade antioxidante nos ensaios realizados, com inibição de 50% dos radicais livres e da peroxidação lipídica em doses $\leq 17,330 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 11,170 \mu\text{g/mL}$ nos ensaios DPPH e β -caroteno/ácido linoleico, respectivamente, com manutenção significativa da atividade após a digestão *in vitro*, indicando alta bioacessibilidade da sua bioatividade ($>70\%$). Na avaliação da atividade anti-inflamatória, observou-se uma redução dose-dependente dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos estimulados com LPS, com reduções entre 60 e 80%. Em células tumorais de mama (MCF-7), a atividade antitumoral foi considerada de baixa, devido à elevada concentração necessária para provocar citotoxicidade ($\text{IC}_{50} 1.908,33 \pm 135,06 \mu\text{g/mL}$), quando comparada aos dados da literatura. Os resultados sugerem que os extratos de capim-elefante possuem propriedades funcionais significativas, evidenciando potencial para desenvolvimento como fitoterápico. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar seus mecanismos de ação e avaliar sua eficácia *in vivo*.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Flavonoides. Efeitos biológicos. Estresse oxidativo. Citocinas.

ABSTRACT

The search for bioactive compounds of natural origin has driven research into promising sources, such as elephant grass [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone], particularly the elite genotype T_44.1, which stands out for its high anthocyanin content. This study aimed to evaluate *in vitro*, the cytotoxicity and the antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of its extract, as well as its bioaccessibility after simulated digestion. The extracts were prepared by aqueous and hydroalcoholic extraction (ethanol:water, 70:30 v/v), followed by rotary evaporation at 30 °C and 40 °C, and subsequent lyophilization. Cyanidin-3-glucoside was identified and quantified by UPLC-MS/MS. Cytotoxicity was assessed in WI-38 fibroblasts and RAW 264.7 macrophages using the MTT cell viability assay. Antioxidant and antitumor activities (in MCF-7 breast cancer cells) were also investigated, along with the anti-inflammatory capacity in macrophages. In the MTT assay, the extract demonstrated cell viability $\geq 70\%$ in WI-38 and RAW 264.7 cell lines up to a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ *in vitro*, indicating potential safety. The extracts exhibited antioxidant activity in the performed assays, achieving 50% inhibition of free radicals and lipid peroxidation at doses $\leq 17.330 \mu\text{g/mL}$ and $\leq 11.170 \mu\text{g/mL}$ in the DPPH and β -carotene/linoleic acid assays, respectively. A significant maintenance of activity was observed after *in vitro* digestion, indicating high bioaccessibility of its bioactivity ($>70\%$). Regarding anti-inflammatory activity, a dose-dependent reduction in TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels was observed in LPS-stimulated macrophages, with decreases ranging from 60% to 80%. In breast cancer cells (MCF-7), the antitumor activity was considered low to moderate, due to the high concentration required to induce cytotoxicity ($\text{IC}_{50} = 1,908.33 \pm 135.06 \mu\text{g/mL}$), when compared with data reported in the literature. The results suggest that elephant grass extracts possess significant functional properties, highlighting their potential for development as phytotherapeutic agents. However, further studies are necessary to elucidate their mechanisms of action and to evaluate their *in vivo* efficacy.

Keywords: Bioactive compounds. Flavonoids. Biological effects. Oxidative stress. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estruturas químicas das antocianidinas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina26
- Figura 2.** Via de biossíntese das antocianinas em plantas. PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato CoA ligase; CHS, chalcona sintase; CHI, isomerase de chalcona; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; DFR, diidroflavonol 4-redutase; ANS, antocianidina sintase; UFGT, UDP-galactose: flavonoide 3-O-galactosiltransferase; OMT, O-metiltransferase28
- Figura 3.** (A) Capim-elefante verde (à esquerda) e roxo (à direita), cultivados na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. (B) Capim-elefante roxo colhido, na mesma instituição36
- Figura 4.** Diagrama de fluxo do método de digestão *in vitro* INFOGEST 2.047
- Figura 6.** (A) Viabilidade celular (%) da linhagem WI-38 e (B) RAW 264.7 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico seco (EHS) de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida do teste de Dunnett, comparando todos os grupos com o controle MC (meio completo). A linha tracejada indica critério de não citotoxicidade estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por $p < 0,05$ (IC 95 %). Sendo * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e se **** $p < 0,0001$ 54
- Figura 7.** Análise antioxidante por sequestro de radical livre DPPH em amostras de extrato de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] aquoso seco, hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C e a 40 °C, nas concentrações entre 500 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado à 30 °C. EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado à 40 °C. EAS: extrato aquoso seco. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras distintas entre grupos da mesma concentração indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; IC 95 %58

Figura 8. Capacidade de redução do ferro para o composto referência (ácido ascórbico). O resultado está expresso pela curva linear, entre as concentrações 2.000 a 125 µg/mL e a densidade óptica (D.O.). $R^2 = 0,976$, $Y = 0,0003470X + 0,4307$ (ácido ascórbico). EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C. EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C. EAS: extrato aquoso seco. (ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; IC 95 %)59

Figura 9. Porcentagem de inibição da oxidação no sistema β-caroteno/ácido linoleico pelos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] em diferentes concentrações (38,46 a 2,4 µg/mL). BHT: butil-hidroxitolueno (controle positivo); EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos para cada concentração, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %)60

Figura 10. Análises de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, em linhagem RAW 264.7, sendo: DMEM: grupo que recebeu somente o meio não suplementado, utilizado para solubilizar os extratos. LPS: grupo que foi estimulado com LPS a 1 µg/mL durante 24 horas. Demais grupos: representam as concentrações utilizadas dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] (500, 250 e 100 µg/mL). A) Análise do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). B) Interleucina-1β (IL-1β). C) Interleucina-6 (IL-6). EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos para cada concentração, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %)63

Figura 11. Citotoxicidade (%) na linhagem MCF-7 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] seco (EHS) avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida do teste de Dunnett, comparando todos os grupos com o controle DMSO. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por $p < 0,05$ (IC 95 %). Sendo * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e se **** $p < 0,0001$ 66

Figura 12. Concentração inibitória média (IC_{50}) pelo ensaio DPPH após a digestão (fase gástrica e intestinal) comparada ao ensaio antes do processo digestivo in vitro dos extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] . E.H.S.R.30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C. E.H.S.R.40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C. E.A.S.: extrato aquoso seco. A: antes da digestão in vitro; FG: após a fase gástrica; FI: após a fase intestinal. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %). As comparações foram realizadas apenas entre as etapas de um mesmo extrato68

Figura 13. Atividade antioxidante por DPPH antes e após as fases da digestão dos extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. A) Fase gástrica. B) Fase intestinal. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os compostos dentro de cada concentração ($p < 0,05$, teste de Tukey). As comparações foram realizadas separadamente para cada concentração70

Figura A1. Cromatogramas do extrato de folhas de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] obtido por cromatografia líquida ultrarrápida

acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS) no modo MRM (ES+) para transição 448.8 a 287, correspondente a cianidina-3-glicosídeo (Cy3G). O pico em 1,75 representa o tempo de retenção do composto. Em verde, o cromatograma do padrão comercial; em vermelho, cromatograma da amostra evidenciando a presença de Cy3G. (A) Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30°C (EHSR30); (B) Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40°C (EHSR40); (C) Extrato aquoso seco (EAS); (D) Extrato aquoso líquido (EAL); (E) Extrato hidroalcoólico líquido (EHL); (F) Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 30°C (EHLR30); (G) Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 40°C (EHLR40)91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] obtidos por extração hidroalcoólica (nas formas líquida, rotaevaporada a 30 °C ou 40 °C, e seca após rotaevaporação) e por extração aquosa (nas formas líquida e seca)37

Tabela 2. Rendimento dos extratos hidroalcoólico e aquoso de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. Os valores representam a média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student48

Tabela 3. Teor de cianidina-3-glicosídeo (C3G) nos extratos líquidos e secos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus*] (Schumach.) Morrone], expressos em $\mu\text{g/mL}$. Os valores representam média \pm desvio padrão de três repetições51

Tabela 4. Concentração inibitória média (IC_{50} , em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] aquosos secos, hidroalcoólicos rotaevaporados a 30 °C e 40 °C sobre o radical DPPH. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições56

Tabela 5. Concentração inibitória média (IC_{50} , em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] e do controle positivo (BHT) no ensaio de inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições.61

Tabela 6. Índice de bioacessibilidade da atividade antioxidante, baseada no valor de concentração inibitória média (IC_{50} , em $\mu\text{g/mL}$), dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS.: extrato aquoso seco. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas

significativas entre os grupos conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %). As comparações foram realizadas apenas entre as etapas de um mesmo extrato68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4CL - 4-coumaroil-CoA ligase

4-HNE – 4-Hidroxi-Nonenal

AKT – Proteína-cinase B

AMPK – Proteína-cinase ativada por AMP

ATCC – American Type Culture Collection

BAGCE - Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante

BEH – Híbrido de etileno em ponte

BHT - Butil-hidroxitolueno

C18 - Fase estacionária de 18 átomos de carbono — padrão em colunas cromatográficas

C3G - Cianidina-3-glicosídeo

C4H - Cinamato-4-hidroxilase

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CAT - Catalase

CHI - Chalcona isomerase

CHS - Chalcona sintase

CO₂ – Dióxido de carbono

CTC₅₀ – Concentração Citotóxica Capaz de Reduzir 50 % da Viabilidade Celular

D.O. - Densidade óptica

Da - Unidade de massa atômica

[M + H]⁺ - Íon molecular protonado

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos Celulares

DCNTs - Doenças crônicas não transmissíveis

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de cultura celular)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAL-Extrato Aquoso Líquido

EAS - Extrato Aquoso Seco

EHLR30 - Extrato Hidroalcoólico Líquido Rotaevaporado a 30 °C

EHLR40 - Extrato Hidroalcoólico Líquido Rotaevaporado a 40 °C

EHSR30 - Extrato Hidroalcoólico Seco Rotaevaporado a 30 °C

EHSR40 - Extrato Hidroalcoólico Seco Rotaevaporado a 40 °C

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Ligado a Enzima)

TAME - Éster metílico do (2S)-2-[(4-metilbenzenossulfonil)amino]-5-guanidinopentanoato

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ESI – Ionização por Electrospray

F3'H - Flavonoide 3'-hidroxilase

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

GPx - Glutathione peroxidase

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

INCA - Instituto Nacional de Câncer

INFOGEST - Protocolo internacional padronizado para simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal.

ISO - International Standard Organization (Organização Internacional para Padronização)

JAK-STAT - Janus Quinase / Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

LINMAP - Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária

LPS - Lipopolissacarídeo

MAPK - Quinase de Proteína Ativada por Mitógeno

MCF-7 - Linhagem de células tumorais humanas de mama

MDA - Malondialdeído

mTOR - Alvo Mecanicista da Rapamicina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NaOH - Hidróxido de sódio

NF-κB - Fator Nuclear kappa B

Nrf2 - Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2

O₂⁻ - Ânion Superóxido

O₂²⁻ - Peróxidos

OH· - Radical hidroxila

-OOH - Grupo hidroperóxido

PAL - Fenilalanina amônia-liase

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões

RAW 264.7 - Linhagem de macrófagos murinos

RPM - Rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium (Meio de cultura celular)

SCI - Inflamação Crônica Sistêmica

SET - Transferência de elétron único

SFG - Solução fluida gástrica

SFI - Solução fluida intestinal

SFO - Solução fluida oral

SOD - Superóxido dismutase

T_44.1 - Genótipo elite de capim-elefante roxo

TCA - Ácido tricloroacético

TLRs - Receptores tipo Toll

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

TQ - Triplo quadrupolo

Tris-HCl - Tris (hidroximetil) aminometano cloridrato

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

UV - Ultravioleta

V - Volt

WI-38 - Linhagem de fibroblastos humanos de pulmão

β -caroteno - Beta caroteno

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Metabolismo vegetal das antocianinas	25
2.2 Estresse oxidativo.....	28
2.3 Atividade antioxidante	30
2.4 Atividade anti-inflamatória	31
2.5 Atividade antitumoral.....	32
2.6 <i>Cenchrus purpureus</i> (Schumach.) Morrone	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 Seleção e preparo da biomassa vegetal.....	37
4.2 Identificação e quantificação de cianidina-3-glicosídeo por UPLC-MS/MS	38
4.3.1 Cultivo das células.....	39
4.3.2 Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	40
4.4 Método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	41
4.5 Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP).....	41
4.6 Método do β -caroteno/ácido linoleico	42
4.7 Análise das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por kit ELISA	43
4.8 Atividade antitumoral.....	44
4.9 Ensaio de bioacessibilidade - simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal INFOGEST 2.0	44
4.10 Análise antioxidante pelo método de sequestro de radical livre (DPPH) para avaliação da bioacessibilidade.....	47
4.11 Análise estatística	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Extração e rendimento dos compostos bioativos do capim-elefante	48

5.2 Determinação de cianidina-3-glicosídeo por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial	50
5.3 Viabilidade celular	54
5.4 Atividade antioxidante	55
5.5 Atividade anti-inflamatória	62
5.6 Atividade antitumoral.....	65
5.7 Análise da bioacessibilidade.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. REFERÊNCIAS.....	72
8. APÊNDICE.....	85

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas não apenas para a alimentação, mas também na forma de infusos ou decocções desde o início da humanidade. Ao longo do tempo, diversos compostos de origem vegetal demonstraram propriedades bioativas de grande relevância para a farmacologia, sendo empregados tanto em práticas tradicionais quanto como alternativa no tratamento e/ou prevenção de doenças. Diante dos potenciais benefícios atribuídos a esses compostos, que são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, o interesse por substâncias bioativas de origem vegetal tem crescido significativamente nos últimos anos (CHE; ZHANG, 2019).

Esse interesse crescente reflete uma tendência global da valorização de formulações mais naturais e livres de aditivos sintéticos, voltadas à promoção da saúde preventiva e à redução do risco de efeitos adversos. Em 2023, o mercado global de fitoterápicos foi estimado em US\$ 70,57 bilhões, com projeção de atingir US\$ 328,72 bilhões até 2030, a uma taxa de crescimento anual de 20,91 (GRAND VIEW RESEARCH, 2023). Este cenário reflete o ressurgimento do interesse do público por terapias naturais e produtos de saúde à base de plantas. Estima-se, ainda, que grande parte da população mundial continue a recorrer a tratamentos botânicos, seja como parte da medicina tradicional ou como prática complementar. Esse movimento não apenas reforça a importância cultural e econômica dos fitoterápicos, como também tem estimulado uma crescente consciência científica voltada à investigação dos constituintes farmacologicamente ativos das plantas medicinais (CHE; ZHANG, 2019).

A despeito da sua importância, a pesquisa com extratos vegetais apresenta desafios devido à complexidade de sua matriz. Por outro lado, essa complexidade pode favorecer uma ação sinérgica entre os compostos presentes no extrato, o que potencialmente contribui para uma maior eficácia em comparação aos compostos isolados (DZOBO, 2022). Dentre esses compostos bioativos, destacam-se as antocianinas, pertencentes ao grupo dos flavonoides. Esses pigmentos naturais, amplamente distribuídos no reino vegetal, são responsáveis pelas cores vermelha,

laranja e azul-violeta, em diversas flores, folhas e frutos, e reconhecidos em grande parte pelas ações antioxidantes, anti-inflamatória e antitumoral (SHI; CHEN; CHEN, 2021; FALLAH; SARMAST; JAFARI, 2020). Essas moléculas estão associadas à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) como as doenças cardiovasculares e o câncer, especialmente câncer colorretal e de mama (AYVAZ et al., 2022; BORTOLINI, et al., 2022; CHEN et al., 2021; FRAGA et al., 2019).

Ademais, o estresse oxidativo tem sido amplamente associado à fisiopatologia de doenças crônicas de origem metabólica, como diabetes mellitus, obesidade, câncer e desordens cardiovasculares. Este processo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo, levando a danos celulares e disfunções em diferentes sistemas. Além disso, há uma estreita relação entre o estresse oxidativo e a inflamação visto que ambos compartilham vias moleculares comuns e se retroalimentam, intensificando a progressão dessas doenças. A compreensão desses mecanismos integrados tem impulsionado pesquisas que buscam estratégias terapêuticas capazes de modular esses processos, visando à prevenção e ao controle de patologias crônicas e complexas (AN et al., 2023; RANI et al., 2016; ROTARIU et al., 2022; WANG et al., 2021). Desta forma, faz-se relevante a busca por descoberta de produtos com efeito preventivo e/ou terapêutico.

As antocianinas podem ser encontradas não apenas em frutas e vegetais consumidos pelo ser humano, mas também em plantas utilizadas como forragem, como o capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] de coloração arroxeada, uma planta forrageira de alto valor nutritivo, amplamente utilizada como alimento para animais e para a produção de bioenergia (PEREIRA et al., 2021). A espécie destaca-se pela tolerância à fatores bióticos e abióticos, rápido crescimento, elevada adaptabilidade a diferentes tipos de solo, e sobretudo pela alta produtividade de biomassa, podendo ultrapassar 250 Mg ha⁻¹ ano⁻¹, o que o torna uma cultura versátil para diversas aplicações (FAYOS-FEBRER et al., 2023; GARCÍA-MONTERO et al., 2021; PEREIRA; LÉDO; MACHADO, 2017; OJO et al., 2022; YAN et al., 2020). Além disso, as suas folhas contêm cerca de 2,25 mg/100

g de antocianinas, uma quantidade de duas a quatro vezes superior à encontrada nas cascas de uvas e em alguns chás (GARCÍA-MONTERO et al., 2021; YAN et al., 2020).

Considerando que o capim-elefante não é tradicionalmente consumido pelo ser humano e que o objetivo a longo prazo é seu desenvolvimento como fitoterápico, torna-se fundamental avaliar sua segurança, especialmente por meio de ensaios de citotoxicidade. A presença de antocianinas em sua composição desperta interesse por suas propriedades bioativas, como a ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, já descritas na literatura como promissoras na prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis (ALMADALLI et al., 2024; CHEN et al., 2020b; ALAM et al., 2021).

Diante deste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade, e as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral de extratos de capim-elefante roxo com alto teor de antocianinas. A proposta visa elucidar as principais atividades biológicas desses extratos, definir concentrações seguras para seu uso e contribuir para a valorização dessa biomassa como um recurso natural viável na prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas. A relevância desta investigação reside na demanda crescente por alternativas terapêuticas eficazes e seguras para seres humanos, que possam complementar as abordagens convencionais e promover melhorias na qualidade de vida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo vegetal das antocianinas

As antocianinas podem ser encontradas na forma glicosilada, ou seja, ligadas a um ou mais açúcares, o que confere maior estabilidade em meio aquoso e facilita seu transporte e armazenamento nas plantas, ou na forma aglicona, conhecida como antocianidina, corresponde ao núcleo flavílico sem açúcares, sendo mais instável e reativa. A glicosilação influencia propriedades como solubilidade, estabilidade, coloração e biodisponibilidade (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Existem mais de 700 tipos de antocianinas na natureza, sendo a maioria encontrada na forma glicosilada, como a cianidina-3-glicosídeo, que representa cerca de 50% do total. As antocianidinas, que correspondem às formas agliconas das antocianinas, incluem as principais moléculas cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 1). Essas seis substâncias representam aproximadamente 95% de todas as antocianinas encontradas em plantas. (AYVAZ et al., 2022; KHOO et al., 2017; MATTIOLI et al., 2020).

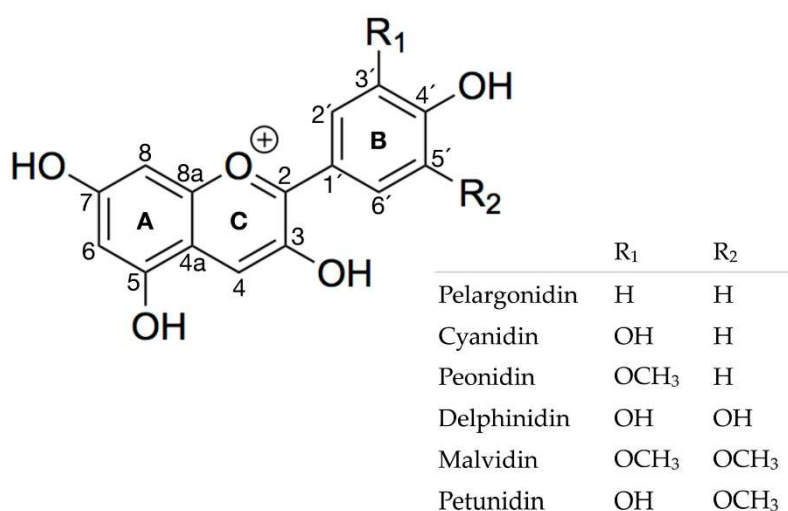


Figura 1. Estruturas químicas das antocianidinas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina.

Fonte: MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ (2018)

As antocianinas são polifenóis glicosilados hidrossolúveis, localizados principalmente nos vacúolos das células vegetais (LIU, Y. et al., 2018; LU et al., 2024; MATTIOLI et al., 2020). Na planta, esses metabólitos secundários exercem funções relevantes, como a atração de polinizadores e a proteção contra estresses bióticos e abióticos (CAPELLINI et al., 2021; LU et al., 2024). A biossíntese das antocianinas ocorre na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático, a partir da via do fenilpropanoide, que envolve diversas enzimas e genes responsáveis pela conversão de moléculas precursoras em compostos finais pigmentados. Embora o carboidrato ligado à antocianina não possua cromóforo, ele influencia a coloração

ao estabilizar a molécula, modificar seu ambiente químico e facilitar interações que intensificam ou mantêm a cor. Dessa forma, a forma glicosilada é mais estável e apresenta coloração mais intensa e visível do que a antocianidina (DAI et al., 2022).

A rota tem início com a conversão da fenilalanina em ácido cinâmico pela fenilalanina amônia-liase (PAL), seguida da transformação deste em ácido 4-cumárico por meio da cinamato-4-hidroxilase (C4H) (Figura 2). O ácido 4-cumárico é então ativado pela 4-coumaroil-CoA ligase (4CL), formando o 4-coumaroil-CoA, que se condensa com malonil-CoA na presença da chalcona sintase (CHS), gerando a naringenina chalcona. Esta, por sua vez, é convertida em naringenina pela chalcona isomerase (CHI). A naringenina pode ser transformada em diidrokaempferol pela flavanona 3-hidroxilase (F3H) ou em dihidroquercetina com a adição de uma hidroxila pelo flavonoide 3'-hidroxilase (F3'H) (CAPELLINI et al., 2021).

Os diidroflavonóis formados são então reduzidos a leucoantocianidinas pela ação da diidroflavonol 4-redutase (DFR), enzima cuja especificidade influencia diretamente o perfil de antocianinas produzidas. Na sequência, as leucoantocianidinas são oxidadas em antocianidinas, moléculas pigmentadas e instáveis, pela antocianidina sintase (ANS). Para garantir estabilidade, solubilidade e acúmulo celular, as antocianidinas passam por um processo de glicosilação catalisado pela UDP-glicosil-transferase 75C1 (UGT75C1 ou UFGT), etapa essencial para a formação das antocianinas estáveis (LU et al., 2024).

Uma vez sintetizadas, as antocianinas são transportadas para o vacúolo, onde se acumulam. Esse transporte ocorre via mecanismos mediados por transportadores específicos, como o ABC AtABCC2, dependente de glutathione (GSH). Nesse processo, as glutathione S-transferases (GSTs) desempenham papel fundamental, atuando como proteínas auxiliares que facilitam o co-transporte das antocianinas do citosol para os vacúolos (MATTIOLI et al., 2020). Este conjunto de reações não apenas garante a pigmentação de tecidos vegetais, mas também está intimamente relacionado à adaptação da planta ao ambiente.

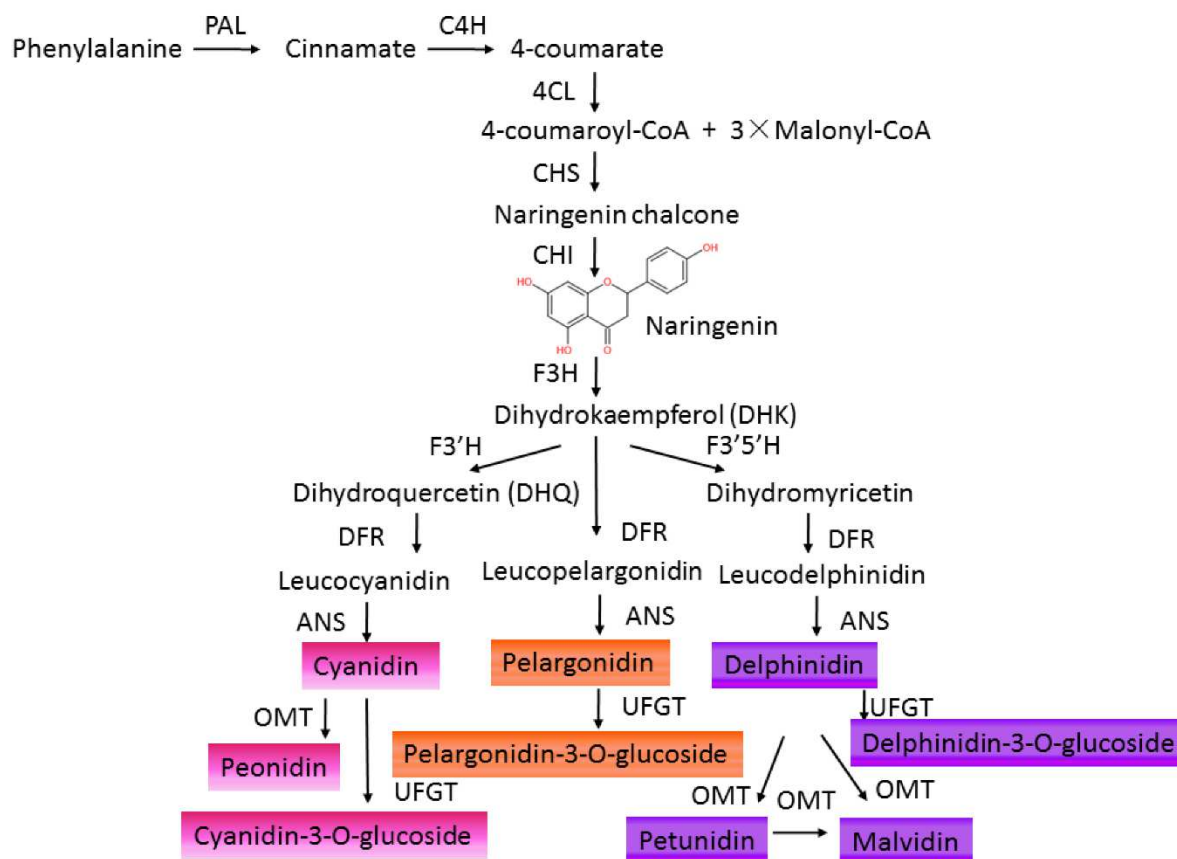


Figura 2. Via de biossíntese das antocianinas em plantas. PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato CoA ligase; CHS, chalcona sintase; CHI, isomerase de chalcona; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; DFR, diidroflavonol 4-redutase; ANS, antocianidina sintase; UFGT, UDP-galactose: flavonoide 3-O-galactosiltransferase; OMT, O-metiltransferase.

Fonte: MA (2021)

2.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade dos sistemas antioxidantes de neutralizá-las ou eliminá-las. As principais EROs envolvidas nesse processo incluem o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e os peróxidos (O_2^{2-}) (SIES, 2021; TELEANU et al., 2022).

As EROs são moléculas instáveis, altamente reativas, derivadas do oxigênio, produzidas por diversos estímulos tanto endógenas quanto exógenas. Entre as fontes exógenas destacam-se a exposição à radiação ionizante, o uso de fármacos

que geram EROs como mecanismo de ação e o metabolismo de compostos químicos ambientais. Contudo, a principal origem dessas espécies reativas é endógena, associada a processos metabólicos das células (TELEANU et al., 2022).

Cerca de 90 % das EROs são geradas durante o metabolismo celular do oxigênio, especialmente nas mitocôndrias (NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020). Por possuírem elétrons desemparelhados, essas moléculas apresentam alta reatividade, o que lhes permite interagir e danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, comprometendo a integridade celular (TELEANU et al., 2022).

Além disso, os radicais livres podem comprometer a membrana celular ao induzir a peroxidação lipídica, processo que gera aldeídos altamente tóxicos, como o 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA), os quais contribuem significativamente para a disfunção estrutural e funcional das membranas. Esses compostos podem alterar diretamente a conformação das proteínas em múltiplos níveis estruturais, incluindo a tridimensional, comprometendo sua função biológica e, em alguns casos, induzindo a formação de agregados proteicos (TELEANU et al., 2022; ZHANG et al., 2017).

A peroxidação lipídica exerce ainda efeitos deletérios sobre o material genético, pois aldeídos reativos como o HNE se unem por ligação covalente ao DNA, comprometendo a estabilidade das bases nitrogenadas, interferindo nos processos de replicação e transcrição, e favorecendo mutações que contribuem para a instabilidade genômica. Além disso, os próprios radicais livres podem causar quebras nas fitas de DNA e oxidar bases de guanina, mecanismos associados ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças crônicas (TELEANU et al., 2022; ZHANG et al., 2017).

O estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento de doenças não apenas por danos diretos e modificações em macromoléculas celulares, mas também pela ruptura da sinalização redox e do metabolismo. Neste contexto, moléculas como o 4-HNE, formadas durante a peroxidação lipídica, atuam como mediadores eletrofílicos, ligando-se a proteínas-chave envolvidas em vias de sinalização celular,

como NF- κ B, Nrf2, AKT e mTOR. Essa modulação desequilibrada interfere em processos vitais, incluindo resposta inflamatória, expressão gênica, proliferação celular e apoptose. Além disso, o estresse oxidativo compromete o metabolismo mitocondrial, resultando em disfunção energética e acúmulo progressivo de danos, contribuindo para o envelhecimento celular e o surgimento de doenças crônicas, neurodegenerativas e metabólicas (SIES, 2021; TELEANU et al., 2022; ZHANG et al., 2017).

Diante de todos esses mecanismos, o estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, envelhecimento precoce, câncer, doenças cardiovasculares e metabólicas, como o diabetes mellitus, entre outras (NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020; SIES, 2021; TELEANU et al., 2022; ZHANG et al., 2017).

2.3 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos capazes de combater a oxidação ao neutralizar os radicais livres e outras espécies reativas, inibir sua formação ou reparar os danos oxidativos já causados. Eles desempenham papéis importantes como agentes de defesa contra os radicais livres e outras espécies reativas, protegendo células e tecidos do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Os antioxidantes podem combater radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) que são produzidas tanto por processos fisiológicos normais quanto por fatores externos, como poluição ambiental, tabagismo, radiação, uso de medicamentos e exposição a agrotóxicos (GULCIN, 2025).

Além disso, os antioxidantes podem ser classificados como primários, quando atuam diretamente na neutralização de radicais livres por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio, o que leva a formação de compostos mais estáveis; e como secundários, quando atuam de forma indireta, inibindo formação de radicais livres ou eliminando espécies reativas por mecanismos como a quelação de metais (ferro e cobre), a decomposição de peróxidos ou absorção de radiação UV. Eles podem ser endógenos como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), que fazem parte das defesas naturais

do organismo ou exógenos, os quais podem ser obtidos pela alimentação ou suplementação (FORMAN; ZHANG et al., 2021; GULCIN, 2025; KOTHA et al., 2022;).

Os antioxidantes provenientes da dieta, como vitaminas, minerais e polifenóis como os flavonoides são substâncias que atuam no organismo após a ingestão. Esses compostos não enzimáticos têm papel fundamental no reforço das defesas antioxidantes naturais do corpo, contribuindo para manter o equilíbrio redox celular, contra o estresse oxidativo (KHOTA et al., 2022).

As defesas antioxidantes endógenas do organismo, embora fundamentais, podem ser insuficientes para controlar completamente o estresse oxidativo, pois este resulta de um desequilíbrio entre oxidantes e as defesas do corpo. A ingestão de antioxidantes exógenos, obtidos principalmente pela dieta, complementa as defesas naturais do organismo, ajudando a mitigar os impactos prejudiciais dos radicais livres (FORMAN; ZHANG et al., 2021; GULCIN, 2025; KOTHA et al., 2022).

2.4 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um mecanismo essencial de defesa do organismo, ativado em resposta a agentes agressores como patógenos, substâncias tóxicas ou danos celulares. Trata-se de um processo coordenado e altamente regulado que visa remover o estímulo nocivo, reparar o tecido lesado e restaurar a homeostase (FURMAN et al., 2019; HENDRAYANI et al., 2016).

A resposta inflamatória inicia-se com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos celulares (DAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), ativando vias intracelulares como NF- κ B, MAPK e JAK-STAT, que regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de leucócitos (FURMAN et al., 2019; HENDRAYANI et al., 2016).

Pode-se apresentar de forma aguda, com duração curta e ação eficaz, ou evoluir para um quadro crônico, caracterizado por uma inflamação persistente e de baixo grau, impulsionada por fatores como disfunção mitocondrial, obesidade

visceral, dieta inflamatória, sedentarismo, estresse, desequilíbrio da microbiota intestinal, envelhecimento celular e poluentes ambientais. Esse estado crônico, denominado inflamação sistêmica crônica (SCI), está associado a diversas doenças não transmissíveis, como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, autoimunes, cânceres, doenças pulmonares, intestinais e renais (FURMAN et al., 2019; HENDRAYANI et al., 2016).

Além disso, o envelhecimento está fortemente ligado a esse fenômeno, no que se convencionou chamar de *inflammaging*, caracterizado por uma ativação imune contínua que prejudica a função de múltiplos órgãos (FURMAN et al., 2019; HENDRAYANI et al., 2016).

As antocianinas, são moléculas capazes de promover a redução de marcadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), bem como ativar as defesas antioxidantes endógenas e modular vias como do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e receptores toll like (TLRs) (GONÇALVES et al., 2021; KOZŁOWSKA; DZIERŻANOWSKI, 2021; MA et al., 2021).

2.5 Atividade antitumoral

O câncer é uma doença complexa com diversas fases distintas e de origem clonal, que se inicia geralmente com uma mutação em uma célula somática normal, promovendo uma vantagem proliferativa. Desta forma, ocorre a expansão clonal e a progressão de alterações genéticas e epigenéticas, o que leva à formação de populações celulares heterogêneas e adaptadas, e torna o diagnóstico e o tratamento mais difíceis (TABASSUM; POLYAK, 2015; ZHANG et al., 2024).

Fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e sistêmicos, como inflamação crônica, dieta, obesidade, disbiose e envelhecimento, também exercem influência crítica nesse processo (INCA, 2022). Compostos naturais, como as antocianinas têm demonstrado efeito positivo contra o câncer, através da inibição da proliferação celular, levando à apoptose, bem como na modulação de vias de sinalização celular (AMPK, PI3K/AKT/mTOR e JAK-STAT). Os seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório são importantes nesse contexto, já que são fatores associados à origem

do câncer. Estudos mostraram a eficácia das antocianinas contra tumores de mama, cólon, fígado, pulmão e pâncreas (ANWAR et al., 2016; BARS-CORTINA et al., 2021; DU et al., 2023; RABELO et al., 2023; SOOD et al., 2024).

2.6 *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone

Cenchrus purpureus (Schumach.) Morrone é uma gramínea pertencente à subfamília Panicoideae da família Poaceae, popularmente conhecida como capim-elefante (WESSAPAK et al., 2023). Trata-se de uma planta perene de metabolismo C4, nativa da África Subsaariana, amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América, tanto como espécie forrageira quanto cultura energética, pelo seu potencial de produção de biomassa (YAN et al., 2020; WESSAPAK et al., 2023). Embora o nome científico atualmente aceito seja [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone], ainda é comum encontrar a sinonímia *Pennisetum purpureum* Schumach. em artigos científicos. A mudança taxonômica do capim-elefante, de *Pennisetum purpureum* (Schumach.) para [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone], foi proposta por Osvaldo Morrone, autor nomenclatural da nova combinação, com base em evidências filogenéticas que demonstraram que os gêneros *Pennisetum*, *Cenchrus* e *Odontelytrum* formam um grupo monofilético (Clado PCO). Estudos moleculares e morfológicos revelaram que *Pennisetum*, como anteriormente definido, era parafilético, e que as distinções morfológicas entre os gêneros eram inconsistentes. Assim, propôs-se a unificação sob o nome *Cenchrus*, que possui prioridade nomenclatural conforme o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CHEMISQUY et al., 2010).

Essa espécie destaca-se pelo rendimento elevado de biomassa, podendo atingir até 250 Mg ha⁻¹ ano⁻¹ de biomassa verde, além da capacidade de suportar cortes frequentes, altas temperaturas, déficit hídrico, baixa fertilidade do solo e ataques de pragas e doenças (FAYOS-FEBRER et al., 2023; GARCÍA-MONTERO et al., 2021; OJO et al., 2022; SÁNCHEZ-GUERRA et al., 2024). Suas estruturas vegetativas (colmos e folhas) são amplamente utilizadas na alimentação animal devido ao alto valor nutritivo, além de apresentarem aplicações na produção de bioenergia (SÁNCHEZ-GUERRA et al., 2024; YAN et al., 2020).

No germoplasma da espécie, destacam-se diferentes genótipos que apresentam coloração arroxeada intensa nas folhas, flores e colmos, podendo atingir mais de 4 metros de altura. Esses genótipos são caracterizados por teores elevados de antocianinas, compostos fenólicos responsáveis pela pigmentação e associados à expansão e expressão de genes-chave na via biossintética desses pigmentos (YAN et al., 2020).

O Brasil apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo do capim-elefante, além do conhecimento técnico-científico sobre a espécie. Neste contexto, destaca-se o trabalho da Embrapa, que conserva a variabilidade genética da espécie por meio do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE), assegurando a preservação de acessos com diferentes características agronômicas e possibilitando o desenvolvimento de novas cultivares com múltiplos usos (MACHADO et al., 2013).

Em extratos aquosos de brotações jovens de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] diversos compostos bioativos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência, incluindo 3-O-rutinosídeo (209,96 µg/10 g), ácido elágico (3,03 µg/10 g), catequina (2,37 µg/10 g), rutina (2,10 µg/10 g) e kaempferol (0,91 µg/10 g) (OJO et al., 2022). Estudos complementares envolvendo análises genômicas, transcriptômicas e metabolômicas de folhas jovens da mesma espécie revelaram três antocianidinas predominantes — malvidina, peonidina e pelargonidina —, totalizando 2,25 mg de antocianinas por 100 g de tecido vegetal (YAN et al., 2021). Além disso, derivados de cianidina também foram identificados em folhas de capim-elefante (ZHOU et al., 2019), reforçando a diversidade de compostos fenólicos presentes na espécie.

Além disso, em extratos hidroalcoólicos de plantas secas, observou-se variação nos teores de metabólitos secundários em função do ambiente de cultivo. Plantas desenvolvidas em ambiente natural apresentaram as maiores concentrações, com 73,5 mg EAG/g MS de polifenóis totais, 18,1 mg EQ/g MS de flavonoides totais e 13,3 mg EC/g MS de taninos condensados (FATIM TRAORÉ et al., 2024). Em extratos aquosos do caule dessa espécie, taninos (647,72 µg/mL) e

o alcaloide lunamarina (250,00 µg/mL) foram os principais compostos identificados, seguidos por menores concentrações de flavonoides — catequina (23,76 µg/mL), rutina (20,00 µg/mL), kaempferol (0,90 µg/mL) e antocianinas (0,54 µg/mL) — e fenóis totais (11,07 µg/mL) (BRANTLEY AKURU et al., 2015).

Além disso, em estudo *in vivo* com ratos Wistar machos, tanto os extratos aquosos do caule quanto de novas brotações de [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] promoveram redução significativa dos níveis glicêmicos em animais com diabetes induzido (Brantley AKURU et al., 2015; OJO et al., 2022). O extrato aquoso, na dose de 16,8 mg/kg, reduziu a glicemia dos ratos diabéticos em 77%, em comparação à metformina, que promoveu redução de 80%. O tratamento também atenuou o estresse oxidativo e a inflamação, diminuindo as concentrações de malondialdeído (MDA), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator nuclear kappa B (NF- κ B), além de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reduzida (GSH) no fígado e pâncreas. (OJO et al., 2022). Entretanto, estudos que investigam os efeitos biológicos de extratos hidroalcoólicos de [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] ainda são escassos. Além disso, considerando que as antocianinas são compostos termossensíveis, observa-se que os trabalhos disponíveis na literatura não mencionam as condições de temperatura utilizadas durante o processo de rotaevaporação, o que pode influenciar diretamente na estabilidade e no teor final desses metabólitos.

O presente estudo utiliza o genótipo melhorado T_44.1, desenvolvido pelo programa de melhoramento genético da Embrapa, caracterizado pelo elevado teor de antocianinas e alta produtividade. Essas características tornam o material vegetal promissor para investigações sobre compostos bioativos e seus efeitos biológicos. A seleção do T_44.1 considerou sua intensa coloração arroxeadada em folhas, colmos e inflorescências, indicativa do alto conteúdo de antocianinas, bem como sua elevada produção de biomassa. Essa abordagem representa um avanço em relação a estudos prévios, ao associar um genótipo otimizado a um processo de

extração controlado, visando preservar e potencializar a atividade funcional das antocianinas (PINTO NOGUEIRA et al., 2023) (Figuras 3.A e B).

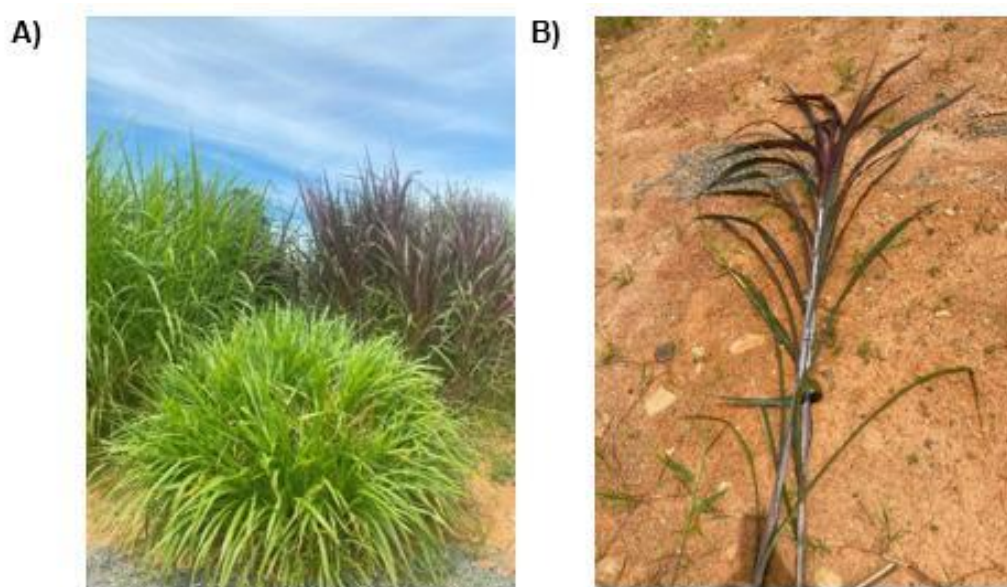


Figura 3 - (A) Capim-elefante verde (à esquerda) e roxo (à direita), cultivados na Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. (B) Capim-elefante roxo colhido, na mesma instituição.

Próprio autor (2025)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a citotoxicidade e as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral *in vitro* de extrato de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] com alta concentração de antocianinas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar extratos hidroalcoólicos e aquosos de capim-elefante com alta concentração de antocianinas;
- Determinar o efeito de diferentes concentrações do extrato de capim-elefante na viabilidade celular;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato de capim-elefante;
- Determinar a atividade anti-inflamatória do extrato de capim-elefante em macrófagos RAW 264.7;

- Determinar a atividade antitumoral do extrato de capim-elefante em célula MCF-7;
- Identificar e quantificar a antocianina cianidina-3-glicosídeo no extrato de capim-elefante;
- Avaliar a bioacessibilidade da cianidina-3-glicosídeo por meio de simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal (protocolo INFOGEST).

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção e preparo da biomassa vegetal

O capim-elefante roxo, genótipo elite T_44.1, foi colhido aos 85 dias de crescimento, durante o verão, no período da manhã, na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais, e as folhas frescas destinado ao processo de extração. As folhas foram cortadas, pesadas (25 g para cada extrato) e trituradas. Em seguida, foram submersas em 500 mL da solução extratora: etanol:água (70:30, v/v), com o pH ajustado para 2,0 com HCl a 5 % nos extratos hidroalcoólicos, uma vez que o meio ácido favorece tanto a extração quanto a estabilidade deste flavonóide; e água deionizada com pH igualmente ajustado para 2,0 com HCl a 5 % nos extratos aquosos. As amostras permaneceram em contato com os solventes por 15 minutos, sem exposição à luz e vedadas com filme de parafina (Parafilm®) (LOPES et al., 2025; PINTO NOGUEIRA, 2023). Os experimentos foram conduzidos em um delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com três repetições.

Tabela 1. Extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] obtidos por extração hidroalcoólica (nas formas líquida, rotaevaporada a 30 °C ou 40 °C, e seca após rotaevaporação) e por extração aquosa (nas formas líquida e seca).

Código da amostra	Descrição
EHLR30	Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 30°C

EHSR30	Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30°C
EHLR40	Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 40°C
EHSR40	Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40°C
EAL	Extrato aquoso líquido
EAS	Extrato aquoso seco

Posteriormente, os extratos foram filtrados utilizando gaze e filtro de membrana e as etapas seguintes foram realizadas conforme a especificação de cada extrato (Tabela 1). Em seguida, os extratos dos grupos EHL e EAL foram aliquotados em frascos de penicilina âmbar de 10 mL, lacrados e armazenados a –80 °C até o momento da análise. Os extratos do grupo EAS foram liofilizados, acondicionados com nitrogênio gasoso para criação de um ambiente inerte e armazenados a –80 °C. Os extratos dos grupos EHLR30, EHSR30, EHLR40 e EHSR40 foram submetidos à rotaevaporação, para remover o etanol presente, nas temperaturas de 30 °C (por 50 minutos) e 40 °C (por 30 minutos), respectivamente. Após esse processo, os extratos EHLR30 e EHLR40 foram fracionados e armazenados a –80 °C, enquanto os extratos EHSR30 e EHSR40 foram tratados com nitrogênio gasoso, liofilizados e armazenados a –80 °C até a análise.

4.2 Identificação e quantificação de cianidina-3-glicosídeo por UPLC-MS/MS

As análises foram conduzidas para todas as amostras no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária (LINMAP), na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

O sistema analítico utilizado foi um Waters Acquity UPLC™ I-Class acoplado a um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo com fonte de ionização por electrospray (ESI) no modo positivo (XEVO-TQ-S micro, Waters). A coluna utilizada foi ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 µm), operando a 40 °C, com injeção de 3 µL e fluxo de 0,3 mL/min, com tempo de retenção de 1,74 minutos.

A fase móvel consistiu em ácido fórmico 1 % (fase A) e acetonitrila contendo ácido fórmico 1 % (fase B), com gradiente de eluição iniciando em 5 % da fase B, aumentando linearmente até 60 % em 3 minutos e, em seguida, até 95 % em 3,01 minutos. Essa condição foi mantida até 3,5 minutos, retornando a 5 % aos 3,51 minutos e permanecendo até 4 minutos para reequilíbrio da coluna. A identificação da cianidina-3-glicosídeo (C3G) foi realizada com base no tempo de retenção (1,74 min), na comparação com o padrão comercial e na análise MS/MS, em que o íon precursor $[M + H]^+$ de 448,8 Da sofreu dissociação induzida por colisão (CID) com energia de 20 V, gerando o íon quantificador de 287 Da, confirmando a identidade do composto.

A curva de calibração foi construída a partir de uma solução estoque de C3G (100 ppm) (Sigma-Aldrich, Cas N° PHL89616), preparada em água acidificada com HCl até pH 2,0, e diluída para obtenção de uma solução de trabalho (1 ppm). A partir desta, foram preparadas soluções com concentrações entre 1 e 1000 ppb, utilizadas para a construção da curva analítica.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 8 mL (2000 µg/mL) de água acidificada (pH 2,0 com HCl 5 %), sonificadas por 10 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Devido à elevada concentração de pigmentos, todas as amostras foram diluídas 100 vezes antes da análise. A concentração final da cianidina-3-glicosídeo foi calculada com base na correção da diluição. O processamento e interpretação dos dados foram realizados utilizando o software MassLynx (Waters).

4.3.1 Cultivo das células

As análises foram realizadas no laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. As linhagens celulares cultivadas foram: fibroblastos humanos derivados de pulmão (WI-38), macrófagos murinos (RAW 264.7) e célula tumoral de mama (MCF-7) (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; RASCHKE et al., 1978; SOULE et al. 1973).

As linhagens foram congeladas em meio composto por 95 % de soro fetal bovino e 5 % de DMSO e criopreservadas sob nitrogênio líquido até o momento do

cultivo. As células foram descongeladas e transferidas para tubos falcon (Kasvi) contendo 3 mL de meio RPMI para a linhagem WI-38 e DMEM para a MCF-7 e a RAW 264.7, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 2 % de antibiótico (penicilina - 10.000 U/mL e estreptomicina - 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, CAS N° P4333) (ATCC). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm, 4°C durante 5 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de meio completo e transferido para a garrafa com filtro e incubadas à 37 °C e 5 % de CO₂ (FRESHNEY, 2016).

As células foram monitoradas a cada dois dias por microscópio óptico, sendo realizadas as trocas de meio de cultura. As células foram monitoradas até atingirem 80 % de confluência para a realização dos ensaios.

4.3.2 Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço e incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5 % de CO₂, por 24 horas. Após esse período, as células aderidas foram tratadas com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para o controle negativo, 150 µL de meio completo para o controle positivo, 100 µL do extrato hidroalcoólico de capim-elefante (EHRS30) em concentrações variando de 8000 µg/mL a 31 µg/mL — correspondendo a concentrações finais nos poços de 800 a 3,1 µg/mL — para os tratamentos, e 100 µL de meio não suplementado para o teste. As placas foram então incubadas novamente a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 horas (ISO 10993-5:2009; RISS et al., 2013).

Posteriormente, os tratamentos foram removidos cuidadosamente de cada poço e adicionados 100 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a 10 % em todos os poços e incubados a 37 °C e 5 % de CO₂ durante 3 horas. Após esse período, o MTT foi retirado de todos os poços, seguido da adição de 100 µL de DMSO, a fim de solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Espectra MAX 190, Molecular Devices) a 595 nm. Para calcular a viabilidade foi utilizada a equação abaixo: (ISO 10993-5:2009; RISS et al., 2013).

$$Viabilidade(\%) = \frac{100 \times DO595a}{DO595CTe}$$

Sendo, D.O.595a: valor da densidade óptica das amostras testadas e D.O.595CTe: valor médio da densidade óptica do controle não tratado (ISO 10993-5: 2009).

4.4 Método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Foram pesados 2 mg de cada extrato liofilizado (EHRS30, EHR40 e EAS) e do composto de referência (ácido ascórbico), bem como 1 mg do radical DPPH, utilizando balança analítica, sem exposição à luz e com auxílio de espátula de vidro. As amostras foram diluídas em 1 mL de metanol, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 8000 rpm, a 4 °C, por 1 minuto, sendo mantidas em gelo até o uso. Posteriormente, foi realizado o plaqueamento em placas de 96 poços. As amostras foram submetidas a diluições seriadas para obtenção de dez concentrações, variando de 2000 a 31,96 µg/mL, com concentração final nos poços entre 500 e 0,97 µg/mL em metanol (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A solução de DPPH foi preparada imediatamente antes do uso, pela diluição do composto em 50 mL de metanol em balão volumétrico. Em cada poço, foram pipetados 150 µL da solução de DPPH, exceto nos poços de branco da amostra e do controle. A placa foi então coberta com papel alumínio e incubada por 30 minutos, em ambiente fresco e protegido da luz. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição e nos respectivos valores de IC₅₀ (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

$$Inibição (\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

sendo, A controle a absorbância do DPPH sem o extrato e o A amostra Absorbância da solução de DPPH com extrato ou composto de referência.

4.5 Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP)

Para a análise do poder redutor do ferro (ensaio FRAP), foram preparadas previamente soluções do extrato de capim-elefante e do composto de referência

(ácido ascórbico) nas concentrações finais de 2000 a 125 µg/mL, em etanol. Imediatamente antes do ensaio, a solução FRAP foi preparada na proporção de 10:1:1, contendo tampão acetato, solução de TPTZ e solução de cloreto férrico (FeCl₃). Em tubos de ensaio, foram adicionados 90 µL de cada concentração do extrato ou do ácido ascórbico, 270 µL de água destilada e 2700 µL da solução FRAP (BENZIE; DEVAKI, 2017; BENZIE; STRAIN, 1996; MORAIS et al., 2013).

Para o branco do reagente FRAP, foram pipetados 360 µL de água destilada e 2700 µL da solução FRAP. Já para os brancos da amostra e da substância referência, foram adicionados 270 µL da solução amostra/ácido ascórbico a 810 µL de água destilada. Todos os tubos foram homogeneizados em vortex, protegidos da luz com papel alumínio e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após o tempo de incubação, foi realizada a leitura espectrofotométrica em placa de 96 poços, com pipetagem de 200 µL de cada solução nos respectivos poços. A absorbância foi medida a 593 nm utilizando um leitor de microplacas (Varioskan). Os resultados foram analisados quanto à linearidade e expressos em µmol AAE/g de ácido ascórbico (BENZIE; DEVAKI, 2017; BENZIE; STRAIN, 1996; MORAIS et al., 2013).

4.6 Método do β-caroteno/ácido linoleico

O ensaio visa analisar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica *in vitro*, sendo realizado conforme Marco (1968), adaptado por Miller (1971) de acordo com as necessidades da amostra. Foram preparadas as amostras e o Trolox (composto de referência) nas concentrações de 2000 a 62,5 µg/mL em etanol, resultando em concentrações finais nos poços de 38,46 a 2,4 µg/mL. A solução estoque de beta-caroteno foi preparada a 2 mg/mL em clorofórmio. Em seguida, foi preparada a emulsão lipídica contendo 1000 µL da solução estoque de beta-caroteno, 25 µL de ácido linoleico, 200 mg de tween 40 e 500 µL de clorofórmio. Essa emulsão foi levada ao banho-maria a 40 °C sob o fluxo laminar durante 10 minutos para a evaporação do clorofórmio. Foram adicionados 50 mL de água deionizada oxigenada (bomba de oxigênio) e homogeneizado.

Para o plaqueamento foram utilizadas placas de 96 poços. Foram pipetados 10 µL de amostra ou composto de referência e 250 µL da emulsão. O mesmo foi feito para o controle, porém usando o metanol. A placa foi imediatamente levada ao leitor de microplacas Varioskan a 45°C durante 120 minutos com leituras a cada 15 minutos ao comprimento de onda a 470 nm. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. Para a obtenção dos resultados de porcentagem de inibição da peroxidação lipídica, foi realizado o cálculo a partir da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{(Aa - Ab)}{(Ac - Ab)} \right] \times 100$$

sendo,

Aa: absorbância da amostra no tempo final

Ab: absorbância do controle positivo no tempo final

Ac: absorbância do controle negativo no tempo final

4.7 Análise das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α por kit ELISA

Para a análise de citocinas, as células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^4$ células por poço e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o meio foi removido e os poços dos grupos controle positivo e tratamento foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 1 µg/mL. Nos poços do grupo tratamento, também foram adicionados 50 µL do extrato de capim-elefante (EHRS30, EHRS40, EAS), nas concentrações de 1000 a 50 µg/mL, seguido de incubação por mais 24 horas nas mesmas condições (37 °C, 5 % de CO₂).

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos estéreis de 1,5 mL, sendo então centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e armazenado a -80 °C. Para a dosagem das citocinas, os sobrenadantes foram descongelados e as análises realizadas conforme o protocolo do kit ELISA (ELISA Development kit Preprotech®). As leituras foram feitas no comprimento de onda de 405 nm utilizando o leitor Varioskan (HSIEH; YANG, 2013; OLSON; MILLER, 2004).

4.8 Atividade antitumoral

Para a análise da atividade antitumoral, utilizou-se a linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma mamário humano, cultivada conforme descrito no item 4.3.1. A escolha dessa linhagem baseou-se em estudos prévios que demonstram o efeito antitumoral de antocianinas sobre células de câncer de mama (CHEN et al., 2020a; Rabelo et al., 2023). A viabilidade celular foi avaliada seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2.

4.9 Ensaio de bioacessibilidade - simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal INFOGEST 2.0

Para a análise do extrato de capim-elefante roxo, foram utilizadas as enzimas pepsina e pancreatina, uma vez que o objetivo foi avaliar a digestibilidade dos compostos bioativos. Além disso, a literatura indica que essa espécie não apresenta quantidades significativas de carboidratos (como o amido) ou lipídeos (BRODKORB et al., 2019; VIVERGRASS, 2025; QUEIROZ FILHO, 2001).

A determinação da atividade enzimática da pancreatina e da pepsina foram realizadas conforme Minekus (2014). A atividade enzimática da pancreatina suína (Sigma-Aldrich, CAS nº P7545) foi avaliada por meio da hidrólise do éster metílico do (2S)-2-[(4-metilbenzenossulfonil)amino]-5-guanidinopentanoato (TAME). A enzima foi testada em duas concentrações (1 e 0,5 mg/mL em HCl 1 mM) e o substrato TAME a 10 mM em água deionizada. Os reagentes foram mantidos em banho de gelo a 4 °C.

A reação foi realizada em cubetas de quartzo contendo 2,6 mL de tampão Tris-HCl 0,046 M com CaCl₂ 0,0115 M (pH 8,1), 300 µL da solução de TAME e 100 µL da solução de pancreatina. O branco foi preparado substituindo-se a enzima por 100 µL de HCl 1 mM. As leituras da absorbância a 247 nm foram realizadas a cada 10 segundos, com intervalos de 30 segundos, durante um total de 10 minutos.

O procedimento foi repetido individualmente para cada concentração, a fim de evitar degradação da enzima. Ao final, os dados de densidade óptica foram

utilizados para gerar a curva de atividade, sendo a média final expressa em unidades enzimáticas por miligrama (U/mg).

A atividade enzimática da pepsina suína (Sigma-Aldrich Cas, Nº. P7000) foi determinada por meio da quantificação dos peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) liberados após a hidrólise da hemoglobina (Sigma-Aldrich, CAS Nº H2625). A enzima foi testada em duas concentrações (5 a 30 µg/mL em HCl 10 mM), o substrato (Hemoglobina bovina) a 2 % (m/v), pH 2,0, em água deionizada e o ácido tricloroacético (TCA) a 5 % em água deionizada. Os reagentes foram mantidos em banho de gelo a 4 °C.

Os microtubos contendo 500 µL do substrato, foram pré-incubados em banho-maria a 37 °C por 3 minutos para equilibrar a temperatura. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de pepsina, que foi conduzida por exatos 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1.000 µL de TCA 5 %. Para os brancos, a adição da pepsina foi realizada somente após a adição do TCA. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a $6.000 \times g$ por 30 minutos a 20 °C, e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos microtubos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 280 nm em espectrofotômetro utilizando cubetas de quartzo. A atividade enzimática foi expressa em unidades de atividade enzimática (U/mg).

O protocolo de digestão *in vitro* foi realizado conforme BRODKORB (2019), contemplando as fases oral, gástrica e intestinal (Figura 4). A primeira etapa foi o preparo das soluções fluídas oral (SFO) gástrica (SFG) e intestinal (SFI). Para a SFO 1,25X foram adicionados 18,875 mL de cloreto de potássio 0,5 M, 4,625 µL de fosfato monobásico 0,5 M, 8,5 mL de bicarbonato de sódio 1 M, 625 µL de cloreto de magnésio anidro 0,15 M e 75 µL de carbonato de amônio a 0,5 M e feito o ajuste de pH utilizando hidróxido de sódio NaOH 1 M até pH 7,0. Para o preparo da SFG 1,25X foram adicionados 8,625 mL de cloreto de sódio 0,5 M, 1,125 µL de fosfato monobásico 0,5 M, 15,625 mL de bicarbonato de sódio 1 M, 14,75 mL de cloreto de sódio 2 M, 500 µL de cloreto de magnésio anidro 0,15 M e 625 µL de carbonato de amônio 0,5 M e feito o ajuste de pH a 3,0 utilizando HCl 1M. Para o preparo da SFI

1,25X foram adicionados 8,5 mL de cloreto de sódio 0,5 M, 1.000 µL de fosfato monobásico 0,5 M, 53,125 mL de bicarbonato de sódio 1 M, 12 mL de cloreto de sódio 2 M, 1.375 µL de cloreto de magnésio anidro 0,15 M e feito o ajuste de pH a 7,0 utilizando NaOH 1 M. Em seguida a bile e as enzimas foram pesadas e mantidas no gelo. Todas as etapas foram analisadas em duplicatas.

Para a fase oral, 5 mL da amostra (EHRS30, EHRS40 e EAS), a uma concentração de 2000 µg/mL (reconstituída em água deionizada), foram misturados a 4 mL de SFO 1,25× (37 °C), 25 µL de CaCl₂ (0,3 M) e 475 µL de água deionizada, totalizando 10 mL. A mistura foi incubada a 37 °C por 2 minutos sob agitação constante (100 rpm) em shaker. Os tubos referentes à fase oral foram imediatamente congelados a -80 °C, enquanto os demais seguiram para as fases subsequentes.

Na fase gástrica, foram adicionados 8,5 mL de SFG 1,25× às amostras provenientes da fase oral, com o pH ajustado para 3,0 usando HCl 1 M. O volume de ácido utilizado foi subtraído posteriormente sobre o volume de água deionizada a ser adicionada (995 µL). Após a correção de volume com base no ácido utilizado, foram adicionados 5 µL de CaCl₂ (0,3 M) e 500 µL de pepsina diluída em água deionizada. A incubação foi realizada a 37 °C por 2 horas sob agitação constante em shaker. Após esse período de incubação, os tubos desta fase foram imediatamente congelados no - 80 °C. E os demais seguiram para a fase final.

Na fase intestinal, o pH das amostras foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M, seguido da adição de 8,5 mL de SFI 1,25×, 40 µL de CaCl₂ (0,3 M), 2,5 mL de bile (10 mM) e 5 mL de pancreatina diluída em SFI. A mistura foi incubada a 37 °C por 2 horas em shaker com agitação contínua. Ao final, os tubos foram imediatamente congelados no - 80 °C para posterior análise.

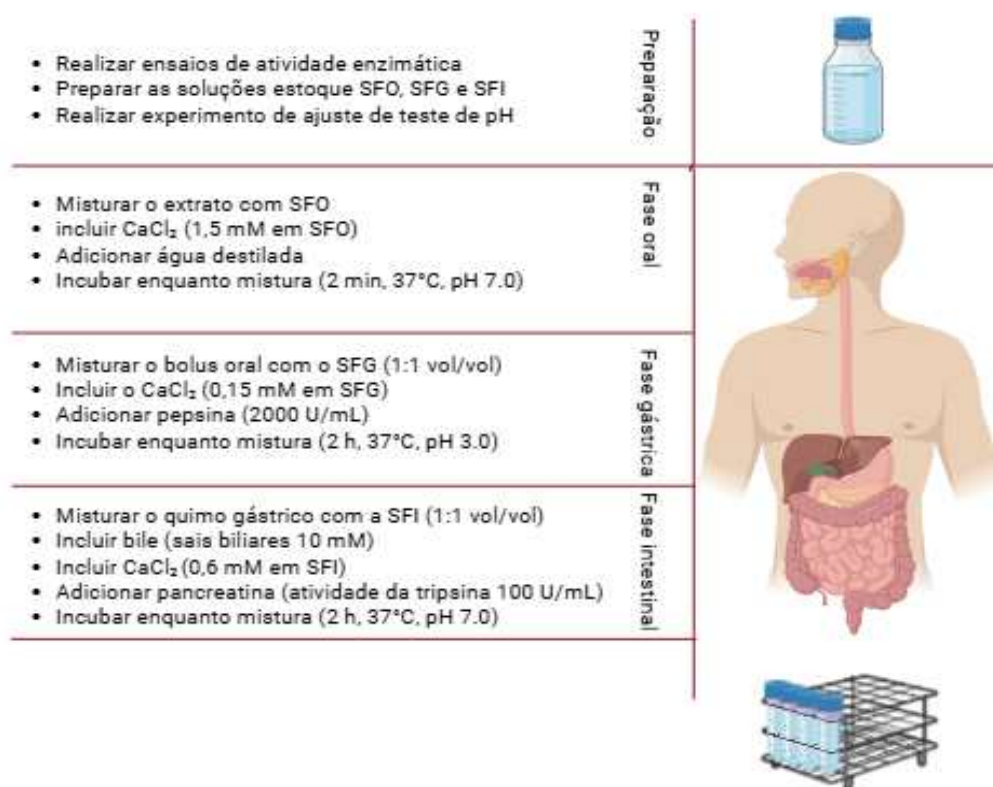


Figura 4. Diagrama de fluxo do método de digestão *in vitro* INFOGEST 2.0

Fonte: adaptado pela autora de BRODKORB et al. (2019)

4.10 Análise antioxidante pelo método de sequestro de radical livre (DPPH) para avaliação da bioacessibilidade

Os tubos do ensaio INFOGEST foram descongelados, centrifugados a 8.000 x g a 4 °C durante 15 minutos. Em seguida foi feito o ajuste do pH a 2.0 para maior estabilidade das antocianinas e feitas alíquotas em microtubos de 2 mL, armazenados no -80 °C até o momento da análise. Esse ensaio foi realizado para amostras da fase gástrica e intestinal em triplicata em placa de 96 poços em diluição seriada. O protocolo seguiu conforme o item 4.4.

4.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism 8 (versão 8.0) e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. O nível de significância estatística adotado foi de 5 % ($p < 0,05$).

Para a comparação entre dois grupos (EHRS30 e EAS), como na avaliação do rendimento dos extratos, foi empregado o teste t de Student. Já para as análises, que envolvem mais de dois grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida por testes *post-hoc* para identificar as diferenças entre os grupos. Especificamente, o teste de Dunnett foi aplicado nos ensaios de viabilidade celular (MTT) e citotoxicidade, enquanto o teste de Tukey foi utilizado para as análises de atividade antioxidante (DPPH, β -caroteno/ácido linoleico), anti-inflamatória (citocinas) e bioacessibilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e rendimento dos compostos bioativos do capim-elefante

Com base na massa utilizada para a extração e na massa obtida após a liofilização dos extratos hidroalcoólicos e aquosos, foram calculados os valores de massa final e seus respectivos rendimentos sobre as folhas frescas. O extrato hidroalcoólico de capim-elefante apresentou massa de $6,19 \pm 0,311$ g com um rendimento de $24,76 \pm 1,24$ %, enquanto o extrato aquoso obteve um rendimento significativamente menor ($p < 0,05$), conforme o teste t de Student. Diante das características das soluções extratoras e dos seus respectivos mecanismos de extração, observa-se um impacto direto no rendimento, sendo que a solução aquosa ácida apresentou rendimento inferior à solução hidroalcoólica ácida na proporção de 70:30 (etanol:água) (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimento dos extratos hidroalcoólico e aquoso de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. Os valores representam a média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student.

Amostra	Massa (g)*	Rendimento (%)*
Extrato aquoso seco	$4,74 \pm 0,012$	$18,96 \pm 0,048$

Extrato hidroalcoólico seco	6,19 ± 0,311	24,76 ± 1,24
-----------------------------	--------------	--------------

(*) indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Comparado ao rendimento de extratos vegetais descritos na literatura, o extrato de capim-elefante apresentou um bom rendimento. Por exemplo, extratos etanólicos de folhas de *Olea europaea* (oliveira) e *Acacia dealbata* (mimosa) apresentaram rendimentos de $4,1 \pm 1,3 \%$ e $6,0 \pm 2,2 \%$ sobre as folhas frescas, respectivamente (BORGES et al., 2020). Esses dados reforçam o potencial do capim-elefante como fonte vegetal promissora para obtenção de extratos com elevado rendimento.

A extração de compostos bioativos de matrizes vegetais é uma etapa essencial para o estudo das suas propriedades funcionais (CAVALCANTI et al., 2021). Dentre os diversos métodos disponíveis, a extração com solventes orgânicos é amplamente utilizada devido a sua simplicidade, eficácia e baixo custo. A proporção de 70 % etanol tem se mostrado eficaz na extração de composto fenólicos, flavonoides e antocianinas, devido à sua polaridade intermediária, que favorece a solubilização de diferentes classes de metabólitos secundários (ADRIANO, 2024; MONRAD et al., 2010; PINTO NOGUEIRA, 2023). A seleção do sistema solvente constitui uma etapa crítica na extração de antocianinas, exigindo uma análise cuidadosa das propriedades físico-químicas dos compostos a serem extraídos (ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; GONZALEZ DE MEJIA, 2018). O método de extração influencia diretamente o rendimento e está fortemente relacionado à polaridade dos solventes utilizados, o que impacta significativamente a pureza, a estabilidade e a composição final do extrato (CAVALCANTI et al., 2021; KAUR; YOUSUF; QADRI, 2024).

A água, por sua vez, caracterizada por sua elevada polaridade, favorece a extração de compostos hidrofílicos, permite que a amostra seca hidrate e facilita a penetração do solvente na matriz. Dessa forma, acelera a difusão dos metabólitos intracelulares para o meio extrator (CAVALCANTI et al., 2021; LI et al., 2024; MONRAD et al., 2010). Já o etanol apresenta polaridade intermediária, permitindo solubilizar compostos menos polares. Essa característica também favorece uma

maior taxa de difusão do soluto e diminui as interações indesejadas entre o soluto e a matriz (CAVALCANTI et al., 2021; MONRAD et al., 2010).

Além disso, a acidificação da solução extratora representa um parâmetro fundamental para a estabilidade das antocianinas, visto que estes compostos se mantêm preferencialmente na forma de cátion flavílio sob condições ácidas (pH 1,0-2,0), conferindo maior estabilidade estrutural e cromática ao extrato resultante (LI et al., 2024; XUE et al., 2024). Normalmente usa-se o ácido clorídrico ou o acético para o ajuste de pH a uma concentração entre 1 e 5 % (ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; GONZALEZ DE MEJIA, 2018; ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; SAMOTA et al., 2022).

5.2 Determinação de cianidina-3-glicosídeo por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

A análise do teor de cianidina-3-glicosídeo (C3G) nos diferentes extratos revelou variações significativas associadas a múltiplos fatores, incluindo o tipo de solvente, as condições de evaporação térmica e a forma de armazenamento. Considerando que as amostras foram analisadas após o período de armazenamento, foi possível avaliar o impacto da extração, além da estabilidade após o seu armazenamento.

A C3G é uma antocianina de coloração que varia entre o vermelho ao vermelho arroxeado, amplamente distribuída em vegetais, sendo a forma mais comum e bem caracterizada entre as antocianinas presentes em plantas. Trata-se de uma antocianina glicosilada, o que lhe confere maior estabilidade em comparação às formas agliconas, especialmente em condições adversas de processamento e armazenamento (DEEPA et al., 2023; JIA et al., 2020). Em capim-elefante, derivados da cianidina já foram identificados nas folhas (ZHOU et al., 2019), o que fundamentou a escolha por sua identificação e quantificação neste trabalho.

Os compostos presentes no extrato de capim-elefante roxo identificados, com base no padrão comercial, está apresentado na figura A1, em que observa-se um pico intenso em aproximadamente 1,75 minutos. De modo geral, os extratos obtidos com solvente hidroalcoólico acidificado (etanol:água 70:30, pH 2,0), na forma líquida, apresentaram teores mais elevados de C3G em comparação aos extratos aquosos (Tabela 3), com valores superiores a 5 mg/L de cianidina-3-glicosídeo. Apesar dos maiores teores de C3G nos extratos hidroalcoólicos, o extrato aquoso seco (EAS) apresentou teor elevado de C3G, também superior a 5 mg/L, que não diferiu estatisticamente do extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C (EHSR30) e do extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 40 °C (EHLR40), (Tabela 3).

A comparação entre os extratos rotaevaporados a diferentes temperaturas revelou que o aumento da temperatura para 40 °C (EHSR40) promoveu maior degradação da C3G, apesar da redução no tempo de exposição ao calor. Por outro lado, no extrato líquido processado a 30 °C por 55 minutos (EHLR30), o teor também foi inferior, indicando que o tempo prolongado de exposição térmica, mesmo sob temperatura mais branda, associado à forma líquida pode igualmente comprometer a estabilidade da antocianina. O extrato aquoso armazenado na forma líquida (EAL) apresentou o menor teor de C3G entre todas as amostras, com diferença estatisticamente significativa em relação às demais ($p < 0,05$).

Tabela 3. Teor de cianidina-3-glicosídeo (C3G) nos extratos líquidos e secos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumacher) Morrone], expressos em µg/mL. Os valores representam média ± desvio padrão de três repetições.

Amostras	Cianidina-3-glicosídeo (mg/L) ¹
EHSR30	5,40 ± 0,47 ^a
EAS	5,09 ± 0,26 ^a
EHLR40	5,04 ± 0,39 ^a
EHL	4,71 ± 1,09 ^{ab}

EHLR30	3,27 ± 0,35 ^{bc}
EHSR40	3,36 ± 0,16 ^{bc}
EAL	2,22 ± 0,62 ^c

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EAS: extrato aquoso sólido; EHLR40: extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 40 °C; EHL: extrato hidroalcoólico líquido. EHLR30: extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAL: extrato aquoso líquido.

A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (UPLC-MS/MS) é uma técnica analítica altamente precisa e versátil, amplamente empregada na quantificação de compostos em matrizes complexas (RAHMAN et al., 2022; RATHOD et al., 2019). Essa metodologia combina a eficiência do UPLC, que utiliza colunas com partículas inferiores a 2,0 µm e opera sob pressões entre 1000 e 1300 bar, resultando em maior resolução e velocidade analítica, com a especificidade da espectrometria de massa em modo MRM, que permite a quantificação seletiva e sensível de múltiplos analitos simultaneamente (RATHOD et al., 2019).

As principais vantagens da UPLC-MS/MS incluem maior sensibilidade e seletividade em comparação a métodos convencionais, além de permitir análise mais rápida, com menor consumo de solventes e excelente repetibilidade (LIU, H. et al., 2018; LU et al., 2023). Diante dessas características, essa técnica foi escolhida neste estudo para a quantificação da C3G nos extratos de capim-elefante.

A extração hidroalcoólica, associada à secagem por liofilização e ao armazenamento em baixa temperatura, demonstrou boa eficiência na obtenção e estabilidade da C3G, o que está em consonância com a literatura (TAGHAVI; PATEL; RAFIE, 2022). Isso se deve à polaridade intermediária do etanol, que favorece a solubilização de compostos fenólicos, como as antocianinas,

especialmente em meio ácido (MONRAD et al., 2010; ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; GONZALEZ DE MEJIA, 2018).

O resultado obtido referente ao extrato aquoso liofilizado pode estar associado à liofilização rápida do extrato logo após a extração, que provavelmente promoveu uma preservação eficiente da C3G, minimizando perdas oxidativas. Adicionalmente, a ausência de uma etapa térmica anterior à secagem no EAS pode ter contribuído para a estabilidade da antocianina.

Embora temperaturas mais elevadas sejam geralmente associadas à degradação térmica de antocianinas, o menor tempo de evaporação (30 minutos) pode ter atenuado esse efeito, preservando o composto, no extrato que foi rotaevaporado à 40 °C. Ademais, o armazenamento em meio líquido acidificado (pH 2,0) pode ter favorecido a estabilidade da C3G, mantendo-a predominantemente na forma de cátion flavílico, que é mais resistente à degradação oxidativa (LI et al., 2024). Também é possível que a evaporação mais eficiente do etanol a 40 °C tenha concentrado os compostos solúveis remanescentes.

O teor encontrado de C3G no extrato aquoso líquido, corrobora à baixa estabilidade da C3G em soluções aquosas, devido à maior suscetibilidade à degradação oxidativa, mesmo sob baixas temperaturas, uma vez que a água possui alta polaridade e não oferece proteção estrutural ao composto.

De modo geral, os resultados indicam que a preservação da C3G não depende exclusivamente do tipo de solvente utilizado na extração, mas do conjunto de estratégias aplicadas no processamento e no armazenamento. A liofilização mostrou-se eficaz na manutenção da integridade da C3G, especialmente quando realizada imediatamente após a extração. Além disso, o uso de solventes acidificados e a otimização do tempo e temperatura de rotaevaporação também influenciaram positivamente a estabilidade do composto.

Esses resultados reforçam a importância da padronização das etapas pós-extração para assegurar a qualidade funcional dos extratos vegetais. A escolha

criterosa do sistema extrator e das condições de conservação pode ser determinante para a recuperação de compostos bioativos como a C3G, com implicações relevantes para seu uso em formulações nutraceuticas e farmaceuticas.

5.3 Viabilidade celular

O ensaio foi conduzido em células da linhagem WI-38, que é validada para testes de citotoxicidade. O mesmo teste foi aplicado em linhagem celular de macrófago murino RAW 264.7, uma vez que foram utilizadas no ensaio de citocinas. Em ambos os casos, foi utilizado o extrato hidroalcoólico, que apresenta maior potencial citotóxico em comparação ao extrato aquoso, possivelmente devido à presença de etanol residual que pode exercer efeito tóxico direto sobre as células. O extrato hidroalcoólico de capim-elefante foi considerado seguro entre as concentrações 1000 a 31,2 µg/mL, uma vez que apresentou viabilidade celular ≥ 70 %. Esses valores atendem ao critério de não citotoxicidade estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009, como pode ser observado pela linha tracejada, para ambas as linhagens celulares (Figuras 6A e B).

Comparado ao controle, células tratadas com meio completo, ou seja, suplementado, apresentaram diferença comparado aos demais grupos, inclusive com o grupo tratado com o meio não suplementado (apenas com RPMI e DMEM), respectivamente. Isso pode ser explicado pelo meio completo apresentar maior disponibilidade de nutrientes para o seu crescimento.

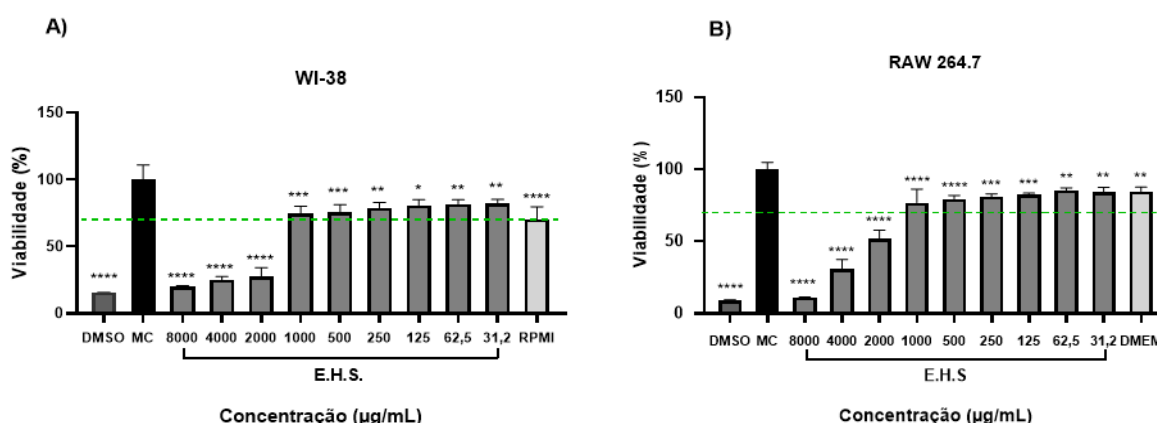


Figura 6. (A) Viabilidade celular (%) da linhagem WI-38 e (B) RAW 264.7 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico seco (EHS) de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida do teste de Dunnett, comparando todos os grupos com o controle MC (meio completo). A linha tracejada indica critério de não citotoxicidade estabelecido pela norma ISO 10993-5:2009. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por $p < 0,05$ (IC 95 %). Sendo * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e se **** $p < 0,0001$.

A avaliação da viabilidade celular de compostos naturais segue os protocolos estabelecidos pela norma ISO 10993-5:2009, que descreve métodos para avaliar a citotoxicidade *in vitro* por meio da incubação de células cultivadas em contato com o material teste e/ou seus extratos, tanto diretamente quanto por difusão. Esta norma internacional fornece diretrizes para determinar a resposta biológica de células cultivadas a materiais, sendo amplamente utilizada para a avaliação de extratos vegetais e compostos naturais bioativos.

A viabilidade celular é um parâmetro essencial em testes de citotoxicidade *in vitro* para analisar os impactos de extratos sobre a saúde da célula (GRUBER; NICKEL, 2023). Entre os métodos validados recomendados pela norma está o ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que permite quantificar a viabilidade celular através da avaliação da saúde celular, morfologia, crescimento e metabolismo celular (ISO 10993-5:2009). A demonstração de que o extrato hidroalcoólico de capim-elefante é seguro em concentrações de até 1000 $\mu\text{g/mL}$ é um passo fundamental para a continuidade dos experimentos. Esse perfil de não citotoxicidade, validado nas linhagens celulares WI-38 e RAW 264.7, permite que o extrato seja utilizado em ensaios subsequentes, garantindo que qualquer efeito biológico observado seja, de fato, resultado da ação dos compostos bioativos presentes no extrato, e não de toxicidade celular.

5.4 Atividade antioxidante

Para uma avaliação abrangente, este estudo utilizou os ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico) e β -caroteno/ácido linoleico. Diferentes mecanismos moleculares podem estar

envolvidos na atividade antioxidante de determinado composto, o que faz com que nenhum método único seja capaz de determiná-la por completo. Por essa razão, é fundamental utilizar mais de um ensaio para analisar esse efeito (CHAVES; SANTIAGO; ALÍAS, 2020; DONOSO-BUSTAMANTE et al., 2025; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023).

Os extratos de capim-elefante liofilizados e o ácido ascórbico (composto referência) foram analisados nas concentrações entre 500 a 0,97 µg/mL no ensaio DPPH. Com base nos valores de IC₅₀ dos extratos liofilizados: aquoso, hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C e a 40 °C, o desempenho sobre a atividade antioxidante foi semelhante, sendo significativamente diferente apenas do ácido ascórbico ($p < 0,05$) (Tabela 4). Além disso, nas concentrações altas e intermediárias 500 e 250 µg/mL, o extrato de capim-elefante aquoso e hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C não apresentaram diferença, comparado ao composto referência com percentual de inibição maior ou igual a 90 % (Figura 7).

É importante ressaltar que o composto referência utilizado, ácido ascórbico, se trata de um composto isolado, diferente do extrato capim-elefante que embora rico em antocianinas, se trata de uma matriz complexa. Dessa forma, embora o valor de IC₅₀ tenha sido diferente e mais alto, comparado ao ácido ascórbico, o extrato pode atuar de forma eficaz como sequestrante de radicais livres.

Tabela 4. Concentração inibitória média (IC₅₀, em µg/mL) dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] aquosos secos, hidroalcoólicos rotaevaporados a 30 °C e 40 °C sobre o radical DPPH. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três repetições.

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL) ¹
Ácido ascórbico	1,248 ± 0,285 ^a
EAS	14,556 ± 1,106 ^b
EHSR30	16,786 ± 3,196 ^b

EHSR40

17,330 ± 0,471^b

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). EAS.: extrato aquoso seco; EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C.

O ensaio DPPH se baseia no mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (HAT) ou transferência de elétrons único (SET), ou seja, é um ensaio de modelo misto, muito utilizado para analisar em primeiro momento se o composto analisado apresenta alguma atividade antioxidante (BALIYAN et al., 2022; CHAVES; SANTIAGO; ALÍAS, 2020; DUDONNÉ et al., 2009; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023). O resultado do ensaio é influenciado não apenas pela concentração do composto, mas também por outros fatores, como sua estrutura, o solvente utilizado e o pH. O composto DPPH é um radical livre estável devido a estrutura molecular única. A sua coloração roxa pode ser observada em absorção de luz na região do espectro visível, no comprimento de onda de 517 nm. Quando o composto analisado apresenta atividade antioxidante, ocorre mudança na coloração da solução, de roxo intenso para roxo mais claro ou até mesmo amarelo claro. A redução da absorbância é proporcional à capacidade antioxidante do composto analisado (HUSSEN; ENDALEW, 2023; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023).

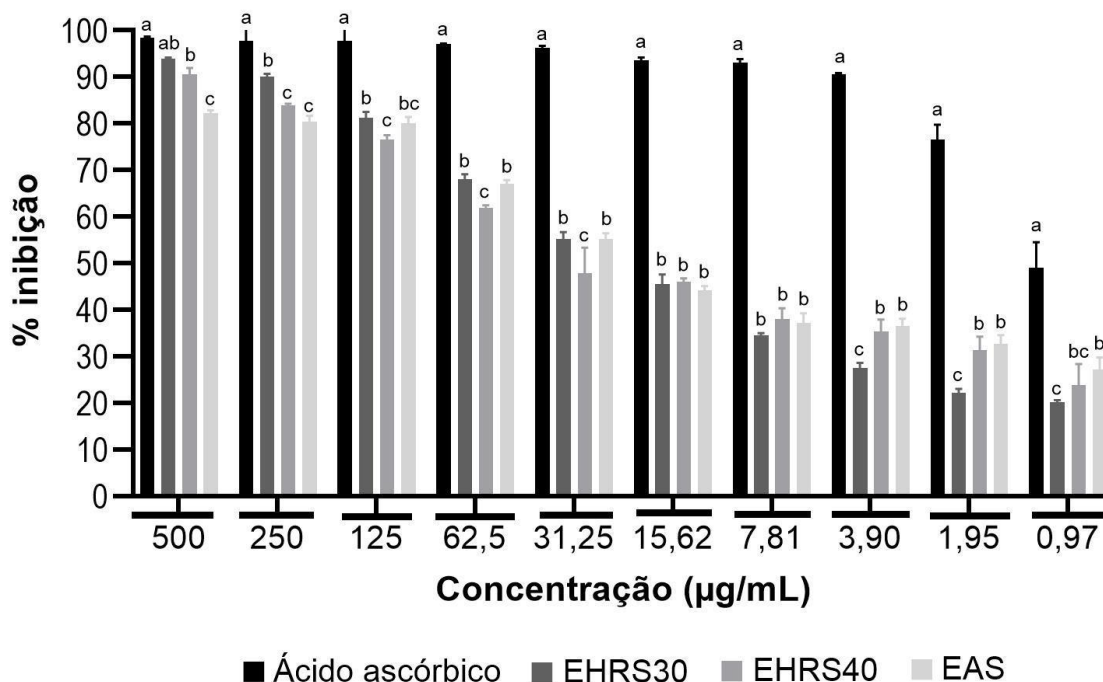


Figura 7. Análise antioxidante por sequestro de radical livre DPPH em amostras de extrato de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] aquoso seco, hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C e a 40 °C, nas concentrações entre 500 a 0,97 µg/mL. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado à 30 °C. EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado à 40 °C. EAS: extrato aquoso seco. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras distintas entre grupos da mesma concentração indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; IC 95 %).

No ensaio FRAP o extrato hidroalcoólico seco por rotaevaporação a 30 °C (EHSR30) apresentou a maior atividade antioxidante, com valor de $354,56 \pm 23,64$ µg de equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra seca (µg AAE/g), diferindo significativamente dos demais. Em seguida, foram observados os valores de $125,67 \pm 15,27$ µg AAE/g para o extrato obtido a 40 °C e de $90,11 \pm 17,10$ µg AAE/g para o extrato aquoso, os quais não apresentaram diferença significativa entre si. A análise das curvas de absorbância apresentadas na Figura 8 evidencia um comportamento dose-dependente para todos os extratos testados, refletindo o aumento da capacidade redutora conforme a concentração das amostras. Embora os extratos de capim-elefante apresentem valores distintos,

conforme mencionado anteriormente, a inclinação das curvas é relativamente próxima, sugerindo que, dentro da faixa testada, todos possuem potencial antioxidante mensurável por meio do método FRAP. No entanto, a curva correspondente ao ácido ascórbico exibiu um aumento mais acentuado da densidade óptica em resposta ao aumento da concentração. Essa diferença corrobora seu uso como padrão positivo no ensaio e ressalta eficácia antioxidante dos extratos de capim-elefante, porém de menor intensidade quando comparados a um antioxidante puro.

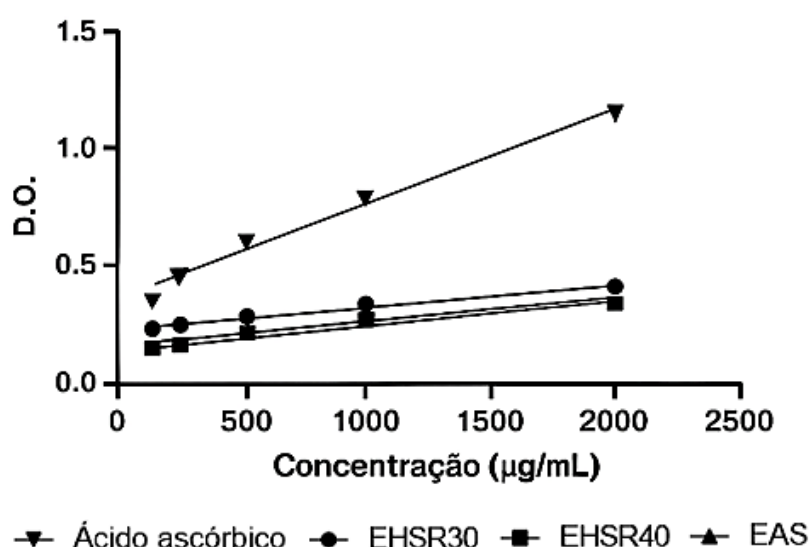


Figura 8. Capacidade de redução do ferro para o composto referência (ácido ascórbico). O resultado está expresso pela curva linear, entre as concentrações 2.000 a 125 µg/mL e a densidade óptica (D.O.). $R^2 = 0,976$, $Y = 0,0003470X + 0,4307$ (ácido ascórbico). EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C. EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C. EAS: extrato aquoso seco. (ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; IC 95 %).

O ensaio do poder redutor do ferro (FRAP) se baseia na redução dos íons férricos (Fe^{3+}), através do mecanismo de transferência de elétron único (SET). É um método amplamente utilizado para analisar compostos bioativos (DUDONNÉ et al., 2009; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023). É um ensaio colorimétrico, em que na presença do composto antioxidante, ocorre a mudança do complexo férrico incolor (Fe^{3+} -tripiridiltiazina) para o complexo ferroso azul-violeta (Fe^{2+} -

tripiridiltriazina). A alteração da cor é analisada por leitura da absorbância no comprimento de onda 593 nm. Uma vantagem deste ensaio para o extrato de capim-elefante é que ele é realizado em meio ácido, o que favorece a estabilidade das antocianinas presentes.

Para o ensaio do β -caroteno/ácido linoleico, foi utilizado como composto de referência o butil-hidroxitolueno (BHT), um antioxidante sintético comumente utilizado em testes de avaliação da capacidade antioxidante de compostos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A inibição da oxidação foi dose-dependente, ou seja, à medida que a concentração dos compostos diminui, a inibição também se reduz (Figura 9).

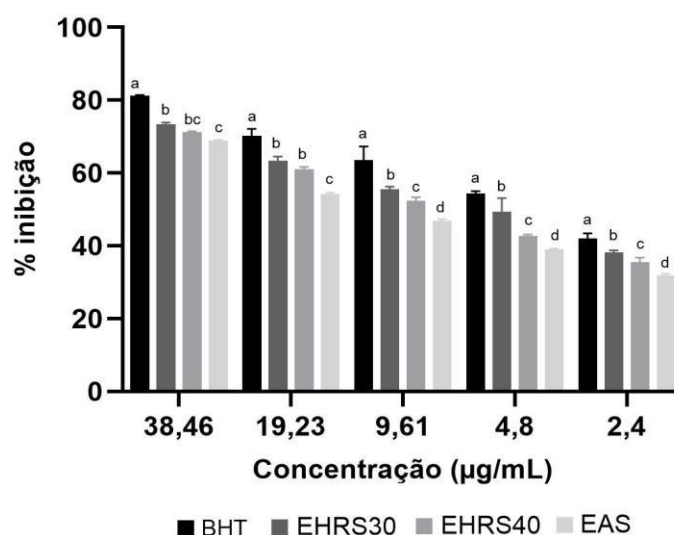


Figura 9. Porcentagem de inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoleico pelos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] em diferentes concentrações (38,46 a 2,4 $\mu\text{g/mL}$). BHT: butil-hidroxitolueno (controle positivo); EHRS30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHRS40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos para cada concentração, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %).

O BHT (controle) apresentou 81,22 % de inibição da oxidação na concentração de 38,46 $\mu\text{g/mL}$. Entre os extratos de capim-elefante secos, aquele que foi rotaevaporado a 30 °C demonstrou melhor desempenho, com valor mais

próximo ao do controle, atingindo 76,36 % de inibição, seguido pelo extrato rotaevaporado a 40 °C que apresentou 71,22 % e o extrato aquoso, 68,87 %.

Embora todas as amostras analisadas tenham apresentado diferença estatística significativa em relação ao valor de IC_{50} , o extrato hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C apresentou o valor de IC_{50} mais próximo do controle positivo (Tabela 5). O ensaio β -caroteno/ácido linoleico é uma metodologia utilizada para a análise da peroxidação lipídica em compostos. Quando o β -caroteno reage com radicais livres, ocorre sua oxidação, formando hidroperóxidos, compostos que contêm o grupo -OOH e atuam como receptores de elétrons (TOYOSAKI, 2002). Trata-se de um ensaio colorimétrico em que a intensa coloração amarela do β -caroteno torna-se pálida devido à oxidação provocada pelos radicais livres formados na emulsão de ácido linoleico. Na presença de compostos antioxidantes, essa reação de oxidação pode ser retardada (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Tabela 5. Concentração inibitória média (IC_{50} , em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] e do controle positivo (BHT) no ensaio de inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições.

Amostra	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹
EAS	11,170 \pm 0,031 ^a
EHSR40	7,816 \pm 0,310 ^b
EHSR30	5,816 \pm 0,627 ^c
BHT	3,904 \pm 0,127 ^d

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), após ANOVA unidirecional (IC 95 %). BHT: butil-hidroxitolueno (controle positivo); EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco.

Considerando que o controle é uma substância antioxidante sintética e pura, enquanto o extrato analisado constitui uma matriz complexa, as amostras demonstraram boa capacidade antioxidante. Destaca-se especialmente o extrato hidroalcoólico liofilizado que foi rotaevaporado a temperatura inferior (30 °C), o qual apresentou resultados mais próximos ao controle, sugerindo que temperaturas mais baixas durante o processamento preservam melhor os compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante neste ensaio.

5.5 Atividade anti-inflamatória

Em macrófagos RAW 264.7, os extratos testados promoveram uma redução significativa ($p < 0,05$) na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, de forma dose-dependente, quando comparados ao grupo controle, o qual foi estimulado com lipopolissacarídeo (LPS), sem tratamento (Figura 10). Entre os extratos avaliados, o extrato hidroalcoólico rotaevaporado a 30 °C (EHRS30) apresentou o melhor desempenho na inibição dessas citocinas, especialmente na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Especificamente, o EHRS30 reduziu os níveis de TNF- α em até $74,99 \pm 2,77 \%$, seguido do EHRS40 ($68,44 \pm 3,27 \%$) e do extrato aquoso (EAS) ($59,13 \pm 3,35 \%$). Para IL-1 β , observou-se uma inibição de $81,02 \pm 4,7 \%$ para o EHRS30, $75,3 \pm 3,1 \%$ para o EHRS40 e $66,2 \pm 2,3\%$ para o EAS. Em relação à IL-6, as reduções foram de $66,8 \pm 1,21 \%$, $52,49 \pm 2,58 \%$ e $49,32 \pm 1,62 \%$, respectivamente. Ainda que a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ tenha promovido as maiores inibições, reduções significativas também foram observadas na dose intermediária (250 $\mu\text{g/mL}$), evidenciando um perfil dose-resposta consistente. Os extratos avaliados neste estudo foram capazes de promover inibições de 60–80 % com concentrações relativamente baixas (250–500 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo boa atividade anti-inflamatória.

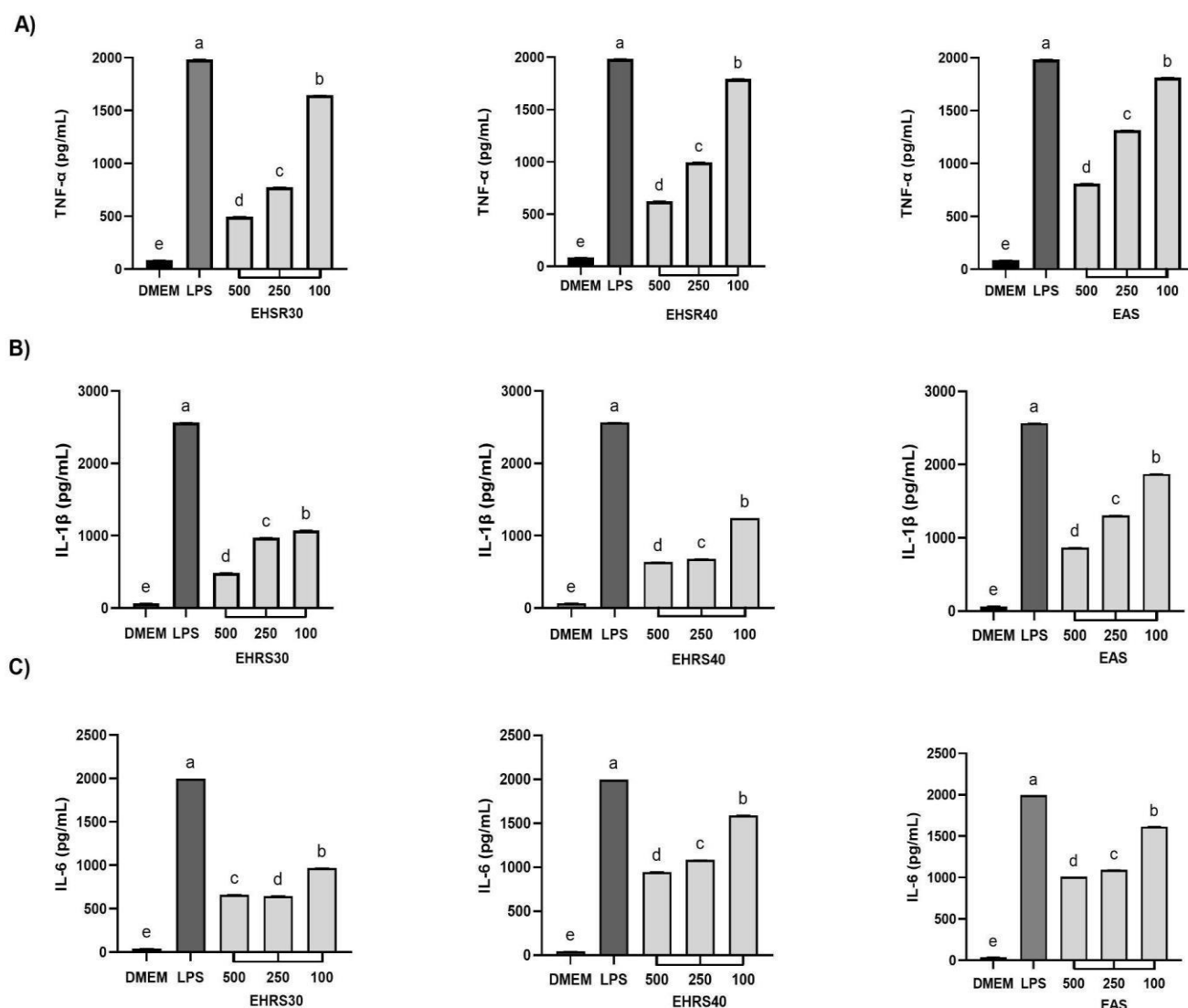


Figura 10. Análises de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, em linhagem RAW 264.7, sendo: DMEM: grupo que recebeu somente o meio não suplementado, utilizado para solubilizar os extratos. LPS: grupo que foi estimulado com LPS a 1 μg/mL durante 24 horas. Demais grupos: representam as concentrações utilizadas dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] (500, 250 e 100 μg/mL). A) Análise do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). B) Interleucina-1β (IL-1β). C) Interleucina-6 (IL-6). EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos para cada concentração, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %).

Os macrófagos são células fagocitárias especializadas, pertencentes ao sistema imunológico inato e desempenham papel central no processo inflamatório, na apresentação de antígenos, fagocitose, secreção de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β e mediadores inflamatórios (AMIRGHOFRAH; NASERI; KALANTAR, 2018). Entretanto, em contexto de inflamação crônica, a redução de citocinas pró-inflamatórias, pode ser benéfica na prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis.

Esses achados mostram o potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais testados, especialmente dos extratos hidroalcoólicos ricos em compostos fenólicos, como as antocianinas. A literatura está em consonância com a capacidade desses compostos de modular vias inflamatórias em modelos *in vitro*. Extratos etanólicos de *Artemisia montana* reduzem IL-1 β e IL-6 de forma dose-dependente em macrófagos estimulados por LPS (JEONG; KIM; MIN, 2018).

Os resultados apresentados revelam potencial antiinflamatório do extrato de capim-elefante, comparável a extratos de *Curcuma longa* que apresentaram redução em torno de 73% para citocina IL-6 e TNF- α (Choi et al., 2019). Enquanto, extratos de batata doce, por exemplo, apresentaram redução de TNF- α entre 11,8% e 30,8 % em concentrações de 25–200 μ g/mL (JIANG et al., 2020). Extratos de framboesa vermelha foram capazes de reduzir significativamente a expressão gênica de IL-1 β e IL-6 em macrófagos RAW264.7 ativados com LPS/IFN- γ , embora sem dados de porcentagem diretamente comparáveis (LI et al., 2014).

A via do NF- κ B é um dos principais reguladores da expressão de genes inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. A literatura aponta que antocianinas podem inibir a ativação e translocação nuclear do NF- κ B, bloqueando a cascata inflamatória. A expressiva redução de citocinas observada neste estudo pode ser explicada, em hipótese, pela inibição desta via sinalizadora (KOWALCZYK et al., 2013; LI et al., 2021; MA et al., 2021).

Além disso, a superioridade do extrato EHRS30 sugere que as condições de processamento (como temperatura de rotaevaporação) impactam diretamente a preservação e a bioatividade dos compostos fenólicos.

5.6 Atividade antitumoral

No ensaio MTT, concentrações iguais ou superiores a 500 µg/mL do extrato hidroalcoólico demonstraram efeito citotóxico sobre as células MCF-7, conforme os critérios da ISO 10993-5:2009, com $23,59 \pm 0,72$ % para 8000 µg/mL comparado ao controle $7,16 \pm 0,10$ %, (Figura 11) com valor de CTC₅₀ (concentração citotóxica 50%) de $1.908,33 \pm 135,06$ µg/mL. Apesar do valor de CTC₅₀ do extrato hidroalcoólico de capim-elefante em células MCF-7 ser superior ao de outros extratos vegetais já consolidados com potentes efeitos citotóxicos, como o extrato de *Punica granatum* L. (CTC₅₀ de 49,08 µg/mL) [OZKAN et al., 2021] ou o de *Annona muricata* (CTC₅₀ de 21,8 µg/mL) [GACCHE et al., 2015], a detecção de um efeito citotóxico significativo a partir de 500 µg/mL indica a presença de compostos bioativos com potencial antitumoral. Esses resultados sugerem que, embora o extrato apresente algum efeito citotóxico em altas concentrações, sua atividade antitumoral frente à linhagem MCF-7 é considerada baixa, especialmente quando comparada a extratos vegetais com ação mais potente descritos na literatura. Entretanto, faz-se relevante para pesquisas futuras avaliar possíveis mecanismos associados ao efeito antiproliferativo do extrato de capim-elefante para compreender melhor o seu efeito, mesmo em concentrações mais elevadas (KIS et al., 2022; OZKAN et al., 2021; SUGANYADEVI et al., 2013; ZHAO et al., 2023).

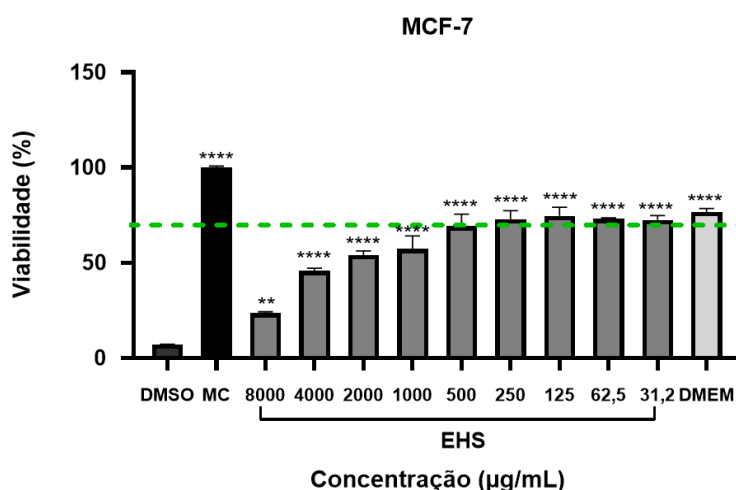


Figura 11. Citotoxicidade (%) na linhagem MCF-7 após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] seco (EHS) avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três repetições. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguida do teste de Dunnett, comparando todos os grupos com o controle DMSO. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por $p < 0,05$ (IC 95 %). Sendo * se $p < 0,05$, ** se $p < 0,01$, *** se $p < 0,001$ e se **** $p < 0,0001$.

A atividade antitumoral de compostos naturais tem sido investigada utilizando linhagens celulares de câncer de mama, sendo a MCF-7 uma das mais empregadas em estudos *in vitro*. A linhagem MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamário humano, é caracterizada como aderente, positiva para receptores de estrogênio, e representa um modelo bem estabelecido para a triagem de agentes antineoplásicos (BOYAN et al., 2003).

5.7 Análise da bioacessibilidade

Para o ensaio de digestão *in vitro* é necessário determinar a atividade enzimática (BRODKORB et al., 2019). A atividade obtida foi de 695 e 7.545 U/mg, para a pepsina e pancreatina (baseada na tripsina), respectivamente. Esse ensaio se faz relevante para manter as condições ideais, considerando as condições fisiológicas da digestão humana. Antes de iniciar o protocolo, é importante avaliar a atividade enzimática das enzimas utilizadas no ensaio, uma vez que a mudança de lote e o tempo de armazenamento interferem na atividade enzimática do produto,

mesmo que ainda esteja lacrado. Essa padronização permite determinar a quantidade de enzima a ser adicionada à amostra para a digestão (BRODKORB et al., 2019).

A pepsina é uma enzima proteolítica secretada pelo estômago, ativada sob meio ácido, responsável pela digestão inicial de proteínas através da hidrólise de ligações peptídicas específicas. A fase gástrica utiliza pepsina a 2000 U/mL em pH 3,0 (BRODKORB et al., 2019; DUQUE-SOTO et al., 2022). A pancreatina é um complexo enzimático extraído do pâncreas suíno que contém múltiplas enzimas digestivas essenciais para a fase intestinal da digestão. A pancreatina de origem suína é comumente usada para fornecer enzimas pancreáticas relevantes como proteases, amilase e lipase. A pancreatina apresenta atividade sob pH alcalino. A fase intestinal utiliza 100 U/mL, baseada na tripsina em pH 7,0 (BRODKORB et al., 2019; DUQUE-SOTO et al., 2022).

Após as etapas da digestão *in vitro* foi realizado o ensaio antioxidante DPPH, com intuito de verificar se os extratos (sobrenadante obtido do processo de digestão *in vitro*) ainda apresentavam atividade, mesmo após todas as etapas, especialmente pensando acerca das alterações de pH que ocorrem a cada fase da digestão. Todos os extratos apresentaram melhor desempenho na fase intestinal, comparado à fase gástrica, mediante a redução dos valores de IC_{50} ($p < 0,05$) (Figura 12). Durante a fase gástrica da digestão *in vitro*, os extratos hidroalcoólicos (EHSR30 e EHSR40) apresentaram percentuais de inibição do radical DPPH semelhantes entre si (Figura 13A), enquanto o extrato aquoso (EAS) demonstrou menor atividade antioxidante em todas as concentrações testadas. Por outro lado, na fase intestinal (Figura 13B), todos os extratos, inclusive o aquoso, apresentaram comportamento mais homogêneo, com percentuais de inibição estatisticamente semelhantes em várias concentrações, indicando uma possível modificação ou liberação de compostos antioxidantes ao longo da digestão.

A partir dos dados de IC_{50} pelo ensaio DPPH (Figura 12) o percentual de bioacessibilidade foi calculado para a sua atividade antioxidante. Com base nos dados obtidos (Tabela 6), todos os extratos apresentaram percentuais acima de 70

%, indicando uma preservação significativa da atividade antioxidante após o processo de digestão *in vitro*. Entretanto, o extrato aquoso, embora tenha apresentado maior IC₅₀ após a digestão *in vitro*, apresentou maior bioacessibilidade referente à sua atividade antioxidante, comparado aos demais extratos ($p < 0,05$). Esse efeito pode estar relacionado à liberação de peptídeos antioxidantes, como observado em estudos com a espécie *Pennisetum glaucum* (AGRAWAL; JOSHI; GUPTA,2016).

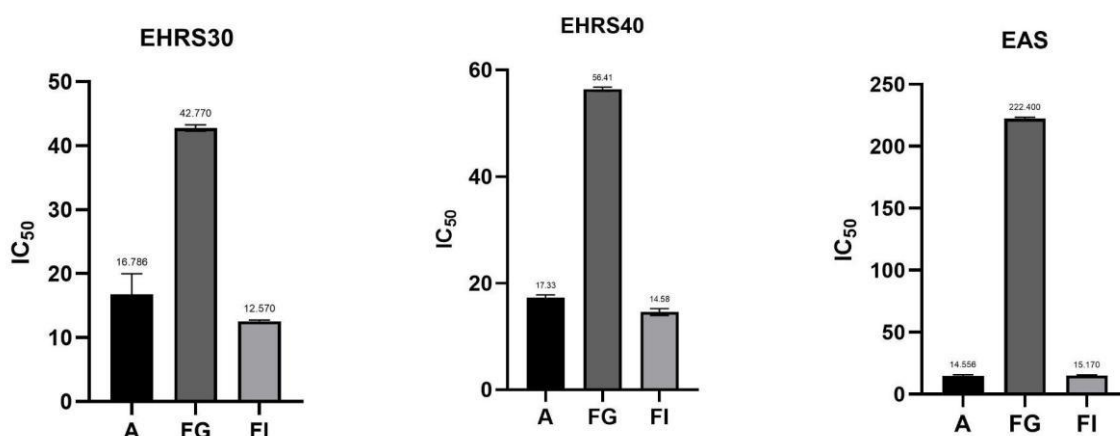


Figura 12. Concentração inibitória média (IC₅₀) pelo ensaio DPPH após a digestão (fase gástrica e intestinal) comparada ao ensaio antes do processo digestivo *in vitro* dos extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. E.H.S.R.30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C. E.H.S.R.40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C. E.A.S.: extrato aquoso seco. A: antes da digestão *in vitro*; FG: após a fase gástrica; FI: após a fase intestinal. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %). As comparações foram realizadas apenas entre as etapas de um mesmo extrato.

Tabela 6. Índice de bioacessibilidade da atividade antioxidante, baseada no valor de concentração inibitória média (IC₅₀, em µg/mL), dos extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS.: extrato aquoso seco. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas

significativas entre os grupos conforme teste de Tukey ($p < 0,05$; IC 95 %). As comparações foram realizadas apenas entre as etapas de um mesmo extrato.

	EHSR30	EHSR40	EAS
DPPH (IC ₅₀ - µg/mL) - Índice de bioacessibilidade	74,88 ± 14,29 ^a	84,13 ± 4,41 ^{ab}	104,26 ± 8,21 ^b

Os valores de IC₅₀ foram analisados individualmente dentro de cada extrato, com o objetivo de comparar as fases anterior à digestão, gástrica e intestinal (Figura 11). Nota-se que, embora na fase gástrica o meio seja ácido, favorável à estabilidade das antocianinas, houve maior atividade antioxidante na fase intestinal.

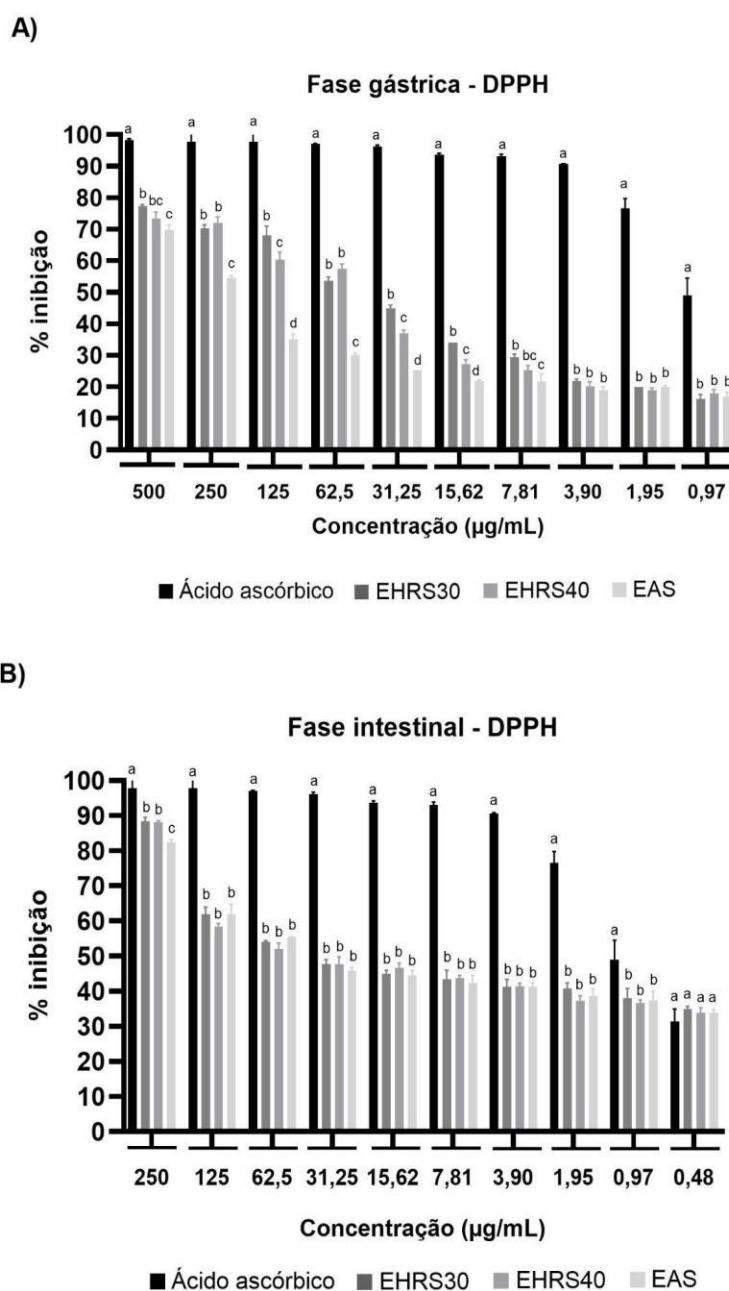


Figura 13. Atividade antioxidante por DPPH antes e após as fases da digestão dos extratos de Capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone]. (A) Fase gástrica. (B) Fase intestinal. EHSR30: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30 °C; EHSR40: extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40 °C; EAS: extrato aquoso seco. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os compostos dentro de cada concentração ($p < 0,05$, teste de Tukey). As comparações foram realizadas separadamente para cada concentração.

Esse resultado sugere que o ambiente intestinal, caracterizado por pH alcalino e pela presença de enzimas pancreáticas, pode ter promovido a liberação de compostos de menor peso molecular anteriormente ligados a componentes da matriz, considerando que os extratos não são compostos isolados. Além disso, a ação enzimática pode ter levado a liberação de metabólitos com maior atividade antioxidante, comparada ao composto de origem. Outro fator importante é a alteração do pH de ácido para alcalino, que pode levar a desprotonação dos polifenóis, o que aumenta a capacidade do composto em doar elétrons (LAIB et al., 2023). Esse aumento de atividade antioxidante após a digestão intestinal corrobora com a ideia de que a biodisponibilidade de compostos bioativos não está apenas relacionada à sua absorção, mas também às transformações que ocorrem no trato gastrointestinal (MANACH et al., 2004).

Entretanto, é difícil comparar à literatura acerca do percentual de bioacessibilidade para a atividade antioxidante, pois os autores embora façam o ensaio DPPH após o protocolo INFOGEST, não calculam esse percentual, apenas apresentam os valores de IC_{50} , ou seja, a concentração mínima capaz de inibir 50 % do radical livre (LAIB et al., 2023; REBOREDO-RODRÍGUEZ et al., 2021; SOLLANO-MENDIETA et al., 2021).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os extratos de capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone], especialmente aqueles preparados por extração hidroalcoólica e rotaevaporados a 30 °C, apresentaram propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e sem efeitos citotóxicos. A cianidina-3-glicosídeo foi identificada e quantificada nos extratos, podendo ser um dos flavonoides mais abundantes nessa matriz. No entanto, investigar a presença de outros compostos bioativos, bem como peptídeos antioxidantes ainda que em menor proporção, pode auxiliar na elucidação dos seus mecanismos de ação e caracterização. Ademais, a ausência de citotoxicidade frente às células fibroblasto

e macrófago reforça a segurança dos extratos até uma concentração de 1000 µg/mL.

Em relação à atividade antioxidante, os extratos demonstraram bom desempenho contra os radicais livres, especialmente na proteção contra a peroxidação lipídica, com manutenção da atividade mesmo após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*. A elevada bioacessibilidade observada, relacionada à atividade antioxidante, reforça o potencial uso desses extratos em formulações nutracêuticas. No entanto, faz-se necessário analisar a bioacessibilidade da cianidina-3-glicosídeo especificamente, para avaliar seu comportamento nas diferentes fases da digestão. É importante ressaltar que o organismo humano apresenta particularidades, como a presença da microbiota intestinal, não contempladas neste ensaio *in vitro*. Dessa forma, torna-se relevante realizar estudos de bioacessibilidade *in vivo* em investigações futuras.

A atividade anti-inflamatória foi evidenciada pela expressiva inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos ativados, com efeito dose-dependente. Tal atividade sugere um mecanismo potencialmente relacionado à inibição da via NF- κ B. Por outro lado, a atividade antitumoral frente à linhagem MCF-7 foi considerada baixa, sendo observada apenas em altas concentrações do extrato hidroalcoólico. Esse resultado, embora inferior ao de extratos vegetais já consolidados na literatura por sua maior potência, ainda indica a presença de compostos bioativos com potencial efeito antiproliferativo, o que justifica a continuidade das investigações, incluindo estudos com outras linhagens tumorais e a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos.

Dessa forma, este trabalho contribui para o conhecimento sobre as propriedades funcionais do capim-elefante roxo, revelando seu potencial como fonte natural de compostos bioativos e justificando sua exploração em futuras aplicações na área de fitoterápicos.

7. REFERÊNCIAS

ADRIANO, Luiz Henrique. **Avaliação do perfil dos extratos aquosos. etanólico e glicólico de antocianinas obtidos a partir de genótipos de capim-elefante com coloração arroxeada.** 2024. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas (ICE), Juiz de Fora, 2024.

AGRAWAL, Himani; JOSHI, Robin; GUPTA, Mahesh. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 204, p. 365–372, 1 ago. 2016.

ALAM, MD. A. et al. Potential health benefits of anthocyanins in oxidative stress related disorders. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 705–749, 8 maio 2021.

ALMADALLI et al. Pomegranate extract-loaded sphingosomes for the treatment of cancer: Phytochemical investigations, formulation, and antitumor activity evaluation. **PloS one**, v. 19, n. 2, p. e0293115–e0293115, 12 fev. 2024.

AMIRGHOFRAN, Z.; NASERI, N.; KALANTAR, K. Anti-inflammatory activity of Echinium amoenum extract on macrophages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 73, 2018.

AN, Y. et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. **Cardiovascular Diabetology**, v. 22, n. 1, p. 237, 2 set. 2023.

ANWAR, S. et al. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 2, p. 1397–1403, 13 jun. 2016.

ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION). **Cell culture protocols and recommendations for each cell line.** Disponível em: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides>. Acesso em: 05 jul. 2025.

AYVAZ, H. et al. Anthocyanins: metabolic digestion, bioavailability, therapeutic effects, current pharmaceutical/industrial use, and innovation potential. **Antioxidants**, v. 12, n. 1, p. 48, 26 dez. 2022.

BALIYAN, S. et al. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1326, 2022.

BARS-CORTINA, D. et al. Chemopreventive effects of anthocyanins on colorectal

and breast cancer: A review. **Seminars in Cancer Biology**, jan. 2021.

BENZIE, I. F. F.; DEVAKI, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity**, p. 77–106, 15 dez. 2017.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.

BORGES, A. et al. Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 48, 28 jan. 2020.

BORTOLINI et al. Biological potential and technological applications of red fruits: An overview. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100014–100014, 9 fev. 2022.

BOYAN, B. D. et al. Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells and estrogen receptor-negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1812–1824, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRANTLEY AKURU, Udiomine *et al.* Phytochemical composition and antidiabetic properties of aqueous stem extract of *Pennisetum purpureum* on alloxan induced diabetic wistar albino rats. Phytochemical Composition and Antidiabetic Properties of Aqueous Stem Extract of *Pennisetum purpureum* on Alloxan-Induced Diabetic Wistar-Albino Rats. **Open Science Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 72–79, 2015.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 18 mar. 2019.

BRS Capiáçu | Viver Grass. Disponível em: <<https://vivergrass.com/brs-capiacu/>>. Acesso em: 20 out. 2025.

CAPPELLINI, F. et al. Anthocyanins: from mechanisms of regulation in plants to health benefits in foods. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 28 out. 2021.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, abr. 2009.

CAVALCANTI, V. P. et al. Solvent mixture optimization in the extraction of bioactive compounds and antioxidant activities from garlic (*Allium sativum* L.). **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 6026, 4 out. 2021.

CHAVES, N.; SANTIAGO, A.; ALÍAS, J. C. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 76, 2020.

CHE, C.-T.; ZHANG, H. Plant natural products for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 830, 15 fev. 2019.

CHEMISQUY, M. Amelia et al. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 107–130, 1 jul. 2010.

CHEN, Dahu et al. Cyanidin-3- O-glucoside inhibits epithelial-to-mesenchymal transition, and migration and invasion of breast cancer cells by upregulating KLF4. **Food & nutrition research**, v. 64, p. 1–10, 2020a.

CHEN, J. et al. Anthocyanin supplement as a dietary strategy in cancer prevention and management: a comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 26, p. 7242–7254, 2021b.

CHEN, Y. et al. Suppression of inflammatory mediators by ethanol extracts of *Pennisetum purpureum* S. (Napiergrass Taishigrass no. 2) in activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 8, n. 8, p. 392–398, 11 ago. 2020.

CHOI, Yohan et al. Puffing as a Novel Process to Enhance the Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Curcuma longa* L. (Turmeric). **Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 506**, v. 8, n. 11, p. 506, 23 out. 2019.

DAI, Y. et al. Transcriptome analysis reveals anthocyanin regulation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) at low temperatures. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 15 abr. 2022.

DEEPA, P. et al. A review of the role of an anthocyanin, cyanidin-3-O-β-glucoside in obesity-related complications. **Plants**, v. 12, n. 22, p. 3889–3889, 17 nov. 2023.

DONOSO-BUSTAMANTE, V. et al. Antioxidant activity of sinapic acid anilides: DPPH, ABTS, FRAP, electrochemical and theoretical analysis. **LWT**, v. 222, p. 117656, 2025.

DU, Y.-W. et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits ferroptosis in renal tubular cells after ischemia/reperfusion injury via the AMPK pathway. **Molecular Medicine**, v. 29, n. 1, 3 abr. 2023.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, jun. 2006.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768–1774, 2009.

DUQUE-SOTO, C. et al. Characterization and Influence of Static *In Vitro* Digestion on Bioaccessibility of Bioactive Polyphenols from an *Olive Leaf Extract*. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 743–743, 3 mar. 2022.

DZOBO, K. The role of natural products as sources of therapeutic agents for innovative drug discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408–422, 2022.

FALLAH, A. A.; SARMAST, E.; JAFARI, T. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103912, 2020.

FATIM TRAORÉ, Nadège *et al.* Assessment of secondary metabolites in *Pennisetum purpureum* planted into constructed wetlands using shale and laterite as substrate for wastewater treatment. **Heliyon**, v. 10, n. 13, 15 jul. 2024.

FAYOS-FEVER, J. et al. Impact of harvest time on the dry matter content, and nutritional parameters related to forage quality of Maralfalfa (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, Poaceae) under Mediterranean climate. **Plants**, v. 12, n. 23, p. 4045–4045, 30 nov. 2023.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 30 jun. 2021.

FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human

health. **Food & Function**, v. 10, n. 2, p. 514–528, 20 fev. 2019.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 7. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, dez. 2019.

GARCÍA-MONTERO, C. et al. Nutritional components in Western diet versus Mediterranean diet at the gut microbiota–immune system interplay. Implications for health and disease. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 699, 22 fev. 2021..

GONÇALVES, A. C. et al. Dietary effects of anthocyanins in human health: a comprehensive review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 690, 18 jul. 2021.

GRAND VIEW RESEARCH. **Herbal medicine market size, share & growth report, 2030**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/herbal-medicine-market-report>>. Acesso em 23 de outubro de 2025

GRUBER, S.; NICKEL, A. Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. **Frontiers in Medical Technology**, v. 5, 14 jun. 2023.

GULCIN, İ. Antioxidants: a comprehensive review. **Archives of Toxicology**, 15 abr. 2025.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, 1961.

HENDRAYANI, S.-F. et al. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF-κB positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41974–41985, 26 maio 2016.

HSIEH, H.-L.; YANG, C.-M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 484613, 2013.

HUSSEN, E.; ENDALEW, S. A. *In vitro* antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, 2023.

INCA. **O que causa o câncer?** Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do>>

cancer/o-que-causa-o-cancer>. Acesso em: 30 junho 2025.

ISO 10993-5:2009. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. International Organization for Standardization, Switzerland, 42p.

JEONG, S. H.; KIM, J.; MIN, H. *In vitro* anti-inflammatory activity of the Artemisia montana leaf ethanol extract in macrophage RAW 264.7 cells. **Food and Agricultural Immunology**, v. 29, n. 1, p. 688–698, 1 jan. 2018.

JIA, Y. et al. A dietary anthocyanin cyanidin-3-O-glucoside binds to PPARs to regulate glucose metabolism and insulin sensitivity in mice. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 18 set. 2020.

JIANG, T. et al. The anti-inflammatory potential of protein-bound anthocyanin compounds from purple sweet potato in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **Food Research International**, v. 137, p. 109647, nov. 2020.

KAUR, D.; YOUSUF, B.; OVAIS SHAFIQ QADRI. Syzygium cumini anthocyanins: recent advances in biological activities, extraction, stability, characterisation and utilisation in food systems. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 6, n. 1, 4 mar. 2024.

KHOO, H. E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored Pigments as food, Pharmaceutical ingredients, and the Potential Health Benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 13 ago. 2017.

KIS, B. et al. Antimicrobial activity, *in vitro* anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of Populus nigra L. buds extract. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 22, n. 1, 16 mar. 2022.

KOTHA, R. R. et al. Oxidative stress and antioxidants—a critical review on *in vitro* antioxidant assays. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2388, 1 dez. 2022.

KOWALCZYK, T. et al. Anti-Inflammatory and Anticancer Effects of Anthocyanins in *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Antioxidants**, v. 13, n. 9, p. 1143–1143, 22 set. 2024.

KOZŁOWSKA, A.; DZIERŻANOWSKI, T. Targeting inflammation by anthocyanins as the novel therapeutic potential for chronic diseases: an update. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4380, 20 jul. 2021.

LAIB, I. et al. Optimization of extraction and study of the *in vitro* static simulation of INFOGEST gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation on the phenolic compounds of dandelion and their antioxidant activities. **Journal of Food**

Measurement & Characterization, v. 17, n. 6, p. 5660–5682, 31 jul. 2023.

LI, L. et al. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 29 ago. 2014.

LI, Y. et al. Extraction and separation of anthocyanins from Kushui rose by ethanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two-phase system. **RSC Advances**, v. 14, n. 30, p. 21250–21259, 2024.

LIU, H. et al. UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of three major metabolites of mequindox in holothurian. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, p. 1–7, 1 jan. 2018.

LIU, Y. et al. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 9 mar. 2018.

LOPES, B. S. et al. Toxicological screening of jambolan hydroalcoholic extract (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology Reports**, v. 14, p. 101999, 17 mar. 2025

LU, S. et al. Development of a UPLC–MS/MS method for simultaneous therapeutic drug monitoring of anti-hepatocellular carcinoma drugs and analgesics in human plasma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 31 maio 2023.

LU, Z. et al. Plant anthocyanins: classification, biosynthesis, regulation, bioactivity, and health benefits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 217, p. 109268–109268, 4 nov. 2024.

MA, Yanyun *et al.* Light Induced Regulation Pathway of Anthocyanin Biosynthesis in Plants. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 11116, v. 22, n. 20, p. 11116, 15 out. 2021.

MA, Z. et al. An insight into anti-inflammatory activities and inflammation-related diseases of anthocyanins: a review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11076, 14 out. 2021.

MACHADO, J. C.; MARTINS, C. E.; AUAD, A. M.; SOUZA SOBRINHO, F.;

MANACH, Claudine *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American**

Oil Chemists' Society, v.45, p. 594-598, 1968.

MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Theoretical characterization by density functional theory (DFT) of delphinidin 3-O-sambubioside and its esters obtained by chemical lipophilization. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1587–1587, 29 jun. 2018.

MATTIOLI, R. et al. Anthocyanins: a comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3809, 21 ago. 2020.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. London, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113–1124, 2014.

MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2862–2868, 11 fev. 2010.

MORAIS, L.M. et al. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do Cerrado brasileiro. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355–360, 1 jun. 2013.

NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v. 37, n. 1, p. 101674, ago. 2020.

OJO, O. A. et al. Antidiabetic activity of elephant grass (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone) via activation of PI3K/Akt signaling pathway, oxidative stress inhibition, and apoptosis in Wistar rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2 mar. 2022.

OLSON, J. K.; MILLER, S. D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, p. 3916–3924, 7 set. 2004.

ONGKOWIJOYO, P.; LUNA-VITAL, D. A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: an update. **Food Chemistry**, v. 250, p. 113–126, jun. 2018.

OZKAN, E. et al. Antiproliferative effects of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) extracts on MCF-7 human breast cancer cell lines with focus on

antioxidant potential and bioactive compounds analyzed by LC-MS/MS. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 9, 19 ago. 2021.

OZKAN, E. et al. Antiproliferative effects of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) extracts on MCF-7 human breast cancer cell lines with focus on antioxidant potential and bioactive compounds analyzed by LC-MS/MS. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 9, 19 ago. 2021.

PEREIRA, A. V. et al. Elephantgrass, a tropical grass for cutting and grazing. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 2, p. 1–13, 23 ago. 2021.

PEREIRA, A. V.; LEDO, F. J.; MACHADO, J. C. BRS Kurumi and BRS Capiáçu - New elephant grass cultivars for grazing and cut-and-carry system. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 59–62, 2017.

PINTO NOGUEIRA, Cecília. **Perfil de separação de antocianinas em capim-elefante (*Cenchrus purpureus* Schum.)**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.

QI, Y. et al. The elephant grass (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone) genome provides insights into anthocyanidin accumulation and fast growth. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 2, p. 526–542, 28 out. 2020.

RABELO, A. C. S. et al. Anthocyanins reduce cell invasion and migration through Akt/mTOR downregulation and apoptosis activation in triple-negative breast cancer cells: A systematic review and meta-analysis. **Cancers**, v. 15, n. 8, 2023.

RAHMAN, M. A. Development of UPLC-MS/MS method and its pharmacokinetic application for estimation of sertraline in rat plasma. **MethodsX**, v. 9, p. 101750, 2022.

RANI, V. et al. Oxidative stress and metabolic disorders: pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 148, p. 183–193, 1 mar. 2016.

RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261–267, 1978.

RATHOD, R. H. et al. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, 31 out. 2019.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Application of the INFOGEST Standardized

Method to Assess the Digestive Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds from Galician Extra-Virgin Olive Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 39, p. 11592–11605, 6 out. 2021.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em 25 de junho de 2025.

ROTARIU, D. et al. Oxidative stress – Complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 152, p. 113238, ago. 2022.

RUMPF, J.; BURGER, R.; SCHULZE, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123470, 2023.

SAMOTA, M. K. et al. Onion anthocyanins: extraction, stability, bioavailability, dietary effect, and health implications. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 27 jul. 2022.

SÁNCHEZ-GUERRA, N. A. et al. Improvements in fermentation and nutritive quality of elephant grass [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] silages: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 56, n. 5, 21 maio 2024.

SHI, N.; CHEN, X.; CHEN, T. Anthocyanins in Colorectal Cancer Prevention Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1600, 12 out. 2021.

SIES, H. Oxidative eustress: on constant alert for redox homeostasis. **Redox Biology**, p. 101867, jan. 2021.

SILVA, S. et al. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3072–3083, 3 nov. 2015.

SOLLANO-MENDIETA, X. C. et al. Effect of *In Vitro* Digestion on the Antioxidant Compounds and Antioxidant Capacity of 12 Plum (*Spondias purpurea* L.) **Ecotypes. Foods**, v. 10, n. 9, p. 1995, 25 ago. 2021.

SOOD, R. et al. Potential anti-cancer properties of malvidin and its glycosides: Evidence from *in vitro* and in vivo studies. **Journal of functional foods**, v. 116, p. 106191–106191, 1 maio 2024.

SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409–1416, 1973.

SUGANYADEVI, P.; SARAVANAKUMAR, K. M.; MOHANDAS, S. The antiproliferative activity of 3-deoxyanthocyanins extracted from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran through P53-dependent and Bcl-2 gene expression in breast cancer cell line. **Life Sciences**, v. 92, n. 6–7, p. 379–382, mar. 2013..

TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473–483, 2 jul. 2015.

TAGHAVI, T.; PATEL, H.; RAFIE, R. Anthocyanin extraction method and sample preparation affect anthocyanin yield of strawberries. **Natural Product Communications**, v. 17, n. 5, p. 1934578X2210999, maio 2022.

TELEANU, D. M. et al. An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5938, 25 maio 2022.

TOYOSAKI, T. Antioxidant effect of β -carotene on lipid peroxidation and synergism with tocopherol in an emulsified linoleic acid model system. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 419–423, jan. 2002.

WANG, M. et al. Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions—Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia–Reperfusion Injury. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 13 abr. 2021.

WESSAPAK, P.; NGERNSAENG SARUAY, C.; DUANGJAI, S. A taxonomic revision of *Cenchrus* L. (Poaceae) in Thailand, with lectotypification of *Pennisetum macrostachyum* Benth. **PhytoKeys**, v. 234, p. 1–33, 28 set. 2023.

XUE, H. et al. Research progress on the extraction and purification of anthocyanins and their interactions with proteins. **Molecules**, v. 29, n. 12, p. 2815–2815, 13 jun. 2024.

ZHANG, H. 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 219–225, 1 out. 2017.

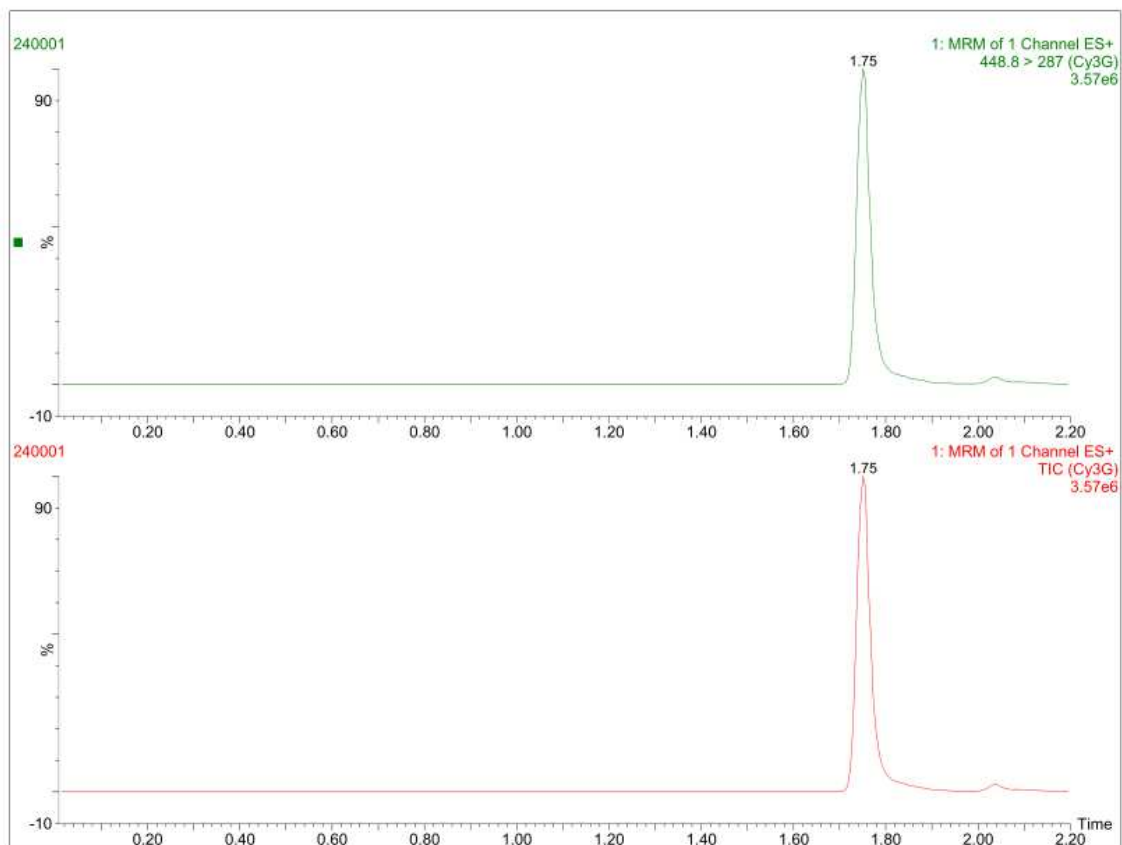
ZHANG, S. et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, 19 jun. 2024.

ZHAO, F. et al. Research on anthocyanins from *Rubus* “Shuofeng” as potential antiproliferative and apoptosis-inducing agents. **Foods**, v. 12, n. 6, p. 1216–1216, 13 mar. 2023.

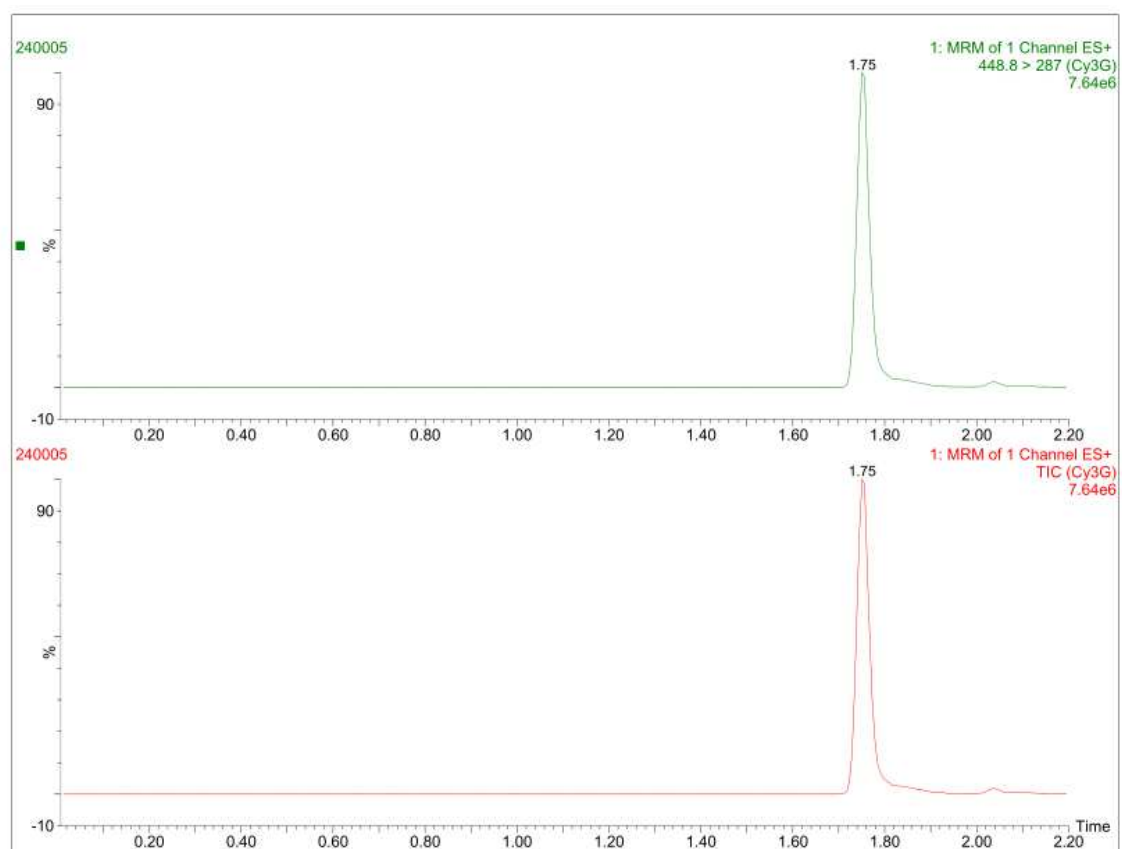
ZHOU, S. et al. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals anthocyanins biosynthesis regulation in grass species *Pennisetum purpureum*. **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111470, 5 out. 2019.

8. APÊNDICE

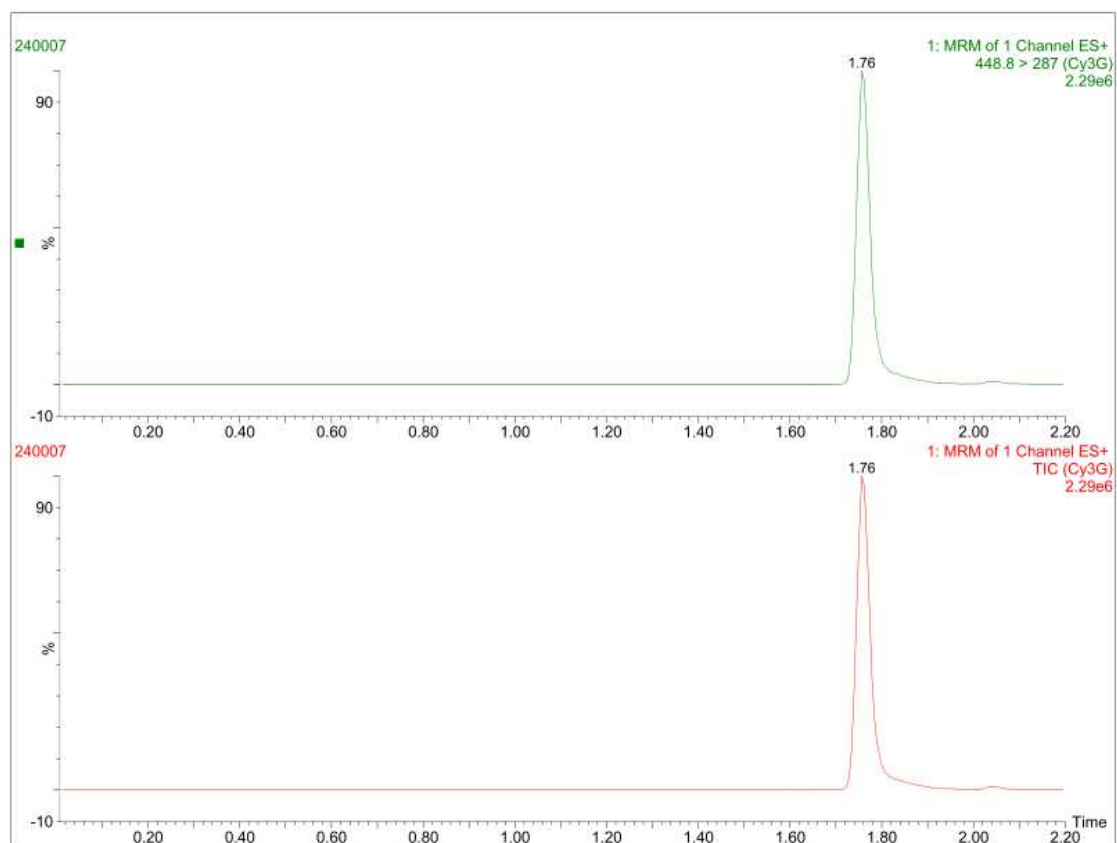
A)



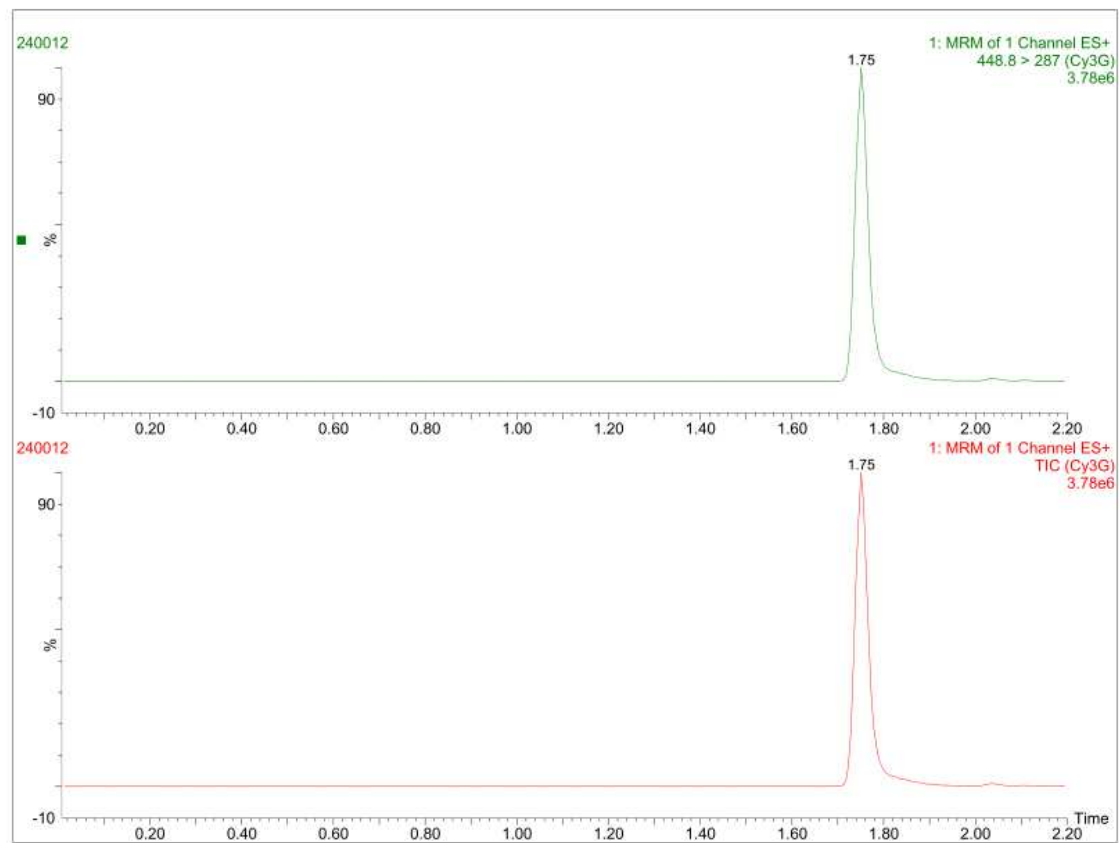
B)



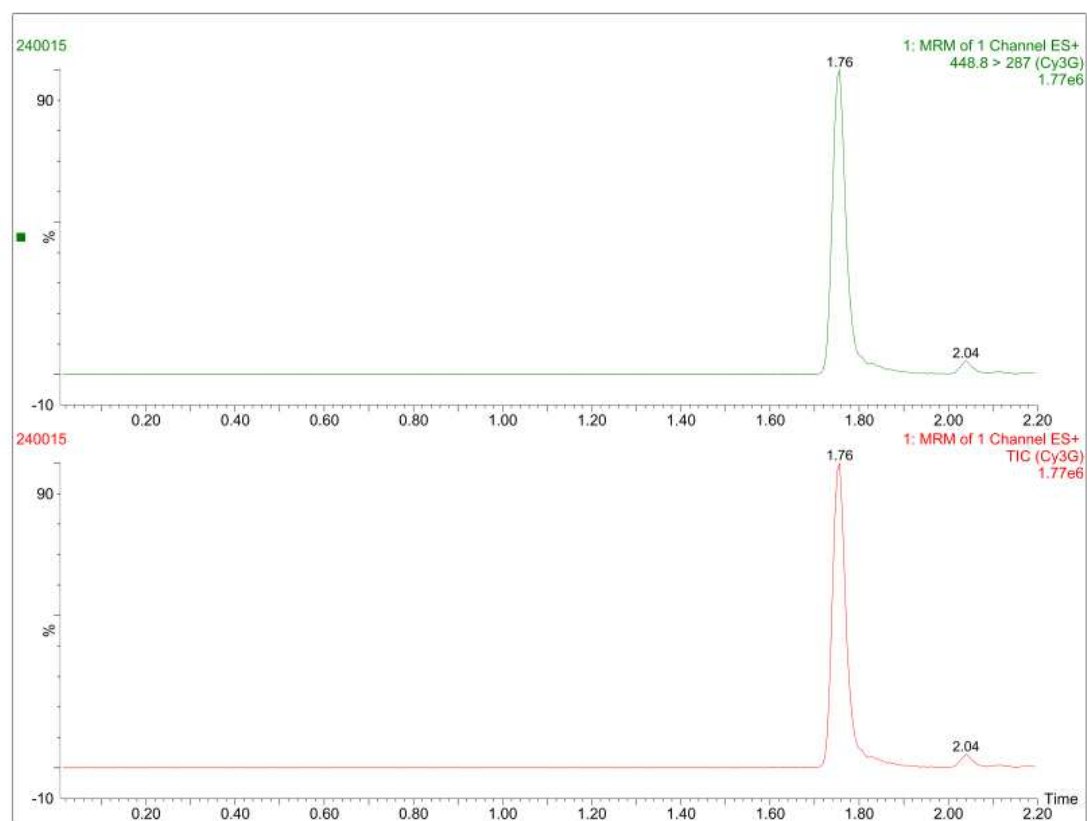
c)



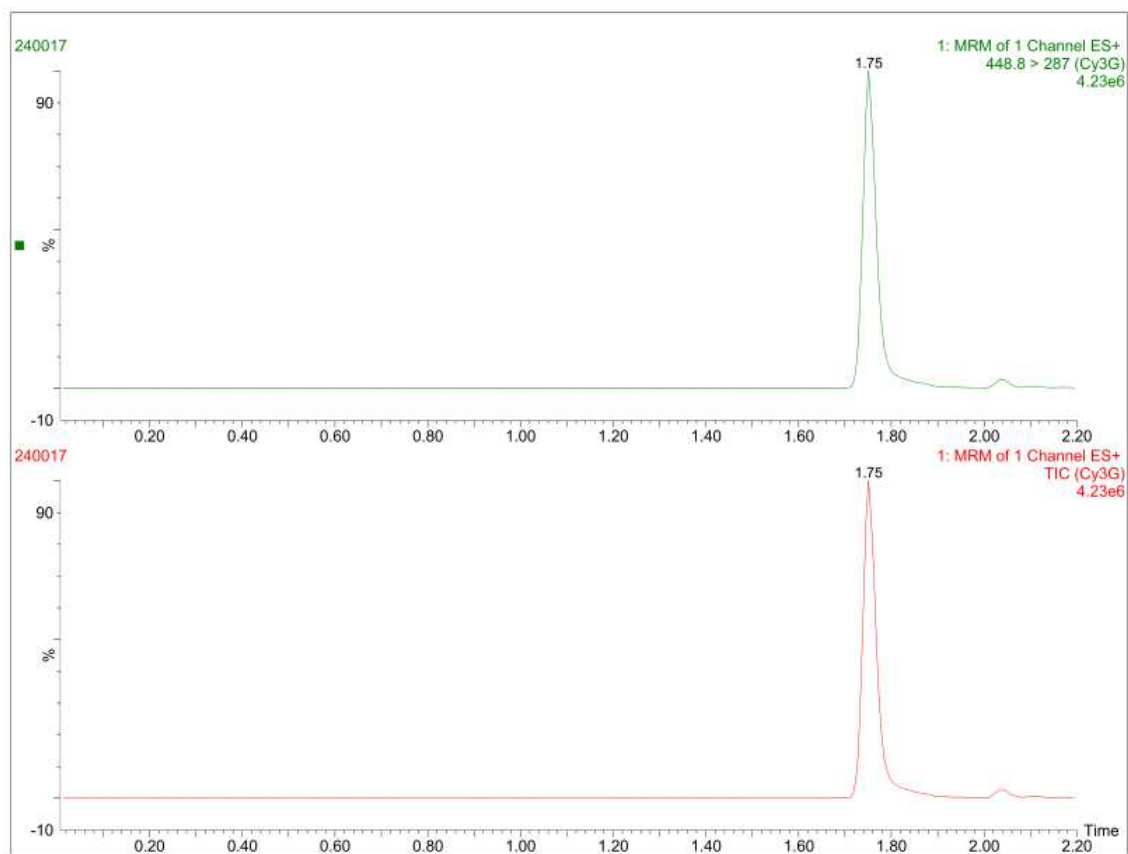
D)



E)



F)



G)

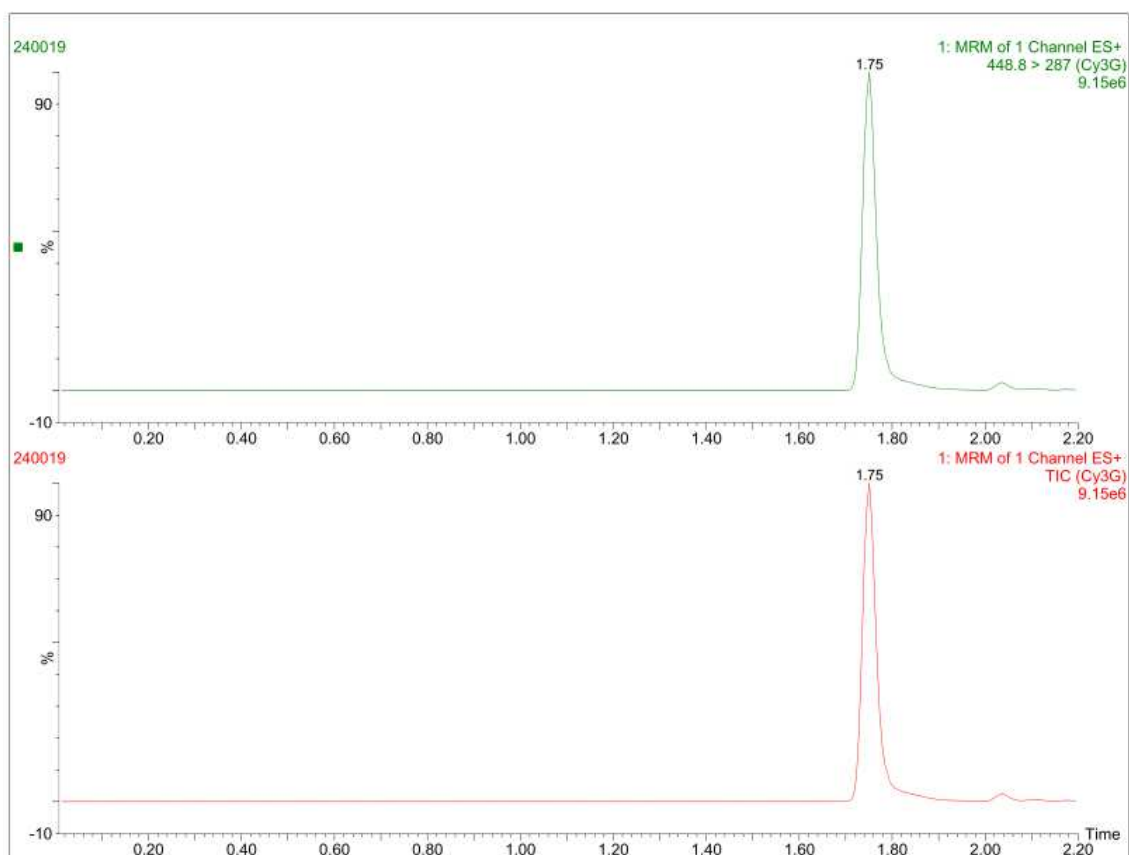


Figura A1. Cromatogramas do extrato de folhas de *Capim-elefante* [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] obtido por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS) no modo MRM (ES+) para transição 448.8 a 287, correspondente a cianidina-3-glicosídeo (Cy3G). O pico em 1,75 representa o tempo de retenção do composto. Em verde, o cromatograma do padrão comercial; em vermelho, cromatograma da amostra evidenciando a presença de Cy3G. (A) Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 30°C (EHSR30); (B) Extrato hidroalcoólico seco rotaevaporado a 40°C (EHSR40); (C) Extrato aquoso seco (EAS); (D) Extrato aquoso líquido (EAL); (E) Extrato hidroalcoólico líquido (EHL); (F) Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 30°C (EHLR30); (G) Extrato hidroalcoólico líquido rotaevaporado a 40°C (EHLR40).