



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia

Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Dissertação

As potencialidades do açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.) como ingrediente alimentar

Maria Helena Lopes Sousa Sancho

Orientador(es) | **Maria do Carmo Martins Serrano**
Maria do Rosário Caeiro Martins

Évora 2026



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia

Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais

Dissertação

As potencialidades do açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.) como ingrediente alimentar

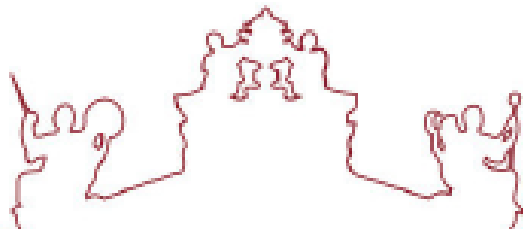
Maria Helena Lopes Sousa Sancho

Orientador(es) | **Maria do Carmo Martins Serrano**
Maria do Rosário Caeiro Martins

Évora 2026



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Évora



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Helena Adão (Universidade de Évora)

Vogais | Anabela Dias Belo (Universidade de Évora) (Arguente)
Maria do Carmo Martins Serrano (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)) (Orientador)

Dedicatória

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

Obrigado PAI

Agradecimentos

Com a conclusão deste trabalho não poderia deixar de expressar o meu mais sentido reconhecimento e gratidão:

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Carmo Serrano e Professora Doutora Maria do Rosário Martins, expresso a minha mais profunda gratidão pela oportunidade de integrar este projeto. A vossa constante disponibilidade, orientação atenta e sugestões valiosas foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Agradeço, igualmente, o vosso empenho, generosidade e incentivo ao longo de todo o percurso, que muito contribuíram para o meu crescimento académico e pessoal.

À Professora Doutora Conceição Oliveira do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa pela disponibilidade para a realização das análises de LC-MS/MS.

A todos os que comigo colaboraram no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, por me terem auxiliado no laboratório sempre que precisei, em especial à Beatriz Lamas e a Beatriz Fernandes.

À família um agradecimento muito especial, obrigada pelo vosso amor incondicional!

Agradeço também a todos aqueles que não mencionei, mas que de alguma forma se cruzaram comigo ao longo deste percurso e que de alguma forma contribuíram para a sua conclusão.

As potencialidades do açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.) como ingrediente alimentar

Resumo

A crescente valorização de produtos alimentares saudáveis, biológicos e sustentáveis reflete-se na procura por corantes naturais, em substituição aos sintéticos, que têm sido associados a potenciais riscos toxicológicos. No entanto, os corantes naturais enfrentam desafios relacionados com a sua estabilidade em condições diversas de processamento e armazenamento. Este estudo investigou o corante amarelo extraído do açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.), avaliando o rendimento de extração, a estabilidade da cor sob diferentes condições de pH e temperatura, bem como a sua atividade antioxidante. O teor em fenóis totais presente no pigmento amarelo foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos, FRAP (redução do ião ferro) e do radical DPPH (captura de radicais livres). Observou-se maior estabilidade do corante em pH ácido e maior degradação em pH alcalino. Estes resultados indicam o potencial do *C. tinctorius* como corante natural funcional na indústria alimentar, ressaltando a necessidade de estudos futuros que ampliem a faixa de condições avaliadas e que testem sua aplicação em produtos alimentares reais.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; *Carthamus tinctorius* L.; compostos fenólicos; corantes naturais; estabilidade da cor

The potential of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) as a food ingredient

Abstract

The increasing demand for healthy, organic, and sustainable food products has driven interest in natural colorants as alternatives to synthetic ones, which have been linked to potential toxicological risks. However, natural colorants often face challenges related to stability under various processing and storage conditions. This study investigated the yellow pigment extracted from safflower (*Carthamus tinctorius* L.), evaluating its extraction yield, color stability under different pH and temperature conditions, and antioxidant activity. The total phenol content of the yellow pigment was assessed by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity was confirmed through FRAP (ferric reducing antioxidant power), and DPPH (radical scavenging) assays. Greater stability was observed at acidic pH, with increased degradation under alkaline conditions. These findings highlight the potential of *C. tinctorius* as a natural functional colorant for the food industry, emphasizing the need for future research exploring a broader range of conditions and real food applications.

Keywords: Antioxidant activity; *Carthamus tinctorius* L.; colour stability; phenolic compounds; natural food colorants

Índice

Índice de Tabelas	3
Índice de Figuras	3
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	4
1. Introdução e objetivos.....	5
2. Enquadramento teórico.....	9
2.1. O açafão-bastardo: descrição e caracterização botânica	9
2.2. Corantes amarelos utilizados na área alimentar	12
2.3. Modo de produção dos corantes naturais.....	16
2.4. Corantes naturais presentes no açafão-bastardo	20
2.5. Propriedades antioxidantes dos extratos do açafão-bastardo	21
2.6. Aplicações etnofarmacológicas de <i>Carthamus tinctorius</i> L.	22
3. Procedimento experimental	25
3.1 Processamento da matéria-prima para obtenção da matéria corante.....	25
3.2. Identificação dos compostos presentes no corante amarelo.....	26
3.3 Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante	27
3.4 Estudos cinéticos para avaliação da estabilidade da matéria corante	29
3.5. Avaliação da estabilidade da cor por colorimetria de refletância.....	30
3.6 Análise estatística	33
4. Resultados e discussão	33
4.1 Rendimento do processo de extração dos corantes	33
4.2 Identificação dos compostos por LC-MS/MS	33

4.3 Avaliação do teor em compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante do extrato do corante amarelo.....	36
4.4 Estabilidade dos corantes do açafraão-bastardo em função do pH	37
4.5 Estudo da estabilidade da cor dos extratos	39
5. Conclusões.....	41
6. Referências Bibliográficas.....	43
7. Anexos.....	58
Anexo I: Resultados gráficos do procedimento experimental	58
Anexo II: Quantificação dos extratos por HPLC-HRMS/MS	60

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Produção de Açafão-bastardo por área, produção e produtividade.

Tabela 2 – Principais corantes alimentares amarelos naturais e sintéticos.

Tabela 3 – Identificação dos compostos presentes nos extratos das pétalas amarelas (AA) e vermelhas (AV).

Tabela 4 – Teor dos compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante.

Tabela 5 – Valores da constante de degradação (KD) e dos tempos de meia vida ($t_{1/2}$).

Índice de Figuras

Figura 1 – A – *Carthamus tinctorius* L.; B – Classificação botânica de *Carthamus tinctorius* L.

Figura 2 – A - Semente; B - Floração; C - Corte; D - Secagem

Figura 3 – Açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.)

Figura 4 – Efeito bioativo das substâncias do açafão-bastardo.

Figura 5 – Representação do Espaço de Cor CIELab

Figura 6 – Fórmula estrutural do hidroxisaflor A e B.

Figura 7 – Estudo da estabilidade da cor a 95°C, aos diferentes valores pH ao longo do tempo.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ADI - Ingestão Diária Admissível

CE - Comissão Europeia

CIE - Comissão Internacional de Iluminação

DP – Desvio padrão

DPPH - radical livre (DPPH•)1,1-difenil-2-picrilhidrazil

E.U.A. – Estados Unidos da América

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO - Organização para a Alimentação e Agricultura

FRAP - Poder antioxidante de redução dos iões férricos, do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HSYA – hidroxisaflor A

INIAV I.P. – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP

ODS - Objetivo de Desenvolvimento Sustentável

ΔE – Valor da diferença da cor total

1. Introdução e objetivos

A sobrevivência humana está intrinsecamente ligada à alimentação, sendo a escolha dos alimentos influenciada pela cor, aparência e sabor. Embora estas características sensoriais sejam subjetivas, exercem um papel determinante na seleção e no consumo dos alimentos, pois ao longo da vida aprendemos a associar as cores a certos sabores. Para que um determinado sabor seja considerado “completo”, o alimento deve apresentar determinada cor (Stringheta & Freitas, 2021). No entanto a procura por alimentos visualmente atrativos, muitas vezes intensificada pelo uso de corantes artificiais, levanta preocupações quanto ao impacto ambiental da produção desses aditivos, especialmente no que se refere à extração de matérias-primas e à produção de resíduos. Assim, é essencial considerar o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 15 – Vida Terrestre, que visa tomar medidas urgentes e significativas para reduzir a degradação de habitats naturais e travar a perda da biodiversidade, promovendo práticas sustentáveis ao longo de toda a cadeia produtiva de alimentos.

Entre as percepções sensoriais captadas pelo homem, estima-se que 87% são captadas pela visão, 9% pela audição e os 4% restantes, distribuído entre olfato, paladar e tato. A expressão popular “comer com os olhos”, evidencia a relevância do apelo visual dos alimentos, uma vez que os consumidores revelam uma tendência para produtos com cores vivas, de aparência sadia e coloração homogênea (Stringheta & Freitas, 2021). Neste contexto, os corantes alimentares desempenham um papel importante, pois atuam na manutenção, estabilização ou recuperação da cor dos alimentos (Anastácio *et al.*, 2016).

Contudo, a crescente procura por alimentos visualmente atrativos deve ser acompanhada de responsabilidade ambiental e social, especialmente no que diz respeito à origem dos ingredientes e à forma como são produzidos. Assim, destaca-se o ODS 2 - Fome Zero e Agricultura Sustentável, que propõe garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas e que fortaleçam a capacidade de adaptação às alterações climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo.

A cor, além de constituir um elemento essencial na aparência dos alimentos, exerce influência direta e indireta sobre as emoções, escolhas e na forma como o consumidor se

relaciona com aquilo que consome. Características como aceitabilidade, percepção de segurança e atratividade visual estão intimamente ligadas à coloração, reforçando o papel determinante que esse atributo desempenha na preferência e decisão de compra (Stringheta & Freitas, 2021).

Historicamente, os corantes naturais começaram a ser utilizados em tecidos, pinturas corporais, habitações e utensílios, bem como na arte rupestre, e na coloração dos cabelos. A sua obtenção era feita a partir de fontes naturais, como animais, frutos, flores, cascas e raízes de plantas (Pereira *et al.*, 2008).

Com o advento da Revolução Industrial, assistiu-se a um aumento significativo nas mais variadas áreas, evoluindo a indústria alimentar, que viu crescer a produção de alimentos processados (Downham & Collins, 2000).

A utilização dos corantes sintéticos teve início no século XX, com o desenvolvimento de novas cores na Europa e nos Estados Unidos da América (E.U.A). Muitos desses corantes foram adicionados de forma pouco controlada a produtos alimentares, como molhos, geleias e vinhos. Nessa época, havia disponíveis mais de 80 corantes sintéticos, alguns dos quais eram oriundos da indústria têxtil e mais tarde vieram a revelar-se tóxicos, originando problemas de saúde e até mortes entre os consumidores (Naidu & Sowbhagya, 2012). A escassez de informação e as limitações analíticas da época dificultavam a identificação da toxicidade destes compostos. Nesse contexto, torna-se essencial refletir sobre a necessidade de práticas mais responsáveis e sustentáveis no uso de aditivos alimentares, alinhadas ao ODS 12, que visa alcançar até 2030 a gestão sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais, promovendo a segurança alimentar e a saúde pública.

Além disso, a menor estabilidade dos corantes naturais face ao calor, luz, pH e agentes oxidativos, contribuiu para a utilização dos corantes sintéticos, que apresentavam maior estabilidade, produção facilitada e coloração mais apelativas. No entanto, a crescente preocupação quanto à sua segurança levou à implementação de regulamentações mais rigorosas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a lista de corantes sintéticos foi reduzida de 700 para apenas 7 corantes admitidos (Downham & Collins, 2000; Naidu & Sowbhagya, 2012).

Na União Europeia, a aprovação de corantes como aditivos alimentares está condicionada a uma avaliação rigorosa de segurança, conduzida previamente à sua autorização. Esta avaliação baseia-se em estudos toxicológicos de longo prazo, com o objetivo de estabelecer a Ingestão Diária Admissível (ADI), com base em dados de

absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). A partir da ADI, a Comissão Europeia (CE) define os limites máximos de uso para cada corante, bem como os géneros alimentícios autorizados em que a sua aplicação é permitida (EFSA, 2024; Comissão Europeia, 2001). Estes pareceres devem fundamentar-se em estudos toxicológicos experimentais, com modelos animais, e em evidência proveniente de estudos epidemiológicos em humanos (Comissão Europeia, 2001; EFSA, 2024).

A regulamentação aplicável, incluindo corantes, integra o Regulamento (CE) n.º 1333/2008, que harmoniza o uso de aditivos alimentares no espaço da União Europeia, e o Regulamento (UE) n.º 1129/2011, que altera o anexo II do Regulamento anterior, estabelecendo uma lista unificada de aditivos autorizados. Adicionalmente, a Diretiva 2009/32/CE regula, por sua vez, a utilização de solventes na produção de géneros alimentícios e ingredientes, especificando os solventes permitidos.

Estas normas refletem o compromisso crescente com a segurança alimentar e incentivam a busca por alternativas naturais mais seguras e sustentáveis para substituir aditivos sintéticos, cuja toxicidade e impacto ambiental têm sido alvo de crescente preocupação. Os novos corantes naturais devem, contudo, cumprir requisitos exigentes: segurança toxicológica, estabilidade em condições de uso e viabilidade económica para a indústria.

Neste contexto, a investigação e o desenvolvimento de corantes e outros aditivos de origem natural, estáveis e eficazes ganham relevância para a indústria alimentar. Um exemplo promissor é o açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.). Além da sua aplicabilidade tecnológica, esta planta é valorizada culturalmente, especialmente na região de Alter do Chão, onde é utilizada na confeção de pratos típicos, como o borrego com arroz amarelo e na produção de licor de açafão. No entanto, esta cultura encontra-se em risco de extinção, o que reforça a importância de preservar e recuperar esse saber ancestral, tanto pelos seus potenciais benefícios industriais como pelo seu valor patrimonial e identitário.

O açafão-bastardo é uma planta de elevado interesse industrial e cultural. Um dos principais compostos extraídos das suas pétalas é o "*Carthamus amarelo*", um corante natural cujos principais constituintes são os pigmentos *hydroxysafflor A* e *B*. Estes pigmentos destacam-se pela sua elevada solubilidade em água, o que lhes confere uma vantagem significativa na indústria alimentar (Yoon *et al.*, 2003).

O Regulamento (UE) n.º 231/2012 que estabelece especificações para aditivos alimentares listados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008, não faz

referência específica ao "*Carthamus* amarelo" nem aos compostos "hydroxysafflor A" e "hydroxysafflor B" como corantes alimentares autorizados. Contudo, a sua utilização na União Europeia é permitida para conferir coloração ou sabor aos alimentos, sem necessidade de atribuição de um número "E", designação oficial dos aditivos autorizados na UE.

O presente estudo teve como objetivo principal a valorização do *Carthamus tinctorius* L. (açafreão-bastardo) como ingrediente alimentar, com foco na sua aplicação como corante natural. Procurou-se, ainda, caracterizar e avaliar a estabilidade do pigmento amarelo, solúvel em água, extraído das pétalas desta planta, sob condições que simulam aplicações reais na indústria alimentar.

Objetivos específicos

- Quantificar o teor de compostos fenólicos presentes no pigmento amarelo de *C. tinctorius* L.;
- Avaliar a atividade antioxidante do pigmento em diferentes condições;
- Estudar a estabilidade do corante sob condições variáveis de pH e temperatura;
- Investigar o potencial de aplicação do pigmento como ingrediente alimentar funcional;
- Contribuir para a valorização e conservação de *C. tinctorius* L, enquanto recurso vegetal com importância biológica e cultural no contexto nacional;
- Validar e complementar dados da literatura existente por meio de ensaios laboratoriais controlados.

2. Enquadramento teórico

2.1. O açafão-bastardo: descrição e caracterização botânica

O *Carthamus tinctorius* L., comumente designado por açafão-bastardo, açafroa, açafrol, falso açafão ou cártamo, é uma planta de reconhecido valor histórico e funcional. A palavra *Carthamus* deriva do hebraico *Kartami*, que significa tingir, remetendo para o uso tradicional da planta na produção de corantes. Em inglês, designa-se por *safflower*, *safflor* ou *bastard saffron*.

Botanicamente, o açafão-bastardo está classificado como *Carthamus tinctorius* L., (Figura 1), pertencente à ordem Asterales, família Asteraceae, género *Carthamus* e espécie *Carthamus tinctorius* com subespécies *inermis* (sem espinho) e *typicus* (com espinho) (Robles,1985).

A família Asteraceae é uma das maiores e mais diversas famílias de plantas com flor, com mais de 23.000 espécies agrupadas em cerca de 1.600 géneros. Esta família é altamente relevante em várias áreas, incluindo a medicina tradicional e o uso de plantas como aditivos ou suplementos alimentares.

Na região do Alentejo, em Portugal, várias espécies pertencentes à família Asteraceae são utilizadas com fins alimentares e terapêuticos. Entre elas destacam-se: artemísia (*Artemisia absinthium*), chagas (*Glebionis coronaria*) e calêndula (*Calendula officinalis*).

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa IX (2009), o açafão-bastardo possui florões de coloração amarelo-alaranjada ou laranja-avermelhada. As flores são tubulosas, gamopétalas, actinomorfas e separadas do capítulo floral. Cada flor é formada por um tubo longo e filiforme, com pétalas afiladas, lanceoladas. Do interior do tubo floral emerge um cilindro oco formado pelas anteras amarelas, fundidas entre si no qual se projeta o estilete filiforme, espessado no ápice.


	Espécie	<i>Carthamus tinctorius</i>
	Género	<i>Carthamus</i>
	Ordem	<i>Asterales</i>
	Sub-classe	<i>Asteridae</i>
	Classe	<i>Magnoliopsida</i>
	Sub-divisão	<i>Magnoliophytina</i> (<i>Angiospermae</i>)
	Divisão	<i>Spermatophyta</i> Açafrão-bastardo
Nome(s) comum	Açafroa Açafról Cártamo	

Figura 1. - *Carthamus tinctorius* L. - Classificação botânica
 Fonte: https://jb.utad.pt/especie/Carthamus_tinctorius

O açafrão-bastardo ou açafroa é nativa do Irão, noroeste da Índia e de algumas regiões de África. Terá sido introduzida em Portugal no século XVI, mais concretamente na região do Alentejo, proveniente da Índia (provavelmente da antiga colónia de Goa) trazida por missionários ou marinheiros, juntamente com outras especiarias amplamente utilizadas na culinária alentejana (Pintão, & Silva, 2008).

Esta planta possui características agronómicas favoráveis ao seu cultivo, especialmente em regiões com condições edafo-climáticas adversas. Adapta-se bem a solos pobres em nutrientes, tolera diferentes climas e apresenta baixos requisitos hídricos. É altamente resistente a altas temperaturas, ventos fortes e secos, sendo, uma cultura bem-adaptada ao ambiente semiárido. No entanto, apesar do seu carácter rústico, o cártamo revela sensibilidade à geada e à humidade excessiva, tanto no solo como na atmosfera (Queiroga *et al.*, 2021).

O açafrão-bastardo é uma planta oleaginosa anual, com elevado potencial de produção de óleo, podendo as suas sementes conter até 40% de óleo (Landau *et al.*, 2004). As sementes (Figura 2A) são aquénios, também conhecidos por cipselas, estrutura típica da família Asteraceae, e apresentam forma irregular, com ápice achatado e base arredondada (Mündel *et al.*, 2004).

O ciclo de desenvolvimento da planta inicia-se com a germinação das sementes, e cerca de 2 a 3 meses depois ocorre a floração. A maturação fisiológica das sementes dá-se entre a 4^a a 6^a semanas após o início da floração (Figura 2B). O ponto ideal para a colheita (Figura 2C) ocorre entre 2^a a 3^a semanas após esta maturação, altura em que se garante a máxima concentração de compostos ativos (Rebocho, 2015). O ciclo cultural da planta tem duração de seis meses.

Após a colheita, os capítulos são colocados em caixas de cartão e submetidos a um processo de secagem natural (Figura 2D), em ambiente seco, escuro e com boa ventilação. A secagem é monitorizada sensorialmente, sendo possível determinar o ponto ideal de conservação e posterior comercialização pela textura das pétalas ao toque.

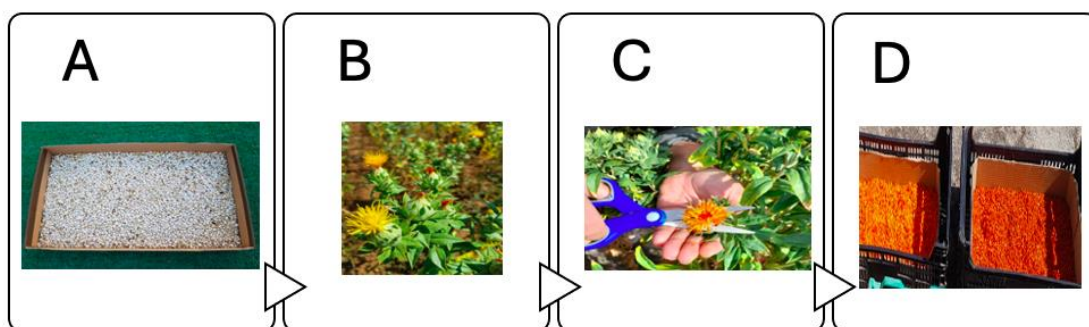


Figura 2. *Carthamus tinctorius* L.: A - Semente; B - Floração; C - Corte; D - Secagem

a. Principais utilizações do açafão-bastardo

O açafão-bastardo, foi originalmente cultivado pelas suas flores, apresenta uma ampla variedade de aplicações – artesanais, cosméticas, têxteis, alimentares, medicinais e energéticas. As suas flores têm sido utilizadas tradicionalmente na extração de corantes naturais, tanto para tecidos como para produtos cosméticos e alimentares. Além disso, as hastes florais apresentam interesse ornamental (Khalil *et al.*, 2013).

Na alimentação humana, o *Carthamus tinctorius* pode ser utilizado como flor comestível, ingrediente alimentar funcional e fonte natural de corantes para alimentos e bebidas. As suas sementes constituem a principal matéria-prima para a produção de óleo vegetal, existindo duas principais variedades: linoleicas e oleicas (Newman & O'Connor, 2013).

O óleo de *C. tinctorius* da variedade linoleica contém cerca de 70 a 80% de ácido linoleico e é utilizado na produção de óleos comestíveis. Enquanto o óleo das variedades oleicas, contém cerca de 80% de ácido oleico, sendo valorizado pela sua maior estabilidade térmica, o que o torna adequado para processos de fritura e outros usos culinários de alta temperatura e serve como óleo alimentar estável ao calor (Oelke *et al.*, 1992).

O óleo de *C. tinctorius* L. é também reconhecidamente valorizado pelas suas propriedades antioxidantes, e pelo seu potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel (Ekin, 2005; Coronado, 2010; Girardi *et al.*, 2013; Emongor & Oagile, 2017).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2022), a cultura de açafrão-bastardo é efetuada em mais de 60 países. Em 2020 a produção mundial rondou as 734 mil toneladas, numa área cultivada de aproximadamente de 725 mil hectares. O país com maior área produtora da cultura é o Cazaquistão com aproximadamente 315 mil hectares com uma produção de aproximadamente 226 toneladas. Em termos de produtividade da cultura, o México apresenta os maiores valores de produtividade média, aproximadamente 17.216 kg/ha, seguido da China, Turquia e Estados Unidos (tabela 1).

Tabela 1. Produção de Açafrão-bastardo por área, produção e produtividade.

2020	País	Área plantação	Produção (Ton.)	Produtividade (kg/ha)
1	Cazaquistão	315177	226739	7.194
2	Rússia	174974	96636	5.523
3	Estados Unidos	51270	67040	13.076
4	México	50414	86793	17.216
5	Índia	85475	44000	5.148
6	China	22724	33404	14.700
7	Turquia	15114	21325	14.109
8	Quirguistão	9836	9870	10.035

Fonte – FAO, 2022

Em Portugal, a planta aparece, ocasionalmente, como subespontânea no Alentejo e no Algarve, sendo nalguns locais também cultivada e utilizada na confeção de alimentos. (Pintão & Silva 2008). Por outro lado, esta planta é também cultivada para fins gastronómicos e culturais, na localidade de Alter do Chão, distrito de Portalegre (Alto Alentejo), e destina-se maioritariamente ao seu uso na culinária, nomeadamente para a confeção do arroz amarelo que acompanha o ensopado de borrego, típico desta zona, bem como, na produção artesanal de licor. Atribui-se a introdução do açafrão-bastardo na região de Alter do Chão, ao Arcebispo D. Francisco Garcia Mendes, missionário e professor em Cochim e em Goa, que terá trazido a planta da Índia no século XVI (Pintão & Silva, 2008).

2.2. Corantes amarelos utilizados na área alimentar

Os corantes alimentares são substâncias adicionadas aos alimentos com a finalidade de colorir, conservar e melhorar características sensoriais. Podem ser classificados com base na cor, na origem e na estrutura química. Em termos de cor,

abrangem tons como vermelho, amarelo, castanho e azul, podendo gerar novas variações através de combinações. Quanto à origem, dividem-se em naturais, extraídos de plantas ou, em menor quantidade, de animais, e sintéticos. No que respeita à classificação com base na estrutura química, consideram-se os grupos funcionais ou estruturas cromóforas, como antraquinonas, flavonóides e carotenóides, além de grupos químicos como grupos azo, vinilo e carbonilo (Novais *et al.*, 2022).

Dentro dessa categoria, há uma distinção entre alimentos corantes e aditivos corantes. Os alimentos corantes são ingredientes naturais, como frutos, legumes e especiarias, utilizados diretamente para conferir cor a alimentos e bebidas. Já os aditivos corantes, conforme o Regulamento (CE) n.º 1333/2008, são substâncias extraídas seletivamente de fontes vegetais ou animais, sem função nutritiva ou aromática, e utilizadas para adicionar ou restaurar a cor dos alimentos. Por exemplo, o pigmento Antocianinas (E163), obtido do sabugueiro, é classificado como aditivo corante devido ao seu processo de extração seletivo, enquanto o sumo concentrado de sabugueiro, consumido diretamente, é um alimento corante (Parlamento Europeu & Conselho da União Europeia, 2008).

A cor desempenha um papel crucial na escolha dos alimentos, sendo um indicativo imediato da sua qualidade, maturidade e armazenamento adequado. Os consumidores associam cores específicas a determinados produtos, como o amarelo ao limão e o verde à menta, e a falta dessa correspondência pode levar à rejeição. Além disso, a publicidade influencia essa percepção, estimulando a aceitação de cores incomuns em alimentos. Atualmente, a maioria dos produtos contém corantes, pois a aparência visual afeta diretamente a percepção do sabor e da qualidade (Spence, 2015).

Os corantes alimentares exercem uma função estética, tornando os produtos mais atrativos e uniformes, sem, no entanto, oferecer benefícios nutricionais diretos. São utilizados para compensar perdas de cor provocadas por fatores como luz, oxigênio, temperatura e tempo de armazenamento. No entanto, sua aplicação é regulamentada para evitar práticas enganosas, como mascarar alterações no alimento ou sugerir a presença de ingredientes de qualidade superior. Embora menos essenciais que outros aditivos, os corantes atendem à expectativa dos consumidores por alimentos visualmente apelativos, reforçando a percepção de qualidade e sabor (Muniz *et al.*, 2003).

Estas substâncias são amplamente utilizadas em produtos como iogurtes, gelados, doces, mostarda, sopas, carnes frias, condimentos e até cascas de queijo. Para garantir a segurança e padronização do seu uso, a União Europeia estabeleceu regulamentações rigorosas, como os Regulamentos n.º 1333/2008 e n.º 1129/2011, que

autorizam quarenta e três substâncias como aditivos. Estes corantes são classificados em dois grupos principais: dezassete naturais e vinte e seis sintéticos, todos identificados pelos códigos E100 a E199 (Frick, 2003).

Além disso, a legislação especifica cinco diretrizes essenciais para o uso destes aditivos, incluindo a proibição em determinados alimentos, como água e leite; restrições a produtos como queijos e cervejas, que só podem conter moléculas específicas; autorização limitada a categorias definidas, como peixe seco e salsichas; isenção de limitação quantitativa para certos corantes, como o caroteno; e imposição de limites de concentração em produtos como bebidas, sobremesas e decorações de confeitaria. Desta forma, a regulamentação procura equilibrar a necessidade de uso dos corantes com a segurança alimentar. Nos últimos anos, a Agência Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), através do seu Painel dos Aditivos Alimentares e dos Aromatizantes, publicou vários pareceres científicos, os quais dirige ao leitor europeu (<https://www.efsa.europa.eu/en/panels/faf>), sobre a utilização de diferentes corantes naturais como aditivos alimentares, em que se encontram os principais dados científicos para a avaliação da segurança, sendo as preocupações associadas ao seu uso relatadas e analisadas criticamente (União Europeia, 2008).

Neste trabalho, o foco será nos corantes alimentares amarelos, cujos principais aditivos utilizados na indústria alimentar estão apresentados na Tabela 2 (Regulamento (CE) N. 1333/2008, Regulamento (UE) N.º 1129/2011 e Frick, 2003)

Dos corantes apresentados na tabela 2 alguns apresentam amplas restrições no seu uso na CE, neste destacam-se os sintéticos (Azo) em que alguns foram banidos na CE. A Crisoína S (E 103) e o Amarelo Sólido (E 105) foram proibidos em 1977 e a venda de produtos alimentares que os contenham proibidos a partir de 1 de janeiro de 1978 (Directiva 76/399/CEE do Conselho, de 6 de abril de 1976).

Diante das preocupações crescentes com a saúde humana e a preservação ambiental, torna-se essencial o desenvolvimento de novos corantes a partir de fontes naturais, sustentáveis e de baixa toxicidade. Corantes sintéticos, embora eficazes na coloração dos alimentos, podem apresentar riscos para a saúde e impactos negativos para o meio ambiente ao longo do seu ciclo de vida. Assim, há um movimento crescente na indústria e na pesquisa científica para explorar alternativas derivadas de frutas, vegetais, microrganismos e resíduos agroindustriais, que além de seguros, podem agregar valor nutricional e funcional aos alimentos. Essa abordagem está alinhada com os princípios da economia circular e da sustentabilidade, promovendo inovação sem comprometer a saúde ou os ecossistemas. De acordo com Martins *et al.* (2016), os

corantes naturais representam uma alternativa promissora, pois são biodegradáveis, menos tóxicos e provenientes de fontes renováveis, sendo compatíveis com as exigências dos consumidores modernos e com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

Tabela 2. Principais corantes alimentares amarelos naturais e sintéticos.

Corante	Origem	Caraterísticas	Uso em Alimentos	Regulamentação
Curcumina (E 100)	Natural (<i>Curcuma longa</i>)	Cor amarela, solúvel em bases, baixa solubilidade em água, éter e etanol	Produtos lácteos, sorvetes, iogurtes, massas, etc.	Permitido em vários alimentos
Riboflavina (E 101)	Natural (Leveduras, gérmen de trigo, ovos, fígado)	Cor amarelo-alaranjado, solúvel em água e ligeiramente em etanol	Laticínios, doces, sobremesas	Permitido numa ampla gama de alimentos
Carotenóides (E 160)	Natural (frutas, vegetais, flores, ovos, peixes)	Variedade de tons amarelos a vermelhos	Frutas, vegetais, flores, ovos, peixes, produtos alimentares	Permitido em muitos produtos alimentares
Xantofilas (E 161)	Natural (alfafa, flores, sementes, ervas)	Corantes extraídos da coagulação térmica de proteínas do suco de alfafa	Sobremesas, produtos de confeitaria, sopas, embutidos, condimentos	Permitido em alimentos selecionados
Ouro (E 175)	Mineral (ouro)	Cor dourada	Produtos de confeitaria, chocolates, licores	Permitido para decoração de produtos de confeitaria e chocolates
Tartrazina (E 102)	Sintético (Azo)	Cor amarelo,	Queijos, doces, produtos de pastelaria, gelados	Aprovado, mas com restrições, associado a reações adversas, como dermatite
Amarelo Laranja S (E 110)	Sintético (Azo)	Cor amarelo alaranjado	Proibido para utilização em doces, crostas de queijos	Proibido em vários países
Amarelo de Quinolina (E 104)	Sintético (Quinolina)	Cor amarela, composto heterocíclico de síntese química	Utilizado em produtos farmacêuticos e alimentos	Permitido, mas com restrições
Crisoína S (E 103)	Sintético (Azo)	Cor amarela	Usado em alimentos	Banido na CE
Amarelo Sólido (E 105)	Sintético (Azo)	Cor amarela	Usado em alimentos	Banido na CE

Adaptado de Frick, 2003.

2.3. Modo de produção dos corantes naturais

Processos de extração

Os corantes naturais podem ser obtidos por dois métodos principais: a extração com solventes orgânicos permitidos pela Diretiva 2009/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de abril de 2009, utilizados para dissolver e extrair os compostos desejados (como por exemplo etanol, hexano, éter etílico, etc.) e a extração com dióxido de carbono supercrítico (Hsieh-Lo *et al.*, 2020), que ocorre sob condições específicas de temperatura e pressão, onde o dióxido de carbono atinge um estado intermediário entre líquido e gás, com elevado poder de extração. Após a extração, o dióxido de carbono retorna ao estado gasoso, permitindo a recuperação do composto extraído na forma líquida ou pastosa. Este método apresenta vantagens, como o uso de dióxido de carbono, um gás natural, não tóxico, incolor, insípido e quimicamente inerte, além de maior seletividade em comparação com solventes orgânicos, mas requer investimentos significativos em infraestrutura e equipamentos especializados.

No mercado, os corantes naturais estão disponíveis em formas variadas, como líquidos, pós, grânulos ou saquetas solúveis em água, sendo a escolha do tipo de corante determinada pelo alimento a ser colorido e pela necessidade de minimizar o risco de contaminação cruzada durante a sua aplicação.

Nos métodos não convencionais, a par do já referido método da extração com dióxido de carbono supercrítico, podemos referir também, a extração assistida por enzima (EAE) (Constantin & Istrati, 2022), extração assistida por micro-ondas (MAE) (Jafari *et al.*, 2019), extração assistida por ultrassom (UAE) (Hu W *et al.*, 2019), extração de alta pressão hidrostática (HHPE) e extração de líquido pressurizado (PLE) (Corrales *et al.*, 2008; Chandra Singh *et al.*, 2021). Para atender às exigências de segurança e sustentabilidade ambiental, foram desenvolvidas novas tecnologias de extração com períodos de extração mais curtos e rendimentos mais elevados, como as já referidas PLE, UAE, MAE, EAE (Constantin & Istrati, 2022):

- A Extração Assistida por Enzima- EAE - baseia-se na utilização de enzimas como auxiliar no processo de quebra de ligações complexas dos compostos bioativos presentes nos materiais vegetais (Pacheco & Mendes, 2021). Tem vantagens diferentes em comparação com os métodos não enzimáticos, incluindo rapidez da extração, melhor rendimento, menor uso de solvente orgânicos, e ainda, baixo consumo de energia (Azmir *et al.*, 2013);

- A Extração Assistida por Micro-ondas - MAE - baseia-se no aquecimento do solvente pela energia das micro-ondas, que em contato com a amostra promove a separação do componente a extrair presente na amostra (Paré *et al.*, 1994). A eficiência do aquecimento por micro-ondas é a principal vantagem, outra é a utilização de cerca de 10 vezes menos solvente do que nos métodos convencionais (Tsukui & Rezende, 2014)
- A Extração de Alta Pressão Hidrostática - HHPE - baseia-se na utilização de pressões muito altas, que variam de 100 a 1000 MPa (Chanioti *et al.*, 2018), permite o uso de temperatura ambiente, baixos volumes de solventes orgânicos, redução do tempo de extração e consumo energético, com maiores rendimentos e extratos finais de alta qualidade (Moreira *et al.*, 2020);
- A Extração de Líquido Pressurizado - PLE - consiste em combinar temperatura e pressão elevada a solventes líquidos a fim de obter extrações rápidas e eficientes de compostos ativos, em um curto espaço de tempo e com utilização de uma pequena quantidade de solvente (Stalikas, 2007);
- A Extração Assistida por Ultrassons - UAE - é um processo que utiliza energia de ondas sonoras imperceptíveis a capacidade auditiva humana (Ji *et al.*, 2006). Trata-se de um método rápido, não depende da matriz, tem baixo custo, contudo apresenta a desvantagem de requerer grande quantidade de amostra e de solvente (Özcan & Özcan, 2004).

Estabilidade dos corantes amarelos

Os corantes naturais desempenham um papel fundamental na indústria alimentar, sendo valorizados pela sua capacidade de proporcionar cores atraentes de forma segura e sustentável. No entanto, a estabilidade e eficácia dos corantes podem ser influenciadas por vários fatores ambientais, como luz, pH, temperatura e atividade enzimática. Por exemplo, corantes como as curcuminas e os carotenóides são sensíveis à luz e à radiação UV, o que pode causar descoloração significativa, especialmente em bebidas e sumos de frutas. Além disso, o pH afeta a estabilidade de corantes naturais, com alguns, como os carotenóides, apresentando boa resistência em condições ácidas, enquanto outros podem sofrer alterações de coloração e levar à formação de depósitos sob pH 3. A temperatura também pode afetar a estabilidade, mas corantes como os carotenóides são relativamente estáveis até 100°C (Fatahi *et al.*, 2009). Por outro lado, corantes extraídos de plantas como o açafrão-bastardo, incluindo cartamina e hidroxisaflor A e B, enfrentam processos físico-químicos que podem alterar a sua estrutura e cor. A hidrólise, que ocorre

em condições de pH ácido ou alcalino, pode levar à quebra de ligações glicosídicas e afetar a solubilidade e a estabilidade destes corantes. A degradação térmica também é um fator importante, pois o aquecimento pode induzir rearranjos estruturais e oxidação, resultando na perda de cor e alteração nas propriedades químicas. Para otimizar a estabilidade desses corantes, é essencial avaliar os efeitos do pH e da temperatura, que influenciam a coloração, solubilidade e resistência térmica durante processos como o cozimento de alimentos. Estratégias como encapsulamento têm sido exploradas para melhorar sua estabilidade e eficácia (Fatahi *et al.*, 2009).

Estes estudos são fundamentais para garantir a viabilidade dos corantes naturais na indústria alimentar, onde é cada vez mais utilizado, por ex. em queijos, xaropes de frutas ou doces, principalmente porque pode ser substituto alternativo aos corantes tetrazina (E102) e amarelo de quinolina (E104) (Dajue L., 1993; Ekin, 2005; Fusaro, 2010; Steberl, 2021), permitindo o desenvolvimento de alternativas mais seguras e ecológicas em relação aos corantes sintéticos. Além disso, ajudam a promover a utilização de corantes naturais, atendendo à crescente procura de soluções sustentáveis e eficazes. Estudo promovido em 2009, onde se comparou a estabilidade da cartamina e açafrão amarelo ao pH, temperatura e luz, indicou que o açafrão amarelo é mais estável à temperatura e pH do que a cartamina que é mais estável à radiação UV (Fatahi *et al.*, 2009).

As vantagens em comparação com outros corantes alimentares, a sua estabilidade à luz em solução aquosa, o uso em diferentes valores de pH e temperatura, tornam os pigmentos amarelos do açafrão-bastardo uma alternativa quando em comparação com outros corantes (Yoon *et al.*, 2003; Shin e Yoo, 2012).

Critérios de pureza

Os corantes alimentares devem ser isentos de impurezas minerais e orgânicas provenientes da extração ou síntese. Solventes usados na extração precisam ter aprovação internacional (Regulamento (EU) N° 231/2012), e resíduos são eliminados quase totalmente por técnicas como vapor de água e alto vácuo, tornando-se indetetáveis no produto final devido ao fator de diluição. A legislação impõe limites rigorosos para impurezas minerais, como 5 mg/kg de arsénio, 20 mg/kg de chumbo e 200 mg/kg no total para elementos como antimónio, cobre e zinco, além de proibir metais como cádmio, mercúrio e urânio (Regulamento (EU) N° 231/2012 e Regulamento (EU) N° 2023/915).

Para impurezas orgânicas, exige-se a ausência de compostos tóxicos (Regulamento (EC) Nº 396/2005), como β -naftilamina e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, além de limites para aminas aromáticas livres (0,01%), produtos intermediários sintéticos (0,5%) e corantes acessórios (4%) em corantes sintéticos.

Geralmente os corantes sintéticos são de produção mais fácil, mais econômica e muitas vezes dotados de propriedades técnicas superiores aos de origem natural, Carrubba, 1998). No entanto, são frequentemente mais tóxicos, designadamente os corantes azo, que representam cerca de 65% dos corantes produzidos e utilizados nas indústrias têxtil, papelreira, cosmética, farmacêutica e alimentar (Guaratini & Zanoni, 2000).

Representam a classe de corantes sintéticos, mais importante e mais utilizada, incluindo: Amarante (E123); Azorrubina ou carmosina (E122); Ponceau 4R (E124); Tartarazina (E102); Vermelho 40 ou vermelho allura AC (E129); Amarelo sol ou amarelo alaranjado S (E110); Vermelho 2G (E128); Negro brilhante BN ou negro PN (E151); Castanho FK (E154); Castanho HT (E155); Litol-rubina BK (E180); Amarelo quinoleína (E104) (Abrahart & Stothers, 2024; Kobylewski & Jacobson, 2010).

Os corantes azo são produzidos, quase exclusivamente, por diazotação de uma amina aromática primária para dar origem a um sal diazotado ou um diazo. Esta reação foi de grande importância para a indústria dos corantes descoberta no século XIX (Leal, 2011). Recentemente, alguns corantes azo foram retirados da lista de substâncias aprovadas para uso em alimentos, medicamentos e cosméticos e muitos outros corantes estão em estudo no que diz respeito aos potenciais efeitos adversos na saúde. Além disso, os corantes azo podem dar origem a aminas que são tão ou mais tóxicas que os corantes que lhe deram origem (Bruins *et al.*, 1987). Outra problemática advém do fato de que estes corantes são quimicamente estáveis e têm pouca biodegradabilidade e, portanto, apresentam potencial de contaminação de águas subterrâneas e de águas potáveis, de modo que a sua pré-eliminação é importante (Reck & Paixão, 2016).

Nos últimos anos, as preocupações públicas sobre o uso de corantes químicos sintéticos em alimentos e cosméticos tem evidenciado um grande crescimento com cada vez mais pessoas a preferir usar alimentos com corantes e aditivos naturais devido à suas propriedades não alérgicas e não cancerígenas (Fatahi, 2008).

2.4. Corantes naturais presentes no açafão-bastardo

Nas flores do açafão-bastardo podem ser identificados flavonóides e alcalóides (Figura 3), especialmente a quinocalcona c-glicosídeo hidroxicártamo amarelo A, N-(*p*-Coumaroil) serotonina e N-feruloilserotonina, e são responsáveis pela maioria das atividades farmacológicas de *C. tinctorius* L. (Zhang *et al.*, 2016). Os flavonóides apresentam cor vermelha sendo derivados de chalconas, designado por cartamina (Figura 3) e as hidroxinaftoquinonas apresentam cor amarela, podendo designar-se por hidroxisaflor A e B.

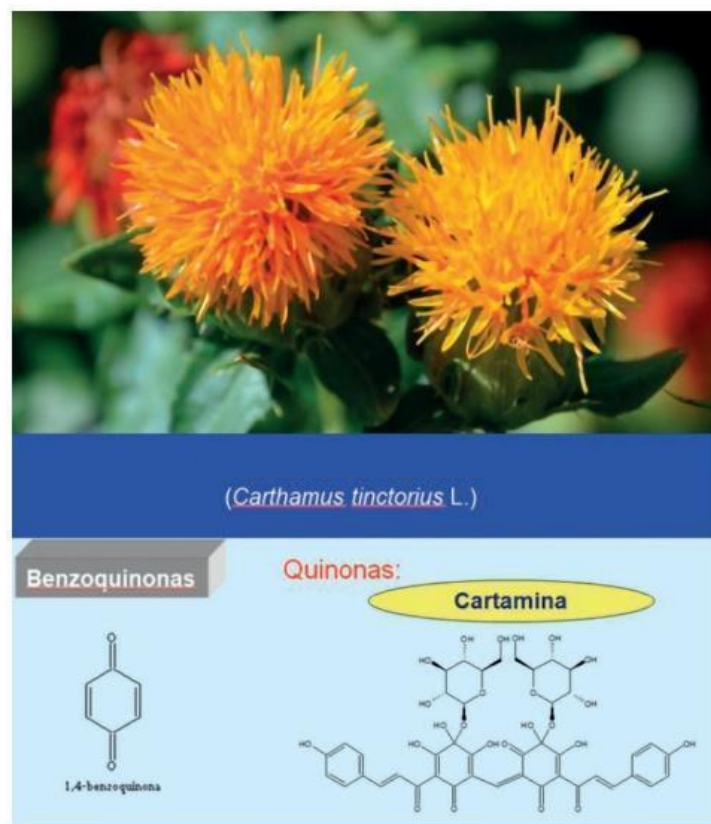


Figura 3. Açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.) (Serrano *et al.*, 2021).

2.5. Propriedades antioxidantes dos extratos do açafreão-bastardo

Diversos constituintes químicos têm sido isolados de diferentes partes da planta *Carthamus tinctorius* L. (açafreão-bastardo), incluindo flavonóides, glicosídeos feniletanóides, cumarinas, ácidos gordos e esteróides (Zhou *et al.*, 2009). Entre esses compostos, os fenólicos, especialmente os flavonóides, destacam-se pelas suas propriedades antioxidantes, o que confere relevância à planta tanto na área alimentar quanto na farmacológica.

Nas células aeróbias, processos metabólicos como a respiração celular e reações de oxidação-redução resultam na formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, como inflamações, neoplasias, doença de Alzheimer e patologias cardiovasculares, bem como a aceleração do envelhecimento precoce (Soutinho, 2012). Para se protegerem desses efeitos, os organismos vivos dispõem de um sistema antioxidante endógeno, composto por antioxidantes lipossolúveis (como a vitamina E e carotenóides), hidrossolúveis (ácido ascórbico e glutatona) e enzimáticos (glutatona peroxidase, superóxido-dismutase, catalase) (Silva *et al.*, 2010).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos suscetíveis, mesmo quando presentes em baixas concentrações. Além de protegerem os alimentos da degradação oxidativa, desempenham um papel essencial na defesa contra os efeitos nocivos dos radicais livres no organismo humano (Pereira, 2010).

Os flavonóides constituem um dos grupos de metabolitos secundários mais amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados nas partes aéreas das plantas. Estruturalmente, derivam da flavona (2-fenil-benzopirona) e podem ocorrer como flavonóis, flavonas e antocianinas, muitas vezes sob a forma de heterósidos hidrossolúveis. Estes compostos têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades biológicas, incluindo atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, estrogênica, antibacteriana e antiviral, entre outras (Proença da Cunha, 2005).

Estudos recentes reforçam o potencial antioxidante dos extratos do açafreão-bastardo. Karimkhani *et al.* (2016) demonstraram que os extratos metabólicos da planta apresentam significativa atividade antioxidante e antimicrobiana. Quatro compostos fenólicos principais foram identificados nos extratos das flores: ácido gálico, ácido p-

cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico, sendo o ácido gálico o composto predominante, conforme revelado por análise HPLC. Resultados semelhantes já haviam sido relatados por Salem *et al.* (2011), corroborando a presença marcante de ácido gálico nas flores da planta.

Além da sua capacidade antioxidante, os extratos do *C. tinctorius* evidenciaram também atividade antimicrobiana, tendo apresentado zonas de inibição significativas contra patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*, o que reforça a versatilidade funcional da planta tanto na área alimentar quanto farmacêutica (Karimkhani *et al.*, 2016).

2.6. Aplicações etnofarmacológicas de *Carthamus tinctorius* L.

O açafão-bastardo (*Carthamus tinctorius* L.) é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional de diversas culturas, incluindo a chinesa e a persa, devido às suas propriedades terapêuticas. Os seus compostos bioativos, como flavonóides e ácidos gordos, têm demonstrado uma série de efeitos farmacológicos benéficos, como ação anti-inflamatória, antioxidante e hepatoprotetora.

A utilização da planta do açafão-bastardo na China para tratamento de doenças, tais como a doença coronária, angina de peito, doença ginecológica, acidente vascular cerebral (AVC) e hipertensão, tem registos de até 2000 anos (Yanhua *et al.*, 2015). As pétalas das flores, na medicina tradicional chinesa, são usadas no tratamento de problemas ginecológicos, em problemas cardiovasculares e em problemas inflamatórios (Li & Che, 1998).

Na região da Pérsia conhecido como Kafesheh é amplamente utilizado na Medicina Tradicional para diversas condições médicas, nomeadamente dismenorrea, amenorrea, dores e massas abdominais pós-parto, traumatismos e dores articulares (Delshad *et al.*, 2018).

As ações farmacológicas dos compostos ativos extraídos do açafão-bastardo, segundo Tu *et al.* (2015) são a proteção de lesões cerebrais, o efeito protetor contra danos das mitocôndrias por isquemias cerebrais, efeito anti trombótico, efeito anti-inflamatório, efeito hepatoprotetor, efeito anti-tumoral e efeito nos osteoblastos. São ainda descritas outras ações farmacológicas como o efeito protetor nas fibroses hepáticas, atividade antidiabética, e efeitos antioxidantes. Estudos atuais para aplicações

farmacêuticas adicionais de açafão-bastardo revelaram capacidades antioxidantes (Kruawan & Kangsadalampai, 2006), anti-inflamatórias (Jun *et al.*, 2011), analgésicas (Almeida *et al.*, 2001), anti convulsivo (Kasahara *et al.*, 1989), aumento da pressão periférica e fluxo sanguíneo, inibição da agregação plaquetária, aumento na amplitude de batimento de células miocárdicas cultivadas e diminuição nos efeitos de tumores da carcinogênese da pele de ratinhos (Hiramatsu *et al.*, 2009; Asgarpanah, 2013).

Na figura 4 apresentam-se alguns dos efeitos bioativos do açafão-bastardo. Substâncias isoladas das flores do açafão-bastardo têm sido utilizadas na medicina (Adamska & Biernacka, 2021).

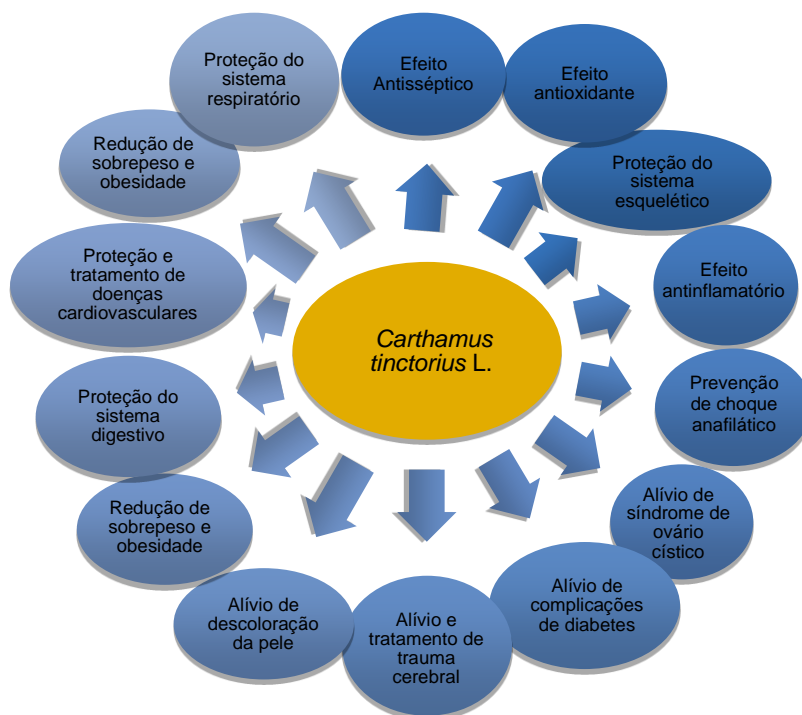


Figura 4. Efeito bioativo das substâncias do açafão-bastardo.

Adaptado de Adamsk & Biernacka (2021)

A maioria dos estudos refere-se ao uso do hidroxisaflor A (HSYA), podendo-se destacar:

- Efeito antioxidante, permitindo às células sobreviver ao stress oxidativo (Yin *et al.*, 2015);
- O amarelo hidroxisaflor A é o composto ativo mais eficaz relativamente para a atividade anticoagulante e anti trombótica, prolonga o tempo de protrombina,

tempo de trombina e inibe a indução de adenosina fosfato que é fundamental para a ativação e a agregação das plaquetas (Zhao *et al.*, 2009);

- Efeito protetor da isquemia do miocárdio com a redução dos fatores de inflamação e melhoramento da função cardíaca (Han *et al.*, 2009);
- Efeito protetor da isquemia cerebral com a verificação da redução enfarte da zona cerebral (Luo *et al.*, 2004);
- Efeito anti-inflamatório com inibição significativa da síntese de óxido nítrico e ciclo-oxigenase-2 e redução da produção de óxido nítrico e de prostaglandinas (Jun *et al.*, 2011).

3. Procedimento experimental

3.1 Processamento da matéria-prima para obtenção da matéria corante

Material vegetal

O material vegetal, açafraão-bastardo, foi cedido por um produtor localizado no Concelho de Alter do Chão, distrito de Portalegre. A planta foi semeada durante a terceira semana de outubro de 2022. A colheita das pétalas ocorreu entre o final do mês de abril e o início de maio de 2023, sendo estas posteriormente armazenadas em caixas de cartão, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Obtenção da matéria corante

A extração dos pigmentos a partir das pétalas foi adaptada do método descrito por Kim *et al.* (2015), com algumas modificações. Inicialmente, as pétalas foram finamente trituradas em moinho (IKA Micro Fine Mill Culatti) e peneiradas através de um crivo com granulometria de 1,0 mm. Pesaram-se 5 g do material vegetal, que foi colocado em um balão Erlenmeyer, ao qual foram adicionados 50 mL de água. A mistura foi submetida a agitação em placa de aquecimento (4000 rpm) a 25°C durante 24 horas, para remover o pigmento amarelo, que é solúvel em água. As pétalas, sob a forma de resíduo sólido, foram separadas do extrato aquoso inicial por filtração com gaze dupla (20 × 20 cm). O sobrenadante, de coloração amarela, constitui o corante amarelo. O sobrenadante recolhido foi imediatamente congelado a -80 °C.

Para a extração do corante vermelho, solúvel em meio alcalino, o resíduo sólido remanescente foi tratado com uma solução de carbonato de potássio (K_2CO_3) 0,1 N, na proporção de 1:10 (p/v), e mantido sob agitação contínua à temperatura ambiente durante 24 horas. Concluído o processo de extração, a mistura foi novamente filtrada com gaze dupla para remoção dos resíduos vegetais. O extrato obtido, inicialmente de cor amarela, teve seu pH ajustado para a faixa de 5,5 a 5,7, estabilizando-se em pH 5,6, mediante adição de 50 mL de solução de ácido acético 0,1 M. O ajuste de pH induziu a conversão da coloração de amarela para vermelha, e, o corante vermelho, assim obtido foi também imediatamente conservado a -80 °C.

De seguida, as soluções amarela e vermelha foram liofilizadas por 24 horas. Os corantes resultantes, em pó amarelo e vermelho, foram armazenados em sacos transparentes sob vácuo e conservados em exsiccador. Devido ao baixo rendimento de extração do corante vermelho, o corante amarelo foi selecionado para os estudos posteriores, incluindo a caracterização química, o estudo da atividade antioxidante e o estudo da estabilidade da cor em função do pH e temperatura.

3.2. Identificação dos compostos presentes no corante amarelo

A técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada à deteção por arranjo de fotodiodos (PDA), permite a separação dos componentes químicos individuais presentes nos corantes, os quais podem ser identificados com base nos seus espectros de absorção na região do ultravioleta-visível. No entanto, os extratos dos corantes naturais frequentemente contêm uma diversidade complexa de compostos, o que dificulta a identificação precisa dos constituintes, sobretudo devido à escassez de padrões analíticos disponíveis comercialmente. Muitos dos compostos potencialmente presentes não estão amplamente disponíveis no mercado, o que limita a confirmação estrutural e pode comprometer a quantificação rigorosa de alguns analitos.

A técnica de cromatografia líquida acoplada a um detetor de massas (HPLC-PDA-MS), permite uma caracterização mais pormenorizada da composição molecular dos extratos. Esta abordagem combinada permite a identificação dos compostos com base tanto nos seus espectros de UV-vis como nas suas massas moleculares e perfis de fragmentação, o que torna a técnica de HPLC-PDA-MS uma ferramenta analítica particularmente robusta e sensível para a caracterização de corantes naturais (Sargent, 2013).

A caracterização química dos extratos foi efetuada por HPLC-PDA-MS (Anexo II). As análises foram realizadas pela Professora Doutora Conceição Oliveira, através de uma colaboração estabelecida entre o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e o Instituto Superior Técnico (IST). No Anexo II apresentam-se os cromatogramas (Figuras 7A – 10A) e a tabela com a identificação dos compostos.

3.3 Avaliação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante

3.3.1 Avaliação do conteúdo em compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato amarelo foi determinado segundo o método Folin-Ciocalteu, descrito por Slinkard K. e Singleton (1977), com algumas modificações.

O ensaio de Folin Ciocalteu é o ensaio mais comumente usado para determinar o conteúdo fenólico total em várias amostras de plantas ou alimentos (Sadeer, 2020). O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por tungstato, molibdato e ácido fosfórico e o método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra reduzirem o reagente de Folin-Ciocalteu, em condições básicas, formando complexos de cor azul, que apresenta uma absorção máxima a 750 nm e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de compostos fenólicos na amostra.

Para a quantificação, num tubo de ensaio, transferiu-se 1mL da amostra de extrato de corante previamente diluída, (na concentração de 0,1 mg/mL), 7mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e 1,5 mL de carbonato de sódio 20% (Hopkin & Williams). Foi preparado um ensaio em branco, no qual o volume da amostra foi substituído por água destilada. De seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente no vortéx Velp Scientifica. Os tubos foram homogeneizados e incubados durante 2 horas, ao abrigo da luz. Após incubação, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 750 nm num espectrofotómetro JascoV-530 Spectrophotometer. Os ensaios foram realizados em triplicado.

O teor em compostos fenólicos totais foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de resíduo seco de extrato, a partir da interpolação gráfica dos valores de absorvância das amostras numa curva de calibração padrão ($y = 112,28x + 0,0201$, $r^2 = 0,9949$) preparada com diferentes concentrações de ácido gálico (0,0005 – 0,008 mg/mL) (Anexo I, figura1A).

3.3.2 Avaliação do potencial de redução do íon ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante dos extratos dos corantes extraídos a partir do material vegetal, foi determinada pelo método FRAP, descrito por Benzie e Strain (1996), com alterações apresentadas por Deightont *et al.*, 2000. Este método baseia-se na redução, em meio ácido, do complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ) ao complexo Fe^{2+} pelos antioxidantes (redutores) presentes na amostra. O composto formado apresenta uma coloração roxa e a sua absorvância é lida a 593 nm ao longo do tempo.

Iniciou-se a preparação de uma solução de reagente FRAP a partir de uma mistura de 3 soluções, previamente preparadas, pela seguinte ordem: 1,25mL de solução de 10 mmol/L de TPTZ (Sigma-Aldrich) em 40 mmolHCl (Merck), 1,25mL de solução de 20 mmol/L de cloreto de ferro (III) hexahidratado (Merck) e 12,5mL de solução de 16 mL/L de ácido acético (Merck), em tampão acetato pH=3,6 (Merck).

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos, transferiu-se para um tubo de ensaio 0,2 mL de amostra previamente diluída (na concentração de 0,1mg/mL) e adicionou-se 1,8 mL de solução reagente FRAP. Preparou-se uma curva de calibração usando como padrão uma solução de sulfato de ferro heptahidratado (5 - 50 $\mu\text{mol/L}$) nas mesmas condições. Foi efetuado um ensaio em branco, com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicado. Os tubos foram homogeneizados e incubados, no escuro, durante 5 minutos. Após incubação efetuou-se a leitura dos valores de absorvância a 593 nm num espectrofotômetro JascoV-530 Spectrophotometer.

Na quantificação da atividade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) obteve-se a curva de calibração com a equação de regressão linear de $y=0,0218x + 0,0767$, e coeficiente de determinação de 0,9933 (Anexo I, figura 2A). Os resultados da capacidade antioxidante do extrato, obtidos por interpolação gráfica na curva padrão, foram expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ por grama de resíduo seco.

3.3.3 Avaliação do potencial de captação de radicais livres (método do radical DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante foi efetuada pelo método do radical DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), que se baseia na capacidade dos compostos antioxidantes presentes na amostra para captar o radical livre, com redução do DPPH,

que se traduz na diminuição do valor de absorvância a 517nm, devido à alteração de coloração de roxo para amarelo, proporcional à atividade antioxidante Kondo, *et al.* (2002).

Este é um método frequentemente utilizado para avaliar o potencial antioxidante de um composto ou de um extrato, dada a sua simplicidade (Kedare, 2011).

Para a determinação da capacidade antioxidante do extrato amarelo foi utilizado o método descrito por Kondo *et al.* (2002), com algumas modificações.

Para o efeito, preparou-se uma solução stock de DPPH na concentração de 40 mg/L, por dissolução do reagente DPPH (Sigma-Aldrich) em etanol 95% (v/v) (Carlo Erba), a qual foi conservada ao abrigo da luz, por um período máximo de 2h. Prepararam-se soluções de extrato nas concentrações de 1mg/mL e de 2mg/mL para a quantificação da atividade antioxidante. Foram preparados 2 ensaios em branco, um com etanol e outro com água destilada. Foi também preparada uma solução padrão de Trolox em etanol (24 a 800 μ mol/L).

Para cada uma das soluções, num tubo de ensaio, adicionaram-se 100 μ L de solução e 2mL da solução DPPH, repetindo-se o procedimento para cada uma das concentrações de extrato, de padrão de Trolox e brancos. O ensaio foi efetuado em triplicado. De seguida, os tubos foram homogenizados usando um vortéx Velp Scientifica e incubados, no escuro durante 1 hora. Após incubação, efetuaram-se as leituras de absorvância a 517 nm no espectrofotómetro Jasco V-530 Spectrophotometer. Os resultados da capacidade antioxidante do extrato pelo método de captação de radicais livres, obtidos por interpolação gráfica na curva padrão, foram expressos em μ mol Trolox por grama de resíduo seco (Anexo I, figura 3A).

3.4 Estudos cinéticos para avaliação da estabilidade da matéria corante

O estudo da estabilidade da matéria corante de cor amarela presente nos extratos do açafraão-bastardo foi realizado com soluções de extrato produzido conforme indicado anteriormente (secção 3.1). As soluções preparadas a três valores distintos de pH (pH=3, pH=4,6 e pH=9), foram colocados em tubos hermeticamente fechados. Os tubos foram colocados numa estufa (marca Venticell 111, Grupo MMM) a 95°C. As soluções de extrato foram retiradas ao fim de 0, 60, 120, 180, 240, e 300 minutos e

avaliados quanto aos valores de absorvância, a 254nm e a 550nm, num espectrofotômetro (marca Jasco V-530 UV/VIS). Os parâmetros de cor dos extratos corantes do açafreão-bastardo, foram realizados de acordo com as especificações indicadas na seção 3.5.

As leituras dos valores da absorvância, dos extratos de açafreão-bastardo, foram usadas para obter os parâmetros que permitem estimar a estabilidade dos corantes na presença de diferentes soluções de pH, à temperatura de 95°C (anexo 1, figuras 4, 5 e 6).

Os valores das constantes de velocidade de degradação (Kd) foram determinados pela inclinação da reta representada pelo logaritmo neperiano da absorvância dos compostos corantes em função do tempo. A partir do Kd determinou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da solução corante, ou seja, o tempo necessário para reduzir em 50% a absorvância inicial dos corantes, obtido pela equação 1:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{Kd} \text{ (equação 1)}$$

3.5. Avaliação da estabilidade da cor por colorimetria de refletância

A cor depende de três fatores: a fonte de luz, a amostra (objeto a ser observado) e o observador. A impressão de cor resulta destas três variáveis e pode ser expressa quantitativamente através da medição da cor.

A colorimetria tem como objetivo quantificar e descrever as percepções humanas da cor, recorrendo a modelos matemáticos, utilizando valores de referência para comparação. Este conceito permite eliminar a subjetividade e tomar como base um sistema numérico como base para análises (Schanda, 1996).

Em 1931, a CIE (Comissão Internacional de Iluminação) - cria um modelo matemático com o objetivo de descrever numericamente todas as cores visíveis ao olho humano, o espaço de cores CIE XYZ. Este sistema tornou-se a base de sistemas colorimétricos cada vez mais detalhados para a medição e especificação da cor. Em 1976 foi publicado o sistema CIELab, tornando-se o sistema universalmente aceite para quantificar e comunicar a cor.

O espaço de cor CIE Lab baseia-se na teoria científica que demonstra que o cérebro traduz estímulos de cor, captados pela retina, em distinções entre luz e escuridão e na teoria de cores opostas, onde duas cores não podem ser verdes e vermelhas ou amarelas e azuis ao mesmo tempo. Este sistema de cores baseia-se numa representação cartesiana sequencial ou contínua de 3 eixos ortogonais: L^* , a^* e b^* . A coordenada L^* representa a luminosidade, a^* representa o componente de cor verde/vermelho e b^* o componente de cor azul/amarelo, como consta na figura 5.

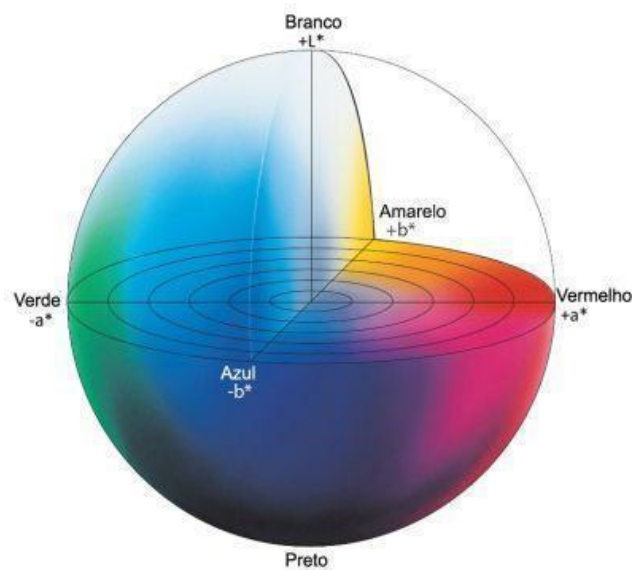


Figura 5. Representação do Espaço de Cor CIE Lab (Fonte: Konica Minolta)

A localização de uma cor é definida pela sua localização num sistema de coordenadas:

- L^* mede se a amostra é clara (L^* + elevado = 100) ou escura (L^* + baixo = 0)
- a^* e b^* representam a cromaticidade (matiz e croma) da amostra
 - a^* indica cores na direção verde-vermelho. Valores positivos indicam mais vermelho e valores negativos indicam mais verde.
 - b^* indica cores na direção azul-amarelo. Valores positivos indicam mais amarelo e valores negativos indicam mais azul.

Utilizando os valores do sistema de coordenadas $L^*a^*b^*$, é possível calcular a diferença entre cores, o que permite um controlo mais preciso da qualidade da cor e avaliações das diferenças de cor.

O valor da diferença de cor total, ΔE , é medido em relação a um padrão e o seu cálculo envolve diferenças de cor absolutas de ΔL , Δa e Δb .

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

onde ΔL^* , Δa^* Δb^* representa a diferença de cor entre cada parâmetro para os extratos da amostra submetidos à temperatura de 95 °C, ao longo do tempo.

O valor ΔE^* indica a perceptibilidade das diferenças de cor:

0 < ΔE^* < 1: As diferenças são imperceptíveis para os observadores.

1 < ΔE^* < 2: Somente observadores experientes podem notar a diferença.

2 < ΔE^* < 3.5: Observadores inexperientes também podem notar a diferença.

3.5 < ΔE^* < 5: Uma clara diferença de cor é notada.

ΔE^* > 5: Os observadores percebem duas cores diferentes.

Os parâmetros de cor foram determinados por colorimetria de refletância, utilizando um colorímetro Minolta Chroma, com um iluminador D65 e ângulo de observação de 2 graus. Os resultados obtidos, a partir da equação 2, foram apresentados no espaço uniforme de cor CIE (L, a*, b*), para determinação do valor de ΔE . Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

A avaliação da cor dos extratos foi realizada a 95 °C em soluções com valores de pH 3, 4,6 e 9, valores representativos de diferentes aplicações alimentares, sendo o pH de 3 característico de alimentos altamente ácidos, como sumos cítricos, refrigerantes, iogurtes acidificados, rebuçados e compotas, o que permite analisar a estabilidade dos corantes em meios fortemente ácidos, onde compostos naturais tendem à degradação ou descoloração, enquanto o pH de 4,6 representa o limite entre alimentos ácidos e pouco ácidos, como molhos, purés e compotas com acidez moderada, sendo relevante para avaliar a estabilidade do corante em condições críticas tanto do ponto de vista químico quanto microbiológico, enquanto que o pH de 9 corresponde a produtos alcalinos ou resultantes de processos específicos, como suplementos alimentares, bebidas proteicas alcalinizadas ou alimentos fermentados, sendo essencial para determinar a resistência dos corantes em meios alcalinos, onde é frequente a degradação térmica dos pigmentos naturais.

3.6 Análise estatística

Os dados foram trabalhados, utilizando métodos paramétricos, com o software Excel, versão Excel 2019 MSO (16.10379.20043) da Microsoft Corporation, para a elaboração das curvas de regressão linear e para os cálculos, e os valores foram apresentados com o cálculo do desvio padrão.

4. Resultados e discussão

4.1 Rendimento do processo de extração dos corantes

Após a extração, das corolas de açafão-bastardo, obteve-se um corante amarelo que apresentou um rendimento de $35,6 \pm 4,3\%$. Enquanto para o corante vermelho, se obteve um rendimento inferior a 2%. O ensaio foi efetuado em triplicado.

O rendimento obtido para o corante amarelo neste estudo foi considerável, atingindo 35,6%, valor superior ao relatado por Nyi Ma (2023), que descreveu um rendimento de extração de 26% para o mesmo pigmento. Ressalva-se que esse autor utilizou uma metodologia distinta, recorrendo ao metanol como solvente de extração, o que pode justificar, em parte, a diferença observada, pelo facto de o corante amarelo ser hidrosolúvel. Além da variação metodológica, outros fatores como o estado de maturação das flores e as condições edafo-climáticas podem igualmente influenciar os rendimentos obtidos.

Devido ao baixo rendimento obtido para o corante vermelho (<2%), este não foi considerado para os ensaios seguintes. No entanto, estes resultados estão de acordo com outros estudos referidos na bibliografia, que apontam para rendimentos de extração do corante vermelho de 2,2% mas com solventes diferentes (Nyi Ma, 2023)

4.2 Identificação dos compostos por LC-MS/MS

Os extratos metanólicos de corolas amarelas (AA) e vermelhas (AV) do açafão-bastardo foram inicialmente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência

acoplada a um detetor de matriz de díodos (HPLC-DAD). Seguidamente a identificação e caracterização estrutural dos componentes fenólicos maioritários presentes nos extratos amarelo (AA) e vermelho (AV) foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a ensaios de espectrometria de massa (MS).

No extrato AA foram identificados e caracterizados 10 compostos atribuídos a 5 quinochalconas e seus isómeros, 3 flavonóides e 1 tri-sacárido, por comparação com dados da literatura (Jiang *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019) Anexo II, Tabela 1.

Os flavonoides maioritários, no corante amarelo foram identificados como hidroxisaflor A e B (figura 6), os quais partilham semelhanças estruturais, os grupos hidroxilo e carbonilo que contribuem para a sua solubilidade em água e atividade biológica, e algumas diferenças subtis podem resultar em variações nas propriedades físico-químicas e biológicas.

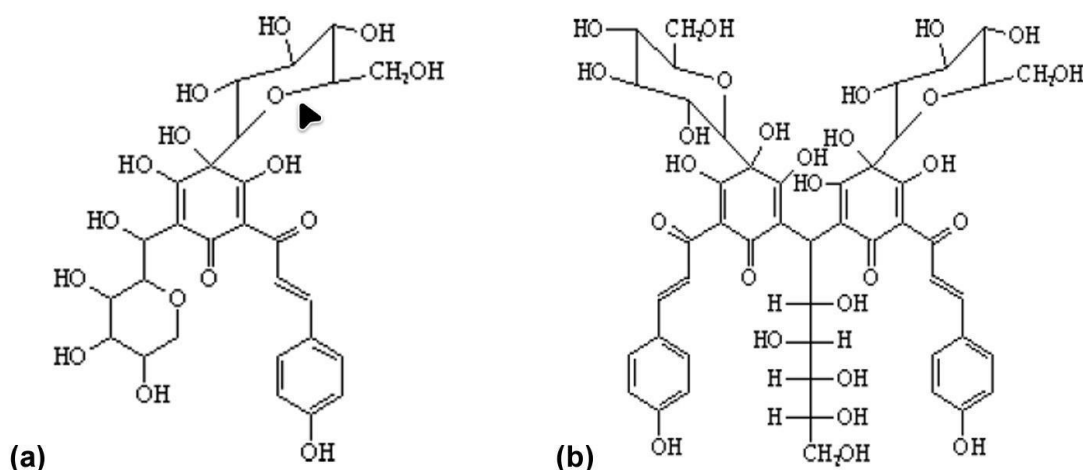


Figura 6. Fórmula estrutural do hidroxisaflor A e B. (FAO, 1998)

Na tabela 3 encontram-se expressos os compostos principais identificados através de HPLC-HRMS no corante amarelo e no corante vermelho. No Anexo II, figura 10A apresentam-se os cromatogramas obtidos e a estrutura dos compostos.

Tabela 3 – Identificação dos compostos presentes nos extratos das pétalas amarelas (AA) e vermelhas (AV).

Extratos	Compostos	Fórmula química
Extrato de corante amarelo (AA)	Hydroxysafflor Yellow A (HSYA)	$C_{27}H_{32}O_{16}$
	α -D-Rha-(1→3)- α -D-Rha-(1→2)- α -D-Rha	$C_{18}H_{32}O_{13}$
	Saffloquinoside A	$C_{27}H_{30}O_{15}$
	HSYA isómer	$C_{27}H_{32}O_{16}$
	6-OH-Kae-3-O-Glc	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	6-OH-Kae-3-O-Rha-Glc	$C_{27}H_{30}O_{16}$
	Anhydrosafflor yellow B (anHSYB)	$C_{48}H_{52}O_{26}$
	Kae-3-O-Rut	$C_{27}H_{30}O_{15}$
	Safflomin C	$C_{30}H_{30}O_{14}$
	Safflospemidine A	$C_{34}H_{37}N_3O_6$
	Safflospemidine B	$C_{34}H_{37}N_3O_6$
Extrato de corante vermelho (AV)	Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$
	Ácido 2-metil cítrico	$C_7H_{10}O_7$
	Cartamina	$C_{43}H_{42}O_{22}$

4.3 Avaliação do teor em compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante do extrato do corante amarelo

O teor em compostos fenólicos analisado no corante amarelo foi expresso em equivalentes de ácido gálico, utilizando a equação da reta de calibração representada na Figura 1A do Anexo I.

Os resultados obtidos para o extrato do corante amarelo de *Carthamus tinctorius* revelaram um conteúdo fenólico total de $750,5 \pm 13,9$ mg EAG/g de extrato, conforme apresentado na Tabela 4. Esta mesma tabela inclui ainda os valores de atividade antioxidante determinados pelos ensaios FRAP e DPPH.

Tabela 4 – Teor em compostos fenólicos totais e avaliação da capacidade antioxidante

Conteúdo em Fenóis totais (EAG, mg/g)	$750,5 \pm 13,9$
Capacidade antioxidante FRAP (mmol eq Fe(II)/g)	$4,30 \pm 0,04$
Capacidade antioxidante DPPH (mmol eq. Trolox/g)	$60,20 \pm 0,82$

O elevado teor de compostos fenólicos obtido neste estudo ($750,5$ mg EAG/g) destaca-se quando comparado aos resultados de Ebadi *et al.* (2014), que reportaram $245,27 \pm 31$ mg EAG/g em extratos metanólicos de *Carthamus tinctorius*. Esta diferença significativa pode ser atribuída não apenas às condições de extração, mas também à variabilidade de origem botânica, estágio de maturação das flores e condições edafoclimáticas.

Segundo Ebadi *et al.* (2014), o rendimento da extração de fenóis totais varia significativamente conforme o solvente utilizado, tendo o metanol demonstrado a maior eficácia entre os três testados, com um valor de $245,27 \pm 31$ mg EAG/g, seguido da acetona ($202,33 \pm 24,5$ mg/g) e do etanol ($141,1 \pm 22,7$ mg/g).

O extrato obtido neste estudo, é um extrato aquoso que apresentou um teor de fenóis totais de $750,5 \pm 13,9$ mg EAG/g. Este extrato contém um teor em compostos fenólicos muito superior aos dos extratos obtidos por Ebadi *et al.* (2014). A elevada eficiência pode ser explicada, em parte, pelo facto de os corantes amarelos de *C. tinctorius* serem naturalmente hidrossolúveis, o que favorece a extração em meio aquoso. Adicionalmente, fatores como o método de extração, o tempo de contacto

solvente/matriz, o estágio de maturação das flores e as condições edafo-climáticas podem também ter contribuído para os resultados superiores obtidos, demonstrando que, sob determinadas condições, a água é uma alternativa viável, eficiente e mais sustentável na extração de compostos fenólicos com elevado potencial bioativo, para além de ser uma opção mais segura quando se trate de compostos. Estes dados mostram que a água, além de ser uma opção mais segura e sustentável, pode ser altamente eficiente na extração de compostos fenólicos de interesse para uso alimentar.

Além do elevado conteúdo fenólico, o extrato do corante amarelo apresentou atividade antioxidante evidenciada por dois mecanismos distintos: $4,30 \pm 0,04$ mmol eq. Fe^{2+} /g no ensaio FRAP e $60,20 \pm 0,82$ mmol eq. Trolox/g no método DPPH. Estes valores são superiores aos relatados por Jayaprakasha *et al.* (2006) para extratos etanólicos do corante de *Curcuma longa*, que apresentaram FRAP de 3,25 mmol eq. Fe^{2+} /g e DPPH de 43,2 mmol eq. Trolox/g. De forma semelhante, Paramasivam *et al.* (2009) também reportaram valores inferiores para *C. longa*, com FRAP de 2,89 mmol/g e DPPH de 38,7 mmol/g.

Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato de açafão-bastardo apresenta não apenas uma elevada concentração de compostos fenólicos, mas também uma capacidade antioxidante superior à de outras fontes de substâncias/compostos naturais amplamente utilizadas como corantes, reforçando o seu potencial como corante natural funcional com aplicações promissoras nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica.

4.4 Estabilidade dos corantes do açafão-bastardo em função do pH

A Tabela 5 apresenta os valores médios das constantes de degradação (kd) e dos correspondentes tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) para o extrato do corante amarelo extraído de *Carthamus tinctorius*, determinado a 95 °C sob diferentes condições de pH (3, 4,6 e 9).

Tabela 5 – Valores médios das constantes de degradação (KD) e dos tempos de meia-vida ($t_{1/2}$ (min.)) do corante amarelo extraído de *Carthamus tinctorius*, determinados a 95 °C, em diferentes condições de pH (3, 4,6 e 9).

Valores de pH	KD	($t_{1/2}$) (min.)
pH=3	0,00305±0,00007	231±1
pH=4,6	0,00140±0,00020	529±80
pH=9	0,00145±0,00007	479±23

Os resultados obtidos demonstraram que o maior tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do corante amarelo de *Carthamus tinctorius* foi registado na solução com pH = 4,6 durante a exposição à temperatura de 95 °C, indicando maior resistência térmica à degradação sob condições levemente ácidas. Este comportamento sugere que o corante apresenta estabilidade ótima em ambientes com pH entre 4 e 5, uma faixa comum em diversos produtos alimentares, como molhos, compotas e vegetais processados.

Com base nos resultados apresentados (Anexo I – Figuras 4A, 5A e 6A), verificou-se que o extrato manteve estabilidade significativa nos valores de pH 3 e pH 4,6, apresentando apenas ligeiras variações nas constantes de degradação (kd), o que indica boa robustez em meios ácidos. Em contraste, no pH 9, observou-se acentuada instabilidade térmica, acompanhada de alterações visíveis na cor e valores de kd negativos, refletindo intensa degradação e inviabilizando sua aplicação em sistemas alimentares alcalinos.

Estes resultados são consistentes com os resultados reportados na literatura. Fatahi *et al.* (2009) observaram que a temperatura, por si só, não provoca degradação significativa do açafrão amarelo, especialmente quando os pigmentos estão em meio ácido, corroborando a estabilidade observada neste estudo a 95 °C nos valores de pH 3 e de pH 4,6. De forma semelhante, Knehira *et al.* (1990) relataram que os pigmentos do açafrão amarelo são relativamente estáveis em ambientes térmicos controlados, desde que o pH não seja excessivamente alcalino.

Ainda, Yoon *et al.* (2003) confirmaram que os pigmentos extraídos de *C. tinctorius* são termoestáveis em condições ácidas, mas sofrem rápida degradação em meios básicos, alinhando-se com os resultados obtidos no presente trabalho para pH 9.

Adicionalmente, Bantea-Zagareanu *et al.* (2022) demonstraram que o açafrão amarelo, quando utilizado como corante na preparação de caramelo, manteve-se estável até 115 ± 2 °C, sem apresentar sinais de degradação, reforçando seu potencial como

substituto natural viável para corantes sintéticos em aplicações alimentares de alta temperatura.

Assim, os dados obtidos neste estudo, aliados aos resultados da literatura, confirmam que o corante amarelo de *Carthamus tinctorius* apresenta excelente estabilidade térmica em pH ácido, sendo uma opção promissora para formulações alimentares submetidas a processamento térmico.

4.5 Estudo da estabilidade da cor dos extratos

A avaliação da estabilidade da cor é essencial para determinar a adequação dos corantes naturais nos alimentos, garantindo que não ocorram alterações indesejadas durante o processamento, armazenamento ou consumo. Na Figura 7, são apresentados os valores de ΔE (medida da diferença perceptível de cor) para soluções de corante expostas a 95 °C em três faixas de pH: 3, 4,6 e 9,8.

Para pH = 3, no primeiro intervalo (1 hora), os valores de ΔE situaram-se abaixo de 4, indicando que observadores inexperientes também podem notar a diferença; nos intervalos subsequentes, ΔE excedeu 5, o que torna a mudança de cor visível a olhos não especializados. No caso de pH = 4,6, o ΔE inicial esteve abaixo de 2 indicando que somente observadores experientes podem notar a diferença, mas posteriormente ultrapassou 5. Já em pH = 9,8, ΔE foi sempre maior que 5, mostrando instabilidade cromática constante. Estes resultados indicam que, embora todos os meios apresentem instabilidade a longo prazo, o corante exibe uma maior estabilidade em pH = 4,6, uma vez que mantém os menores valores de variação de cor ao longo de todo o período analisado.

Estes resultados são corroborados por Popescu *et al.* (2022), que observaram $\Delta E \leq 0,79$ em iogurte enriquecido com corante amarelo de cártamo (pH ~ 4,4) durante 28 dias, indicando alta estabilidade cromática em ambiente levemente ácido.

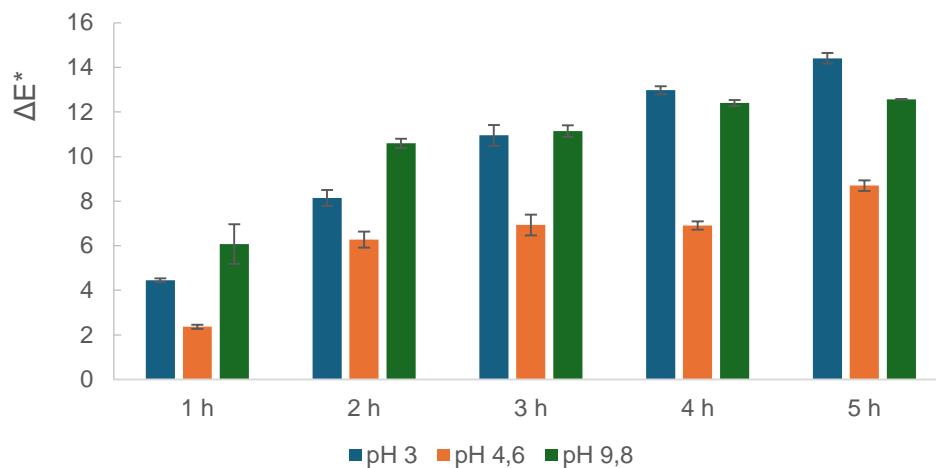


Figura 7. Estudo da estabilidade da cor a 95°C, aos diferentes valores de pH (pH 3, pH 4,6 e pH 9), ao longo do tempo.

Adicionalmente, *Fatahi et al.* (2009) relataram que o pigmento amarelo é menos afetado por temperatura em pH ácido, embora o pigmento vermelho seja instável em condições similares. Essa assimetria na resposta aos pH provavelmente explica por que o pH intermédio (4-5) favorece a preservação cromática geral do extracto - um comportamento novamente confirmado por *Yoon et al.* (2006).

Esses dados reforçam que o pH levemente ácido, como 4,6, é um ponto ótimo para a preservação da intensidade e tonalidade do corante amarelo do *Carthamus tinctorius*, conferindo maior resistência ao calor e menores alterações visuais perceptíveis, o que é altamente relevante para formulações alimentares que exigem estabilidade de cor durante o processamento e vida útil.

5. Conclusões

O presente estudo evidenciou o potencial do *Carthamus tinctorius* L. (açafão-bastardo) como uma fonte promissora de corante natural hidrossolúvel e ingrediente funcional com propriedades antioxidantes, alinhando-se à crescente procura por soluções alimentares mais seguras, sustentáveis e compatíveis com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, número 2 - fome zero e agricultura sustentável, número 12 – consumo e produção responsáveis e número 15 – vida terrestre.

Os principais resultados obtidos foram:

O corante amarelo, rico em flavonoides como Hydroxysafflor Yellow A e B, apresentou elevado rendimento de extração ($35,6 \pm 4,3\%$), utilizando um solvente compatível com aplicações alimentares, o que reforça a sua viabilidade para uso industrial.

A atividade antioxidante significativa foi confirmada por três métodos distintos: teor de fenóis totais (Folin-Ciocalteu), capacidade redutora (FRAP) e captação de radicais livres (DPPH), destacando o valor funcional do extrato, nomeadamente na prevenção da oxidação de alimentos.

A estabilidade térmica do corante foi superior em $\text{pH} = 4,6$, demonstrando maior tempo de meia-vida a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este resultado revela que o corante mantém melhor a sua integridade estrutural e funcional em ambientes ligeiramente ácidos.

De forma consistente, a análise da variação de cor (ΔE) indicou também maior estabilidade cromática em $\text{pH} = 4,6$, sugerindo que formulações alimentares com este pH são mais adequadas para preservar a tonalidade e intensidade do corante ao longo do tempo.

Contudo, reconhecem-se limitações inerentes ao caráter laboratorial deste estudo, que envolveu condições controladas de temperatura, pH e ausência de ingredientes típicos de formulações alimentares. Estas restrições, embora necessárias para a caracterização inicial, não refletem completamente os desafios da aplicação industrial, tais como diferentes matrizes alimentares (lácteas, cárnicas, panificação), presença de gorduras, sais ou açúcares, variações de processamento térmico e condições de armazenamento prolongado.

Recomendações para trabalhos futuros:

- Avaliar a termoestabilidade do corante em outras faixas de pH e temperaturas, ampliando o leque de possíveis aplicações alimentares;
- Estudar a extração e caracterização do corante vermelho e amarelo do açafão-bastardo, utilizando solventes não orgânicos (água destilada) ou métodos de extração para superar o baixo rendimento observado neste estudo, nomeadamente ultrassons assistidos por sonda;
- Aplicar os extratos diretamente em alimentos reais, a fim de observar o seu comportamento em sistemas complexos e industrialmente relevantes;
- Realizar ensaios de vida útil em produtos alimentares contendo o corante, avaliando parâmetros físico-químicos, sensoriais e microbiológicos ao longo do tempo.

Perspetivas complementares:

- Desenvolver estudos agronómicos que avaliem a adaptação da cultura de *C. tinctorius* a diferentes condições edafoclimáticas, bem como o impacto do manejo agrícola na qualidade e rendimento dos pigmentos;
- Promover o aproveitamento integral da planta, incluindo o óleo das sementes e os subprodutos vegetais (com potencial uso em alimentação animal, fertilizantes orgânicos ou bioenergia), em linha com os princípios da economia circular e da valorização de resíduos agroindustriais.

Em síntese, o açafão-bastardo revela-se uma alternativa tecnicamente viável e funcionalmente interessante para a indústria alimentar, quer como corante natural, quer como ingrediente bioativo, conjugando segurança, funcionalidade e sustentabilidade. A sua valorização representa uma oportunidade estratégica para inovação alimentar, bem como para a preservação do património agrícola e cultural associado a esta espécie tradicional.

6. Referências Bibliográficas

- Abrahart, E. N., & Stothers, J. B. (2024, October 18). Dye. In *Encyclopedia Britannica*.
<https://www.britannica.com/technology/dye>
- Adamska, I., & Biernacka, P. (2021). Bioactive substances in safflower flowers and their applicability in medicine and health-promoting foods. *International Journal of Food Science*, 657639, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2021/6657639>
- Almeida, R. N., Navarro, D. S., & Barbosa-Filho, J. M. (2001). Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8, 310–322. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00049>
- Anastácio, L. B., Oliveira, D. A., Delmaschio, C. R., Antunes, L. M. G., & Chequer, F. M. D. (2016). Corantes alimentícios amaranço, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficos à saúde humana. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences – JAPHAC*, 2, 16–30.
- Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., & Quevedo-Hidalgo, B. E. (2021). A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, 26(13), 3813. <https://doi.org/10.3390/molecules26133813>
- Asgarpanah, J., & Kazemivash, N. (2013). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 19, 153–159. <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1354-5>
- Azmir, J., Zaidul, I. S., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A. A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bantea-Zagareabu, V., Savcenco, A., Baerle, A., & Tatarov, P. (2022). Use of yellow food dye from safflower petals in producing of caramel . Technical University of

Moldova. <https://www.cris.utm.md/bitstream/5014/1582/1/Conf-MTFI-2022-p105.pdf>

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bin, X., Wang, R., Jiang, H., Zhou, Y., Yan, J., Huang, X., Chen, J., Wu, Q., Chen, C., Xi, Z., Ren, C., & Pei, J. (2022). Comprehensive review of two groups of flavonoids in *Carthamus tinctorius* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113462. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113462>
- Bruins, A. P., Weidolf, L. O. G., Henion, J. D., & Budde, W. L. (1987). Determination of sulfonated azo dyes by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59, 2647–2652. <https://doi.org/10.1021/ac00147a029>
- Carrubba, A., & Calabrese, I. (1998). Vegetable extracts as natural sources of dyes. *Acta Horticulturae*, 457, 95–104. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.457.11>
- Chanda, S., Dudhara, P., & Kaneria, M. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of *Curcuma zedoaria*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8, 218–223.
- Chandra Singh, M., Probst, Y., Price, W. E., & Kelso, C. (2021). Relative comparisons of extraction methods and solvent composition for Australian blueberry anthocyanins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104232. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104232>
- Chanioti, S., Katsouli, M., & Tzia, C. (2021). Novel processes for the extraction of phenolic compounds from olive pomace and their protection by encapsulation. *Molecules*, 26, 1781. <https://doi.org/10.3390/molecules26061781>
- Comissão Europeia. (2001, 1 de outubro). Report from the Commission on Dietary Food Additive Intake in the European Union. *Jornal Oficial da União Europeia*.

- Constantin, O. E., & Istrati, D. I. (2022). Extraction, quantification and characterization techniques for anthocyanin compounds in various food matrices—A review. *Horticulturae*, 8, 1084. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111084>
- Coronado, L. M. (2010). El cultivo del cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) en México. Ciudad Obregón: SGI.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>
- Cunha, A. P., & Roque, O. (2011). Plantas medicinais da farmacopeia portuguesa: Constituintes, controlo, farmacologia e utilização (2ª ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Dajue, L. (1993). Progress research and production in China. In L. Dajue & H. Yuanzhou (Eds.), *Proceedings of the Third International Safflower Conference* (pp. 35–46). Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1307–1313. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200008\)80:10<1307::AID-JSFA646>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200008)80:10<1307::AID-JSFA646>3.0.CO;2-P)
- Delshad, E., Yousefi, M., Sasannezhad, P., Rakhshandeh, H., & Ayati, Z. (2018). Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (safflower): A comprehensive review from traditional medicine to modern medicine. *Electronic Physician*, 10, 6672–6681. <https://doi.org/10.19082/6672>
- Diário do Sul. (1991, junho 15). Alter do Chão recorda um arcebispo erudito e ainda hoje ritualiza o açafraão. Diário do Sul.
- Downham, A., & Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 5–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>

- Ebadi, F., Mohseni, M., & Mirza Alizadeh, A. (2014). Evaluation of antioxidant activity of safflower florets (*Carthamus tinctorius* L.) as food coloring agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6, 539–544.
- Ekin, Z. (2005). Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Utilization: A global view. *Journal of Agronomy*, 4(2), 83–87. <https://doi.org/10.3923/ja.2005.83.87>
- Emongor, V., & Oagile, O. (2017). Safflower production. Regional Universities Forum for Capacity Building in Agriculture (RUFORUM).
- European Food Safety Authority. (2024, dezembro 5). Food additives. EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives.htm>
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E. de, & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 707–715. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(01\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00226-4)
- Fan, L., Zhao, H.-Y., Xu, M., Zhou, L., Han, J., Wang, B.-R., & Guo, D.-N. (2009). Qualitative evaluation and quantitative determination of 10 major active components in *Carthamus tinctorius* L. by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2063–2070. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.046>
- Fatahi, N., Carapetian, J., & Heidari, R. (2008). Spectrophotometric measurement of valuable pigments from petals of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and their identification by TLC method. *Research Journal of Biological Sciences*, 3, 761–763.
- Fatahi, N. M., Carapetian, J., & Heidari, R. (2009). Comparing stability of carthamin and safflower yellow pigments at pH, temperature and light, from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) florets. *Research Journal of Biological Sciences*, 4, 250–253.

- Figueiredo Muniz, V. R. G., Ribeiro, I. S., Beckmam, K. R. L., & Godoy, R. C. B. (2023). The impact of color on food choice. *Brazilian Journal of Food Technology*, 26, e2022088. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.e2022088>
- Flora-On. (n.d.). Família Asteraceae. Flora-On. Recuperado em 20 de agosto de 2025, de <https://flora-on.pt/#/1Asteraceae>
- Frick, D. (2003). The coloration of food. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, 33, 18–25. <https://sdc.org.uk/wp-content/uploads/2022/06/2003RP015.pdf>
- Fusaro, L. (2010). When it comes to synthetic food colours: Beware the ‘Southampton Six’. *Food Processing*. <https://www.foodprocessing.com/articles/2010/colorants/>
- Girardi, L. B., França-Neto, J. B., Henning, F. A., Krzyzanowski, F. C., Lorini, I., & Henning, A. A. (2013). Qualidade de sementes de cártamo colhidas em diferentes períodos de maturação. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 11, 67–73. <https://doi.org/10.7213/academica.10.S01.AO08>
- Guaratini, C. C. I., & Zanoni, V. B. (2000). Corantes têxteis. *Química Nova*, 23(1), 71–78. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100013>
- Han, S. Y., Li, H. X., Ma, X., Zhang, K., Ma, Z. Z., & Tu, P. F. (2009). Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia *in vivo* and *in vitro*. *Phytomedicine*, 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.007>
- Hattori, M., Huang, X.-L., Che, Q.-M., Kawata, Y., Tezuka, Y., Kikuchi, T., & Namba, T. (1992). 6-Hydroxykaempferol and its glycosides from *Carthamus tinctorius* petals. *Phytochemistry*, 31, 4001–4004. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80401-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80401-K)
- Hiramatsu, M., Takahashi, T., Komatsu, T., Kido, T., & Kasahara, Y. (2009). Antioxidant and neuroprotective activities of mogami-benibana (safflower, *Carthamus tinctorius* Linne). *Neurochemical Research*, 34, 795–805. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9872-9>
- Hsieh-Lo, M., Castillo-Herrera, G., & Mojica, L. (2020). Black bean anthocyanin-rich extract from supercritical and pressurized extraction increased *in vitro* antidiabetic

- potential, while having similar storage stability. *Foods*, 9, 655. <https://doi.org/10.3390/foods9050655>
- Hu, W., Gong, H., Li, L., Chen, S., & Ye, X. (2019). Ultrasound treatment on stability of total and individual anthocyanin extraction from blueberry pomace: Optimization and comparison. *Molecules*, 24, 2621. <https://doi.org/10.3390/molecules24142621>
- INFARMED (2009). Farmacopeia Portuguesa IX. Edição oficial, 9ª edição. Lisboa. ISBN 978-972-8425-96-8.
- Jafari, S. M., Mahdavee Khazaei, K., & Assadpour, E. (2019). Production of a natural color through microwave-assisted extraction of saffron tepal's anthocyanins. *Food Science & Nutrition*, 7, 1438–1445. <https://doi.org/10.1002/fsn3.978>
- Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J. M., & Sakariah, K. K. (2006). Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*, 98(4), 720–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.037>
- Ji, J., Lu, X., Cai, M., & Xu, Z. (2006). Improvement of leaching process of geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.08.004>
- Jiang, J.-S., Lu, L., Yang, Y.-J., Zhang, J.-L., & Zhang, P.-C. (2008). New spermidines from the florets of *Carthamus tinctorius*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10, 447–451. <https://doi.org/10.1080/10286020801948540>
- Jun, M. S., Ha, Y. M., Kim, H. S., Jang, H. J., Kim, Y. M., Lee, Y. S., & Kim, H. J. (2011). Anti-inflammatory action of methanol extract of *Carthamus tinctorius* involves heme oxygenase-1 induction. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.045>
- Kanehira, T., Naruse, A., Fukushima, A., & Saito, K. (1990). Decomposition of carthamin in aqueous solutions: influence of temperature, pH, light, buffer systems, external gas phases, metal ions, and certain chemicals. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 190, 299-305.

- Karimkhani, M.M. & Shaddel, Rezvan & Khodaparast, Mohammad & Vazirian, Mahdi & Piri-Gheshlaghi, Sh. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) extract from four different cultivars. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 8. 1-10. 10.3920/QAS2015.0676.
- Kasahara Y., Kumaki K., Sato T., & Katagiri S. (1989). Pharmacological studies on flower petals of *Carthamus tinctorius* central actions and anti-inflammation. *Shoyakugaku Zasshi*. 43, 331-338.
- Kazuma, K., Takahashi, T., Sato, H., Takeuchi, H., Matsumoto, T., & Okuno, T. (2000). Quinochalcones and flavonoids from Fresh Florets in different Cultivars of *Carthamus tinctorius* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1588-1599. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1588>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- Khalil, N.A.A.; Dagash, & Y.M.; Yagoub, S.O. (2013). Effect of sowing date, irrigation intervals and fertilizers on safflower (*Carthamus tinctorius* L.) yield. *Disc. Journal of Agricultural Food Scienc.*, 1, 97-102.
- Kim, H-W, Hwang K-E, Song D-H, Kim Y-J, Ham Y-K, Lim Y-B, Jeong T-J, Choi Y-S, & Kim C-J. (2015). Wheat fiber colored with a safflower (*Carthamus tinctorius* L.) red pigment as a natural colorant and antioxidant in cooked sausages, LWT. *Food Science and Technology*, 64, 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.064>
- Kobylewski S., & Jacobson F. M. (2010) *Food Dyes A Rainbow of Risk*. Center for Science in the Public Interest, 1, 49.
- Kondo, S. & Tsuda, K. & Muto, No. & Nakatani, S. (2002). Changes in Antioxidant Activity during Fruit Development in Citrus Fruit. *Horticultural Research (Japan)*. 1. 63-66. 10.2503/hrj.1.63.
- Kruawan K, & Kangsadalampai K. (2006). Antioxidant activity, phenolic compound contents and antimutagenic activity of some water extract of herbs. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 28-35.

- Landau, S., Friedman, S., Brenner, S., Bruckental, I., Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Dvash, L., & Leshem, Y. (2004). The value of safflower (*Carthamus tinctorius*) hay and silage grow under Mediterranean conditions as forage for dairy cattle. *Livestock Production Science*, 88, 263-271.
- Li, F., He, Z., & Ye, Y. (2017). Isocartomin, a novel quinocalcone C-glycoside from *Carthamus tinctorius*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7, 527-531. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.04.005>
- Li, Y., & Che, Q. (1998). Studies on chemical components of *Carthamus tinctorius* petals. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 626–628.
- Lu, J-X., Zhang, C-X., Hu. Y., Zang, M-H., Wang, Y-N., Qian, Y-X., Yang, J., Yang, W-Z., Jiang, M-M., & Guo, D-a. (2019). Application of multiple chemical and biological approaches for quality assessment of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by determining both the primary and secondary metabolites. *Phytomedicine*, 58, 152826. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152826>
- Luo, C. Z., Gao, Z. Q., Jiang, J. Y., Yang, X. Y., Tang, J. P., & Luo, Y. (2014). Effects of safflor injection on serum IL-6 and IL-10 level of young patients with mild acute cerebral infarction. *Chongqing Medical University*, 29, 463-5.
- M. Sargent (Ed.) (2013). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. ISBN 978-0-948926-27-3.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Natural food colorants and preservatives: A review on bioactivity, sources and application. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 251–259.
- Menegaes, J.F; Bellé, R.A. & Nunes, U.R, (2021). Produtividade de Cártamo Conduzido com Diferentes Números de Capítulos por Planta, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Fitotecnia. RS, Brasil
- Moreira, S., Pintado & M., Saraiva, J. (2020). High hydrostatic pressure-assisted extraction: A review on its effects on bioactive profile and biological activities of extracts. 10.1016/B978-0-12-816405-1.00014-5.

- Mündel, H.-H., Blackshaw, R. E., Byers, J. R., Huang, H. C., Johnson, D. L., Keon, R., Kubik, J., McKenzie, R., Otto, B., Roth, B., & Stanford, K. (2004). Safflower production on the Canadian Prairies. Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre. <http://publications.gc.ca/site/eng/333269/publication.html>
- Naidu, M. M., & Sowbhagya, H. B., (2012). Technological Advances in Food Colours. *Chemical Industry Digest*, 79-88.
- Newman, S. E., & O'Connor, A. S. (2013). Edible Flowers. Colorado State University Extension, Fact Sheet No. 7.237, Colorado. Retrieved from Nova, 23, 1, 71-78.
- Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural food colorants and preservatives: A review, a demand, and a challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 2789–2805. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07533>
- Nyi Ma, D., Mi Yee, D. M., & Zan Aung, D. K. (2023). Extraction of dyes from *Carthamus tinctorius* (Safflower) and *Jatropha curcas* (Physic nut) from Southern Shan State, Taunggyi (Myanmar). *International Journal of Current Innovations in Advanced Research*, 2, 1–10. <https://www.ijciar.com/index.php/journal/article/view/117>
- Oelke, E. A., Oplinger, E. S., Teynor, T. M., Putnam, D. H., Doll, J. D., Kelling, K. A., Durgan, B. R., & Noetzel, D. M., (1992). Safflower. Alternative Field Crop Manual, University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension.
- Özcan, A.S., & Özcan, A.S. (2004). Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. *Talanta*, 64, 491-495.
- Pacheco, T. F. & Mendes, T. D. (2021). Guia prático para caracterização de enzimas. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia.

- Paré, J.R., Bélanger, J.M., & Stafford, S.S. (1994). Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, 13, 176-184.
- Pereira, A. R. P., Silva, M. J. de S. F., & Oliveira, J. A. (2008). Análise química de pigmentos Minerais de Itabirito (MG). *Cerâmica*, 53, 35-41.
- Pereira, M. O. S. (2010). Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa
- Pintão, A.M., & Silva, I.F (2008). A verdade sobre o açafão. Workshop Plantas Mediciniais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos. Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa.
- Paramasivam, M. & Venkatesh, R.; Ambigapathi, V. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of Curcuma longa rhizome extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3,1088–1095, 2009.
- Parlamento Europeu, & Conselho da União Europeia. (2008, 16 de dezembro). Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, 354, 16–33.
- Popescu, L., Aliona, G-M., Baerle, A., Alexandra, & S., Tatarov, P. (2022). Color stability of yogurt with natural yellow food dye from safflower (*Carthamus tinctorius* L). *Journal of Engineering Science*. 29. 10.52326/jes.utm.2022.29 (1).13.
- Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Queiroga, V. P., Girão, E. G., & Albuquerque, E. M. B. (2021). *Cártamo (Carthamus tinctorius L.) tecnologias de plantio e utilização*. Ed. A Barriguda.

- Rebocho, A. M. C. Z. T. (2015). Produção de Plantas Medicinais para a Indústria Farmacéutica, Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Reck, I. M., & Paixão, R. M. (2016). Impactos ambientais dos corantes azo e tratamentos de remoção: uma revisão. *Uningá Review*, 28.
- Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005
- Regulamento (CE) N.º 1333/2008 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares.
- Regulamento (UE) N.º 231/2012 Regulamento (UE) 2023/915 da Comissão de 25 de abril de 2023.
- Regulamento (UE) N.º 1129/2011 Da Comissão de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares.
- Ren, R., Shi, C., Cao, J., Sun, Y., Zhao, X., Guo, Y., Wang, C., Lei, H., Jiang, H., Ablat, N., Xu, J., Li, W., Ma, Y., Qi, X., Ye, M., Pu, X., & Han, H. (2016). Neuroprotective Effects of A Standardized Flavonoid Extract of Safflower Against Neurotoxin-Induced Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease. *Scientific reports* 24;6.10.1038/srep22135. PMID: 26906725; PMCID: PMC4764910.
- Robles, S. R. (1985). Producción de oleaginosas y textiles. Segunda edición. Editorial Limusa. México, D. F. 1985, 141-142.
- Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*. 9. 709. 10.3390/antiox9080709.

- Salem N., Msaada K., Hamdaoui G., Limam F., & Marzouk B. (2011). Variation in phenolic composition and antioxidant activity during flower development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 59, 4455-63. 10.1021/jf1049936. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21434653.
- Sargent, M. (Ed.) (2013). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. ISBN 978-0-948926-27-3
- Schanda, J. (1996). CIE Colorimetry and Colour Displays. Color and Imaging Conference, 230-234
- Serrano C., Sapata M. M., Soares A., & Diogo S. (2021). Plantas Tintureiras: Obtenção de corantes Naturais por Encapsulação e Estabilização, Revista Vida Rural, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
- Shin, Y.-S., & Yoo, D.-I. (2012). Storage stability and color reproducibility of yellow and red dyes extracted from *Carthamus tinctorius* L. *Textile Coloration and Finishing* 24, 165–172, doi:10.5764/TCF.2012.24.3.165.
- Silva M.L.C., Costa R.S., Santana A.S., & Koblitz M.G.B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e actividade antioxidante em produtos vegetais. *Revista Ciências Agrárias*, 3, 669-682.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28, 49-55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49>
- Spence, C. (2015). On the psychological impact of food colour. *Flavour*, 4, 21. <https://doi.org/10.1186/s13411-015-0031-3>
- Soutinho, S. M. A. (2012). Avaliação dos compostos fenólicos e da Atividade Antioxidante de Frutos Vermelhos produzidos em Modo Biológico, Dissertação de Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar, Escola Superior Agrária de Viseu.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.

- Steberl, Kathrin. (2021). Coloring foods - development of a suitable cultivation and harvesting system for florets of safflower (*Carthamus tinctorius* L.).
- Stringheta, P., Freitas, P. A., (2021). Corantes Naturais: da diversidade da natureza as aplicações e benefícios. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos 10.29327/540979.
- Tsukui, A., & Rezende, C.M. (2014). Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. Revista Virtual de Química <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/download/969/526/0>
- Tu, Y., Xue, Y., Guo, D., Sun, L., & Guo, M. (2015). Carthami flos: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 553-566.
- UNESCO Portugal. (n.d.). Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 15: Proteger, restaurar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, travar e reverter a degradação dos solos e travar a perda de biodiversidade. <https://unescoportugal.mne.gov.pt>
- UNESCO Portugal. (n.d.). Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2: Erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar e promover a agricultura sustentável. Comissão Nacional da UNESCO – Ministério dos Negócios Estrangeiros de Portugal. Recuperado em 16 de julho de 2025. <https://unescoportugal.mne.gov.pt>
- União Europeia. (1976). Directiva 76/399/CEE do Conselho, de 6 de abril de 1976, relativa à aproximação das regulamentações dos Estados-Membros respeitantes aos corantes que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana. Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
- União Europeia. (1994). Directiva 94/36/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de junho de 1994, relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios. Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

- União Europeia. (2008). Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 354, 16–33. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1333>
- União Europeia. (2009). Directiva 2009/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de abril de 2009, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre os solventes de extração utilizados no fabrico de géneros alimentícios e dos respetivos ingredientes. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Weiss, E. A. (1971). Safflower In: Weiss, E. A. Castor, Sesame and Safflower. New York: Barnes & Noble, 529–744, 1971.
- Yan, Z., Alimu, R., Wan, J., Liao, X., Lin, S., Dai, S., Chen, F., Zhang, S., Tong, Y., Liu, H., Qin, R., & Liu, J. (2022). Composition of major quinochalcone hydroxysafflor yellow A and anhydrosafflor yellow B is associated with colour of safflower (*Carthamus tinctorius*) during colour-transition but not with overall antioxidant capacity: A study on 144 cultivars. *Food Research Int.* 162 Part B, 112098. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112098>
- Yanhua, T., Xue, Y., Guo, D., Sun, L., & Guo, M. (2015). Carthami flos: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 553-566. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.06.001>
- Yao, C-L., Yang, W-z., Si, W., Shen, Y.; Zhang, N-x., Chen, H-I., Pan, H-q., Yang, M., Wu, W-j., & Guo, D-a. (2017). An enhanced targeted identification strategy for the selective identification of flavonoid O-glycosides from *Carthamus tinctorius* by integrating offline two-dimensional liquid chromatography/linear ion-trap-Orbitrap mass spectrometry, high-resolution diagnostic product ions/neutral loss filtering and liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance. *Journal of Chromatography*, 1491, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.041>
- Yoon, J. M., Cho, M.H., Park, J.E., Kim, Y.H., Hahn, T.R., & Paik, Y.S. (2003). Thermal Stability of the Pigments Hydroxysafflor Yellow A, Safflor Yellow B, and Precarthamin from Safflower (*Carthamus tinctorius*). *Journal of Food Science*, 68: 839-843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08252.x>

Zhang, L.L., Tian, K., Tang, Z.-H., Chen, X.-J., Bian, Z.-X., Wang, Y.-T., & Lu, J.-J. (2016). Phytochemistry and pharmacology of *Carthamus tinctorius* L. *The American Journal of Chinese Medicine*, 44, 197–226.

<https://doi.org/10.1142/S0192415X16500130>

Zhou, FR., Zhao, & MB., Tu, PF. (2009). Simultaneous determination of four nucleosides in *Carthamus tinctorius* L. and Safflower injection using high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 18, 326-330.

Zhou, X., Tang, L., Xu, Y., Zhou, G., & Wang, Z. (2014). Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 27–43. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.050>

7. Anexos

Anexo I: Resultados gráficos do procedimento experimental

Método de Folin-Ciocalteu

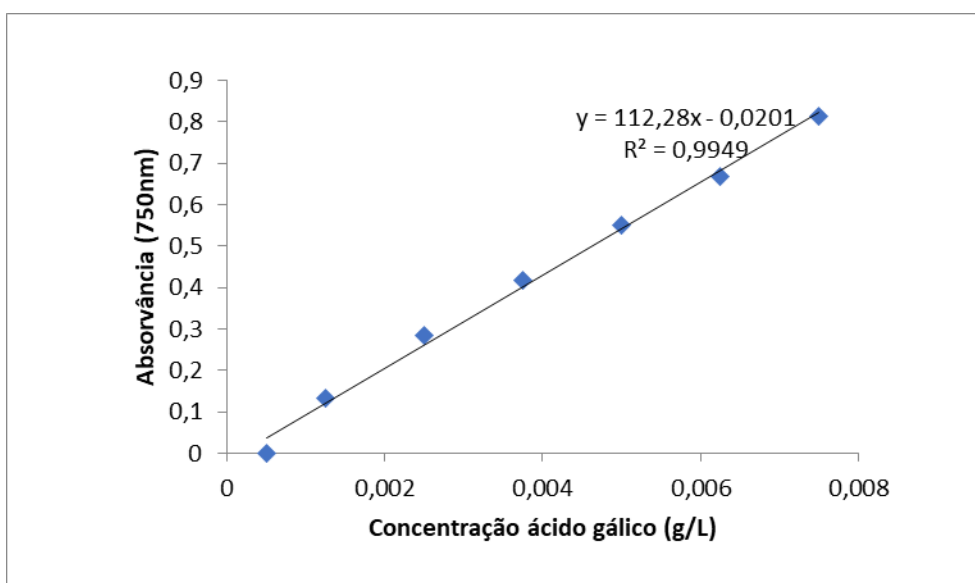


Figura 1 A. Curva de calibração do ácido gálico - método Folin-Ciocalteu.

Método de redução do ião ferro (FRAP)

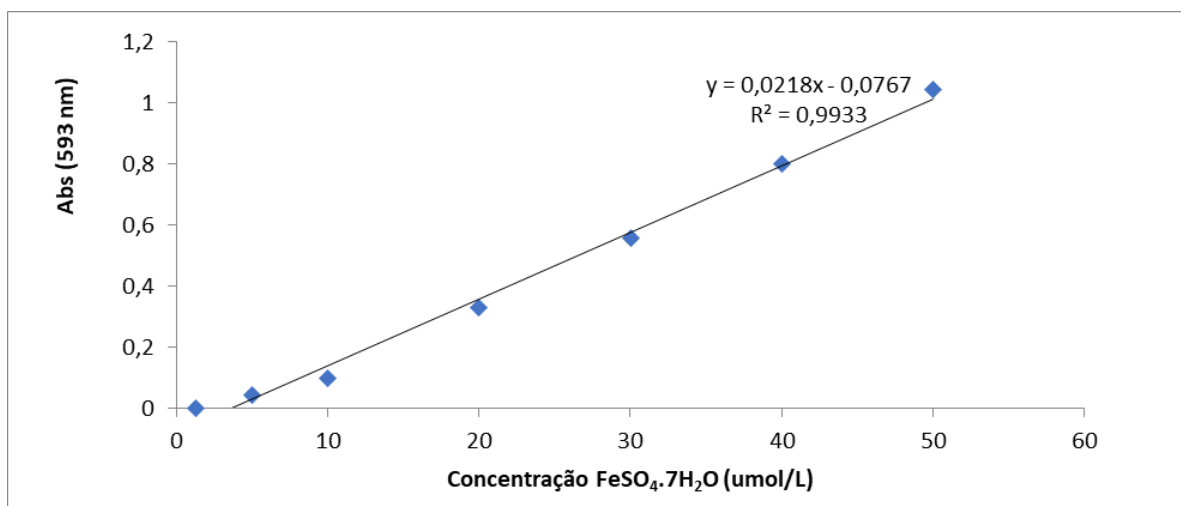


Figura 2 A. Curva de calibração do sulfato de ferro - método de redução do ião ferro (FRAP).

Método de captação de radicais livres (DPPH)

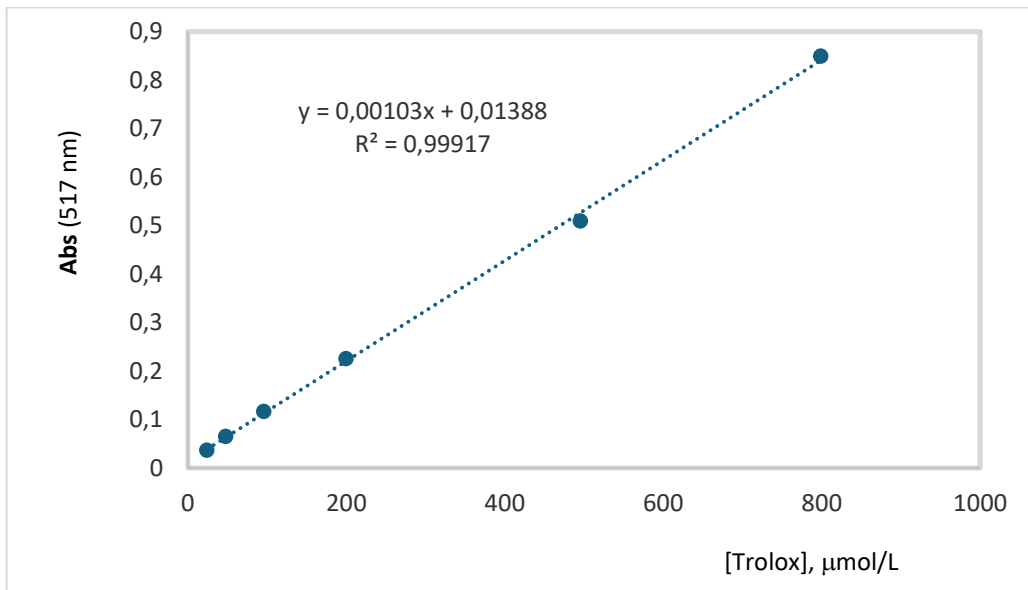


Figura 3 A. Curva de calibração do Trolox - método de captação de radicais livres (radical DPPH).

Estudo da estabilidade da cor para diferentes pH ao longo do tempo

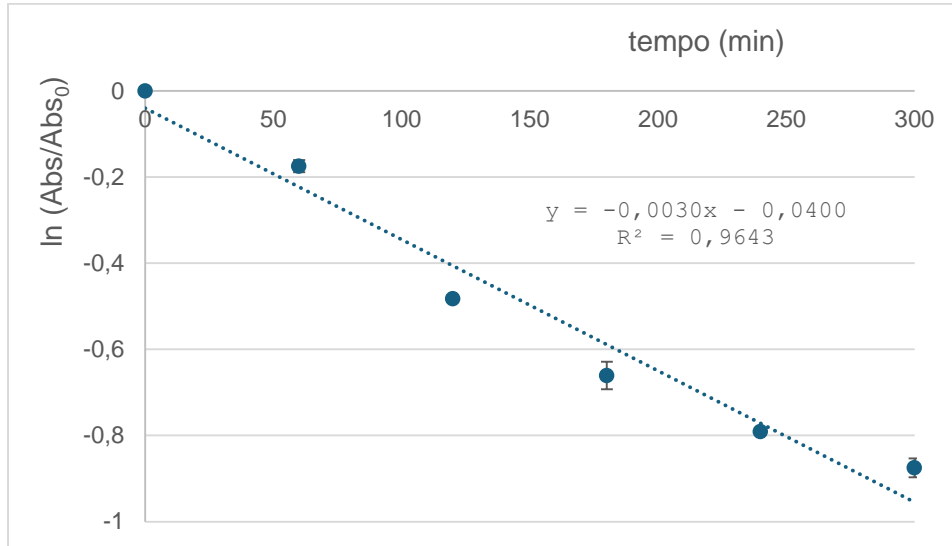


Figura 4 A. Curva da cinética de degradação para o pH=3.

Curva da cinética de degradação para pH=4,6

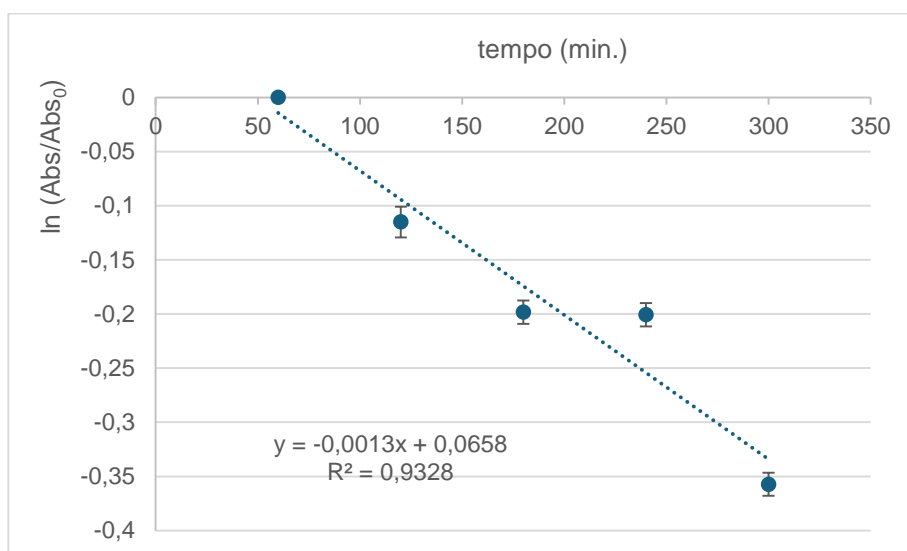


Figura 5 A. Curva da cinética de degradação para o pH=4,6.

Curva da cinética de degradação para pH=9

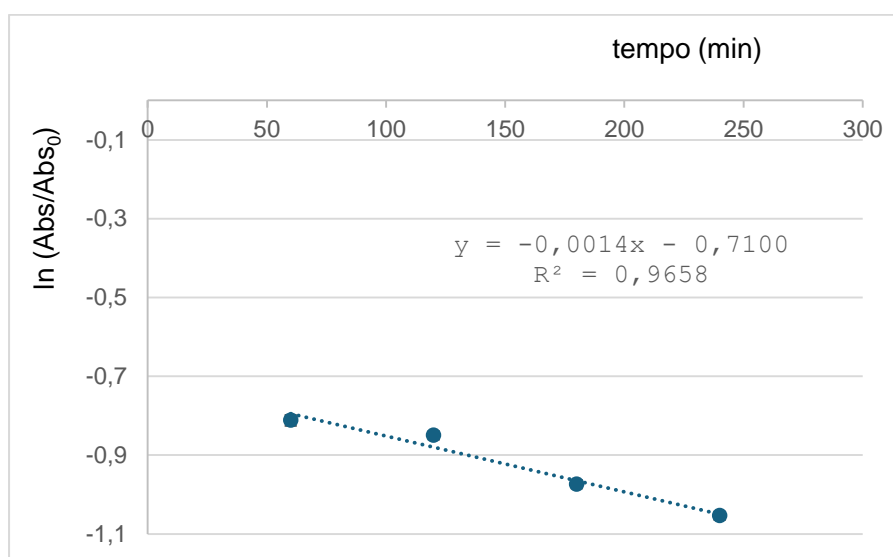


Figura 6 A. Curva da cinética de degradação para o pH=9.

Anexo II: Quantificação dos extratos por HPLC-HRMS/MS

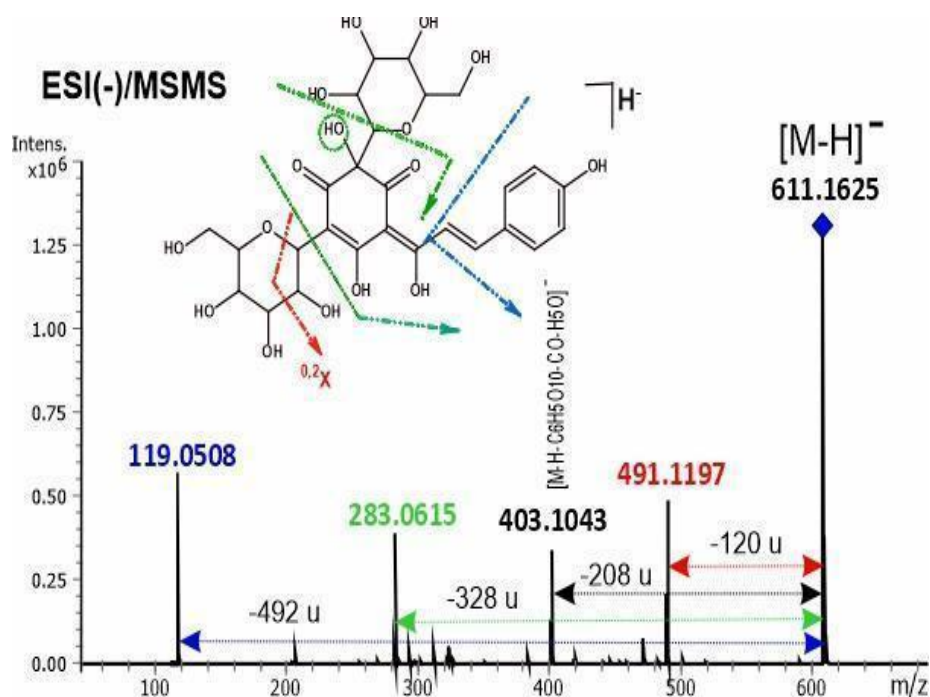


Figura 7 A. Espectro de massa tandem de alta resolução obtido no modo ESI negativo para o íon precursor m/z 611.1625 atribuído à molécula desprotonada de hydroxysafflor yellow A, identificada no extracto AA.

O pico 1 gerou uma molécula desprotonada a m/z 611.1625, com fórmula iónica $[C_{27}H_{31}O_{16}]^-$, atribuída ao composto hydroxysafflor yellow A, a quinocalcona dimérica C-glicosídea mais abundante no açafão-bastardo (Yan *et al.*, 2022) O espectro MS/MS gerou um grupo de iões fragmentos característicos deste tipo de compostos. A fragmentação do íon precursor m/z 611.1625 envolveu quatro passos: (1) formação do fragmento m/z 491 resultante da fragmentação $^{0,2}X$ que ocorre no grupo C-glicosídico na posição 2 (ou 4) por perda do resíduo neutro com 120 u; (2) eliminação combinada das moléculas Glc+CO+H₂O (perda de 208 u) conduzindo à formação do íon fragmento m/z 403; (3) eliminação combinada Glc+ H₂O +C₅H₈O₅ (-328 u) com formação do íon fragmento m/z 283; (4) formação do íon fragmento m/z 119 característico da molécula desprotonado do *p*-hidroxiestireno com fórmula iónica $[C_8H_7O]^-$.

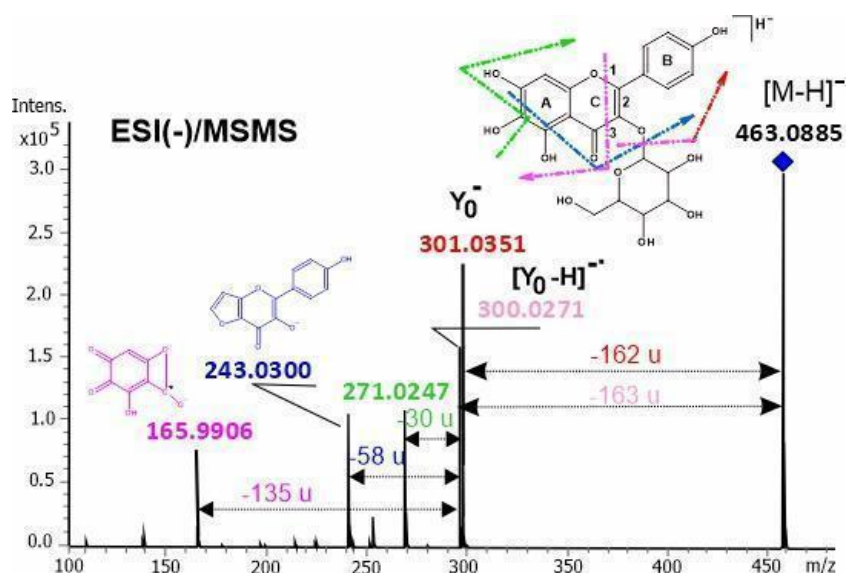


Figura 8 A. Espectro de massa tandem de alta resolução obtido no modo ESI negativo para o ião precursor m/z 463.0885 atribuído à molécula desprotonada do 6-hidroxikaempferol 3-O-glicosídeo.

Os compostos 5, 5a e 7 foram identificados como flavonoides pertencentes à família dos flavonóis, nomeadamente um kaempferol *O*-di-glicósido (7) e dois 6-hidroxi-kaempferóis, um *O*-glicosídeo (5) e um *O*-di-glicósido (5 a). (Hattori *et al.*, 1992) Os espectros de fragmentação (MS/MS) dos flavonoides apresentam perdas características de resíduos do açúcar que conduzem à identificação da aglicona presente na molécula. A eliminação do grupo glicosídeo (perda de 120 u) origina o ião Y_0^- , a m/z 301, atribuído à molécula desprotonada da 6-OH-Kae. Adicionalmente, o espectro apresenta um pico a m/z 300 resultante da quebra homolítica da ligação *O*-glicosídica originando a espécie radical $[Y_0-H]^{-\bullet}$, uma fragmentação característica dos flavonóis 3-*O*-glicosídicos. Os iões produto a m/z 271 e 243 resultam da fragmentação do ião Y_0^- por perda de CH_2O (-30 u) e $C_2H_2O_2$ (-58 u), respetivamente. O ião m/z 165 resulta de uma quebra homolítica no anel C originando o fragmento $^{1,3}A^{-\bullet}$.

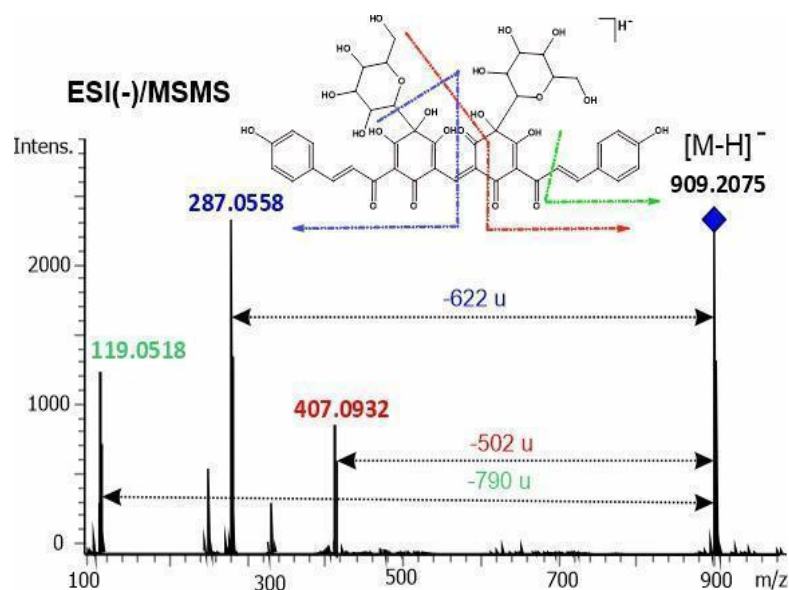


Figura 9 A. Espectro de massa tandem de alta resolução obtido no modo ESI negativo para o íon precursor m/z 909.2075 atribuído à molécula desprotonada do cromóforo vermelho cartamina.

No cromatograma do extrato AV foram apenas identificados 3 compostos, tal como se encontra expresso na figura 9A. Os dois picos eluindo no início do cromatograma foram atribuídos ao ácido cítrico e seu derivado.

Nas Figuras 9 e 10 apresentam-se os cromatogramas iônicos totais (TIC) obtidos no modo ESI negativo para os extratos amarelo (AA) e vermelho (AV). No anexo 10 sumarizam-se os tempos de retenção e os fragmentos obtidos na análise MS/MS dos extratos assim como a identificação dos compostos.

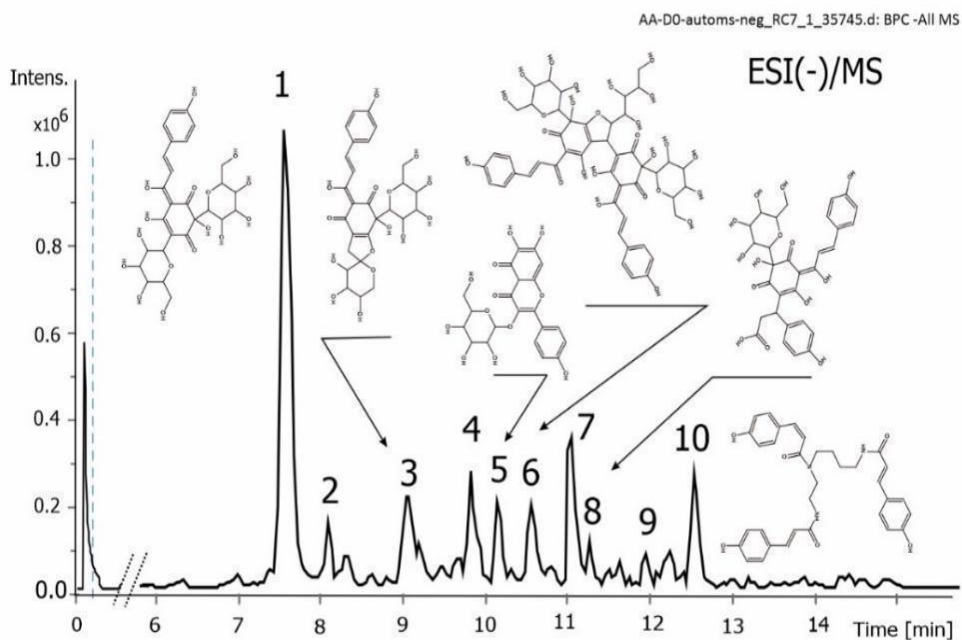


Figura 10 A. Cromatograma iónico total obtido por HPLC-HRMS no modo ESI negativo do extracto metanólico das flores amarelas (AA) do açafrão-bastardo. Os números e respetivas estruturas indicam os compostos listados no anexo 10.

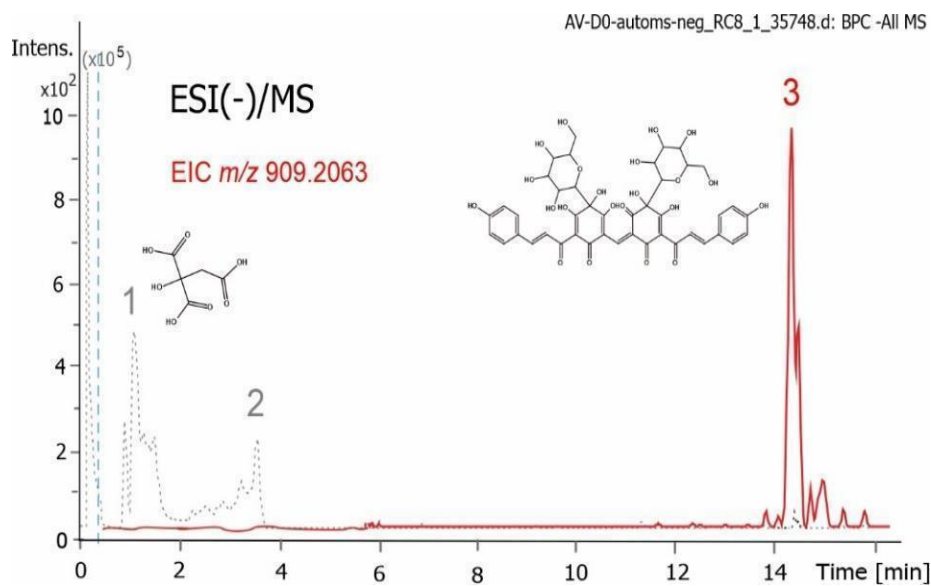


Figura 11 A. Cromatograma iónico total (a tracejado) do extrato aquoso do corante vermelho do açafrão-bastardo obtido por HPLC-HRMS no modo ESI negativo. A vermelho apresenta-se o cromatograma iónico extraído para o ião *m/z* 909.2063 atribuído à cartamina.

Tabela 1. HPLC-HRMS/7MS análise no modo ESI negativo dos extratos metanólicos das flores amarelas (AA) e vermelhas (AV) do açafão-bastardo.

Pico	t _R (min)	Formula molecular	[M-H] ⁻ [m/z (± Δ ppm)]	MS/MS [m/z (± Δ ppm; atribuição)]	Proposta de estrutura
Extracto AA					
1	7.8	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	611.1625 (-1.2)	491.1197 (-0.4) (C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂) ⁻ 403.1043 (-2.1) (C ₂₀ H ₁₉ O ₉) ⁻ 283.0615 (-1.1) (C ₁₆ H ₁₁ O ₅) ⁻ 119.0508 (-4.4) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Hydroxysafflor Yellow A (HSYA)
2	8.3	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₃	455.1774 (-2.6)	409.1774 (-0.5) (C ₁₇ H ₂₉ O ₁₁) ⁻ 307.1039 (-1.3) (C ₁₂ H ₁₉ O ₉) ⁻ 163.0616 (-2.3) (C ₆ H ₁₁ O ₅) ⁻ 101.0608 (-0.5) (C ₅ H ₉ O ₂) ⁻	α-D-Rha-(1→3)-α- D-Rha-(1→2)- α- D-Rha
3	9.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1526 (-2.4)	327.0511 (-0.1) (C ₁₇ H ₁₂ O ₇) ⁻ 119.0505 (-1.9) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Saffloquinoside A
4	9.3	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	611.1627 (-1.6)	521.1300 (-1.5) (C ₂₇ H ₂₅ O ₁₃) ⁻ 287.0565 (-0.1) (C ₁₅ H ₁₁ O ₆) ⁻ 119.0508 (-4.4) (C ₈ H ₇ O) ⁻	HSYA isomer
5	10.0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0885 (-0.2)	301.0351 (-1.1) [Y ₀] ⁻ (C ₁₅ H ₉ O ₇) ⁻ 300.0271 (-1.6) [Y ₀ -H] ^{-*} (C ₁₅ H ₈ O ₇) ^{-*} 271.0247 (-0.2) (C ₁₄ H ₇ O ₆) ⁻ 243.0300 (-0.4) (C ₁₃ H ₇ O ₅) ⁻ 165.9906 (-0.8) (C ₇ H ₂ O ₅) ^{-*}	6-OH-Kae-3-O- Glc
5a		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1462 (-0.2)	521.1282 (-3.5) (C ₂₄ H ₂₅ O ₁₃) ⁻ 301.0352 (-0.7) [Y ₀] ⁻ (C ₁₅ H ₉ O ₇) ⁻ 300.0336 (-3.4) [Y ₀ -H] ^{-*} (C ₁₅ H ₈ O ₆) ^{-*} 271.0251 (-1.1) (C ₁₄ H ₇ O ₆) ⁻ 165.9911 (-2.1) [^{1,3} A ⁻] (C ₇ H ₂ O ₅) ⁻	6-OH-Kae-3-O- Rha-Glc
6	10.4	C ₄₈ H ₅₂ O ₂₆	1043.2676 (-0.2)	1025.2575 (-0.6) (C ₄₈ H ₄₉ O ₃₅) ⁻ 449.1095 (-1.2) (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁) ⁻ 287.0561 (-0.0) (C ₁₅ H ₁₁ O ₆) ⁻ 119.0506 (-3.2) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Anhydrosafflor yellow (anHSYB) B
7	11.3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1519 (-1.2)	285.0412 (-2.4) [Y ₀] ⁻ (C ₁₅ H ₉ O ₆) ⁻ 284.0333 (-2.3) [Y ₀ -H] ^{-*} (C ₁₅ H ₈ O ₆) ^{-*} 151.0042 (-3.7) (C ₇ H ₃ O ₄) ⁻	Kae-3-O-Rut
8	11.3	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₄	613.1552 (-1.7)	551.1570 (-2.1) (C ₂₉ H ₂₇ O ₁₁) ⁻ 287.0565 (-0.2) (C ₁₅ H ₁₁ O ₆) ⁻ 241.0499 (-3.0) (C ₁₄ H ₉ O ₄₄) ⁻	Safflomin C

119.0504 (-1.4) (C₈H₇O)⁻

Tabela 1 (continuação) – HPLC-HRMS/MS análise no modo ESI negativo dos extratos metanólicos das flores amarelas (AA) e vermelhas (AV) do açafraão-bastardo.

Pico	t _R (min)	Formula molecular	[M-H] ⁻ [m/z (± Δ ppm)]	MS/MS [m/z (± Δ ppm; atribuição)]	Proposta de estrutura	
9	11.9	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	582.2602 (-1.9)	462.2036 (-0.3) (C ₂₆ H ₂₈ N ₃ O ₅) ⁻ 342.1474 (-4.3) (C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ₄) ⁻ 316.1678 (-3.7) (C ₁₇ H ₂₂ N ₃ O ₃) ⁻ 119.0504 (-1.2) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Safflospemidine A	
10	12.8	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	582.2611 (-0.2)	462.2031 (-2.4) (C ₂₆ H ₂₈ N ₃ O ₅) ⁻ 342.1459 (-0.1) (C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ₄) ⁻ 119.0500 (-2.0) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Safflospemidine B	
Extrato AV						
1	1.3	C ₆ H ₈ O ₇	191.0197 (-0.6)	173.0083 (-4.8) (C ₈ H ₅ O ₇) ⁻ 129.0189 (-3.0) (C ₅ H ₅ O ₄) ⁻ 111.0091 (-3.1) (C ₅ H ₃ O ₃) ⁻ 87.0088 (-0.1) (C ₃ H ₃ O ₃) ⁻ 85.0296 (-0.8) (C ₄ H ₅ O ₂) ⁻	Ácido cítrico	
2	3.7	C ₇ H ₁₀ O ₇	205.0356 (-1.2)	143.0356 (-4.2) (C ₆ H ₇ O ₄) ⁻ 111.0089 (-1.4) (C ₅ H ₃ O ₃) ⁻ 87.0091 (-3.4) (C ₃ H ₃ O ₃) ⁻	Ácido cítrico	2-metil
3	14.7	C ₄₃ H ₄₂ O ₂₂	909.2075 (-1.5)	407.0932 (12.7) (C ₁₉ H ₁₉ O ₁₀) ⁻ 287.0558 (1.0) (C ₁₅ H ₁₁ O ₆) ⁻ 119.0518 (13.4) (C ₈ H ₇ O) ⁻	Cartamina	

Nota: Rha, Ramnose; Kae, Kaempherol; Glc, Glucose; Rut, Rutinose.