



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROSIANNE PEREIRA SILVA

**Desenvolvimento e Aplicação da Extração Guiada por
Dispersão Energizada (EDGE) na Análise de Capim-
limão, Espinheiro Branco e Espinheira Santa: Estudo
Cromatográfico e Determinação de Atividades
Antioxidantes**

***Development and Application of Energized Dispersion
Guided Extraction (EDGE) in the Analysis of Lemongrass,
Hawthorn and Espinheira Santa: Chromatographic Study
and Determination of Antioxidant Activities***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ROSIANNE PEREIRA SILVA

**Desenvolvimento e Aplicação da Extração Guiada por Dispersão
Energizada (EDGE) na Análise de Capim Limão, Espinheiro Branco e
Espinheira Santa: Estudo Cromatográfico e Determinação de
Atividades Antioxidantes**

Dissertação de Mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Elina Bastos Caramão

***Development and Application of Energized Dispersion Guided
Extraction (EDGE) in the Analysis of Lemongrass, White Hawthorn and
Espinheira Santa: Chromatographic Study and Determination of
Antioxidant Activities***

Master's Dissertation, presented to the Postgraduate Program in Chemistry at the Federal University of Sergipe as a partial requirement for obtaining the MSc in Chemistry.



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE

S586u

Silva, Rosianne Pereira

Desenvolvimento e aplicação da extração guiada por dispersão energizada (EDGE) na análise de capim limão, espinheiro branco e espinheira santa: estudo cromatográfico e determinação de atividades antioxidantes / Rosianne Pereira Silva ; orientadora Elina Bastos Caramão - São Cristóvão, 2024.

93 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Fenóis. 2. Antioxidantes. 3. Ervas – Uso terapêutico. Camarão, Elina Bastos orient. II. Título.

CDU 543



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Rosianne Pereira Silva apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 16/08/2024.

Documento assinado digitalmente
ELINA BASTOS CARAMÃO
Data: 16/08/2024 12:10:43 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Elina Bastos Caramão
Programa de Pós-Graduação em Química - UFS

Documento assinado digitalmente
LISIANE DOS SANTOS FREITAS
Data: 19/08/2024 13:39:58 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Lisiane Santos Freitas
Departamento de Química - UFS

Documento assinado digitalmente
ANAI LOREIRO DOS SANTOS
Data: 16/08/2024 12:27:45 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Anai Loreiro dos Santos
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - INCT

RESUMO

O consumo de chás e infusões de ervas é difundido e traz diversos benefícios à saúde devido aos compostos bioativos presentes nessas bebidas. Entre os efeitos benéficos ressalta-se a antioxidante por prevenir doenças e o envelhecimento precoce, ao combater radicais livres e espécies oxigenadas que danificam células do organismo. Para potencializar esses benefícios, é importante identificar e mensurar adequadamente os compostos bioativos por meio de técnicas que os extraem e concentram sem degradá-los, como é o caso da EDGETM, técnica ainda em estado da arte, da espectrofotometria e da Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC). Este estudo otimizou a extração EDGETM para determinar compostos fenólicos totais (TPC) em ervas medicinais, utilizando uma matriz Doehlert com variáveis de tempo e temperatura, analisadas por Metodologia de Superfície de Resposta e ANOVA. A atividade antioxidante dos extratos de capim-limão, espinheiro branco e espinheira santa foi avaliada pelos ensaios ABTS, DPPH e FRAP, correlacionando-as ao TPC medido pelo método Folin-Ciocalteu. Além disso, os analitos não-voláteis dos extratos hidroetanólicos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos. As análises preliminares revelaram que as amostras estão de acordo com os limites da Legislação brasileira que prevê LMRs entre 8 e 12%. A otimização revelou uma temperatura de 165,5°C e o tempo de 6,03 minutos como condições ideais para a extração de compostos fenólicos. O TPC foi de 59,65 mg GAE/g no capim-limão, com identificação por HPLC UV-Vis/DAD de ácido cafeico (15,01 μL^{-1}), ácido p-cumárico (3,70 μL^{-1}), ácido trans-ferúlico (16,49 μL^{-1}) e ácido trans-3-hidroxycinâmico (3,06 μL^{-1}). No espinheiro branco, o TPC foi de 85,62 mg GAE/g, contendo ácido cafeico (10,98 μL^{-1}), ácido p-cumárico (5,78 μL^{-1}), teofilina (6,37 μL^{-1}) e rutina (93,05 μL^{-1}). Por fim, a espinheira santa apresentou TPC de 25,92 mg GAE/g de fenólicos, com ácido cafeico (14,59 μL^{-1}), ácido p-cumárico (3,49 μL^{-1}), ácido cinâmico (3,82 μL^{-1}) e teofilina (2,49 μL^{-1}). A avaliação combinada dos ensaios antioxidantes forneceu um perfil abrangente da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos. No ensaio ABTS, os valores de captura foram de 55,71 $\pm$ 2,74 mg TE/g para capim-limão (CL), 19,5 $\pm$ 0,92 mg TE/g para espinheira santa (ES) e 82,41 $\pm$ 4,14 mg TE/g para espinheiro branco (EB). No ensaio DPPH, as capacidades antioxidantes foram de 22,34 $\pm$ 0,1 mg TE/g (CL), 5,83 $\pm$ 0,55 mg TE/g (ES) e 54,64 $\pm$ 0,27 mg TE/g (EB). O potencial redutor foi maior em EB (1920,4 $\pm$ 66,39 mg TE/g), seguido por ES (1216,3 $\pm$ 47,02 mg TE/g) e CL (1158,92 $\pm$ 29,87 mg TE/g).

PALAVRAS-CHAVE: EDGETM; Compostos fenólicos; Extratos hidroetanólicos; Compostos antioxidantes.

ABSTRACT

Tea and herbal infusions are widely consumed and offer numerous health benefits, primarily due to their bioactive compounds. These compounds have powerful antioxidant properties that help prevent diseases and slow premature aging by neutralizing free radicals and oxygenated species that can damage cells. To fully harness these benefits, it is essential to accurately identify and measure bioactive compounds using advanced techniques that extract and concentrate them without degradation. Cutting-edge methods such as EDGE, spectrophotometry, and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) are particularly effective in this process. This study optimized EDGE extraction to determine total phenolic compounds (TPC) in medicinal herbs using a Doehlert matrix with time and temperature variables. The optimization process was analyzed through Response Surface Methodology and ANOVA. The antioxidant activity *in vitro* of lemongrass, hawthorn, and espinheira santa extracts was evaluated using ABTS, DPPH, and FRAP assays, correlating the results with TPC values measured by the Folin-Ciocalteu method. Additionally, non-volatile analytes in the hydroethanolic extracts were identified and quantified using liquid chromatography with diode array detection. The TPC was 59.65 mg GAE/g in lemongrass, with HPLC UV-Vis/DAD identification of caffeic acid ($15.01 \mu\text{L}^{-1}$), p-coumaric acid ($3.70 \mu\text{L}^{-1}$), transferulic acid ($16.49 \mu\text{L}^{-1}$) and trans-3-hydroxycinnamic acid ($3.06 \mu\text{L}^{-1}$). In hawthorn, the TPC was 85.62 mg GAE/g, containing caffeic acid ($10.98 \mu\text{L}^{-1}$), p-coumaric acid ($5.78 \mu\text{L}^{-1}$), theophylline ($6.37 \mu\text{L}^{-1}$), and rutin ($93.05 \mu\text{L}^{-1}$). Finally, espinheira santa presented a TPC of 25.92 mg GAE/g of phenolics, with caffeic acid ($14.59 \mu\text{L}^{-1}$), p-coumaric acid ($3.49 \mu\text{L}^{-1}$), cinnamic acid ($3.82 \mu\text{L}^{-1}$) and theophylline ($2.49 \mu\text{L}^{-1}$). The combined evaluation of the antioxidant assays provided a comprehensive profile of the *in vitro* antioxidant activity of the extracts. In the ABTS assay, capture values were 55.71 ± 2.74 mg TE/g for lemongrass (CL), 19.5 ± 0.92 mg TE/g for espinheira santa (ES), and 82.41 ± 4.14 mg TE/g for hawthorn (EB). In the DPPH assay, the antioxidant capacities were 22.34 ± 0.1 mg TE/g (CL), 5.83 ± 0.55 mg TE/g (ES), and 54.64 ± 0.27 mg TE/g (EB). The reducing potential was highest in EB (1920.4 ± 66.39 mg TE/g), followed by ES (1216.3 ± 47.02 mg TE/g) and CL (1158.92 ± 29.87 mg TE/g). These results provide a comprehensive profile of the *in vitro* antioxidant activity of the extracts, highlighting their potential health benefits.

KEYWORDS: EDGETM; Phenolic compounds; Hydroethanolic Extracts; Antioxidant compounds.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
2.1 O consumo de plantas medicinais	2
2.2 As plantas em estudo	4
2.2.1 Espinheiro branco (<i>Crataegus Oxycantha linn</i>)	4
2.2.2 Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus (DC) Stapf</i>).....	6
2.3 Compostos bioativos em folhas de chás e infusões	10
2.4 Técnicas de preparo, isolamento e caracterização de compostos bioativos	12
2.4.1 Técnicas de preparo de amostras	12
2.4.2 Técnicas de extração de metabólitos secundários	13
2.4.3 Métodos de avaliação do perfil fenólico e da capacidade antioxidante in vitro de chás e infusões	16
2.4.4 Técnicas de separação e caracterização de amostras	21
2.5 Quimiometria	24
2.5.1 Design de Experimentos (DoE- Design of Experiments)	24
2.5.2 Doehlert (DD)	25
2.5.3 Metodologia da Superfície de Resposta (RSM).....	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODO	28
4.1 Amostras.....	28
4.2 Pré-tratamento das amostras.....	28
4.3 Caracterização da amostra	29
4.3.1 Determinação do teor de voláteis	29
4.3.2 Determinação do teor de cinzas	29
4.3.3 Determinação do teor de Carbono Fixo.....	29
4.4 Extração Guiada por Dispersão Energizada (EDGE) TM	29
4.4.1 Limpeza e preparo do sistema EDGE TM	30
4.4.2 Otimização da extração por EDGE TM para a determinação de fenólicos	30
4.5 Delineamento experimental Doehlert	30
4.6 Determinação do teor de compostos fenólicos nas amostras	31
4.7 Atividade antioxidante	32
4.7.1 Atividade antioxidante pelo método ABTS ⁺⁺	32
4.7.2 Atividade antioxidante pelo método FRAP.....	32
4.7.3 Atividade antioxidante in vitro pelo método DPPH.....	32
4.8 Métodos de Separação: Análise por cromatografia líquida LC/DAD	33

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Avaliação preliminar das amostras de folhas de ervas.....	35
5.4 Avaliação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	42
5.5 Avaliação qualitativa e quantitativa da fração de Compostos fenólicos por HPLC UV-Vis/DAD	44
5.6 Relação entre TPC, composição dos extratos e atividade antioxidante <i>in vitro</i> ..	48
6 CONCLUSÃO.....	53
7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9 APÊNDICES	71

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Fig.1	Detalhes planta, flores e frutos da espécie <i>Crataegus Oxycantha</i> .	4
Fig.2	Detalhes da folha, planta arbustiva e bulbos da espécie <i>Cymbopogon citratus</i> .	6
Fig.3	Detalhes da planta, folhas, florescência e frutos da <i>Sorocea bonplandii</i> .	8
Fig.4	Esquema do sistema EDGE™ e os acessórios do equipamento.	14
Fig. 5	Esquema detalhando o funcionamento do processo de extração no EDGE™.	15
Fig. 6	Reação genérica de oxidação e redução envolvida no ensaio de Folin-Ciocalteu apresentando os complexos organometálico segundo Perez <i>et al.</i> , [103].	17
Fig. 7	Mecanismo de reação envolvendo a reagente DPPH com antioxidante R:	19
	H = eliminador de radicais antioxidantes; R = radical antioxidante.	
Fig. 8	Reação de estabilização do radical ABTS● ⁺ e geração do radical pelo persulfato de potássio.	20
Fig. 9	Mecanismo de reação do ensaio de avaliação do poder antioxidante de redução de ferro.	21
Fig. 10	Elementos fundamentais e sequência de operação de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (HPLC-UV-Vis/DAD).	22
Fig. 11	Representação da Superfície de Resposta (a) Gráfico de contornos, (b) Superfície de resposta no espaço tridimensional. Eixo y: Absorbância, Eixo x: Tempo e temperatura (fatores).	26
Fig. 12	Fluxograma do desenvolvimento experimental EDGE™ para avaliação de compostos fenólicos em amostras de chás com propriedades antioxidantes.	34
Fig. 13	Superfície de resposta obtidas pelo planejamento Doehlert., bem como superfície de contorno da região avaliada experimentalmente.	38
Fig. 14	Variação do teor de fenólicos em função do tempo de extração.	39
Fig. 15	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD a partir de uma solução mix de padrões de compostos fenólicos com concentração de 50 µg mL ⁻¹ .	44
Fig. 16	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de capim-limão	46
Fig. 17	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de espinheira santa.	47
Fig. 18	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de espinheiro branco.	47
Fig. 19	Matriz de correlação entre ensaios antioxidantes, teor de fenólicos e composição dos extratos.	49

LISTA DE TABELAS

Tab. 1:	Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com espinheiro branco (<i>Crataegus oxycantha</i>).	Pág. 5
Tab. 2:	Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com capim-limão (<i>Cymbopogon citratus stapf</i>).	7
Tab. 3:	Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com falsa espinheira santa (<i>Sorocea bonplandii</i>).	10
Tab. 4:	Aplicação da extração por EDGE na extração de fitoquímicos a partir de matrizes vegetais.	16
Tab. 5:	Informações acerca do material vegetal utilizado no estudo sob perspectiva da ANVISA.	28
Tab. 6:	Valores codificados, valores reais e respectivas respostas à matriz Doehlert para a EDGE™.	31
Tab. 7:	Condições para análise cromatográfica dos extratos.	33
Tab. 8:	Resultado da análise Imediata das amostras de plantas e valores de referência.	35
Tab. 9:	Resultados para a otimização do processo de extração.	38
Tab. 10	ANOVA para a otimização da extração de compostos fenólicos do capim-limão	39
Tab. 11	Teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos dos ervas analisadas.	41
Tab. 12	Resultados dos ensaios para determinação da capacidade antioxidante dos extratos analisados (média ± desvio padrão).	42
Tab. 13	Dados da construção da curva analítica para determinação de compostos fenólicos em amostras de extratos das folhas de chás obtida por HPLC UV-Vis/DAD.	45
Tab. 14	Resultados da identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos obtida por HPLC UV-Vis/DAD.	46
Tab. 15	Propriedade físico-químicas dos compostos observados no estudo.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAE - do inglês acid ascorbic equivalent (Miligramas equivalentes a ácido ascórbico)
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS - 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA - do inglês Analysis of variance (Análise de Variância)
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM - do inglês American Society for Testing and Materials
BBD - Box-Behnken design
C18 - Octadecilsilano
CCD - Central composite design
CL - Capim-limão
CUPRAC - do inglês CUPric Reducing Antioxidant Capacity (Poder Antioxidante Redutor de Cobre)
DD - Doehlert Design
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DoE - do inglês Design of Experiments (Design de Experimentos)
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
dSPE - do inglês Dispersive Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida dispersiva)
EB - Espinheiro branco
EDGE™ - do inglês Energized Dispersive Guided Extraction (Extração Guiada por Dispersão energizada)
ES - Espinheira santa
FE - Fase estacionária
FM - Fase móvel
FRAP - do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante Redutor de Ferro)
H NMR - do inglês proton nuclear magnetic resonance (Ressonância Magnética Nuclear de próton)
HPLC UV-Vis/DAD - do inglês High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Visible Diode Array Detector (Cromatografia líquida de alta performance com detecção por Ultravioleta-Visível e Arranjo de Diodos)
HPTLC - do inglês High Performance Thin Layer Chromatography (Cromatografia Líquida em camada delgada de alta performance)
LC-MS - do inglês Liquid chromatography–mass Spectrometry (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas)
mg EAG/g ms - Miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de material seco
mg/L - Miligramas por litro de solução
NBR - Normas Brasileiras Regulamentadoras
NMR - do inglês Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
ORAC - do inglês Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)
PLE - do inglês Pressurized Liquid Extraction (Extração por líquido pressurizado)
QuEChERS - do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe
R - Radical antioxidante.
R:H - eliminador de radicais antioxidantes
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RLs - Radicais livres
RP-LC - do inglês reverse phase liquid chromatography (Cromatografia Líquida em fase reversa)
RSM - do inglês Response Surface Methodology (Metodologia de Superfície de Resposta)
TPC - do inglês Total Phenolic Compounds (Compostos fenólicos totais)
TROLOX/mL - solução Trolox por mililitro
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a Deus por me consolar em todos os momentos em que achei que não conseguiria, pelas oportunidades e dons.

Meu mais profundo agradecimento a minha mãe Maria por seu carinho e dedicação, a meu irmão Gabriel que sempre ao meu lado. Agradeço imensamente a meu esposo Márcio, por estar ao meu lado, acreditando em meus sonhos, com paciência, compreensão.

Deixo expressa minha gratidão à minha orientadora, professora Dra. Elina Bastos Caramão, que se dispôs a me aceitar em seu Laboratório, por sua paciência e compreensão, por sua orientação.

A Dr. Allan dos Santos Polidoro, que me proporcionou a oportunidade, juntamente com professora Elina de trabalhar com um grupo de pesquisa excepcional. Agradeço pela calma e paciência dedicadas e, que foram importantes para o desenvolvimento de um novo trabalho.

A Apollo, que nunca me deixou sozinha durante os desafios. Meu pequeno companheiro de todos os momentos de estudo, experimentos, tratamento de dados e escrita. Sem seu carinho e companhia eu não teria me mantido sã. Obrigada por ser meu cúmplice, minha sombra nas noites em que seu ronronar embalou meus esforços e sonhos.

Um agradecimento especial a todos os colegas do Laboratório de Análises Cromatográficas (LAC) que me receberam e, em especial a Paulo Natan e Dayane que me auxiliaram durante a curta jornada. Sem o conhecimento, o auxílio e as palavras de encorajamento de vocês, essa jornada teria sido mais difícil. A todos que compõem o LAC, registro meu agradecimento.

Um agradecimento muito especial a meus amigos Tiago, Brenda, Tayssa, Lukas e Alex. A vida é mais leve quando temos pessoas para chamar de amigos.

AGRADECIMENTOS

Deixo registrada a minha gratidão aos professores do Programa de Pós - Graduação em Química por compartilharem seus conhecimentos.

À Universidade Federal de Sergipe, departamento de Química e Laboratório de Análises Cromatográficas por proporcionar o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCNT) da Universidade Federal de Sergipe por disponibilizar a infraestrutura analítica.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca: Prof^a. Dr^a. Lisiane dos Santos Freitas, Dr^a. Anaí Loreiro dos Santos.

*"I am among those who think that science has great beauty. Nothing in life is to be
feared; it is only to be understood."
(Marie Curie)*

1 INTRODUÇÃO

O consumo de plantas medicinais é amplamente disseminado ao redor do mundo. Relatos históricos descrevem uso de plantas medicinais e aromáticas, há centenas de anos. Na Índia pratica-se o consumo de plantas segundo a medicina *ayurvédica* [1, 2], em que as plantas são incorporadas à alimentação in natura, em condimentos e acompanhamentos, temperos, chás e infusões. Na China, o consumo de plantas com fins medicinais também é conhecido, principalmente os chás e infusões com propriedades antioxidantes [3].

Mesmo em países de língua inglesa, a tradição do consumo de chás e infusões é altamente disseminada desde meados do século XV, sendo mantida até os dias atuais devido aos benefícios à saúde atribuídos aos seus constituintes. Os chás e infusões são utilizados para as mais diversas finalidades, as quais variam de acordo com a crença popular ou com estudos científicos. Por exemplo, temos infusões com reconhecida ação digestiva, calmante, antipirética, emagrecedora e antioxidante, dentre outras [4].

As infusões com propriedades antioxidantes auxiliam no combate aos radicais livres que se formam nos organismos. Os radicais livres (RLs) são espécies que ocorrem naturalmente no organismo, por estresse metabólico, devido a fatores como má alimentação, consumo de medicamentos, tabagismo, consumo de bebidas e exposição solar, dentre outros [5].

Os Radicais Livres (RLs) são moléculas instáveis caracterizadas pela presença de um elétron desemparelhado. Para alcançar estabilidade, essas moléculas reagem com outras, retirando seus elétrons, o que resulta na formação de novos radicais livres. Esse processo desencadeia uma cascata de reações que pode ter efeitos benéficos, como a destruição de patógenos pelo sistema imunológico e a sinalização de perigo celular, ou efeitos prejudiciais, como a oxidação do DNA e danos celulares [6].

Essas espécies reativas promovem a oxidação do material genético, causando danos celulares que contribuem para o desenvolvimento de doenças e o envelhecimento celular. Para neutralizá-las, o organismo dispõe de antioxidantes, que podem ser endógenos ou obtidos por meio da dieta, destacando-se o papel dos chás e infusões como fontes importantes desses compostos [4,6].

Os principais compostos bioativos que conferem atividade antioxidante aos chás e infusões são os polifenóis que incluem catequinas, flavonoides, teaflavinas. Estes compostos atuam neutralizando os radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e reduzindo a inflamação. As catequinas, por exemplo, são eficazes na proteção das células contra o estresse oxidativo e têm sido associadas à melhoria da função endotelial e à prevenção de doenças metabólicas [5].

Além dos polifenóis, outros compostos como os ácidos fenólicos e as vitaminas presentes nessas bebidas também contribuem para suas propriedades antioxidantes [6].

A interação associada entre esses compostos bioativos pode potencializar os efeitos antioxidantes, proporcionando benefícios adicionais à saúde, suprimindo espécies com elétrons desemparelhados (radicais livres) ou regulando os impactos causados por essas espécies [6].

Uma vez que esses compostos bioativos são importantes na dieta, entender a composição fitoquímica, bem como extrair esses compostos de matrizes vegetais sem degradá-los é de grande importância visto que há necessidade de garantir a qualidade da matéria-prima para a finalidade à qual o bioativo for destinado.

Recentemente, o sistema EDGETM de extração guiada por dispersão energizada (EDGE, do inglês *Energized Dispersive Guided Extraction*), que combina extração por dispersão em fase sólida com extração acelerada por solvente, tem se destacado como alternativa aos métodos tradicionais de extração de compostos bioativos de matrizes vegetais [7,8]. A extração realizada no sistema EDGETM é considerada mais rápida que métodos como a extração Soxhlet, além disso, é mais automatizada que o processo conhecido como QuEChERS (método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe*) e simplifica o processo de extração utilizando solventes [7,8]. Entretanto, ainda são poucos os estudos sobre as aplicações da EDGETM na extração de compostos bioativos de plantas, o que indica a possibilidade de estudos acerca da composição fitoquímica de espécies nativas brasileiras, utilizando a técnica de extração como base.

O presente estudo tem como objetivo otimizar a extração guiada por dispersão energizada (EDGETM) a partir dos parâmetros de tempo e temperatura, utilizando uma matriz Doehlert. Além disso, visa caracterizar os extratos hidroetanólicos de folhas de diferentes ervas medicinais, avaliando o conteúdo fenólico por meio da reação de Folin-Ciocalteu e suas atividades antioxidantes *in vitro* pelos ensaios de ABTS, DPPH e FRAP. A separação, identificação e quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (HPLC UV-Vis/DAD).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O consumo de plantas medicinais

O consumo de plantas e ervas medicinais é amplamente disseminado na cultura mundial. Essas plantas e ervas são consumidas de diversas formas, sendo as mais populares os condimentos e chás ou infusões [5,9-11].

Quanto à definição de chá, é referida à bebida preparada utilizando as folhas da planta *Camellia sinensis*, [11] sendo que, a definição mais aceita para os demais preparos realizados a partir de outras espécies de plantas é infusão. Entretanto, neste trabalho serão usadas as duas denominações como sinônimos.

Os chás são popularmente consumidos como complemento alimentar saudável devido às suas propriedades bioativas. Dentre esses efeitos terapêuticos, a ação antioxidante é mais notável, uma vez que essas plantas possuem alto teor de compostos fenólicos [11-14].

Alguns dos compostos encontrados nos chás incluem compostos fenólicos (catequinas, teaflavinas, taninos e flavonóides), juntamente com polissacarídeos e alcalóides (cafeína, teobromina e teofilina); também proteínas, lipídios e elementos inorgânicos como selênio, ferro e manganês [5,15].

Essa variedade de elementos na constituição natural caracteriza a bebida como um sistema químico complexo. Portanto, compreender a composição química de chás é importante pois esta bebida pode ser perigosa quando ingerida, representando riscos à saúde [5,6]. Dessa forma, a identificação correta das espécies utilizadas no preparo de chás, bem como a regulamentação apropriada são aspectos igualmente importantes.

O chá é definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um produto de origem vegetal, composto pela planta inteira, fragmentos ou mesmo partes moídas, que pode ou não incorporar diferentes partes (folhas, caules, flores, frutas e raízes) em sua composição. Além disso, chá refere-se ao material vegetal obtido por meio de processos técnicos adaptados a cada espécie, cujo foco é exclusivamente o preparo de alimentos e bebidas por maceração ou decocção em água potável e não tem finalidade terapêutica medicinal [11,16].

Uma vez que chás e infusões são ricos em compostos bioativos, estudos acerca da toxicidade, composição e posologia são importantes. Ainda, é essencial uma legislação que controle e fiscalize a qualidade dos princípios ativos, trazendo segurança alimentar a seu consumo. Dessa forma, o Ministério da Saúde, através da ANVISA, determinou a fiscalização dos chás vendidos comercialmente através da Portaria 519 de julho de 1998. Esse documento estabelece medidas e padrões técnicos para identificação e qualidade das plantas destinada ao preparo de infusões e decocções [16].

Atualmente está em vigor a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de setembro de 2005 que aprova aspectos técnicos para avaliação de riscos e proteção à saúde do consumidor de café, cevada, erva-mate, chás e produtos solúveis. A RDC 277/2005 [17] estabelece as condições mínimas de identificação e qualidade dos materiais vegetais utilizados no preparo dessas bebidas.

Ainda, de modo a ampliar a fiscalização e controle do consumo e comercialização de chás e infusões, ainda em 2005, o Ministério da Saúde aprovou sob regulamentação da ANVISA a RDC 267, que traz o Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás e infusões, excluindo deste regulamento as espécies vegetais com finalidade medicamentosa ou terapêutica [18].

2.2 As plantas em estudo

As plantas utilizadas com finalidade fitoterápica englobam vários mecanismos de ações terapêutica como digestórios, anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-hipertensivos, dentre outros. Neste estudo serão destacadas as plantas cujo foco é a produção de infusões com reconhecida atividade antioxidante.

2.2.1 Espinheiro branco (*Crataegus Oxycantha* linn)

A identificação taxonômica da *Crataegus Oxycantha* linn consta na Livraria Nacional de Medicina do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, tendo sido registrado em 1753, sob número 510738 [19]. *Crataegus* é um gênero arbóreo e arbustivo da família Rosaceae, com cerca de 250 espécies conhecidas [20]. No Brasil, a espécie é conhecida popularmente por espinheiro branco (Hawthorn).

O espinheiro branco (EB) (Figura 1) é uma planta com propriedades medicinais reconhecidas, com registro oficial no sistema internacional de medicina homeopática, sendo comumente utilizado em tratamentos cardiovasculares [20]. São consumidos folhas, flores e frutos dessa espécie em infusões ou medicamentos e suplementos comerciais. Segundo a Biblioteca digital de Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a ocorrência dessa espécie se dá apenas por cultivo controlado no Rio Grande do Sul [21].

Figura 1: Detalhes planta, flores e frutos da espécie *Crataegus Oxycantha* (espinheiro branco).



Fonte: O autor, Freepik.

Em relação às aplicações do potencial bioativo do espinheiro branco, os estudos têm origem bastante antiga, sendo utilizado pelos celtas em rituais para cura de moléstias

do coração e pelos chineses, em bebidas com a mesma finalidade [20,22]. Na América do Norte, a planta é bastante utilizada pelos indígenas.

Uma vez que o espinheiro branco é reconhecido por suas aplicações medicinais, a composição fitoquímica de folhas, flores e frutos tem sido amplamente estudada. Dentre os compostos de principal interesse fitoquímico e aos quais são atribuídas as propriedades terapêuticas estão os flavonoides e procianidinas oligoméricas e outros compostos como ácidos triterpênicos, ácidos orgânicos, esteróis e aminas, sendo os primeiros apontados como componentes majoritários responsáveis por efeitos anti-inflamatórios, redutor de colesterol [23] e antioxidante [19,24,25].

Zhang *et al.* [26] citam que os compostos bioativos envolvidos nas atividades terapêuticas e benefícios à saúde atribuídos ao espinheiro branco são polifenóis (ácido clorogênico, proantocianidina B2, epicatequina), flavonóides (proantocianidinas, mucoxantina, quercetina, rutina) e triterpenóides pentacíclicos (ácido ursólico, ácido espinheiro, ácido oleanólico), que também são seus principais constituintes químicos [26].

Os estudos sobre o espinheiro branco focam na atividade antioxidante de extratos associada a tratamentos cardíacos, hepáticos e contra câncer. A Tabela 1 apresenta um levantamento bibliográfico sobre os estudos já desenvolvidos com esta planta.

Tabela 1. Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com espinheiro branco (*Crataegus oxyantha*).

Ref.	Objetivos
[27]	Os autores utilizaram extratos metanólicos de espinheiro branco produzidos por decocção para amenizar o estresse oxidativo e danos cardíacos pelo método de redução de cobre (CUPRAC).
[28]	Os autores realizaram um estudo comparativo entre duas espécies do gênero <i>Crataegus</i> , dentre eles o espinheiro branco em termos de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O estudo foi realizado utilizando flores como amostra, etanol ou etanol 50% como solventes extratores e a separação e identificação dos compostos foi feita por LC-MS.
[29]	O estudo visou a determinação do conteúdo fenólico e atividade antioxidante de folhas e flores de espinheiro branco a partir da extração sólido-líquido utilizando solventes de diferentes polaridades. O maior teor de compostos fenólicos para folhas foi obtido usando acetato de etila como solvente extrator (345.60 ± 0.23 mg/L).
[30]	Os autores avaliaram o extrato aquoso de espinheiro branco para redução do teor de tetracloreto de carbono em ensaios in vivo de oxidação hepática via fibrose cística induzida. Foi avaliada a atividade antioxidante do extrato que foi determinada por FRAP ($877.8 \mu\text{mol} \pm 5.33$ AAE) bem como o teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu (150.37 ± 1.33 mg EAG).
[31]	Os autores realizaram um estudo sobre a determinação do teor de compostos fenólicos em flores e frutos de espinheiro branco. O extrato foi obtido por micro-ondas, por 2 minutos a partir de 0,5 g de amostra e 50 mL de metanol 50% como solvente extrator. O extrato foi caracterizado por HPLC/DAD e a atividade antioxidante foi determinada por FRAP (559.6 ± 109.4 para flores e 581.2 ± 60.1 para os frutos mg EAG). O teor de fenólicos totais foi obtido por Folin-Ciocalteu (2759.0 ± 333.6 para flores e 3145.2 ± 992.6 para os frutos).
[32]	Realizaram um estudo sobre a quimio prevenção da colite em ratos, a partir do chá de espinheiro branco. O extrato aquoso foi obtido por decocção, tendo sido caracterizado quanto ao teor de fenólicos por Folin-Ciocalteu (165.55 ± 2.20 mg

	EAG), e atividade antioxidante por FRAP ($0,62 \pm 0,06 \mu\text{mol TROLOX/mL}$) e ORAC (entre $4,31 \pm 0,71 \mu\text{mol TROLOX/mL}$)
[33]	Os autores avaliaram a influencia da inclusão do extrato de espinheiro branco na dieta de frangos de corte a partir da atividade antilipidêmica e antioxidante do extrato. O teor de fenólicos totais foi de $102.43 \pm 2 \text{ mg EAG}$ e o total de inibição pelo ensaio de DPPH foi de $91.80 \pm 0.5 \%$.

2.2.2 Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)

A *Cymbopogon citratus* é uma planta da família Poaceae, que conta com mais de 180 espécies de gramíneas conhecidas originárias do continente asiático e cujo cultivo se estendeu para regiões tropicais ao redor do mundo, uma vez que altas temperaturas e clima úmido favorecem o crescimento da planta [34,35]. Esta espécie foi registrada em 1906 e consta na Livraria Nacional de Medicina do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia sob o número de identificação taxonômica 66014 [36].

No Brasil, país de rica flora em que o uso de plantas tradicionalmente ditas medicinais é bastante difundido, também são encontrados exemplares da *Cymbopogon citratus* popularmente conhecida por capim-limão ou capim santo (CL) [37-39]. O capim limão já é considerada uma planta naturalizada e tem ocorrência comprovada nas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do país [40]. A Figura 2 apresenta imagens com detalhes da planta Capim-Limão.

Figura 2: Detalhes da folha, planta arbustiva e bulbos da espécie *Cymbopogon citratus*.



Fonte: O autor, Freepik.

As aplicações para o extrato de *capim limão* são diversas e estão focadas em vários setores como saúde e alimentação. Os extratos dos brotos e folhas são empregados em medicamentos, cosméticos e suplementos alimentares uma vez que a planta são

atribuídas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatória, antibacteriana, para citar algumas [39,41-44].

As propriedades medicinais que são imputadas à espécie justificam estudos que visam elucidar a composição fitoquímica, e que são naturalmente estendidos ao extrato e óleo essencial, cujas composições são distintas [38,39] e contemplam uma grande variedade de aplicações etnofarmacológicas [34,45,46].

Os compostos químicos envolvidos nas atividades farmacológicas da *Cymbopogon Citratus* são ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos. Destaca-se como composto majoritário em óleos essenciais da planta o citral. O citral é uma mistura de isômeros, geranial (α -citral) e neral (β -citral) sendo uma molécula hidrossolúvel [43,46].

Em complemento, diversos estudos destacam o potencial antioxidante significativo dos extratos do capim-limão [46], relacionado à presença de compostos fenólicos. Os benefícios atribuídos à erva estão associados ao combate ao estresse oxidativo e, consequentemente ao alívio de sintomas cardiovasculares, neurodegenerativos, respiratórios e anti-inflamatório [46], relacionados às formas de consumo dos bioativos presentes na composição do capim-limão, os chás e infusões, além do óleo essencial.

Os principais compostos fenólicos relatados na composição dos extratos de chás e infusão do capim limão encontram-se os ácidos gálico, elágico, cafeíco, p-cumárico, clorogênico, hidroxibenzóicos, siríngico, vanílico, trans ferúlico e trans cinâmico, além da catequina, epicatequina, rutina, quercetina [47-49]. A Tabela 2 apresenta um breve levantamento bibliográfico de estudos desenvolvidos com esta erva com foco na composição química e antioxidante do capim-limão

Tabela 2. Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com capim-limão (*Cymbopogon citratus stapf*).

Ref.	Objetivos
[50]	O perfil de extratos obtidos por decocção foi avaliado por cromatografia líquida com detecção por arranjo de díodos, com foto na avaliação anti-inflamatória. Os resultados dos autores sugerem uma composição rica em polifenólicos, taninos e flavonóides, em especial a luteolina, a qual é atribuída a propriedade anti-inflamatória dos extratos e capim-limão.
[51]	Os autores avaliaram o melhor método de extração para bioativos do capim-limão utilizando métodos convencionais e a extração assistida por ultrassom. Foi avaliada pelos autores a melhor temperatura para extração de modo a conservar os bioativos determinando sua capacidade antioxidante e antimicrobiana usando embutidos de frango. A atividade antioxidante foi determinada por FRAP, ORAC e DPPH.
[52]	Os autores realizaram o estudo em que nanopartículas de prata foram adicionadas à extratos de capim-limão e testadas para patógenos dominantes. Os extratos foram obtidos por Soxhlet e foi observado um teor compostos fenólicos de $1584.56 \pm 16,32$ mg/100g EAG.
[48]	Os autores buscaram otimizar as condições de extração a fim de obter e caracterizar o extrato com maior conteúdo fenólico. O conteúdo fenólico foi de 71,98 0,33 mg GAE/100 mL extrato e a atividade antioxidante, avaliada por DPPH, foram de 80,63 0,49 mg TE/100mL extrato. A melhor condição de extração foi 98,3°C e 11,3 min de decocção.
[49]	Os autores avaliaram os efeitos da solubilização do colesterol submetidos à tratamento com extrato de capim-limão preparados por decocção. O perfil

	cromatográfico revelou os ácidos p-cumárico, cafeíco e ácido ferúlico, os flavonóides C- e O-glicosilados da luteolina e, por fim, taninos do tipo condensado, procianidinas do tipo B.
[53]	Os autores avaliaram o melhor método de extração para a extratos de mudas de capim-limão obtidos por três métodos de extração, a infusão, a maceração e ultrassom. Para todos os métodos de extração foram avaliados como solventes extratores dos bioativos o etanol 99% e a água ultrapura. Os resultados indicaram que o melhor solvente para a extração dos bioativos foi o ultrassom, cujos picos característicos dos compostos foram avaliados em termos de intensidade por cromatografia líquida com detecção por arranjo de díodos.
[54]	O objetivo do estudo foi a avaliação fitoquímica de extratos hidroetanólicos (70%) de capim-limão para possíveis usos como suplementação alimentar. Os autores compararam a farinha de trigo convencional com farinha de capim limão obtendo teor de fenólicos de 240.46 ± 0.20 mg/100g EAG para a farinha de capim limão. Em relação à atividade antioxidante, a farinha de capim-limão obteve 60.18 ± 0.14 mg/100 g de GAE.

2.2.3 Espinheira Santa (*Sorocea bonplandii*)

A *Sorocea bonplandii* é uma planta pertencente à família Moraceae, encontrada em grande extensão do território brasileiro (regiões centro-oeste, sudeste e sul do país). Ainda, a espécie *Sorocea bonplandii* foi registrada em 1875, sob número de registro taxonômico 241921 [40,55].

A Figura 3 apresenta em detalhes partes da planta da planta *Sorocea bonplandii* (folhas, fluorescência e frutos), sendo que a parte utilizada para o preparo de infusões são as folhas.

Figura 3: Detalhes da planta, folhas, florescência e frutos da *Sorocea bonplandii*.



Fonte: O autor, Freepik.

A espécie, conhecida popularmente como cincho, mata-olho ou falsa espinheira-santa (ES), é nativa da Mata Atlântica e Caatinga [55-59]. Seu interesse farmacológico decorre da comercialização sob o nome de espinheira-santa, devido às semelhanças morfológicas com *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa verdadeira) [55,60-63]. Contudo, a

literatura carece de estudos detalhados sobre o perfil químico ou a eficácia fitoterápica da *Sorocea bonplandii*, incluindo análises perfiláticas ou fingerprint metabolômicos [54,55]. São atribuídas comumente ações terapêuticas de alívio gástrico e analgésico na *S. bonplandii*, ações estas que são verificadas para a *M. ilicifolia* com maior dimensão de relatos [54,63].

Os estudos existentes na literatura concentram-se na espinheira santa verdadeira e na distinção dessa planta e das suas principais espécies comercializadas (*Maytenus aquifolia* e *Sorocea bonplandii*) [64]. Apesar de a literatura indicar semelhanças entre componentes majoritários encontrados na *Sorocea bonplandii* e na *Maytenus ilicifolia*, não está completamente clara a sua caracterização química [55].

A escassa literatura aponta a Soroceína A como o constituinte majoritário na composição, tendo sido relatados dois compostos fenólicos isoprenóides inéditos, o sorocenol A, B, C, D, E e F [64,65-67,66].

Considerando estudos mais recentes, Antunes et al., [65] realizaram a diferenciação entre *M. ilicifolia* e suas espécies adulterantes, indicando que existem diferenças entre o *fingerprint* de flavonoides e no teor mínimo de epicatequinas. Os autores utilizaram a cromatografia de camada fina e alto desempenho (HPTLC, do inglês *High Performance Thin Layer Chromatography*) para comparar a concentração de epicatequinas. A técnica de extração adotada foi o refluxo com água ou metanol para obtenção dos extratos.

Ali et al. [60] conduziram um estudo para diferenciar as características morfológicas similares e os perfis metabólicos utilizando ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*). Os autores ressaltaram que o uso da técnica na obtenção de informações moleculares globais seria mais recomendado do que investigar biomarcadores. Normalmente os estudos são focados em flavonoides como biomarcadores de interesse, sendo analisados por técnicas como cromatografia e espectroscopia. O estudo não encontrou diferenças significativas nos perfis obtidos para diferenciação das plantas uma vez que os constituintes são bastante similares.

Do Amaral et al. [61] por sua vez, conduziram um estudo de identificação da planta verdadeira em meio a amostras de comerciais. O estudo observou as características anatômicas (padrões de veias) das folhas para posteriores comparações com dados da literatura de maneira a garantir a autenticidade da planta utilizando fotomicrografia.

A Tabela 3 apresenta um levantamento bibliográfico de estudos já desenvolvidos com a falsa espinheira santa envolvendo diversas finalidades.

Tabela 3. Levantamento Bibliográfico sobre estudos desenvolvidos com falsa espinheira santa (*Sorocea bonplandii*).

Ref.	Objetivos
[64]	Avaliação do extrato metanólico obtido a partir das raízes da <i>Sorocea bonplandii</i> e seu uso como droga de indução.
[67]	Isolamento de Sorocenol A e B e dos compostos fenólicos isoprenilados da raiz de <i>Sorocea bonplandii</i> por ^1H NMR.
[68]	Fiscalização do comercio da espécie <i>Sorocea bonplandii</i> como adulterante da espécie <i>Maytenus illicifolia</i> .
[56]	Estudos teórico das propriedades farmacológicas da <i>Maytenus illicifolia</i> e de duas espécies adulterantes.
[69]	Estudo de extratos hidroetanólicos (70%) obtidos por maceração na inibição da atividade bacteriana.
[70]	Identificação das espécies adulterantes comercializadas como espinheira santa por análise morfológica das folhas, odor e presença de características tóxicas. .
[71]	Caracterização das folhas da espécie <i>Sorocea bonplandii</i> por microscopia ótica para verificação de padrões de identificação.
[55]	Avaliar o uso da <i>Maytenus illicifolia</i> como planta medicinal a partir de levantamento botânico, etnobotânico, fitoquímico, fitotécnico e adulterações no extrativismo à produção sustentável.

2.3 Compostos bioativos em folhas de chás e infusões

As plantas de modo geral são constituídas por metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários conferem à planta sua estrutura e armazenamento energético já que são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta [72]. Metabólitos primários como aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e clorofila, estão envolvidos nos processos de fotossíntese, respiração celular e síntese de proteínas, dentre outros processos essenciais [13,72-74].

Por sua vez, os metabólitos secundários são os produtos naturais produzidos pelas plantas em resposta à estresses abióticos e bióticos [74]. Estes compostos secundários não têm relação com a estrutura da planta, mas têm um papel importante, atuando como mecanismo de defesa através de uma interface química entre a planta e o ambiente em que ela vive [13,72,73]. Estes compostos bioativos possuem valor nutricional e farmacológico para seres humanos, além de serem utilizados como aditivos, cosméticos e corantes. Um aspecto interessante a ser discutido é o fato de que a composição de compostos bioativos é afetada por diversos fatores, como espécies de ervas, ambiente (clima, luz, solo, etc), estágio de desenvolvimento e armazenamento [75,76]. Esses fatores fazem com que compostos específicos estejam presentes na composição das ervas, além de influenciarem na quantidade e qualidade de bioativos. Cita-se os ácidos orgânicos, saponinas, antraquinonas, flavonóides, cumarinas, quinonas, taninos, alcalóides, além dos óleos essenciais, como constituintes bioativos do metabolismo secundário de plantas [13,76-79].

Os metabólitos secundários são tipicamente caracterizados por sua estrutura complexa, baixo peso molecular e alta bioatividade (vide apêndice para verificar a

estrutura de alguns compostos fenólicos presentes em chás e infusões). Eles diferem dos metabólitos primários porque são encontrados em pequenas quantidades e variam de acordo com a famílias de plantas específicas [75-80].

Estes compostos podem ser classificados em: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenos são o maior e estruturalmente mais diversificado grupo de metabólitos secundários derivados de fontes naturais. Os terpenoides são produzidos a partir do ácido mevalônico no citoplasma da célula vegetal ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto celular. Estes compostos estão presentes principalmente nos óleos essenciais [72].

Os compostos fenólicos são definidos como moléculas que apresentam em sua estrutura um anel aromático que pode conter um ou mais grupos hidroxílicos ligados à estrutura aromática. Dentre esses compostos é comum encontrar desde estruturas simples até moléculas mais complexas em arranjos poliméricos [72,76]. Esta classe de compostos, em razão da diversidade de plantas, pode conter fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas [75, 76]. Estes compostos são os principais compostos bioativos que compõe chás e infusões [13,74-80].

Por fim, os alcalóides são compostos aromáticos que contém um nitrogênio em estado de oxidação negativo. Essa classe de compostos compreende uma vasta quantidade de produtos naturais conhecidos, comumente agrupados em diversos grupos (tropânico, quinolínicos, piperidínicos, indólicos) [72,75].

Os compostos bioativos provenientes de plantas medicinais têm recebido crescente atenção devido aos benefícios que proporcionam à saúde [82,83]. Os efeitos terapêuticos dos compostos fenólicos são particularmente proeminentes [82,84] e nas últimas décadas, cresceram os estudos sobre o consumo de compostos fenólicos de ervas, seja como especiarias, condimentos, corantes, chás, infusões ou suplementos alimentares, com o objetivo de prevenir ou tratar os sintomas de doenças [13, 83,84].

O crescimento do consumo de ervas justifica o desenvolvimento de pesquisas para determinar a composição química, perfis de metabólitos secundários e *fingerprint* de espécies utilizadas para fins fitoterápicos, a fim de conhecer as respostas biológicas causadas pela sua inclusão na dieta, além de outros usos em organismos [11,14,34,82,85,86].

Shi e colaboradores [13] argumentam que mensurar adequadamente o teor de compostos fenólicos em plantas é um passo essencial para que seja atribuído o uso do material vegetal e melhores formas de consumo.

Associada à primordialidade de entendimento sobre a composição química de plantas medicinais e sua resposta biológica, verifica-se a necessidade de técnicas de preparo de amostras capazes de extrair e concentrar esses compostos de interesse *in*

situ, sem degradá-los, para posteriores análises. O isolamento e caracterização desses compostos bioativos a partir de técnicas precisas e robustas são igualmente importantes e, aliados à rapidez de execução, ampliam a gama de informações coerentes e precisas sobre os materiais vegetais.

2.4 Técnicas de preparo, isolamento e caracterização de compostos bioativos

A busca por metodologias analíticas rápidas, precisas e, com menores custos e menos impactantes ao meio ambiente é uma constante em laboratórios, o que justifica atualizações constantes de técnicas de extração, isolamento e caracterização de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes diversas. Diante da necessidade de verificar a presença de compostos bioativos em alimentos, principalmente quando se trata de segurança alimentar, a busca por métodos de extração eficientes que levem a resultados robustos e rápidos é de grande importância [13, 82,87,88].

2.4.1 Técnicas de preparo de amostras

As técnicas analíticas de preparo de amostras têm por objetivo isolar, purificar e pré-concentrar os analitos da matriz de modo a tornar possível a compatibilidade e consequente análise por técnicas instrumentais de separação e detecção [88].

Amostras de alimentos são sistemas complexos e não podem ser analisadas diretamente, pois os analitos e possíveis interferentes possuem diferentes propriedades físico-químicas, tamanho de partícula e polaridade [82,90]. Muitas vezes, as amostras alimentares apresentam características complexas que exigem etapas adicionais no processo de extração de um analito [82]. Isso ocorre porque a presença de interferentes inerentes à matriz pode prejudicar ou até mesmo impedir a determinação do composto bioativo. Além disso, parâmetros analíticos importantes, como limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão do método, são negativamente afetados por esses interferentes, resultando em seletividade e sensibilidade reduzidas [82,89-91].

Diante desse contexto, as técnicas de preparo de amostras são escolhidas com o objetivo de preservar os analitos e reduzir a complexidade da amostra, eliminando a maior parte dos interferentes. Em alguns casos, pode ser necessário utilizar métodos de limpeza (clean up), homogeneização, secagem ou liofilização das amostras para minimizar as dificuldades relacionadas ao isolamento do analito de interesse. Os procedimentos comuns de preparo de amostra são baseados na partição dos analitos por solventes líquidos apropriados ou adsorventes sólidos, em que o processo de extração é conduzido exaustivamente [86,87,91].

É evidente a necessidade de compreender aspectos da matriz de interesse para facilitar a escolha das técnicas de caracterização. A bromatologia estuda a composição química, valores calóricos e nutricionais, ação no organismo, propriedades físico-

químicas, toxicológicas, presença de adulterantes e contaminantes das amostras alimentares [92,93].

Dentre os métodos de análise de alimentos, o teor de voláteis, teor de cinzas e carbono fixo são ensaios importantes para avaliar a qualidade alimentar. O teor de voláteis está relacionado à estabilidade, qualidade e composição do alimento, pois a umidade afeta o tempo de estocagem e ingestão. A gravimetria de volatilização é usada para determinar o teor de umidade, seguindo normas da ABNT e ASTM [94]. Por sua vez, o teor de cinzas é comumente determinado na indústria alimentícia, permitindo investigar a qualidade do alimento a partir da existência de matéria inorgânica, seguindo normas da ABNT (NBR 8112) e ASTM (D1102) [95].

2.4.2 Técnicas de extração de metabólitos secundários

Diversas técnicas clássicas de extração de metabólitos secundários são utilizadas, seja para a obtenção de extratos (maceração, Soxhlet) ou de óleos essenciais (maceração) [96]. Essas técnicas de extração embora ainda utilizadas, deram lugar a técnicas mais rápidas, eficazes e ambientalmente amigáveis. Estudos apontam potencialidades de metodologias inovadoras em relação a tempo de extração, consumo de solvente, reprodutibilidade e rendimento, visando tornar o processo menos custoso e facilitar sua aplicação em rotinas analíticas [96]. Nesse contexto, técnicas de extração como a EDGETM surgem como alternativa na extração de compostos bioativos de matrizes vegetais, dentre outras possibilidades de aplicação.

2.4.2.1 Extração Guiada por Dispersão Energizada (EDGETM)

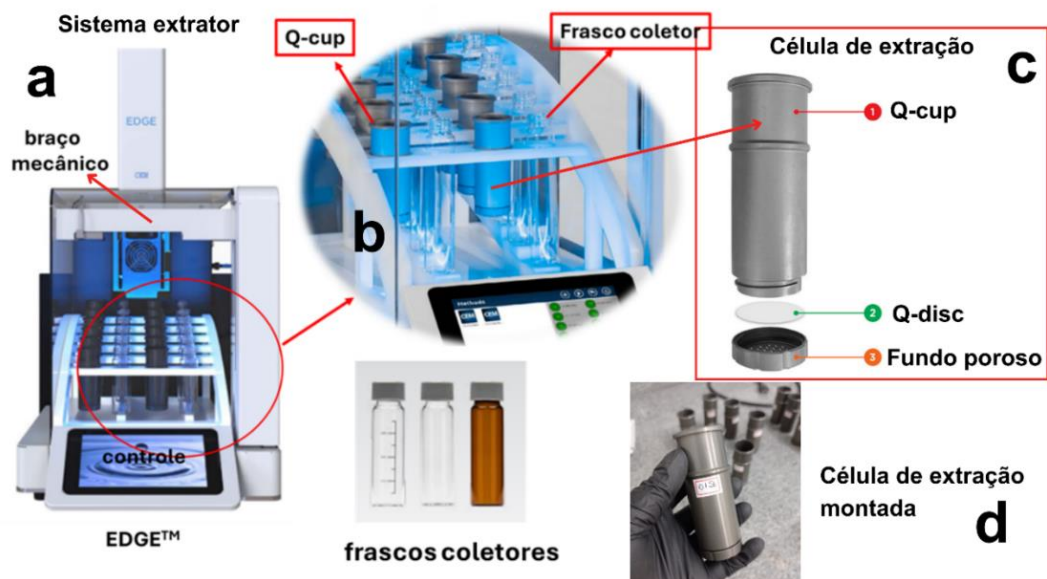
A Extração Guiada por Dispersão Energizada (EDGETM) é uma técnica moderna que combina a extração por líquido pressurizado (PLE) com a extração dispersiva em fase sólida (dSPE) [7,8; 97]. O método se destaca pela redução no tempo de preparo, baixo consumo de solventes, automação e reprodutibilidade [98,99].

O processo opera em temperaturas entre 25°C e 200°C e pressões até 200 psi, otimizando a difusão do solvente e a transferência de massa [7,97]. Apesar das limitadas publicações (tabela 4), a técnica possui ampla aplicabilidade em análises ambientais, alimentares, plásticos e fármacos [99].

Entre suas vantagens destacam-se: alta recuperação de analitos em matrizes complexas, células de extração (Q-cup) reutilizáveis, dispensa de equipamentos auxiliares e processo rápido de extração (5 minutos) com limpeza automatizada [7,8,99].

O extrator tem tamanho compacto e robusto, com um braço mecânico que torna o processo automatizado (Figura 4a), uma vez que as condições experimentais são selecionadas via software. A Figura 4 apresenta detalhes do sistema extrator (Figura 4a e b) e seus acessórios (Figura 4c e d).

Figura 4: Esquema do sistema EDGE™, incluindo os acessórios do equipamento.



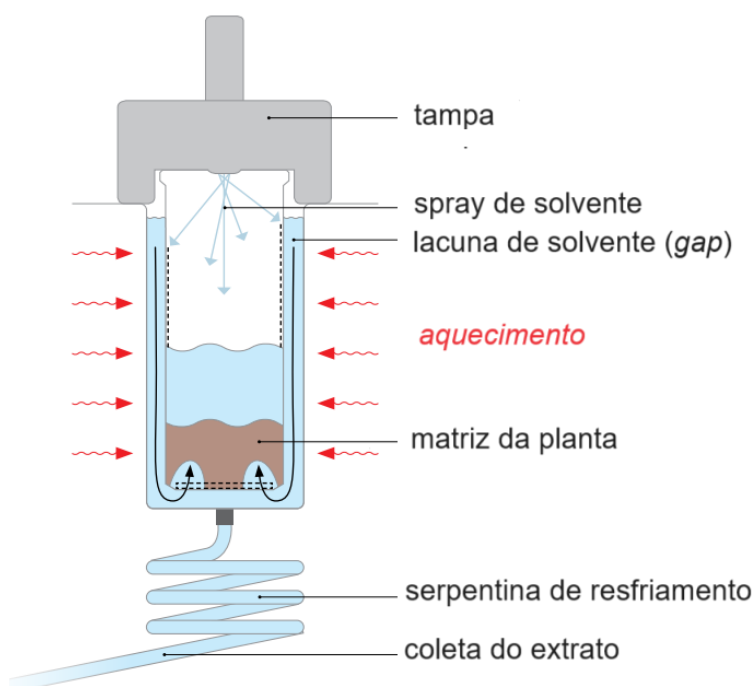
Fonte: O autor, adaptado de [98].

A célula de extração (*Q-cup*) é composta por 3 partes. A primeira parte é um cilindro de alumínio de fina espessura, sendo a segunda parte o fundo rosqueável com pequenos orifícios que permitem a permeabilidade do solvente na amostra. A terceira parte é o *Q-disc*, um filtro de celulose, fino e descartável, trocado a cada extração, conforme demonstrado na **Figura 4b**. A amostra é pesada diretamente no *Q-cup* devidamente montado (**Figura 4d**), sendo possível utilizar massas de até 30 g de amostra [98,99]. A estrutura da célula de extração permite a melhoria da taxa de aquecimento e transferência de calor durante a extração, tornando o processo mais eficiente, rápido e sem etapas adicionais [6,7,96].

Brevemente, o processo de extração é relativamente simples (**Figura 5**). A amostra é pesada diretamente na célula de extração previamente montada. Em seguida, as células são posicionadas no rack do extrator, junto aos frascos destinados à coleta dos extratos.

A próxima etapa é a seleção das condições de extração, que é realizada via software. Dentre as condições de extração podem ser citadas a temperatura, tempo de extração, volume de solvente, que pode ser adicionado pelo fundo e topo da célula de extração, a depender da quantidade de amostra utilizada na extração. Uma vez que as condições são selecionadas, o processo de extração se inicia (Figura 5).

Figura 5: Esquema detalhando o funcionamento do processo de extração no EDGE TM.



Fonte: O autor, adaptado de [98].

Com o processo de extração iniciado, o *Q-cup* é levado pelo braço mecânico à câmara de extração e, vedado pela tampa de pressão do equipamento. Solvente é adicionado do topo entre as paredes da câmara e da célula de extração, até o preenchimento da câmara com o volume previamente selecionado de solvente. O solvente extrator é então adicionado pelo topo para dentro da célula de extração. Em seguida, o processo de aquecimento do solvente entre a câmara e a célula de extração é iniciado, controlado pela interface gráfica do equipamento.

À medida que o processo de aquecimento avança, a pressão entre a câmara de aquecimento e o *Q-cup* aumenta, vaporizando o solvente até que ele ultrapasse a pressão interna do recipiente, forçando o solvente a se dispersar na amostra. Este processo garante movimento frequente da amostra sob alta temperatura e baixa pressão [7,8,99]. Após o tempo de extração pré-selecionado, o extrato flui através de uma bobina abaixo da câmara de extração, resfriando durante o processo. O extrato é então coletado automaticamente e fica pronto para análise. Além disso, uma etapa de rinçagem pode ser realizada para remover quaisquer analitos aderidos às paredes da célula de extração, com o extrato resultante coletado no mesmo frasco que o extrato primário.

Cabe ressaltar que por se tratar de uma técnica de extração relativamente nova, poucos trabalhos estão disponíveis da literatura acerca de aplicações da técnica em diversas matrizes, embora exista uma ampla gama de aplicações possíveis [98,99] como

pode-se verificar na Tabela 4, em que estão apresentados estudos em que a técnica foi aplicada.

Tabela 4: Aplicação da extração por EDGE™ na extração de fitoquímicos a partir de matrizes vegetais.

Matriz	Analito	Solvente	Objetivo	Ref.
Folhas	Compostos antioxidantes	Acetona	Investigar a composição fitoquímica de compostos antioxidantes da <i>Eugenia uniflora</i> .	[7].
Folhas	Pesticidas	H ₂ O/ACN	Comparação da extração acelerada por solvente e da extração guiada por dispersão energizada na extração de pesticidas em folhas de alface.	[8]
Flores	Compostos fenólicos	Etanol	Identificar as diferenças na composição de fenólicos das espécies <i>Acacia retinodes</i> e <i>Acacia mearnsii</i> .	[14].
Sementes	Compostos fenólicos	Etanol/H ₂ O	Caracterização e atividade antioxidante de sementes de açaí.	[97].
Casca	Hinocinina	Etanol	Investiga o aumento da hinocinina <i>Commiphora leptophloeos</i> Mart. – J. B. Gillett a partir do método de extração.	[100]

Além de aplicações em matrizes vegetais, Black *et al.*, [101] desenvolveram uma metodologia para extração de multirresíduos de pesticidas em amostras de solo. Em contrapartida, De Melo *et al.*, [102] utilizaram a EDGE™ para monitorar a Qualidade de mariscos após um derrame de petróleo.

2.4.3 Métodos de avaliação do perfil fenólico e da capacidade antioxidante *in vitro* de chás e infusões

A determinação de espécies fenólicas em amostras alimentares e biológicas podem ser realizadas por diversas metodologias, sendo a reação colorimétrica de *Folin-Ciocalteu*, um dos mais utilizados [13,103]. De maneira análoga, a atividade antioxidante *in vitro* também é determinada por várias metodologias, como por exemplo, DPPH, ABTS, FRAP e ORAC [104]. Os ensaios realizados com a finalidade de determinar o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante em amostras alimentares estão inclusos numa série de metodologias baseadas na mudança de coloração dos extratos em determinadas condições [5,77,103,104].

2.4.3.1. Reação de Folin-Ciocalteu para a determinação de compostos fenólicos em amostras alimentares e biológicas

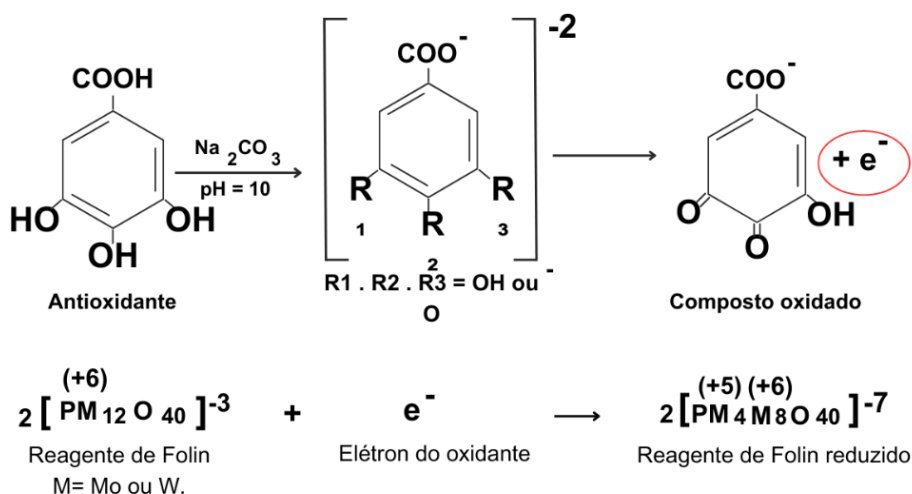
A determinação de compostos fenólicos em amostras alimentares e biológicas é realizada utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu [13, 103,104]. O método se baseia na redução dos íons molibdênio e tungstênio do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos presentes na amostra. Essa redução resulta na formação de um

complexo colorido azul, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de compostos fenólicos [13]. A absorvância desse complexo pode ser medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda específico, geralmente entre 725 e 765 nm. Trata-se de uma metodologia de simples execução e de boa reprodutibilidade e amplamente disseminado [13,103,104].

Entretanto, o método de Folin-Ciocalteu não foi desenvolvido especificamente para a determinação de compostos fenólicos, uma vez que outras espécies químicas podem ser reduzidas na reação de oxidação e redução que ocorre em pH alcalino, portanto, fornecendo uma estimativa do teor de compostos de interesse [105]. Esta metodologia que pertence aos ensaios colorimétricos foi desenvolvida para a determinação de tirosina em 1927, [13,103,105], tendo sido adaptada para a determinação do conteúdo fenólico de amostras alimentares. As concentrações dos compostos fenólicos determinados por essa metodologia são calculadas com base em uma curva analítica cujos resultados são expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca (mg EAG/g), padrão analítico utilizado no desenvolvimento do método.

Pérez e colaboradores [103], em seu estudo sobre as reações químicas envolvidas na estimativa do teor de compostos fenólicos em alimentos, discutem as reações químicas do método de Folin-Ciocalteu. Essa metodologia é baseada na transferência de elétron da espécie antioxidante, reação iniciada pelo reagente de Folin, que leva ao surgimento de uma cor azul que varia em intensidade de acordo com a concentração de espécies fenólicas contidas na amostra, conforme pode ser visualizado na Figura 6 [103,106,107].

Figura 6: Reação genérica de oxidação e redução envolvida no ensaio de Folin-Ciocalteu apresentando os complexos organometálico segundo Perez *et al.*, [103].



Fonte: Autoria própria, adaptado de [103].

O reagente de Folin-Ciocalteu é composto por uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, cuja base é a medida da quantidade de compostos fenólicos e polifenólicos que é necessária para inibir/limitar a oxidação do reagente [107]. Ainda, segundo Samara e colaboradores [108] a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos fenólicos no ensaio de Folin-Ciocalteu se dá por suas características estruturais, devendo considerar atenção às condições de calibração, pH, temperatura, tempo de incubação e solvente utilizado no ensaio a fim de prevenir falsos positivos [103].

2.4.3.2 Determinação da atividade antioxidante em amostras de chás e infusões

A atividade antioxidante de chás e infusões é um aspecto de grande relevância considerando sua contribuição na prevenção de doenças crônicas e no combate ao estresse oxidativo [109-111]. Infusões de plantas contêm diversos compostos bioativos, como polifenóis, flavonoides e vitaminas, que oferecem benefícios à saúde [110]. Esses compostos são essenciais na neutralização de radicais livres, reduzindo danos celulares e o risco de doenças como cardiovasculares, diabetes e câncer [111].

Em um contexto global, a investigação da atividade antioxidante em infusões se torna uma área promissora de pesquisa, cuja exploração pode levar a novas abordagens para a promoção da saúde e do bem-estar, além de potencializar a valorização de plantas medicinais e tradicionais [112].

Além dos benefícios à saúde, a atividade antioxidante das infusões tem um impacto significativo na indústria alimentícia e na formulação de produtos funcionais. O consumo de infusões ricas em antioxidantes não apenas melhora a saúde do consumidor, mas também ajuda a preservar a qualidade dos alimentos, atuando como conservantes naturais que inibem a oxidação [113].

A avaliação da atividade antioxidante pode ser feita por diferentes métodos, como DPPH, ABTS e FRAP, que medem a capacidade de doação de elétrons ou hidrogênio dos fitoquímicos presentes [115].

A seleção do método apropriado para a avaliação do potencial antioxidante é influenciada por fatores como o tipo de antioxidante em análise, a matriz da amostra e o objetivo da pesquisa. Cada técnica apresenta sensibilidades distintas para os diversos antioxidantes, e a interferência de componentes da matriz da amostra pode comprometer a precisão dos resultados. Portanto, é aconselhável utilizar múltiplos métodos para uma análise mais abrangente [114,115]. Por sua vez, a aplicação de diferentes métodos, como ABTS, DPPH e FRAP, possibilita a avaliação de variados mecanismos de ação dos antioxidantes, incluindo doação de elétrons e hidrogênio, além do poder redutor total. Um antioxidante pode se comportar de maneira divergente em cada técnica, o que está relacionado à sua estrutura química específica. Dessa forma, a combinação de dados de

múltiplos métodos enriquece a caracterização da atividade antioxidante da amostra estudada [114-116].

Além disso, a utilização conjunta desses métodos facilita a comparação com outras investigações e a interpretação dos dados gerados. Isso não só aumenta a confiabilidade dos resultados, como reduz a probabilidade de obter resultados enganosos. A abordagem integrada, portanto, oferece uma visão mais precisa e completa do perfil antioxidante de certas plantas, permitindo uma avaliação mais rigorosa e robusta de suas propriedades.

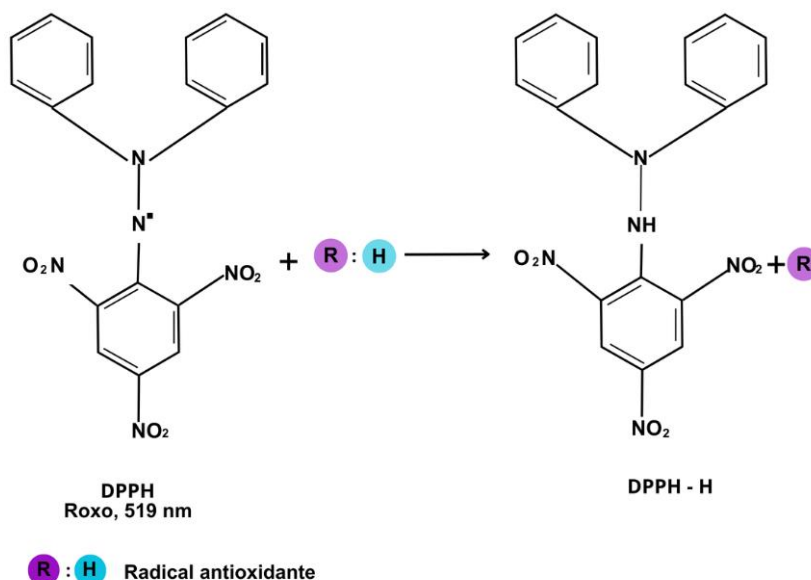
a. Atividade Antioxidante por DPPH

O método DPPH foi introduzido por Blois em 1958, caracterizando-se como um ensaio colorimétrico simples, de baixo custo e com resultados qualitativos bem aceitos segundo a literatura [112-118]. O mecanismo de redução da ação do DPPH pode ser visto na Figura 7.

O DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) é um radical livre estável de cor violeta e mede a capacidade de doação de hidrogênio [119]. Os antioxidantes doam um elétron ao DPPH, reduzindo sua cor e, conseqüentemente, sua absorbância. É um método simples e amplamente utilizado, cuja principal limitação é a possibilidade de ser influenciado pela solubilidade dos compostos antioxidantes no solvente utilizado [115].

Figura 7: Mecanismo de reação envolvendo a reagente DPPH com antioxidante R:

H = eliminador de radicais antioxidantes; R = radical antioxidante.



Fonte: O autor, adaptado de Kitts e Liang, [116].

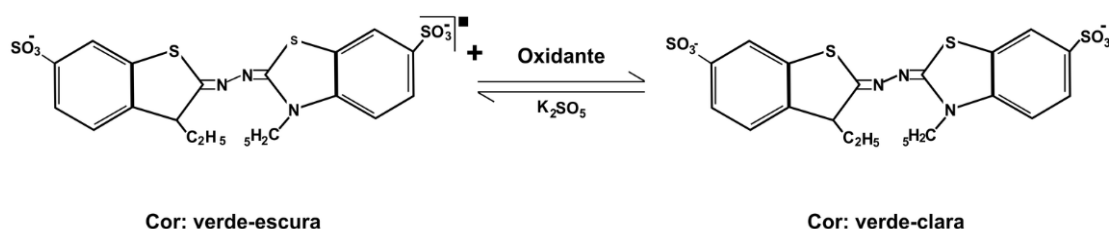
Este método é amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, no qual a amostra é incorporada a uma solução de DPPH [116]. A redução na absorbância

da solução é monitorada por meio de um espectrofotômetro UV/Vis na faixa de 515 nm. A quantificação da redução do radical DPPH permite a determinação da atividade antioxidante *in vitro* da amostra, sendo que uma diminuição mais significativa na absorção indica uma maior capacidade antioxidante do composto analisado [115].

b. Atividade Antioxidante por ABTS^{•+}

O composto ABTS é oxidado para formar um radical catiônico de intensa coloração azul (ABTS^{•+}). Nesse contexto, os antioxidantes presentes na amostra doam elétrons ao radical, resultando na redução de sua absorbância, o que permite a avaliação da capacidade de doação de elétrons da amostra [119] (Figura 8).

Figura 8: Reação de estabilização do radical ABTS^{•+} e geração do radical pelo persulfato de potássio.



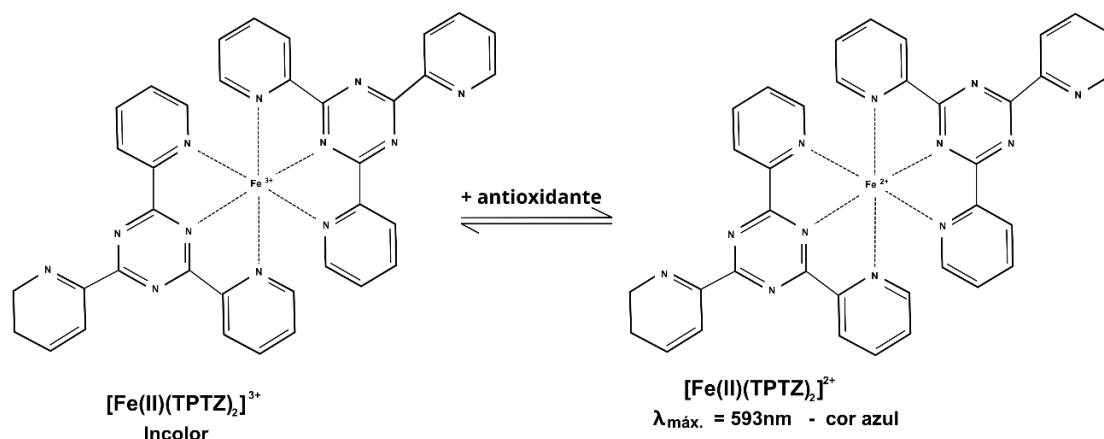
Fonte: O autor, adaptado de Rufino *et al.*, [120].

Este método é caracterizado por ser rápido, sensível e reprodutível, embora sua principal limitação seja a possibilidade de interferência de compostos que reagem com o peróxido de hidrogênio utilizado na reação, o que pode gerar falsos positivos. O ensaio para determinação da atividade antioxidante via método ABTS^{•+} foi introduzido em 1993 por Miller e Rice Evans [119,120]. A geração do radical ocorre por meio de reações químicas, eletroquímicas ou enzimáticas. Assim como no método DPPH, a capacidade antioxidante é avaliada pela redução da coloração do radical ABTS^{•+}, sendo a absorbância medida por espectrofotometria em 734 nm [115,119].

c. Atividade antioxidante por FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma)

O ensaio de Poder Antioxidante de Redução do Ferro foi introduzido por Benzie e Strain [121]. Este ensaio mede a capacidade de uma amostra de reduzir o complexo férrico-tripiridiltriazina [Fe(III) (TPTZ)₂]³⁺ a ferroso [Fe(II) (TPTZ)₂]²⁺, que exibe uma cor azul intensa em pH ácido (pH 3,6). Assim como outros ensaios para determinação de antioxidantes *in vitro* envolvendo o ensaio, ocorre a formação de um complexo colorido é detectada e quantificada, refletindo a capacidade antioxidante da amostra. Os compostos com hidrofílicos têm maior reatividade neste ensaio [122,123] (figura 9).

Figura 9: Mecanismo de reação do ensaio de avaliação do poder antioxidante de redução de ferro.



Fonte: Autoria própria, adaptado de 122.

A metodologia possui uma ampla gama de antioxidantes analisáveis, porém, pode ser influenciado por compostos que reagem diretamente com o reagente TPTZ. Ressalta-se que este ensaio é uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em amostras alimentares, mas, também, para avaliar a eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados confiáveis, reprodutíveis e de simples execução e baixo custo [119-123].

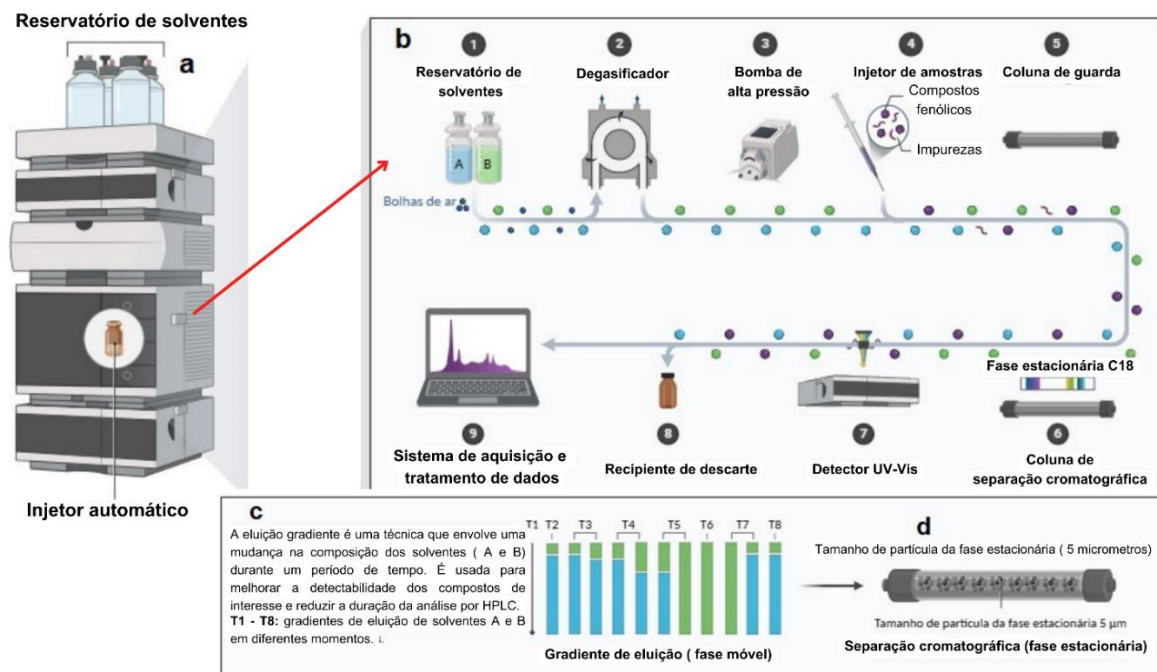
2.4.4 Técnicas de separação e caracterização de amostras

2.4.4.1 Cromatografia em Fase Líquida

Atualmente, diversas ferramentas analíticas são aplicáveis à análise de compostos bioativos, com destaque para a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa, amplamente utilizadas em virtude de sua elevada capacidade de separação e identificação dos compostos de interesse [124 -134].

A cromatografia líquida (LC), frequentemente referida como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), emerge como uma das técnicas mais eficazes para a purificação e separação de analitos não voláteis [124,134]. Esta metodologia fundamenta-se na adsorção e dessorção dos componentes, que se distribuem entre uma fase estacionária e uma fase móvel líquida [125,128]. A Figura 10 ilustra um típico sistema de HPLC.

Figura 10: Elementos fundamentais e sequência de operação de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (HPLC-UV-Vis/DAD).



Fonte: O autor, feito com BioRender. **Legenda:** a) Sistema HPLC UV-Vis/DAD; b) caminho percorrido por uma amostra analisada pelo sistema cromatográfico; c) princípio da eluição de fase móvel em modo gradiente; d) detalhe da separação cromatográfica com foco na fase estacionária.

A Figura 10a ilustra um sistema de HPLC com detector UV-Vis e o caminho percorrido pela amostra analisada pelo sistema cromatográfico (Figura 10b). Tem-se em 10b: 1) Reservatório de fase móvel; 2) sistema de degaseificação; 3) sistema de bombeamento de alta pressão para mistura e de manutenção do fluxo da fase móvel; 4) sistema de injeção automático através de um loop de volume fixo; 5 e 6) coluna de separação contida em um forno para manutenção da temperatura constante, geralmente em torno de 30~40°C; 7) detector UV-Vis; 8) recipiente de descarte e 9) sistema de aquisição e tratamento dos dados.

No sistema HPLC, a coluna desempenha um papel importante, influenciando diretamente a eficiência da separação cromatográfica. Os compostos-alvo, que podem estar na forma líquida ou dissolvidos em um solvente apropriado, são separados com base em suas interações com a fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida [129-134]. Posteriormente, esses compostos são introduzidos em um detector, como um espectrômetro de massa ou um espectrofotômetro UV-Vis, permitindo tanto a identificação quanto a quantificação dos analitos na amostra [127, 135].

A fase móvel (FM) é tipicamente um solvente que pode ser uma solução aquosa ou mistura de solventes orgânicos, como metanol, acetonitrila, propanol ou hexano. A eluição da fase móvel em análise por HPLC pode ser realizada de duas formas: isocrática ou gradiente. A análise isocrática, mantém a composição da FM constante durante toda a

análise, enquanto a análise com eluição gradiente, traz variações na composição da FM ao longo do processo (Figura 10c). O metanol é um dos solventes orgânicos mais utilizados como fase móvel, em estudos de separação de compostos bioativos dadas as suas polaridade e solubilidade que permitem extrair e solubilizar uma ampla variedade de bioativos [136; 137].

Por sua vez, a fase estacionária (FE) pode ser um sólido poroso de partículas poliméricas ou pequenas moléculas de sílica contendo poros uniformes, com tamanhos específicos. A FE pode ainda ser um líquido ligado a um sólido como suporte polimetilssiloxano, ou outro polímero sobre partículas de sílica colocados em uma coluna de aço inoxidável [130,131].

Considerando a separação de misturas complexas por HPLC, os dois modos mais utilizados são a cromatografia líquida de fase normal e cromatografia em fase reversa [132]. Essas modalidades cromatográficas se distinguem pela polaridade da fase móvel e fase estacionária. Na cromatografia líquida de fase normal são utilizadas fases estacionárias em combinação com fases móveis não polares como éter, clorofórmio e hexano. Por outro lado, a cromatografia líquida de fase reversa apresenta o mecanismo oposto, a partir do uso de fases estacionárias não polares, como por exemplo, o C18 e fases móveis polares, como metanol e acetonitrila, ou misturas de solventes moderadamente polares, como água/acetonitrila ou água metanol [133,134].

A cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC, do inglês *reverse phase liquid chromatography*) destaca-se na análise de compostos bioativos em plantas pela capacidade de separar substâncias com diferentes características físico-químicas, como polaridade e solubilidade, que afetam diretamente o comportamento dos analitos durante a eluição. Nessa modalidade cromatográfica, normalmente utiliza-se uma fase estacionária apolar, como a C18, composta por cadeias de carbono ligadas a um suporte sólido, e uma fase móvel mais polar, usualmente uma mistura de solventes aquosos e orgânicos [138,139].

A análise cromatográfica em fase reversa permite a interação diferencial dos compostos com a fase estacionária, com base em suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas [140]. Compostos bioativos, como flavonoides e terpenoides, que apresentam variações significativas em polaridade, podem ser separados de forma eficiente, possibilitando uma análise detalhada de suas concentrações e relações estruturais. Portanto, a escolha adequada das condições de fase móvel e estacionária é crucial para otimizar a separação e garantir a obtenção de dados analíticos que reflitam com precisão a complexidade química dos extratos vegetais [139,140].

Além disso, os analitos devem ser completamente solúveis na fase móvel escolhida e apresentar interações distintas com a fase estacionária para que possam ser separados em tempos diferentes, chegando sequencialmente ao detector, que analisará cada analito

isoladamente. Além disso, esse procedimento requer a construção de curvas analíticas e o desenvolvimento de metodologias que promovam uma separação otimizada entre os analitos [138-140].

2.5 Quimiometria

As metodologias de análise de amostras alimentares estão em constante evolução científica, metodológica e tecnológica, evidenciando a necessidade de ferramentas que permitam determinar de forma precisa, eficiente e rápida uma ampla gama de analitos, mesmo em níveis baixos de concentração, comuns a esse tipo de amostra. Para enfrentar os desafios impostos pela análise de amostras complexas, os designs experimentais emergem como soluções que visam facilitar a compreensão dos processos experimentais, proporcionando maior custo-benefício [141].

Nesse contexto, a Quimiometria surgiu na década de 1970, enfocando a aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas a conjuntos de dados para extrair e interpretar informações sobre o comportamento e as tendências de sistemas químicos [142]. O objetivo desse campo é otimizar as condições experimentais por meio do planejamento e seleção de experimentos que maximizem a obtenção de informações químicas [143,144]. O emprego de técnicas quimiométricas tem sido amplamente incorporado em estudos experimentais, reduzindo práticas laboriosas relacionadas à execução de um grande número de experimentos, além de minimizar o consumo de reagentes e o tempo de análise.

2.5.1 Design de Experimentos (DoE- Design of Experiments)

Na química analítica, a otimização refere-se à melhoria de processos experimentais, visando identificar condições ideais que proporcionem a resposta mais eficaz para o processo analítico [145,146]. O delineamento experimental, ou design de experimentos (DoE), emerge como uma estratégia essencial para planejar atividades experimentais de forma coesa, ajustando-as a modelos matemáticos que consideram variáveis dependentes e independentes [147,148]. As variáveis independentes não são influenciadas por alterações no experimento, enquanto as variáveis dependentes reagem a essas mudanças, refletindo seus efeitos em cada modificação [141].

A otimização pode ser realizada de forma univariada, onde cada variável é avaliada isoladamente, ou de maneira multivariada, que considera a interação entre duas ou mais variáveis simultaneamente [141- 148]. Embora a abordagem univariada seja simples, sua eficiência é limitada, resultando em consumo excessivo de reagentes e tempo, o que não é ideal para a analítica moderna [141]. Em contraste, a abordagem multivariada tem se destacado por desenvolver metodologias analíticas mais eficientes e precisas,

oferecendo maior exatidão e sensibilidade, além de permitir a avaliação simultânea dos efeitos interativos das variáveis [141-150].

Essa perspectiva de otimização multivariada busca maximizar o rendimento experimental, evitando a realização de um grande número de experimentos que consomem reagentes e tempo [151]. Diversos tipos de designs experimentais, como Box-Behnken (BBD), planejamento fatorial completo, planejamento de composto central (CCD), Doehlert (DD) e planejamentos de misturas, contribuem para esse objetivo otimizado. Portanto, a integração do uso de técnicas quimiométricas com abordagens avançadas de otimização experimental representa um avanço significativo na eficiência das metodologias analíticas, possibilitando a análise criteriosa de amostras complexas.

2.5.2 Doehlert (DD)

O delineamento experimental do tipo Doehlert foi introduzido por Doehlert e Klee, em 1972, porém seu primeiro registro de aplicação em química analítica se deu no estudo realizado por Hu e Massart [152], em 1989.

Os modelos multivariados, como é o caso do planejamento Doehlert, são mais completos que os univariados, pois permitem o estudo de várias variáveis simultaneamente. Este modelo reduz o número de experimentos a ser realizados e seu uso em conjunto com a metodologia de superfícies de resposta são muito utilizados para otimizar condições reacionais e de extração [141,153].

A matriz Doehlert é um design experimental rotacional que assegura uma cobertura homogênea do espaço experimental dispondo as variáveis de estudo em um padrão hexagonal para duas variáveis. Essas duas variáveis podem então ser investigadas em diferentes níveis [153].

Um de seus principais pontos fortes reside em sua natureza rotativa e na capacidade de estender o domínio experimental em direções de interesse com o mínimo de experimentos adicionais. O delineamento consiste em $N=k^2+k+1$ experimentos, onde k representa o número de variáveis (neste caso, $k = 2$, resultando em 7 pontos experimentais) [143]. As condições experimentais do ponto central são replicadas em triplicata, permitindo avaliar o erro puro do modelo. A avaliação das condições experimentais do modelo é realizada utilizando uma superfície de resposta [146].

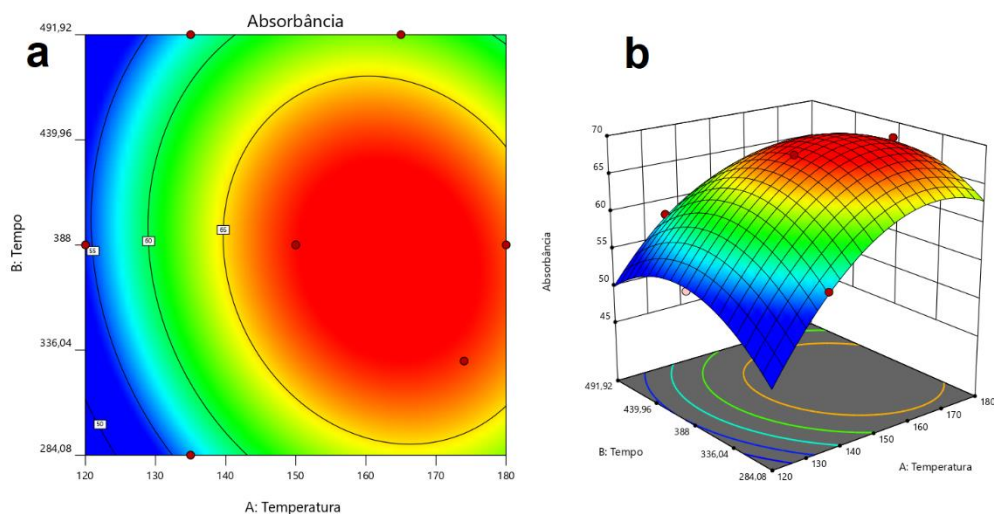
2.5.3 Metodologia da Superfície de Resposta (RSM)

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) é uma ferramenta estatística utilizada para modelagem e análise de problemas onde o resultado obtido é influenciado por diversas variáveis. Essa ferramenta foi introduzida por Box e colaboradores na década de 50, tendo recebido essa denominação devido à geração de gráficos específicos após o ajuste do modelo

matemático empírico, que ocorre a partir do emprego de funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema em estudo [154].

A representação gráfica do modelo é válida para encontrar a área ótima utilizando dois tipos de gráficos: Gráficos de Contorno, que projetam a superfície em um plano com linhas de resposta constantes (Figura 11a), e Superfícies de Resposta Tridimensionais (Figura 11b), cujo contorno representa uma região específica da superfície gráfica cuja resposta é função de dois fatores, que podem ser um valor máximo, mínimo ou específico, identificados pela inspeção visual do gráfico.

Figura 11. Representação da Superfície de Resposta **(a)** Gráfico de contornos, **(b)** Superfície de resposta no espaço tridimensional. Eixo y: Absorbância, Eixo x: Tempo e temperatura (fatores).



Fonte: Autoria própria, feito com Design Expert.

Para desenvolver um estudo utilizando a RSM, é fundamental selecionar inicialmente os fatores independentes, pois estes impactam diretamente o processo e a resposta desejada [155]. Essa seleção baseia-se em uma revisão da literatura e em experimentos prévios, com o objetivo de verificar a magnitude da variação dos fatores sobre a resposta gerada.

Segundo Li *et al.*, [156], a RSM é amplamente aplicada na otimização de processos, especialmente devido à sua eficiência em explorar interações entre fatores distintos e identificar condições ótimas de operação com base nas respostas geradas para um modelo considerado significativo [147,157-160]. A metodologia utiliza modelos polinomiais para ajustar os dados experimentais, permitindo prever a resposta do sistema sob diferentes condições operacionais e possibilitando uma análise aprofundada das relações entre variáveis e a resposta [146].

A confiabilidade e validade do modelo proposto são avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA), que compara as variações derivadas das mudanças nas combinações dos níveis dos fatores com a variação causada por erros aleatórios, impactando assim os resultados [157, 158].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a otimização das condições de extração de compostos fenólicos totais em ervas medicinais, empregando tempo e temperatura como variáveis independentes e, em complemento, investigar a relação entre esses parâmetros e a atividade antioxidante dos extratos relacionada aos analitos não-voláteis identificados por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tempo e da temperatura na extração de compostos fenólicos totais da matriz selecionada, a partir de um delineamento Doehlert (DD), e metodologia de superfície de resposta (MSR);
- Obter os extratos hidroetanólicos a partir das folhas de interesse utilizando o sistema de Extração Guiada por Dispersão Energizada - EDGE™;
- Estimar as condições que maximizam a eficiência da EDGE™ para os compostos fenólicos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos utilizando ensaios de ABTS, DPPH e FRAP, relacionando os resultados com os teores de compostos fenólicos totais;
- Caracterizar a composição química da fração não-volátil dos metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Quantificar os compostos identificados nos extratos por HPLC-DAD;
- Correlacionar os seus perfis de compostos fenólicos com a atividade antioxidante observada nos ensaios *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Amostras

As plantas espinheiro branco (*Crataegus spp. Oxycantha*), espinheira santa (*Sorocea blonpandii*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foram selecionados para o estudo tendo sido adquiridos junto ao grupo Rocha Saúde (Lote GRS10), com características certificadas de identificação, composição e origem do material vegetal.

As amostras de material vegetal foram adquiridas junto ao Grupo Rocha Saúde, cuja rotulagem foi avaliada de acordo com a RDC 712, 01/julho/2022 e a Farmacopéia Brasileira [161,162]. A norma prevê a rotulagem do produto obedecendo aos seguintes critérios: nome científico da planta; parte utilizada; denominação de venda do produto; lista de ingredientes; nome ou razão social e endereço do produtor ou, no caso de produtos importados, do importador; identificação do lote: prazo de validade; instruções sobre o preparo e uso do produto, quando necessário. Não deve constar na rotulagem quaisquer informações acerca de finalidade terapêutica [163].

Tabela 5: Informações acerca do material vegetal utilizado no estudo sob perspectiva da ANVISA.

Amostra	Nome científico	Lote	Data de fabricação	Validade	Origem	Composição
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i> <i>Stapff</i>	GRS10	04/01/2024	18 meses	Ásia	folhas
Espinheira santa	<i>Sorocea bonplandii</i>	GRS10	04/01/2024	18 meses	Brasil	Folhas e caules
Espinheiro branco	<i>Crataegus oxycantha</i>	GRS08	07/02/2024	18 meses	China	Folhas e flores

4.2 Pré-tratamento das amostras

Parte do material vegetal foi triturado em liquidificador e moído em moedor a fim de alcançar granulometria adequada às extrações. O material moído foi posteriormente peneirado em malha de alumínio com granulometria de 35 mesh. Aproximadamente 10 gramas de cada material vegetal foram secas em estufa a 65°C por 24 horas a fim de caracterizar as amostras em termos de voláteis, cinzas e carbono fixo. Parte do material foi também utilizado para a análise termogravimétrica.

4.3 Caracterização da amostra

4.3.1 Determinação do teor de voláteis

A determinação do teor de voláteis presentes no material vegetal seguiu as normas da ABNT (NBR8112) e ASTM (E872), segundo as quais, o teor de voláteis no material vegetal foi determinado a partir de 1 grama de amostra seca, previamente calcinada e tarada. O material vegetal foi disposto em um cadinho com tampa e deixado na mufla a uma temperatura de 800 °C entre 7 e 10 minutos. Após o tempo determinado, a amostra foi transferida para um dessecador contendo sílica, e mantida até atingir o equilíbrio térmico. O procedimento foi realizado em triplicata e o teor de voláteis foi calculado conforme a Equação 1:

$$\text{Voláteis (\%)} = (m_i - m_f) / m_i \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: m_i é a massa da amostra inicial e m_f a massa final, após sair da mufla.

4.3.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi obtido segundo as normas da ABNT (NBR 8112) e ASTM (D1102), nas quais é queimado 1 grama da amostra, previamente pesada, isenta de umidade e voláteis, em uma mufla a 700 °C por 1 hora. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após o tempo determinado, o cadinho contendo a amostra é resfriado em dessecador e a massa é novamente medida em uma balança analítica permitindo a determinação do teor de cinzas, em base seca. O cálculo do teor de cinzas foi realizado utilizando-se a Equação 2.

$$\text{Cinzas (\%)} = m_{\text{cinzas}} / m_i \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: m_{cinzas} é a massa da amostra final no cadinho e m_i a massa inicial da amostra.

4.3.3 Determinação do teor de Carbono Fixo

O teor de carbono fixo presente nas amostras foi determinado a partir das medidas de teor de voláteis e teor de cinzas presentes no material vegetal. Para isso, os resultados dos ensaios anteriores (teor de cinzas e voláteis), são avaliados segundo a equação 3, de acordo com a norma NBR 8112 da ABNT.

$$\text{Carbono Fixo (\%)} = 100 - (\text{cinzas} + \text{voláteis}) \quad (\text{Equação 3})$$

4.4 Extração Guiada por Dispersão Energizada (EDGE)TM

As extrações foram realizadas segundo procedimento previamente proposto pelo grupo de pesquisa [7]. Para isso, foi adotado o delineamento experimental Doehlert. Foram fixadas as condições de massa e composição e volume do solvente extrator.

Foram pesados em balança analítica 500 mg de material vegetal diretamente no Q-cup e, foram utilizados como solvente extrator 20 mL da mistura etanol e água (40/60, v/v), adicionados pelo topo do Q-cup durante o procedimento que é totalmente automatizado.

4.4.1 Limpeza e preparo do sistema EDGE™

Uma etapa anterior à extração é a limpeza do equipamento segundo as recomendações do fabricante. Inicialmente é realizada a purga do equipamento, procedimento que dura cerca de 30 segundos e visa a remoção de possíveis impurezas do amostrador.

O procedimento realizado a cada troca de solvente incluiu uma lavagem completa do sistema, onde foram introduzidos 80 mL de água destilada à célula de extração vazia que é aquecida à temperatura de 150 °C e pressurizada por um período de 5 minutos conforme recomendação do fabricante. Depois que o sistema EDGE™ foi completamente limpo, suas linhas de solvente foram preenchidas com o solvente de extração apropriado e é realizada a lavagem da câmara de extração segundo a recomendação do fabricante. Para essa lavagem da câmara de extração, 20 mL do solvente extrator foram inseridos na câmara de extração, que foi posteriormente pressurizada e aquecida a 120 °C por 5 minutos.

4.4.2 Otimização da extração por EDGE™ para a determinação de fenólicos

Estudos anteriores do grupo de pesquisa indicaram que a mistura de etanol e água (40:60, v/v) é o solvente mais eficaz na extração de compostos bioativos [7]. Com isso, foram realizados experimentos para identificar a temperatura e o tempo ideais de extração, visando a otimização da atividade antioxidante conforme o método de DPPH. Foram pesadas 500 mg da amostra diretamente na célula de extração (Q-cup), que foi colocada em um suporte com vials de 40 mL para a coleta do extrato.

O processo automatizado de extração foi realizado no sistema EDGE™, utilizando 20 mL da mistura de solventes. Uma matriz Doehlert foi empregada para encontrar as melhores condições de extração, com a resposta avaliada pela Metodologia de Superfície de Resposta (Teor de fenólicos totais). O teor de compostos fenólicos (TPC) foi determinado pelas reações de Folin-Ciocalteu e os extratos foram analisados via HPLC-UV-Vis/DAD para separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos de interesse.

4.5 Delineamento experimental Doehlert

Para o desenvolvimento da metodologia otimizada e a determinação das condições ideais para a extração de compostos bioativos, a amostra de *Cymbopogon citratus* Stapff (capim-limão) foi selecionada aleatoriamente dentre três variedades de folhas de ervas. A matriz Doehlert foi o design experimental escolhido para os ensaios de otimização,

englobando um total de nove experimentos, incluindo a duplicata do ponto central, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Valores codificados, valores reais e respectivas respostas à matriz Doehlert para a EDGE™.

Experimento		Temperatura		Tempo	
		Código	(valor °C)	Código	(valor min)
Experimentos	1	1	180	0	6.47
	2	0.5	165	0.866	8.20
	3	-1	120	0	6.47
	4	-0.5	135	-0.866	4.74
	5	0.5	165	-0.866	4.74
	6	-0.5	150	0.866	8.20
Ponto Central	7	0	150	0	6.47
	8	0	150	0	6.47
	9	0	150	0	6.47

As variáveis independentes adotadas para o estudo de otimização foram a temperatura (°C) e o tempo de extração (min) e, a variável dependente foi o teor de compostos fenólicos totais (TPC), expresso em mg de ácido gálico por grama de material vegetal seco (capim-limão) (mg EAG/g). A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar a resposta analítica do processo de otimização.

4.6 Determinação do teor de compostos fenólicos nas amostras

O teor total de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu foi realizado segundo metodologia descrita por Singleton [107], com adaptações. As reações de Folin-Ciocalteu foram realizadas utilizando 100 µL do extrato hidroetanólico que foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 2 mL de água MilliQ, sendo a mistura então homogeneizada. Foram adicionados posteriormente, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 5 mL de uma solução de Na₂CO₃ a 7% e mais 4 mL de água MilliQ. A mistura final foi novamente homogeneizada e deixada em repouso em ambiente ao abrigo de luz por 2 horas após as quais, a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro a 765 nm. Todos os ensaios para determinação do teor de fenólicos foram realizados em triplicata.

Usou-se uma curva analítica construída com concentrações variando entre 5 e 125 mg/L de ácido gálico, em quintuplicata, com R² igual a 0,9906 (vide Apêndice). A equação da curva analítica foi utilizada para determinar o teor total de compostos fenólicos (TPC) nos extratos. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra de folhas dos chás (mg EAG/g).

4.7 Atividade antioxidante

4.7.1 Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)] foi realizada conforme a metodologia descrita por Rufino et al. [120]. O radical ABTS é gerado pela reação da solução ABTS^{•+} 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados no escuro por 12h à temperatura de 25 °C. Uma vez formado, o radical é diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm. A partir dos extratos vegetais hidroetanólicos são preparadas três diluições diferentes, em triplicata. Posteriormente, em ambiente escuro, transfere-se uma alíquota de 30 µL de cada solução da amostra para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da reação a 734 nm, e o etanol puro foi utilizado como branco. Como referência, usou-se Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 100 a 2000 µM. Os resultados da atividade antioxidante são expressos em µM Trolox/g amostra (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.7.2 Atividade antioxidante pelo método FRAP

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do íon ferro foi realizada conforme a metodologia descrita por Rufino et al. [122]. O reagente FRAP foi preparado a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Em seguida, os extratos hidroetanólicos foram diluídos em 3 concentrações para cada amostra. Uma alíquota de 90 µL de cada solução diluída foi transferida para tubos de ensaio devidamente identificados, aos quais foram adicionados volumes de 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após o tempo de incubação, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco na calibração do espectrofotômetro. Os resultados da atividade antioxidante são expressos em µM Trolox/g amostra (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.7.3 Atividade antioxidante in vitro pelo método DPPH

Para realizar a determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o método DPPH que consiste na observação da captura do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) por antioxidantes presentes na amostra. Para tanto, a análise foi baseada na metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset [164].

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 0,06 mM a partir da solubilização de 12 mg de DPPH em 500 mL de álcool metílico grau analítico. Esta

solução é então homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar. Em seguida, os extratos hidroetanólicos foram diluídos em 3 concentrações para cada amostra (25, 50 e 100 ppm – Capim limão; 25,50,100 ppm – espinheira santa e, 15, 20 e 25 ppm – espinheiro branco ppm m/v em metanol).

Em ambiente escuro, 0,1 mL de cada solução diluída foi misturada com 3,9 mL da solução contendo DPPH a 0,06 mM e agitada com o auxílio de um Vórtex. Também foi preparada uma solução controle contendo álcool metílico, a qual 0,1 mL será adicionada a 3,9 mL de DPPH. O branco da curva de calibração foi a absorbância do álcool metílico puro. A leitura no espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 515 nm. A atividade antioxidante foi expressa como miligramas equivalentes a Trolox/ g de amostra (mg TE/g)

4.8 Métodos de Separação: Análise por cromatografia líquida HPLC UV-Vis/DAD

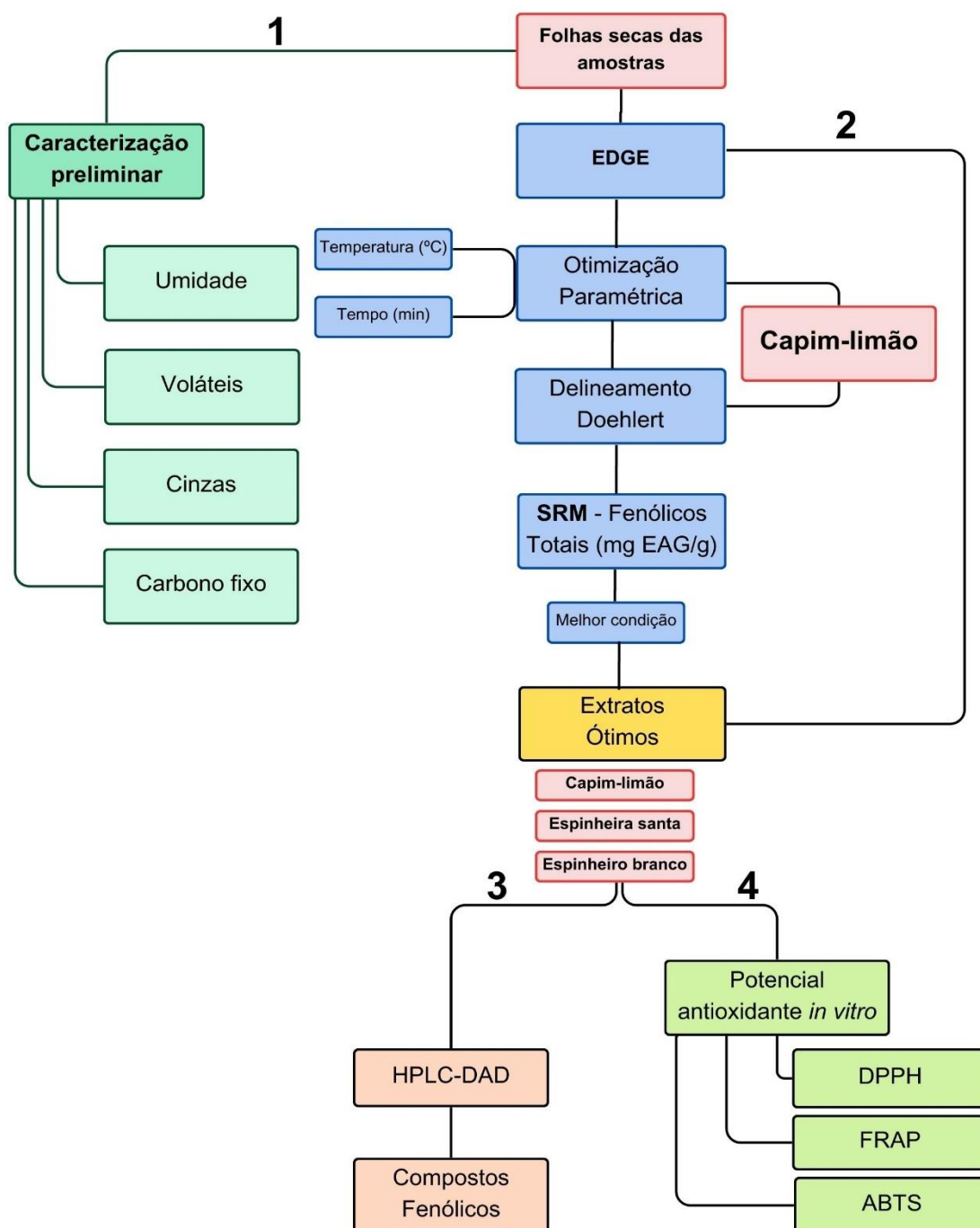
A separação dos compostos na fração não-volátil foi realizada por um sistema de cromatografia líquida de alta performance, da Shimadzu, modelo LC20AD. O sistema cromatográfico foi composto por um degaseificador DGU-20A, sistema de bombeamento quaternário LC-20AD, Sistema de injeção SIL-20A, forno de coluna CTO-20A mantido a 30 °C, contendo uma coluna de fase reversa Luna Su C18 (2) (250 x 4,6 mm) com coluna de guarda de mesma fase estacionária e, um detector de arranjo de diodos UV-Vis/DAD SPD-M20A. As condições de análise são apresentadas na **Tabela 7**.

Tabela 7: Condições para análise cromatográfica dos extratos.

Cromatógrafo Líquido	Shimadzu - LC20AD
Fase estacionária analítica	Luna Su C18 (2) (250 mm x 4,6 mm)
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Modo de eluição	Eluição Gradiente: 0 a 3 min 5% B; 20 a 35 min 40% B; 35 a 45 min 50% B; 55 a 65 min 95% B; 66 a 70 min 5% B.
Fase móvel	(A) Água (5 % ácido acético); (B) Metanol
Temperatura do Forno	40 °C
Volume de injeção (µL)	20 µL
Comprimento de onda monitorado (nm)	200 A 400 nm.
Comprimentos de onda (nm) selecionados	322, 310, 291, 240, 254, 280

A seguir tem-se um fluxograma do desenvolvimento experimental completo (**Figura 12**).

Figura 12: Fluxograma do desenvolvimento experimental EDGE™ para avaliação de compostos fenólicos em amostras de chás com propriedades antioxidantes.



Como detalhado nos itens 4.2 e 4.3, as amostras passaram por pré-tratamento a fim de realizar as caracterizações preliminares. Após essa etapa, a amostra de capim-limão foi selecionada o estudo para otimização do processo de extração utilizando uma matrix Doehlert e a metodologia de superfície de resposta (SRM) para otimizar os processo de extração. Uma vez otimizada a metodologia de EDGE, cuja avaliação contemplou o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (item 4.6), extratos ótimos obtidos foram levados às análises abordadas nos itens 4.7 e 4.8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação preliminar das amostras de folhas de ervas

Segundo a Portaria 519 de 26/06/1998 [161], as análises físico-químicas indicam a qualidade do material vegetal comercializado para o preparo de chás e infusões, sendo as análises de cinzas, teor de voláteis, teor de umidade e carbono fixo as mais utilizadas dada a sua simplicidade de execução, resultados rápidos e reprodutíveis. Essas análises preliminares são previstas pela Farmacopéia Brasileira [162].

Segundo a Farmacopéia Brasileira [162], o teor de cinzas e umidade em amostras de chás e infusões são requisitos para atestar sua pureza. O teor de cinzas e teor de umidade encontrado nas amostras podem ser visualizados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Resultado da análise Imediata das amostras de plantas e valores de referência.

Análise imediata		CL	ES	EB
Umidade	experimental	9,62% ± 0,005%	9,47% ± 0,005%	10,79 % ± 0,005%
	referência (*)	9,0%	12,0%	11,0%
Voláteis (bs)		87,71% ± 1,0%	84,16% ± 3,9%	82,57% ± 1,8%
Carbono fixo (bs)		5,4% ± 1,1%	10,24% ± 3,2%	9,38% ± 1,8%
Cinzas(bs)	experimental	6,89 % ± 0,07%	5,60 % ± 0,83%	8,05% ± 0,12%
	referência(*)	11,0%	8,0%	10,0%

Legenda: CL: Capim limão; ES: Espinheira santa; EB: Espinheiro branco. bs = base seca
(*) Valores limites de referência segundo na Farmacopéia Brasileira

A avaliação do teor de cinzas permite a identificação de possíveis interferentes na amostra. Essa análise é realizada a fim de verificar o teor de matéria inorgânica presente na composição da amostra e com isso, avaliar a presença de possíveis adulterantes. As cinzas são constituídas de material mineral contendo silício, alumínio, metais alcalinos e alguns nutrientes, que se transformam em óxidos no processo de calcinação [165]. Teores elevados de cinza podem revelar elementos minerais por exemplo, presença de terra ou areia nas amostras. Além disso, a determinação de cinzas totais indica o equilíbrio microbiano e estabilidade físico-química das amostras [165].

Observa-se que os valores encontrados para as análises de teor de cinzas estão dentro dos limites máximos previstos pela legislação e Farmacopéia brasileira que variam entre 8 e 11% para as ervas selecionadas para este estudo [161,162].

A amostra de CL apresentou teor de cinzas igual a 6,89 ± 0,07%, valor inferior ao observado no trabalho de Muala *et al.*, [48], que foi de 8,06% ± 0,05% em amostra de capim-limão. Camargo *et al.*, [166], verificaram um valor de 8,66% em seu estudo,

também superior ao encontrado no presente estudo. Em resumo, observa-se que todos os valores relativos à análise do teor de cinzas nas amostras estudadas são inferiores ao valor limite de referência, indicando baixo teor de matéria inorgânica na composição da amostra original [161,162].

A verificação do teor de umidade em amostras de ervas tem por objetivo avaliar a possibilidade de crescimento de microrganismos, além de degradação enzimática e componentes químicos, uma vez que o ambiente úmido favorece a degradação de produtos naturais e sua contaminação [167].

Os resultados da análise do teor de umidade, apresentados na Tabela 8, indicam que as amostras apresentaram baixos teores de umidade, com exceção da amostra CL, em que um teor de 9,62%, um pouco superior ao valor de referência foi observado. Para as outras amostras, os teores encontrados estão abaixo do limite de Farmacopéia (EB = 10.98%, com limite de 11% e ES = 9,47%, com limite de 12%) em consonância com a legislação em vigor. O baixo teor de umidade indica pouca probabilidade de degradação das substâncias bioativas pela ação enzimática, bem como poucas chances de crescimento microbiano nas amostras selecionadas [48].

Costa *et al.* [50] obtiveram um teor de variando entre 7,40 a 8,58%. Unuigbé *et al.*, [168], apresentam $13,00 \pm 2,92\%$ de umidade nas amostras de CL. Mabai *et al.* [169] apresenta teor de umidade entre 2,1 e 5% com base no método de secagem de folhas para a amostras de capim-limão.

Além disso, a umidade e os voláteis indicam o grau de estabilidade oxidativa da amostra, por afetarem a qualidade do processo de armazenamento e consequentemente a vida útil esperada, além de serem fontes de contaminação por microrganismos [170]. Em complemento, as análises de umidade e voláteis, indicam a estabilidade oxidativa da composição da amostra já que a presença de umidade e compostos voláteis afeta a qualidade do processo de estocagem e consequentemente o tempo de validade previsto, além de se constituírem fontes de contaminação por microrganismos [170].

O teor voláteis presentes na amostra pode ser relacionado a características sensoriais como aroma e gosto, sendo constituídos por misturas complexas de substâncias de baixa massa molecular, que normalmente podem evaporar à temperatura ambiente [162, 171, 172].

A metodologia abordada para a determinação do teor de carbono fixo envolve a determinação do teor de cinzas e dos compostos voláteis presentes na amostra. O carbono fixo é o nome dado ao conjunto de substâncias combustíveis que não se desprendem quando a biomassa é aquecida e é obtido por diferença, ou seja, a massa total menos o teor de umidade, material volátil e cinzas. Considerando amostras de folhas para chá e infusões, o teor de carbono fixo não é relevante em termos de qualidade

quanto outros componentes como compostos fenólicos e antioxidantes, que são mais diretamente relacionados ao sabor e aos benefícios à saúde [48] .

5.2 Otimização das condições de extração para a determinação de compostos fenólicos em amostras de folhas de ervas

5.2.1 Otimização do processo EDGE para maior conteúdo de compostos bioativos

A otimização das condições de extração de compostos fenólicos em folhas de ervas é fundamental para maximizar o rendimento e a qualidade dos extratos, considerando que esses compostos são amplamente reconhecidos por suas propriedades bioativas e benefícios à saúde [173, 174]. Neste contexto, a temperatura e o tempo de extração foram selecionados como variáveis independentes e, o teor de compostos fenólicos totais foi adotado como variável dependente, para estabelecer uma relação eficaz entre esses parâmetros.

Visando otimizar temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos a partir das folhas secas de capim-limão (CL), foi utilizada a metodologia de superfície de resposta em conjunto com a matriz de Doehlert, uma vez que esse design experimental se destaca pela necessidade de menor quantidade de pontos experimentais para obtenção de uma superfície de resposta, além de descrever de maneira eficiente as relações entre as variáveis independentes e a variável dependente, ao mesmo tempo em que mantém alto poder preditivo [141].

A matriz gera uma distribuição uniforme de pontos no espaço experimental, dispostos em um padrão hexagonal para duas variáveis, onde a temperatura (x_1) e o tempo de extração (x_2) utilizados para investigar diferentes níveis. Um de seus principais pontos fortes reside em sua natureza rotativa e na capacidade de estender o domínio experimental em direções de interesse com o mínimo de experimentos adicionais. O delineamento consiste em $N=k^2+k+1$ experimentos, onde k representa o número de variáveis (neste caso, $k = 2$, resultando em 7 pontos experimentais) [153]. Esta abordagem de otimização permite o desenvolvimento de modelos polinomiais de segunda ordem que podem descrever efetivamente a superfície de resposta e identificar condições ideais através de menos execuções experimentais em comparação com outros delineamentos experimentais tradicionais [141,153].

Neste sentido, a eficiência de um planejamento pode ser calculada pela divisão do número de coeficientes da equação quadrática pelo número de experimentos necessários para realização do planejamento [153]. A temperatura foi estudada em cinco níveis distintos (120;135;150;165;180 °C), enquanto o tempo de extração foi examinado em três níveis diferentes (4,74; 0,6,47; 8,20 min).

O design experimental foi aplicado de acordo com os experimentos descritos na Tabela 6, no item 4.5, onde são apresentados os valores codificados e decodificados da

matriz Doehlert. Por sua vez, a Tabela 9 apresenta os resultados da análise dos compostos fenólicos totais dos extratos obtidos através do planejamento experimental aplicado à extração da amostra de capim limão.

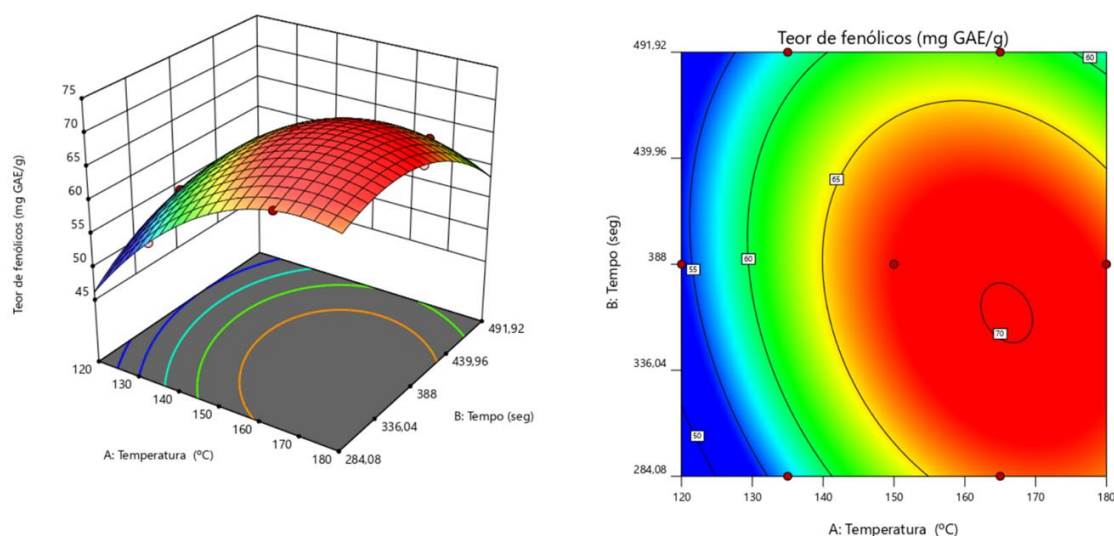
Tabela 9: Resultados para a otimização do processo de extração.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	TPC (mg EAG/g)
1	180 (1)	6.47 (0)	67,86
2	165 (0.5)	8.20 (0.866)	62,04
3	120 (-1)	6.47 (0)	53,98
4	135 (-0.5)	4.74 (-0.866)	56,67
5	165 (0.5)	4.74 (-0.866)	66,82
6	135 (-0.5)	8.20 (0.866)	58,16
7 (C)	150 (0)	6.47 (0)	69,85
8 (C)	150 (0)	6.47 (0)	69,54
9 (C)	150 (0)	6.47 (0)	68,16

Legenda: TPC- medido em mg de ácido gálico por grama de material vegetal seco (capim-limão).

Na Figura 13 é representada a superfície de resposta, bem como o diagrama de contorno. As condições ótimas de extração foram: **6,03** minutos a uma temperatura de **165,82 °C**. análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar o efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente e, revelou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$) e com R^2 de 0,99 (Tabela 10). A média do ponto central foi de 69,18 mg EAG/g com um desvio padrão de 0,73%.

Figura 13: Superfície de resposta obtidas pelo planejamento Doehlert., bem como superfície de contorno da região avaliada experimentalmente.



Os resultados determinam que a variável temperatura de extração (x_1 , com $p = 0,0005$) e a interação entre temperatura e tempo de extração (x_{12} , com $p = 0,0237$) são

estatisticamente significativas (Tabela 10). Com relação ao tempo de extração (x_2 , com $p = 0,1113$), não foi considerado significativo ao nível de confiança de 95%.

Foi observada uma diferença no teor fenólico dos extratos extraídos a 150 e 180 °C, com um tempo de extração de 6,47 minutos. Um teor fenólicos de 67,86 mg EAG/g foi observado para um tempo de extração de 6,47 minutos, a uma temperatura de 180 °C, enquanto com o mesmo tempo de extração e a 150 °C foi determinado um teor fenólico médio de 69,18 mg EAG/g foi observado. Esse comportamento se deve ao fato de tempos de extrações maiores aliados às altas temperaturas ocasionarem a degradação térmica de compostos bioativos [175]. Ainda, foi possível observar que o aumento do tempo de extração verificou teores fenólicos inferiores aos determinados nas triplicatas do ponto central com 6,47 minutos de extração, como mostra a figura 14.

Figura 14: Variação do teor de fenólicos em função do tempo de extração.

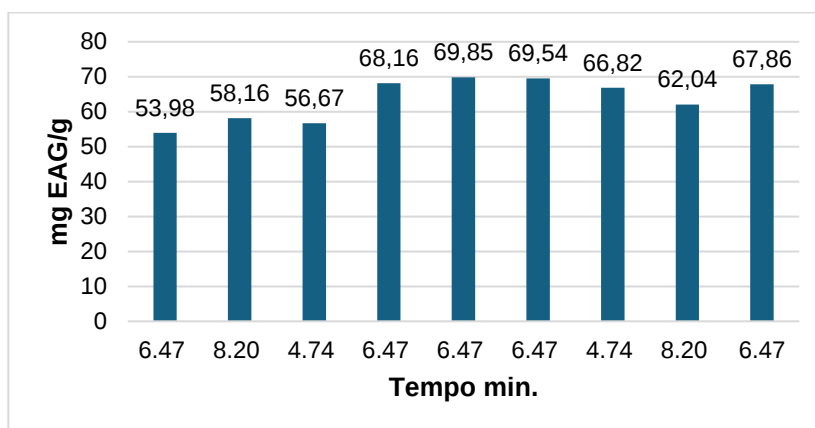


Tabela 10: ANOVA para a otimização da extração de compostos fenólicos do capim-limão.

Parâmetros	Soma quadrática (SQ)	GL	Média quadrática (QM)	F _{calc}	p-valor
Modelo	294,58	5	58,92	108,93	0,0014
Temperatura (X_1)	145,53	1	145,53	269,07	0,0005
Tempo (X_2)	2,71	1	2,71	5,00	0,1113
X_1X_2	9,83	1	9,83	18,17	0,0237
X_1^2	81,94	1	81,94	151,49	0,0012
X_2^2	81,87	1	81,87	151,37	0,0012
Falta de Ajuste	0,0038	1	0,0038	0,0046	0,9519
Erro Puro	1,62	2	0,8094		
$R^2 = 0,9945$					

O valor F do modelo de 108,93 indica que o modelo é significativo. Há apenas 0,14% de chance de que um valor F tão grande possa ocorrer devido ao ruído. Ainda, o

F da falta de ajuste (0,0046) indica que é estatisticamente insignificante em comparação com o erro puro. A utilização desses parâmetros permitiu a calibração do modelo matemático (Equação 5) para prever a resposta com base nas variáveis significativas que influenciam o processo de extração e estimar a resposta máxima alcançável.

Nesse caso, X_1 , X_1X_2 , X_1^2 e X_2^2 são termos significativos do modelo. Valores superiores a 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos. Com estes parâmetros, foi possível prever a resposta em função das variáveis significativas na extração a estimativa da resposta máxima obtida.

$$\text{TPC} = 69,18 + 6,96 X_1 - 0,8225 X_2 - 3,13 X_1X_2 - 8,26 X_1^2 - 6,19 X_2^2 \quad \textbf{Equação 5}$$

Em que, TPC = a função resposta (neste caso, o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu); enquanto X_1 e X_2 correspondem às variáveis independentes (temperatura e tempo). Neste contexto, a adequação da predição ótima do modelo proposto foi avaliada comparando seus resultados em triplicata.

Aplicando a condição ótima, em triplicada, para a amostra de capim limão, encontrou-se uma resposta média de 69,18 mg EAG/g, que se aproxima do valor predito pelo modelo, 70,035 mg EAG/g¹, apresentando uma diferença de apenas 1,2%, o que atesta a qualidade de predição da modelagem.

Em termos de robustez do modelo matemático otimizado, um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,99 confirma a precisão do modelo e, também indica que os experimentos foram bem projetados e executados, cobrindo adequadamente o espaço experimental [141,153]. Esse fato se deve à vantagem de o processo de extração ser automatizado, minimizando erros operacionais.

Nesse sentido, a amostra selecionada para o processo de otimização (CL) apresentou um teor de compostos fenólicos totais de $69,65 \pm 1,8$ mg EAG/g obtidos a partir da extração guiada por dispersão energizada, utilizando 20 mL da mistura etanol e água (40%, v/v). As condições ótimas de extração foram: a mistura etanol e água (40:60%v/v, 500 mg de material vegetal, tempo de extração de 6,03 minutos a uma temperatura de 165,82 °C.

5.3 Avaliação do conteúdo fenólico dos extratos ótimos obtidos por EDGE™

Após o estabelecimento de condições ótimas de extração para compostos fenólicos na amostra CC, essas condições foram posteriormente aplicadas às amostras ES e EB. O teor de compostos fenólicos (TPC) foi determinado através do ensaio de Folin-Ciocalteu e os resultados estão apresentados na Tabela 11, expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de extrato seco (mg EAG/g).

Tabela 11: Teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos das ervas analisadas.

Amostra	TPC (mg EAG/g)* $\pm$ desvio padrão
Capim-limão (CL)	69,65 $\pm$ 1,8
Espinheira santa (ES)	25,92 $\pm$ 0,007
Espinheiro branco (EB)	85,62 $\pm$ 0,007

*Considerando massa de matéria vegetal seca.

A amostra de CL apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 69,65 mg EAG/g obtidos a partir da extração guiada por dispersão energizada, utilizando 20 mL da mistura etanol e água (40%, v/v) em condições otimizadas. Kouassi *et al.* [176] obtiveram um teor de fenólicos totais na amostra de capim-limão de 35,43 mg EAG/g utilizando etanol puro em extração por Soxhlet.

O estudo conduzido por Irfan *et al.*, [177], utilizou as técnicas de maceração e sonicação para a avaliação do conteúdo fenólico de extratos hidroetanólicos obtidos a partir de folhas de capim-limão. Os autores utilizaram duas proporções diferentes na mistura de solventes, etanol: água como solvente extrator nas composições 50:50 e 70:30%, v/v. Os experimentos resultaram em 36,8 e 32,9 mg EAG/g de material vegetal para as composições 50:50 e 70:30% dos solventes etanol:água, respectivamente. Ainda, a extração por sonicação verificou um conteúdo de fenólicos de 61,2 e 54,1 mg EAG/g para as respectivas combinações de solventes.

Dessa forma, evidencia-se a maior eficiência da extração EDGE (12,12%) na determinação do conteúdo fenólico em amostras de folhas de capim limão, quando comparadas às técnicas clássicas de extração por maceração ou por Soxhlet. A diferença observada no teor de fenólicos totais para a EDGE é possivelmente resultado da combinação entre a pressão e temperatura do sistema extrator que permite a maior permeabilidade da amostra, uma vez que a pressão elevada 180 psi favorece a solvatação enquanto a temperatura aumenta a difusão do solvente por diminuição da viscosidade. Ainda, fatores como a natureza dos compostos extraídos da matriz possivelmente favorecem a melhor extração pela combinação de solventes utilizada no presente estudo [178, 179].

A amostra de EB no presente estudo verificou um teor de 85,62 $\pm$ 0,007 mg GAE/g de compostos fenólicos em sua composição. Alirezalu *et al.*[180] usando ultrassom (metanol/água, 80:20, 25 mL), determinaram em conteúdo fenólico das folhas de EB entre 19,98 e 62,08 mg GAE/g. Issadi *et al.* [31] observaram um conteúdo fenólico entre 23,64 e 31,78 mg GAE/g para frutos de EB. Culum *et al.* [181] em seu estudo sobre uma das variedades de *Crataegus* relatam um conteúdo fenólico total de 14.43 mg GAE/g para os extratos obtidos em extração por Soxhlet, em um tempo de 5 horas utilizando etanol como único solvente extrator.

Por sua vez, ainda relacionando o conteúdo fenólico observado no presente estudo para a variedade *Crataegus*, Abu-Gharbien *et al.*, [182] em seus estudo sobre folhas da variedade *Crataegus azarolus*, obtiveram um teor de fenólicos totais de 1,5 mg EAG/g utilizando etanol 70% como solvente na extração por maceração. O resultado observado no do presente estudo verificou um alto TPC, evidenciando a eficiência da metodologia EDGE desenvolvida. Ferioli *et al.* [183] relataram um conteúdo fenólico de 0,056 mg GAE/g usando maceração com etanol:água (60:40%) em folhas de *Crataegus oxycantha*.

Logo, observa-se que a metodologia desenvolvida apresentou resultados superiores aos verificados na literatura, o que indica que a EDGETM apresenta melhor eficiência extrativa de compostos bioativos.

Os extratos obtidos a partir das folhas da SB resultaram em um teor fenólico de $25,92 \pm 0,007$ EAG/g, no entanto, o presente estudo não encontrou registros na literatura científica que apresentassem dados sobre o conteúdo fenólico total da espécie *Sorocea bonplandii* (ES). Esta lacuna de informação indica a necessidade de mais investigações sobre esta planta, o que pode ter implicações importantes para estudos de suas propriedades bioativas e potencial uso em farmacologia e nutrição.

5.4 Avaliação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos a partir das folhas das ervas CL, EB e ES foi realizada utilizando os ensaios ABTS, DPPH e FRAP (Tabela 12). Várias técnicas têm sido utilizadas para a obtenção de extratos com atividade antioxidante das folhas das plantas [184-186], porém as metodologias aqui aplicadas estão entre as mais utilizadas para essa finalidade.

Os extratos obtidos sob condições ótimas de CL, EB e ES tiveram o conteúdo antioxidante avaliado e, os dados variaram de acordo com o tipo ensaio utilizado. A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos medida pelo FRAP foi superior à dos outros ensaios antioxidantes, provavelmente devido à sua reação específica com antioxidantes fenólicos hidrofílicos, seguida pelos métodos ABTS e DPPH, que reagem com compostos hidrofóbicos e hidrofílicos/lipofílicos. Assim, os ensaios DPPH e ABTS são baseados na atividade de captura de radicais, enquanto o FRAP é baseado no potencial redutor de ferro [115,187].

Tabela 12: Resultados dos ensaios para determinação da capacidade antioxidante dos extratos analisados (média $\pm$ desvio padrão).

Ensaio	Capim-limão	Espinheira santa	Espinheiro branco
ABTS	$55,71 \pm 2,74$	$19,5 \pm 0,92$	$82,41 \pm 4,14$
DPPH	$22,34 \pm 0,1$	$5,83 \pm 0,55$	$54,64 \pm 0,27$
FRAP	$1158,92 \pm 29,87$	$1216,3 \pm 47,02$	$1920,4 \pm 66,39$

*Resultados expressos em mg/g de matéria vegetal seca.

O ensaio ABTS mostrou que, em condições ideais, a atividade de captura do DPPH foi de $55,71 \pm 2,74$, $19,5 \pm 0,92$ e $82,41 \pm 4,14$ mg TE/g para CL, ES e EB, respectivamente. O ensaio ABTS é baseado na reação com cátion radical orgânico e no mecanismo pode ocorrer uma transferência de átomo de hidrogênio (TAH) ou uma transferência de elétron único (TEU) [115,184,186].

Por sua vez, o ensaio DPPH apresentou capacidades antioxidantes *in vitro* de $22,34 \pm 0,1$, $5,83 \pm 0,55$ e $54,64 \pm 0,27$ mg TE/g, para CL, ES e EB, respectivamente. A atividade antioxidante *in vitro* medida pelo método DPPH é baseada na capacidade de doar elétrons da amostra em análise [115,187].

A capacidade antioxidante *in vitro* em extratos também foi avaliada utilizando o ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP). Os resultados apresentaram maior potencial redutor com atividade antioxidante de $1920,4 \pm 66,39$, $1216,3 \pm 47,02$ e $1158,92 \pm 29,87$ $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, para as espécies EB, ES e CL, respectivamente. A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos medida pelo FRAP foi superior aos demais ensaios antioxidantes, devido à sua especificidade de reação com antioxidantes fenólicos hidrofílicos [184].

Alirezalu *et al.* [180] em um ensaio FRAP encontraram atividade antioxidante variando entre 0,32 e 1,84 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ em frutos de EB usando extração por ultrassom. Belabdelli *et al.* [188] relataram 22 mg VCE/g (mg de equivalente de ácido ascórbico/g DW) em extratos etanólicos de folhas de uma variedade de Crataegus por Soxhlet no ensaio DPPH. Ferioli *et al.* [183] relataram atividade antioxidante pelo ensaio ABTS em seus extratos hidroetanólicos variando de 31,48 a 52,58 mg Trolox/ K^{-1}DW . Hamza *et al.* [189] relataram em um ensaio FRAP em extratos de partes aéreas de espinheiro branco uma atividade antioxidante de 877,8 $\mu\text{mol VCE/g}$.

Os ensaios antioxidantes são classificados de acordo com seu mecanismo de reação: transferência de átomo de hidrogênio (TAH) ou transferência de elétron único (TEU) [115]. No entanto, reações mais complexas costumam ocorrer combinando esses mecanismos a depender da natureza do analito. Portanto, os ensaios DPPH e ABTS são classificados como mecanismo misto de reação, envolvendo tanto os mecanismos TAH quanto TEU, reagindo com antioxidantes hidrofóbicos e hidrofílicos/lipofílicos, respectivamente. Em contraste, o ensaio FRAP é baseado na transferência de elétron único, e envolve antioxidantes hidrofílicos que reagem apenas em soluções aquosas [115, 190].

As metodologias empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos ótimos demonstraram resultados satisfatórios. A utilização combinada desses ensaios para a análise do potencial antioxidante dos extratos proporcionou uma visão abrangente e precisa de seu perfil antioxidante, dado que cada método avalia os extratos sob diferentes aspectos da atividade antioxidante *in vitro* relacionada à reatividade das

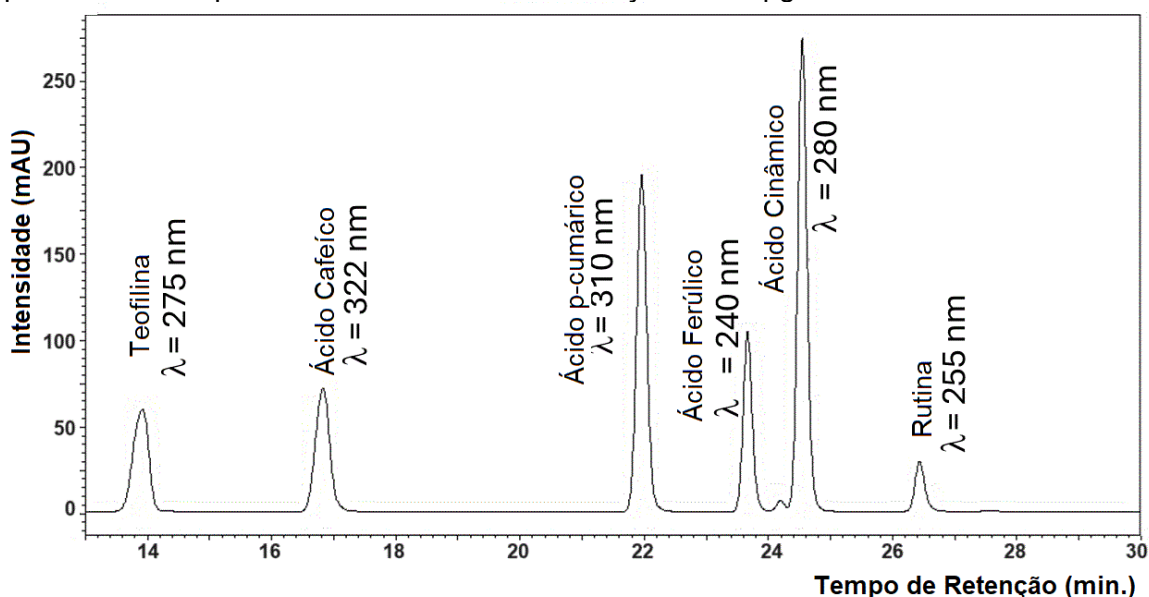
moléculas presentes no meio reacional. Assim, é possível inferir sobre a classe de compostos contidos no extrato, sugerindo que a combinação dos resultados contribui para uma caracterização mais robusta e confiável das propriedades antioxidantes.

5.5 Avaliação qualitativa e quantitativa da fração de Compostos fenólicos por HPLC UV-Vis/DAD

Os extratos obtidos por extração guiada por dispersão energizada foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC UV-Vis/DAD), a partir da identificação e quantificação por padrões analíticos certificados.

Para isso, foram injetadas soluções individuais dos padrões certificados de compostos fenólicos, em modo de análise exploratória variando a composição da fase móvel (metanol e água ultrapura contendo 5 % de ácido acético) de 5 a 100% de solvente orgânico durante um tempo total de 70 minutos, a fim de verificar a resposta analítica do padrão frente às condições experimentais iniciais. O cromatograma (solução mista de padrões analíticos de compostos fenólicos) pode ser verificado na Figura 15.

Figura 15: Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD a partir de uma solução mix de padrões de compostos fenólicos com concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.



A partir da resposta cromatográfica gerada pela análise exploratória, foi injetada uma solução conjunta de padrões certificados preparada em metanol grau HPLC, com concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Desse modo, foram coletadas as informações iniciais acerca dos compostos, como tempo de retenção e comprimento de onda de absorção máxima para cada composto fenólico, além de verificar o perfil de separação desses compostos (Figura 15).

Tabela 13: Dados da construção da curva analítica para determinação de compostos fenólicos em amostras de extratos das folhas de chás obtida por HPLC UV-Vis/DAD.

Padrão	T _R (min)	λ _{máx.} (nm)	Equação da reta	R ²	Faixa de trabalho (mg/L)
Ác. cafeíco	16,79	322	y= 9. 10 ⁻⁶ x +2,1048	0,9970	1 a 50
Ác. p-cumárico	21,98	291/310	y= 5. 10 ⁻⁶ x +2,1949	0,9963	1 a 50
Ác. ferulico	23,54	240	y= 8. 10 ⁻⁶ x +3,7393	0,9892	1 a 50
Ác. cinâmico	25,24	280	y= 1. 10 ⁻⁵ x +2,0494	0,9970	1 a 50
Teofilina	14,76	275	y= 6. 10 ⁻⁶ x +2,2500	0,9969	1 a 50
Rutina ^a	27,19	255	y= 9. 10 ⁻⁵ x +2,6450	0,9962	1 a 50
Rutina ^b	27,19	255	y= 2. 10 ⁻⁵ x +15,259	0,9943	50 a 150

Legenda: ^a - curva analítica baixa para a Rutina; ^b - curva analítica alta para a Rutina.

As informações reunidas foram então utilizadas para preparar curvas analíticas contendo os compostos fenólicos de interesse, permitindo a quantificação dos analitos nos extratos produzidos. São apresentados na Tabela 13 os dados da curva analítica contemplando além do tempo de retenção e o comprimento de onda de máxima absorção, a equação da reta relativa à curva analítica, o coeficiente de determinação (R²) e a faixa linear de trabalho do estudo.

A curva analítica indicou a faixa linear de trabalho variando entre 1 mg/L a 50 mg/L para os padrões de ácidos fenólicos e teofilina. Já para o padrão analítico de rutina, foram necessárias duas curvas com a primeira com concentrações variando de 1 mg/L a 50 mg/L e a segunda curva analítica com concentração de padrão variando entre 50 a 150 mg/L, a fim de atender à quantificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de folhas de ervas.

A detecção dos compostos fenólicos por detecção de arranjo de diodos baseia sua resposta na absorção da radiação na região UV-Visível, propriedade conferida pela presença de ligações duplas conjugadas, presentes na estrutura desses compostos [191]. Essas ligações duplas funcionam como um grupo cromóforo capaz de absorver a radiação [192-194].

Para o estudo cromatográfico, as amostras preparadas por EDGE™ foram filtradas em filtro nitrílico de 20 µm, sendo posteriormente analisadas por HPLC/DAD em modo gradiente de eluição, com tempo total de corrida de 70 minutos. Foi utilizada para a separação dos compostos uma coluna de fase reversa, C18 e, a fase móvel foi composta por metanol e água ultrapura contendo 5% de ácido acético na composição.

Os perfis cromatográficos das amostras analisadas estão apresentados nas **Figuras 16, 17 e 18**. Foram identificados com o auxílio de padrões analíticos certificados ácidos fenólicos, um alcaloide e um flavonol nos extratos das ervas. Por outro lado, foram observadas nas amostras a presença de vários outros compostos que não tiveram sua

identificação realizada diante dos padrões analíticos disponíveis. Na tabela 14 são apresentados os compostos fenólicos identificados e quantificados nas amostras de folhas de ervas. Podem ser verificados a concentração e desvio padrão dos compostos fenólicos identificados neste estudo.

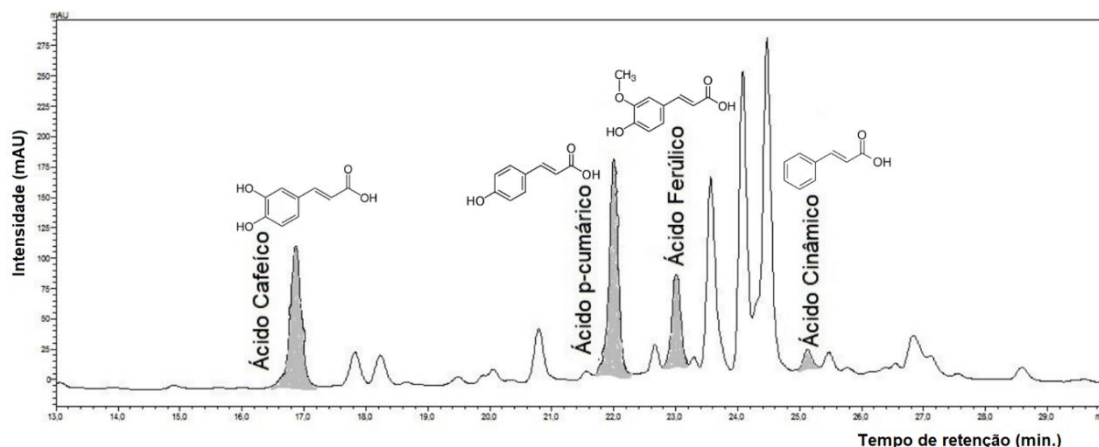
Foi observada principalmente a presença de ácidos fenólicos, que são classificados como ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos de acordo com o número de átomos de carbono presentes em sua estrutura [195, 196]. Os ácidos fenólicos tem reconhecidas propriedades antioxidantes e, sua presença em todas as amostras de ervas analisadas indica o potencial antioxidante do extrato obtido [195, 197].

Tabela 14: Resultados da identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos obtida por HPLC UV-Vis/DAD.

Compostos	Concentração $\mu\text{g/L}^*$		
	Capim-limão	Espinheira santa	Espinheiro branco
Ácido cafeíco	15,01 $\pm$ 0,12	14,59 $\pm$ 0,07	10,98 $\pm$ 0,01
Ácido p-cumárico	3,7 $\pm$ 0,04	3,49 $\pm$ 0,20	5,78 $\pm$ 0,01
Ácido ferulico	16,49 $\pm$ 0,1	n.d.	n.d.
Ácido cinâmico	3,06 $\pm$ 0,01	3,82 $\pm$ 0,32	n.d.
Teofilina	n.d.	2,49 $\pm$ 0,05	6,37 $\pm$ 0,02
Rutina	n.d.	n.d.	93,05 $\pm$ 0,27

*Concentração média $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{g/L}$)

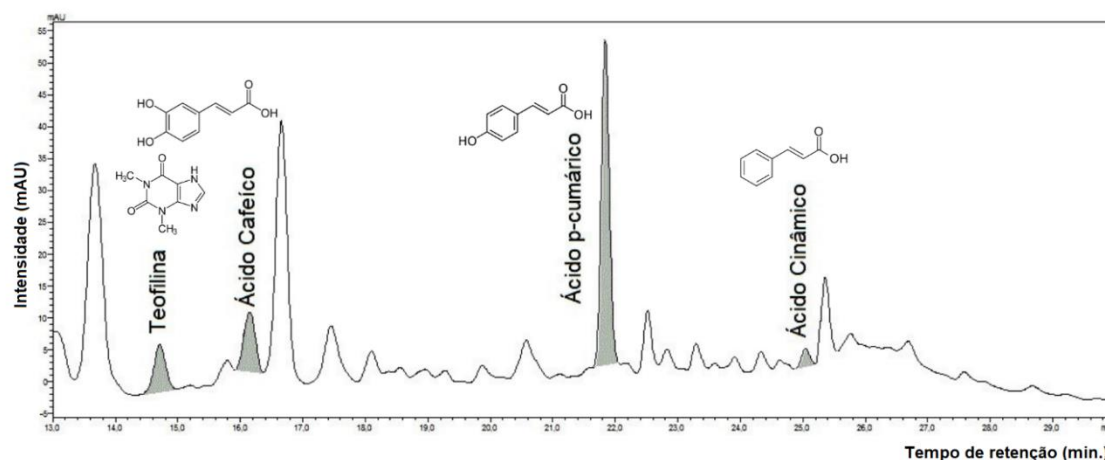
Figura 16: Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de capim-limão.



Na amostra de capim-limão foram identificados os ácidos fenólicos cafeíco (15,01 $\pm$ 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$), p-cumárico (3,70 $\pm$ 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$), ferúlico (16,49 $\pm$ 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e cinâmico (3,06 $\pm$ 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$). Foram observados outros compostos cuja identificação não foi possível em correlação aos padrões analíticos disponíveis. Coelho *et al.*, [197] verificaram a presença de três dos ácidos observados no presente estudo, o ácido cafeíco, ferúlico e p-cumárico na composição das amostras de capim-limão, também avaliadas por HPLC/DAD. Por sua vez, Muala *et al.*, [48] verificaram a presença dos ácidos cafeíco, p-cumárico, ferúlico e cinâmico como ocorreu no presente trabalho, além de ácidos vanílico, gálico, siríngico,

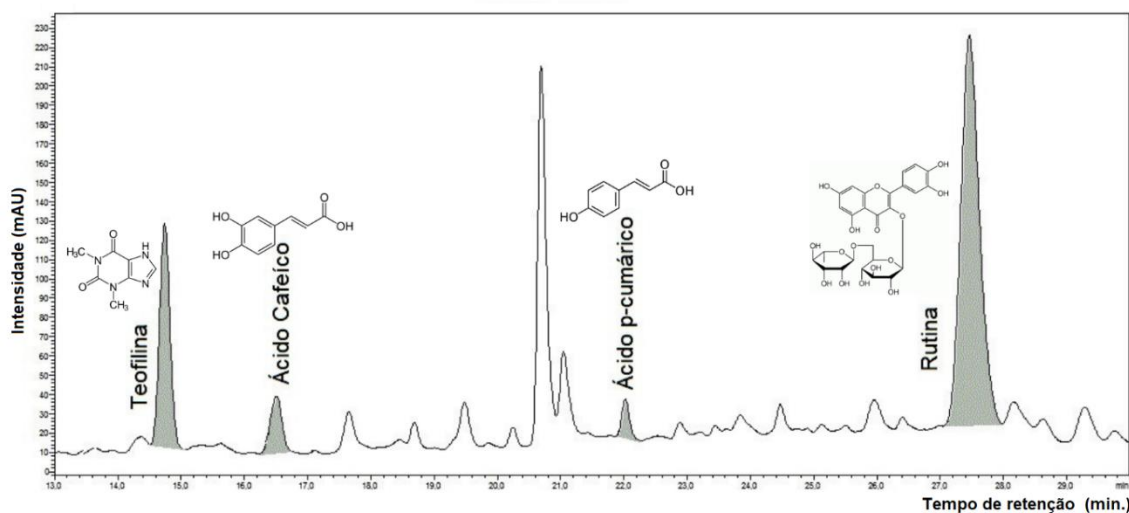
dihidroxibenzóico. Os autores verificaram a presença dos flavonóides catequina, epicatequina e quercetina em suas amostras.

Figura 17: Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de espinheira santa.



A amostra de espinheira santa (*Sorocea bonplandii*) analisada neste estudo apresentou os ácidos fenólicos cafeíco ($14,59 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$), p-cumárico ($3,49 \pm 0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) e cinâmico ($3,82 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$), além de teofilina ($2,49 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) em sua composição. Não foram encontrados na literatura estudos fitoquímicos aprofundados sobre a composição química da espécie *Sorocea bonplandii*.

Figura 18: Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD para o extrato ótimo de espinheiro branco.



Na amostra de espinheiro branco foram observados os ácidos cafeíco ($10,98 \pm 0,01 \mu\text{g/L}$), p-cumárico ($5,78 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$), além de teofilina ($6,37 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) e rutina ($93,05 \pm 0,27 01 \mu\text{g L}^{-1}$). Zhang *et al.*, [199], em seu estudo sobre a composição química e atividade antibacteriana do espinheiro branco, verificaram a presença dos ácidos clorogênico e p-cumárico, além de procianidinas, quercetina e seu derivado isoquercetina, em extrato metanólico. Benabderrahmane *et al.*, [29], verificaram a

presença dos ácidos cafeíco e clorogênico na composição em que o solvente extrator foi o acetato de etila. Por sua vez, Alirezalu *et al.* [180] relataram a presença de ácido clorogênico e rutina em frutos de espécies do gênero *Crataegus*.

A rutina é um flavonol de grande importância para a indústria farmacêutica, com atividade farmacológica comprovada, dentre as quais anti-inflamatória e antioxidante, além da cardioprotetora [200, 201]. Dessa forma, ressalta-se que a partir da metodologia otimizada para extração de compostos fenólicos por EDGE™, verificou-se alto teor de rutina na amostra de espinheiro branco, sendo a única amostra em que o composto foi observado.

Foi observada a presença de teofilina é uma xantina metilada, caracterizada pela combinação de um anel imidazol e uma pirimidinediona, com atividade antioxidante comprovada [202, 203]. Este composto ocorre naturalmente em bebidas como café, chás e infusões de ervas medicinais [203]. No presente estudo, a teofilina foi observada nas amostras de espinheira santa e espinheiro branco.

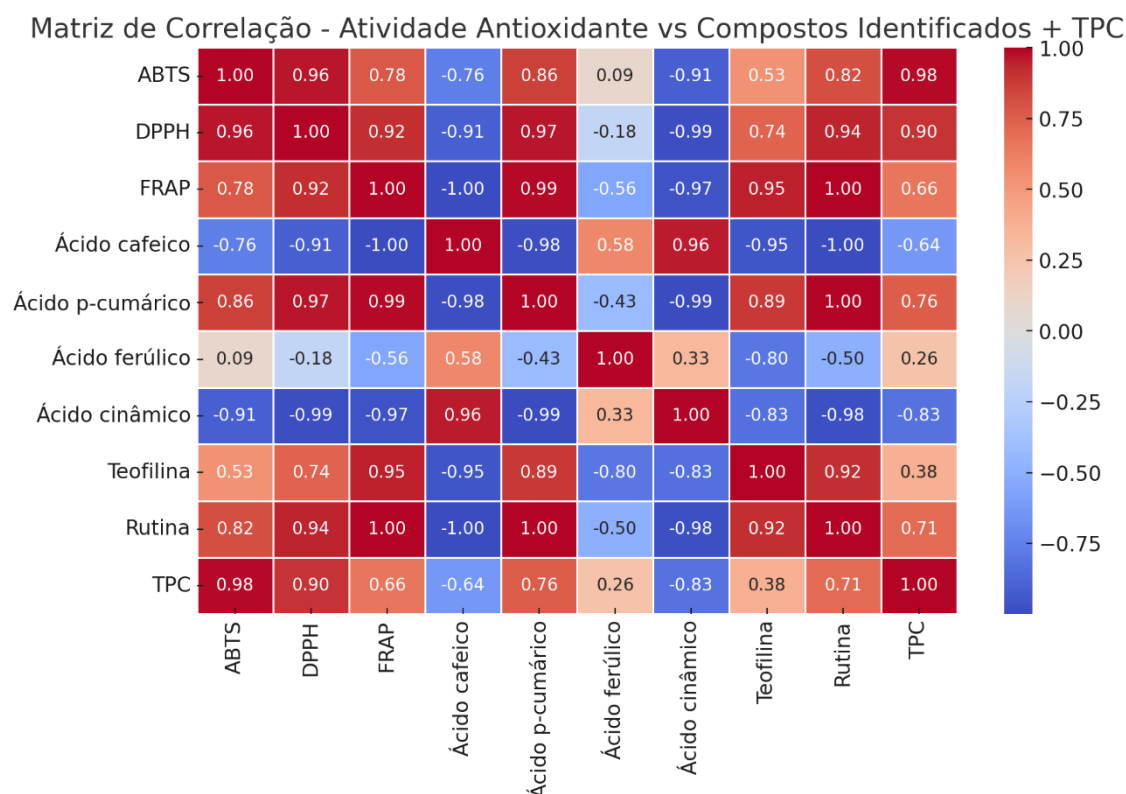
Os ácidos fenólicos foram observados em todas as amostras de ervas avaliadas neste estudo. Estes compostos bioativos foram majoritários nos extratos nos trabalhos desenvolvidos por Vastrad *et al.* [203, 204]. Dentre estes, o ácido cinâmico é o antioxidante mais ativo, devido à dupla ligação presente em suas estruturas, que participa da estabilidade do radical por ressonância, deslocando o elétron desemparelhado [197, 205].

5.6 Relação entre TPC, composição dos extratos e atividade antioxidante *in vitro*

A correlação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais (TPC) é fundamental para compreender as interações bioquímicas envolvidas na capacidade antioxidante de matrizes naturais. Neste contexto, fez-se uso de uma matriz de correlação (Figura 19) para visualizar padrões e relações entre variáveis de forma intuitiva, destacando associações positivas ou negativas que podem revelar tendências relevantes. Essa abordagem facilita a interpretação de como diferentes compostos fenólicos contribuem para a atividade antioxidante, possibilitando inferências sobre sinergismos ou antagonismos presentes na matriz avaliada.

A partir da Figura 19 é possível obter indicativos da tendência entre os ensaios de determinação da capacidade antioxidante dos extratos e o conteúdo fenólico dos extratos obtidos por EDGE. O TPC apresentou uma correlação positiva forte com os ensaios antioxidantes ABTS (0,98), DPPH (0,94) e FRAP(1,00), indicando que quanto maior o teor total de compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante da amostra [206, 207]. Esse resultado reforça o papel central dos compostos fenólicos na neutralização de radicais livres e na capacidade de redução do ferro.

Figura 19: Matriz de correlação entre ensaios antioxidantes, teor de fenólicos e composição dos extratos.



Um aspecto importante a ser considerado ao extrair compostos bioativos de matrizes vegetais é a seleção de solventes e o métodos de extração apropriados, pois estes são essenciais para o isolamento eficiente de compostos bioativos. A escolha do solvente de extração é baseada na polaridade, que por sua vez afeta a capacidade de extrair analitos específicos das matrizes vegetais com foco em suas propriedades estruturais e físico-químicas.

Os solventes mais comumente usados para fins bioprospectivos incluem principalmente água e etanol [208], que, com base na polaridade, impacta significativamente a eficiência de extração de compostos fenólicos. Solventes com polaridade mais baixa produzem níveis mais baixos de compostos fenólicos, resultando em menor capacidade de eliminação de radicais livres do extrato [209,210].

Um outro aspecto de interesse é a correlação entre os ensaios antioxidantes realizados e a composição individual dos extratos obtidos no processo de otimização da EDGE. Os ácidos fenólicos, em específico, os ácidos cafeico e p-cumárico contribuíram de forma acentuada para o TPC dos extratos, o que evidencia sua contribuição também para a atividade antioxidante. A correlação forte observada para a presença desses dois ácidos na composição dos extratos e sua relação com a atividade antioxidante, em todas as amostras analisadas corrobora esse indicativo.

Por sua vez, a presença de rutina com uma correlação moderada decorre do fato de esse composto ter sido observado apenas na amostra EB. Em contrapartida, a

presença de rutina em EB está altamente associada aos valores de atividade antioxidante do ensaio FRAP. Por fim, em relação a teofilina, encontrada nas amostras ES e EB, a fraca correlação observada em relação à sua contribuição para o TPC decorre do fato de esse composto não se tratar de um composto fenólico, o que limita sua contribuição para a atividade antioxidante nos ensaios.

Flavonóides com estruturas fenólicas altamente hidroxiladas são geralmente solúveis em água, álcoois e suas combinações, enquanto formas de flavonóides menos polares e altamente metoxiladas são preferencialmente extraídas usando solventes menos polares [210-212]. Como os grupos hidroxila nos compostos fenólicos são cruciais para a atividade antioxidante, os extratos com maior polaridade normalmente exibem melhores propriedades antioxidantes.

A rutina é um glicosídeo composto pelo flavonóide aglicona quercetina e pelo dissacarídeo rutinose, com grande solubilidade em água. A estrutura e as propriedades físico-químicas da rutina, aliadas à elevada quantidade encontrada na amostra de EB, explicam a considerável capacidade antioxidante apresentada no ensaio FRAP para essa amostra [213-215]. Um aspecto interessante a ser ressaltado é o fato de a rutina ser bastante sensível à termodegradação, sofrendo quebra de sua estrutura em unidades menores, mais simples, quando exposta a temperaturas acima dos 100°C [216-218].

Os ácidos fenólicos são geralmente solúveis em misturas de etanol:água, e a solubilidade dos compostos fenólicos é afetada pela composição do solvente [219]. Neste estudo, a composição do solvente 40:60% (v, v) apresentou alto teor de ácidos fenólicos, encontrados em todas as amostras. Além disso, o conteúdo antioxidante foi consistente com o teste ABTS, cujo mecanismo reacional favorece compostos antioxidante hidrofílicos/lipofílicos [115].

O ensaio de DPPH, cujo mecanismo é preferencialmente reativo às moléculas hidrofóbicas, apresentou os menores valores de atividade antioxidante *in vitro* observados no presente estudo. Este fato possivelmente indica a pouca incidência de analitos hidrofóbicos na composição do extrato hidroetanólico obtido [115, 210-221].

Em relação à natureza diversa do conteúdo fenólico, este consiste em uma gama de compostos que apresentam diferentes propriedades físico-químicas e, desse modo buscou-se explorar as conexões entre o conteúdo fenólico total (TPC) e a atividade antioxidante nas amostras relacionadas à essas propriedades. Fatores como o coeficiente de partição octanol-água e a constante de dissociação eletrolítica desempenham um papel importante nesta avaliação (Tabela 15) [219-221]. Considerando os mecanismos reacionais dos ensaios antioxidantes *in vitro* e os compostos fenólicos observados é possível relacionar a natureza dos compostos à sua reatividade. Verifica-se que compostos reativos ao ensaio ABTS apresentam natureza hidrofílica e lipofílica. Por sua vez, o ensaio DPPH envolve moléculas hidrofóbicas,

especialmente em meios orgânicos e, por fim, o ensaio FRAP interage com espécies hidrofílicas [115,123].

Tabela 15: Propriedade físico-químicas dos compostos observados no estudo.

Composto fenólico	Classe	Formula molecular	PM (g/mol)	pKa	Log Kow	Solubilidade em água (mg/mL)
Ácido cafeíco	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	4,62	1,15	<1
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,64;9,45	1,79	<1
Ácido cinâmico	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₂	148,16	4,45	2,07	<1
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,58	1,51	<1
Teofilina	Alcalóide	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,16	8,81	-0,02	0,027
Rutina	Flavonóide	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	650,52	-	-1,3	0,125

Fonte: PubChem [222].

A composição da amostra CL apresentou ácidos fenólicos proeminentes junto com vários compostos não identificados. Os ácidos fenólicos são caracterizados por um baixo coeficiente de partição octanol/água (log Kow), indicando que são espécies polares que são mais solúveis em água e apresentam menores tendências de bioacumulação [115]. As amostras de EB e ES também apresentaram ácidos fenólicos, além de uma metilxantina e flavonol em seus extratos, todos compostos com valores de log Kow baixos, o que explica sua maior reatividade com ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* ABTS e FRAP, indicando maior presença de compostos com hidrofílicos.

Considerando a natureza reativa de cada ensaio, é possível associar os valores de atividade antioxidante *in vitro* observados para cada amostra na Tabela 12 com as informações da tabela 15 e, assumir a natureza majoritária dos compostos extraídos pelo EDGE otimizado. Como os menores valores de atividade antioxidante foram verificados para o ensaio DPPH, indica poucos compostos nas amostras são de natureza hidrofóbica. Por outro lado, foram observados valores mais expressivos para os testes ABTS e FRAP, cuja natureza é fortemente hidrofílica [115, 213]. Este fato está relacionado à composição do solvente extrator, cuja composição é água em seu maior percentual. A porção orgânica do extrato interage com compostos de afinidade lipofílica, conforme verificado na natureza do ensaio ABTS [115, 213].

A constante de dissociação eletrolítica (pKa) avalia quantas moléculas ácidas ionizam e quantas moléculas básicas se dissociam em um nível de pH específico. A compreensão dos valores de pKa é essencial para avaliar a absorção biológica e os comportamentos de ligação das moléculas em contextos ambientais e biológicos. O pKa é uma característica que afeta significativamente as propriedades antioxidantes de um composto, uma vez que as interações de um composto com radicais livres e outras moléculas são determinadas pelo seu potencial redox, solubilidade e pKa [220,223].

Ainda, a literatura aponta que a estrutura do composto bioativo faz com que sua solubilidade mude sob influência do pH afetando o processo de extração e a disponibilidade desses analitos no extrato [223-225].

Na busca de aplicações bioprospectivas para compostos fenólicos, o pKa serve como parâmetro vital para o desenvolvimento, pois revela a propensão para doar ou aceitar um próton (H^+). Também é fundamental na previsão das formas predominantes de produtos farmacêuticos no meio ambiente e na formulação de formas farmacêuticas [226,227].

Em resumo, diferenças significativas foram observadas nas correlações entre o TPC, a composição individual dos extratos e os ensaios antioxidantes. A amostra EB apresenta maior atividade antioxidante corroborada nos três ensaios realizados. Essa atividade antioxidante indica uma relação direta entre a propriedade e o teor fenólico total.

A composição individual certamente controla os valores observados. A amostra CC apresentou uma atividade antioxidante boa e um TPC intermediário, sugerindo que a composição qualitativa dos compostos (ácidos fenólicos) pode ser tão importante quanto a concentração desses compostos. Por fim, a amostra ES exibiu menor valor de TPC e boa atividade antioxidante, embora o menor valor dentre as amostras, reforçando a relação direta entre o TPC e a atividade antioxidante. Ainda, a composição da amostra ES, assim como as demais, apresenta compostos não identificados que poderiam contribuir para melhores percepções acerca dos resultados.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, a Extração Guiada por Dispersão Energizada (EDGE) foi aplicada para obter extratos de três tipos de erva utilizadas em infusões com reconhecidas atividades fitoterápicas. Foram realizadas a otimização do processo de extração, a determinação suas atividades antioxidantes *in vitro* e a caracterização do conteúdo dos extratos hidroetanólicos por HPLC/DAD. No processo de otimização, a aplicação do design experimental Doehlert e a metodologia de superfície de resposta (RSM) resultaram em uma melhora significativa na obtenção de compostos fenólicos com reconhecida atividade antioxidante, além de alto nível de conteúdo fenólico presente nos extratos. Foi possível explorar eficientemente as variáveis experimentais (temperatura e tempo).

O estudo realizado permitiu obter as melhores condições de extração para maximizar o teor de compostos polifenólicos com potencial capacidade antioxidante usando EDGE. A condição ótima foi obtida usando uma mistura de etanol (40%)/água (60%) a 165,82°C, com um tempo de extração 6,03 min. A análise de variância (ANOVA) revelou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$) com um R^2 de 0,99. O teor de compostos fenólicos médio do ponto central foi de 69,18 mg GAE/g com um desvio padrão de 0,73%. A EDGE provou ser eficiente para a preparação de amostras com conteúdo bioativo, permitindo uma recuperação rápida, simples, reprodutiva e com menor consumo de solventes a partir pequena quantidade do material vegetal. O bom desempenho da técnica no isolamento de compostos fenólicos, resulta de um processo de extração menos trabalhoso, com menos etapas de preparação de amostras e maior automação. O extrato obtido mostrou ser uma fonte de alto nível de compostos fenólicos importantes com potencial antioxidante.

Em relação ao perfil fitoquímico observado na análise cromatográfica, todas as amostras de ervas analisadas apresentaram ácidos fenólicos na composição. Teofilina foi observada nas amostras de ES e EB e, finalmente, rutina em alta concentração foi observada na amostra de EB. Outros compostos foram encontrados nas amostras, mas não foram identificados em relação aos padrões certificados disponíveis. Dessa maneira, é necessária a identificação desses constituintes químicos para entender suas propriedades bioativas e potencial para possíveis aplicações terapêuticas, fornecendo informações relevantes sobre a composição química e qualidade dos extratos.

7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Publicação do artigo científico.

Análises complementares a fim de identificar nos extratos compostos remanescentes.

Avaliação da fração volátil das amostras a fim de complementar o estudo.

Avaliação de toxicidade dos extratos obtidos para fins prospectivos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Arnold, J.T. Integrating ayurvedic medicine into cancer research program part 2: Ayurvedic herbs and research opportunities. *J. Ayurveda and Integr. Med.*, **2023**, 14, 100677. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2022.100677>.
- [2] Kumar, S.; Dobos, G.J.; Rampp, T. The Significance of Ayurvedic Medicinal Plants. *J. Evidence-Based Integr. Med.*, **2017**, Jul;22(3):494-501. <https://doi.org/10.1177/2156587216671392>.
- [3] Barrella, F.; Padoveze, A. Medicinal Teas in Ayurveda. *ACiS, São Paulo*, **2023**, 11, 65. Available in <https://revistaseletronicas.fmu.br>. Accessed in August, 2th, 2024.
- [4] Arts, I.C.W.; A Review of the Epidemiological Evidence on Tea, Flavonoids, and Lung Cancer. *J. Nutr.*, **2008**, 138 (Supplement), 1561S. <https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1561S>.
- [5] Yao, J.; Liu, H.; Ma, C.; Pu, L.; Yang, W.; Lei, Z. A Review on the Extraction, Bioactivity, and Application of Tea Polysaccharides. *Molecules*, **2022**, 27, 4679. <https://doi.org/10.3390/molecules27154679>.
- [6] Pizzino G.; Irrera N.; Cucinotta M.; Pallio G.; Mannino F.; Arcoraci V.; Squadrito F.; Altavilla D.; Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell Long.* **2017**, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [7] Dos Santos, P.N.; Conrado, N.M.; Neubauer, T.M.; Dos Santos, A. L.; Krause, L.C.; Caramão, E.B. Optimization of Energized Dispersive Guided extraction (EDGE) of antioxidants from *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) leaves using response surface methodology. *Microc. Journal*, **2023**, 187, 108411. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108411>.
- [8] Kinross, A.D.; Hageman, K.J.; Doucette, W.J.; Foster, A.L. Comparison of Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE) for the analysis of pesticides in leaves. *J. Chromatog. A*, **2020**, 1627, 461414. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461414>.
- [9] Pereira, R.J.; Cardoso, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotech. Biodiv.*, 2012, 3 (4), 146. ISSN: 2179-4804
- [10] Issaoui, M.; Delgado, A.M.; Caruso, G.; Micali, M.; Barbera, M.; Atrous, H.; Ouslati, A.; Chammem, N. Phenols, flavors, and the mediterranean diet. *J. AOAC Intern.*, **2020**, 103 (4), 915. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qs018>.
- [11] Barros, D.M.; De Moura, D. F.; Do Monte, Z. S.; Ribeiro, A.N.S.; Rodrigues, T. H. G.; Rocha, T. A.; Pimentel, P. R. G.; Silva, K. G.L.; Gomes, V. C. M.; Barbosa, M. M. F.; Dos Santos, J. S. S.; Ferreira, S. A.O.; Maehler, A.K.A.P.; Da Silva, A. A.; Da Silva, T. P.; Da Costa, M. P. Atividade antioxidante de chás amplamente consumidos no brasil: uma revisão de literatura. *Ver. Contemporânea*, 3(12), 29963–29976., **2023**. <https://doi.org/10.56083/RCV3N12-262>.
- [12] Oladeji, O. S.; Adelowo, F. E.; Ayodele, D. T.; Odelade, K. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. *Sci. African*, **2019**, 6, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>.
- [13] Shi, L.; Zhao, W.; Yang, Z. Subbiah, V. Suleria, H.A.R. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ. Sci. Poll. Res.*, **2022**, 29, 81112 <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>.
- [14] Pedro, S.I.; Rosado, T.; Barroca, C.; Neiva, D.; Alonso-Herranz, V.; Gradillas, A.; García, A.; Gominho, J.; Gallardo, E.; Anjos, O. Characterization of the Phenolic Profile of *Acacia retinodes* and *Acacia mearnsii* Flowers' Extracts. *Plants*, **2022**, 11, 1442. <https://doi.org/10.3390/plants11111442>.

- [15] Fresno, R.V.; Rosana, A. R. R.; Sajed, T.; Onookome-Okome, T.; Wishart, N. A.; Wishart, D. S. Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies – A Systematic Review. *Genes & Nutrition*, **2019**, 14(18), 27 pp. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0636-8>.
- [16] MS-SVS-Brasil, 1998. Portaria 519 de 26 de junho de 1998, Ministério da Saúde e Secretária de Vigilância Sanitária (MS-SVS). Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1998/prt0519_26_06_1998.html Acesso: 25/05/2024.
- [17] MS-SVS-Brasil, 2005(a). Resolução da Diretoria Colegiada nº 277 de 22 de setembro de 2005. Ministério da Saúde e Secretária de Vigilância Sanitária (MS-SVS). Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/anexo/anexo_res0277_22_09_2005.pdf. Acesso em 24/05/2024.
- [18] MS-SVS-Brasil, 2005(b) Resolução da Diretoria Colegiada nº 267 de 22 de setembro de 2005. Ministério da Saúde e Secretária de Vigilância Sanitária (MS-SVS). Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0267_22_09_2005.html#:~:text=Aprova%20o%20%22REGULAMENTO%20T%C3%89CNICO%20DE,que%20lhe%20confere%20o%20art. , Acesso em:24/05/2024.
- [19] NCBI, 2024(a) Espécime: *Crataegus oxycantha*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Crataegus+oxyacantha>. Acesso em:24/04/2024.
- [20] Kashyap et al.; 2012. Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn. – A review. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.*, **2021**, 2(2), S1194. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60383-9](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60383-9).
- [21] Giehl, 2024. Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Disponível em: <http://floradigital.ufsc>. Acesso em:14/06/2024.
- [22] Chen, J.D.; Wu, Y.Z.; Tao, Z.L.; Chen, Z.M.; Liu, X.P. Hawthorn (Shan Zha) Drink and Its Lowering Effect on Blood Lipid Levels in Humans and Rats. *Plants in Human Nutrition, In World Review of Nutrition and Dietetics: Plants in Human Nutrition*. **1995**, 77, 147. <https://doi.org/10.1159/000424470>.
- [23] Wang, T.; An, Y.; Zhao, C.; Han, L.; Boakye-Yiadom, M.; Wang, W.; & Zhang, Y. Regulation Effects of *Crataegus pinnatifida* Leaf on Glucose and Lipids Metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59(9), 4987. <https://doi.org/10.1021/jf1049062>.
- [24] Behnam, A.; Majid, K.; Samira, A.; Hossein, H. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of hawthorn extract (*Crataegus oxyacantha*) in broiler chickens. *Vet. Med. Sci.*, **2024**, published by John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/vms3.1414>.
- [25] Verma, S.K.; Jain, V.; Verma, D.; Khamesra, R. *Crataegus oxyacantha*- A Cardioprotective herb. *J. Herbal Med. Toxicol.*, **2007**, 1(1), 65. ISSN: 0973-4643
- [26] Zhang, J.; Chai, X.; Zhao, F.; Hou, G.; Meng, Q. Food Applications and Potential Health Benefits of Hawthorn. *Foods*, **2022**, 11, 2881. <https://doi.org/10.3390/foods11182861>.
- [27] Cuevas-Durán, R.E.; Medrano-Rodríguez, J.C.; Sánchez-Aguilar, M.; Soria-Castro, E.; Rubio-Ruíz, M.E.; Del Valle-Mondragón, L.; Sánchez-Mendoza, A.; Torres-Narvaéz, J.C.; Pastelín-Hernández, G.; Ibarra-Lara, L. Extracts of *Crataegus oxyacantha* and *Rosmarinus officinalis* Attenuate Ischemic Myocardial Damage by Decreasing Oxidative Stress and Regulating the Production of Cardiac Vasoactive Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2412. <https://doi.org/10.3390/ijms18112412>
- [28] Bekbolatova, E.; Kukula-Koch, W.; Baj, T.; Stasiak, N.; Ibadullayeva, G.; Koch, W.; Glowniak, K.; Tulemissov, S.; Sakipova, Z.; Boylan, F. Phenolic composition and antioxidant potential of different organs of Kazakh *Crataegus almaatensis* Pojark: A

- comparison with the European *Crataegus oxyacantha* L. flowers *Open Chemistry* **2018**, 16(1), 415. <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0048>.
- [29] Benabderrahmane, W.; Lores, M.; Benaissa, O.; Lamas, J. P.; De Miguel, T.; Amrani, A.; Benayache, S. Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) *Nat. Prod. Res.* **2019**, 35(4), 627. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1582044>.
- [30] Hamza, A. A.; Lashin, F. M.; Gamel, M.; Hassanin, S. O.; Abdalla, Y.; Amin, A. Hawthorn Herbal Preparation from *Crataegus oxyacantha* Attenuates In Vivo Carbon Tetrachloride -Induced Hepatic Fibrosis via Modulating Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **2020**, 9(12), 1173. <https://doi.org/10.3390/antiox9121173>.
- [31] Issaadi, O.; Fibiani, M.; Picchi, V.; Scalzo, R. L.; Madani, K. Phenolic composition and antioxidant capacity of hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) flowers and fruits grown in Algeria. *J. Compl. Integr. Med.*, **2020**. <https://doi.org/10.1515/jcim-2018-0125>.
- [32] Nascimento, R.P.D.; Machado, A.P.D.F.; Lima, V.S.; Moya, A.M.T.M.; Reguengo, L.M.; Bogusz Junior, S.; Leal, R.F.; Cao-Ngoc, P.; Rossi, J.C.; Leclercq, L.; Cottet, H.; Cazarin, C.B.B.; Marostica Junior, M.R. Chemoprevention with a tea from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) leaves and flowers attenuates colitis in rats by reducing inflammation and oxidative stress. *Food Chem.* **2021**, 12, 100139. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100139>.
- [33] Ahmadipour, B.; Kalantar, M.; Abaszadeh, S.; Hassanpour, H. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of hawthorn extract (*Crataegus oxyacantha*) in broiler chickens. *Vet. Med. Sci.* **2024**, 10, e1414. <https://doi.org/10.1002/vms3.1414>.
- [34] Silva, H.; Bárbara, R. Exploring the Anti-Hypertensive Potential of Lemongrass - A Comprehensive Review. *Biology* **2022**, 11, 1382. <https://doi.org/10.3390/biology11101382>.
- [35] Kumar, A.; Jnanesha, A. C.; Lal, R.K. Coppicing impact on the essential oil yield and its chemical composition of lemongrass cultivars of the genus *Cymbopogon* under the semi-arid region of South India. *Acta Ecol. Sinica* **2023**, 43, 20. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.05.005>.
- [36] NCBI, Livraria Nacional de Medicina do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Espécime: *Cymbopogon citratus* stapf. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Cymbopogon+citratus>. , Acesso em: 24/04/2024., .
- [37] Du, X.; Zhang, M.; Wang, S.; Li, J.; Zhang, J.; Liu, D. Ethnopharmacology, chemical composition and functions of *Cymbopogon citratus*. *Chin. Herb. Med.* **2024**, 18(3), 358. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.07.002>.
- [38] Martins, W.S.M.; De Araújo, J.S.F.; Feitosa, B.F.; Oliveira, J.R.; Kotzebue, L.R.V.; D Agostini, D.L.S.; De Oliveira, D.L.V.; Mazzetto, S.E.; Cavalcanti, M.T.; Da Silva, A.L. Lemongrass (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf) essential oil microparticles: Development, characterization, and antioxidant Potential. *Food Chem.* **2021**, 355, 129644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129644>.
- [39] Magotra, S.; Singh, A.P.; Singh, A.P. A review on pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*. *Intern. J. Pharm. Drug Anal.* **2021**, 9 (2), 151. <https://doi.org/10.47957/ijpda.v9i2.465>.
- [40] Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. . Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 13 jun. 2024 .
- [41] Verma, T.; Sinha, M.; Bansal, N.; Yadav, S. R.; Shah, K.; Chauhan, N. S. Plants Used as Antihypertensive. *Nat. Prod. Biopr.* **2020**, 11(2), 144. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00281-x>.

- [42] Boeira, C. P.; Piovesan, N.; Flores, D. C. B.; Soquetta, M. B.; Lucas, B. N.; Heck, R. T.; Terra, N. N. Phytochemical characterization and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* extract for application as natural antioxidant in fresh sausage. *Food Chem.* **2020**, 319, 126553. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126553>.
- [43] Oliveira, J.B.; Silva, B.F.L.; Machado, A.M.R.; Garcia, C.F.; Lucas, E.M.F. Estudo do perfil químico de chás de capim cidreira (*Cymbopogon citratus* Stapf) mediante a variação na forma de preparo. *Res. Soc. Develop.* **2021**, 10(11), 234101119413. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19413>.
- [44] Haque, A. N. M. A.; Remadevi, R.; Naebe, M. (Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. *Cellulose* **2018**, 25, 5455. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1965-2>.
- [45] Tibenda, J.J.; Yi, Q.; Wang, X.; Zhao, Q. Review of phytomedicine, phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology, and pharmacological activities of *Cymbopogon* genus. *Frontiers Pharmacol.* **2022**, 13, 997918. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.997918>.
- [46] Kiani, H.S.; Ali, A.; Zahra, S.; Hassan, Z.U.; Kubra, K.T.; Azam, M.; Zahid, H.F. Phytochemical Composition and Pharmacological Potential of Lemongrass (*Cymbopogon*) and Impact on Gut Microbiota. *Appl. Chem.* **2022**, 2, 229. <https://doi.org/10.3390/appliedchem2040016>.
- [47] De Magalhães, Bárbara E.A. & Dos Santos, Walter N.L. Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs: Optimization of phenolic extraction and HPLC-DAD Method. *Anais Acad. Bras. Ciências* **2020**, 92(3), e20190646. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190646>.
- [48] Muala, W. C. B.; Desobgo, Z. S. C.; Jong, N. E. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. *Heliyon*, **2021**, 7(4), e06744. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06744>.
- [49] Da Ressurreição, S.; Pedreiro, S.; Batista, M.T.; Figueirinha, A. <https://doi.org/10.3390/molecules27217338> Effect of Phenolic Compounds from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Leaves on Micellar Solubility of Cholesterol. *Molecules* **2022**, 27, 7338. *Molecules* **2022**, 27, 7338. <https://doi.org/10.3390/molecules27217338>.
- [50] Costa, G.; Ferreira, J. P.; Vitorino, C.; Pina, M. E.; Sousa, J. J.; Figueiredo, I. V.; Batista, M. T. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *J. Ethnoph.* **2016**, 178, 222. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.016>.
- [51] Boeira, C. P.; Piovesan, N.; Soquetta, M. B.; Flores, D. C. B.; Lucas, B. N.; Da Rosa, C. S.; Terra, N. N. Extraction of bioactive compounds of lemongrass, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity in fresh chicken sausage. *Ciência Rural*, **2018**, 48(11), e20180477. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180477>.
- [52] Basera, P.; Lavania, M.; Agnihotri, A.; Lal, B. Analytical Investigation of *Cymbopogon citratus* and Exploiting the Potential of Developed Silver Nanoparticle Against the Dominating Species of Pathogenic Bacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00282>.
- [53] Correia, D.C.C.; Assunção, C.T. de, Damião, V.H.B.; Martins, A.P.C.; Coelho, E.M.P. Métodos de extração de metabólitos secundários da planta jovem de capim limão (*Cymbopogon citratus*) para identificação por cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz. J. Develop.* **2023**, 9(7), 22251. <https://doi.org/10.34117/bjdv9n7-075>.
- [54] Hussain, A.; Kausar, T.; Rehman, A.; Batool, A.; Saleem, M.; Musharraf, T.M.; An, Q.U.; Fatima, H.; Yaqub, S.; Gorski, F.I.; Haroon, H.; Arif, M.R. Evaluation of the Phytochemical and Medicinal Value of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*), by Conversion into Powders and Extracts to Develop a Nutritional Bakery Product. *Future Integr Med.* **2023**, 2(3), 129. <https://doi.org/10.14218/FIM.2023.00033>.

- [55] NCBI, Livraria Nacional de Medicina do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Espécime: *Sorocea bonplandii*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=sorocea+bonplandii> Acesso em: 24/04/2024.
- [56] Garcia, J.S.; Oliveira Jr, C.J.F. Espinheira-santa: do extrativismo à produção sustentável. *Nativa. Sinop. Pesq. Agr. Ambi.* **2021**, *9* (4), 401. <https://doi.org/10.31413/nativa.v9i4.12222>.
- [57] Jesus, W.M.M.; Da Cunha, T.N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. *Rev. Saúde Des.* **2012**, *2* (1), 20. Disponível em: <https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/67>.
- [58] Leonhardt, C.; Calil, A. C.; Pereira, C. M.; Fior, C. S. Comportamento germinativo de sementes de *Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C. Burger, Lanjouw & Boer – Moraceae. *Iheringia, Ser. Bot., Porto Alegre*, **2011**, *66* (1), 133. Disponível em: <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/66>.
- [59] Bittencourt, R.; Ruschel, A.R.; Ferreira, D.K.; Nodari, R.O. *Sorocea bonplandii*: Espécie Promissora para o Manejo e Conservação da Floresta Atlântica. *Rev. Bras. Bioc., Porto Alegre*, **2007**, *5* (1), 834. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/rbrasbioci/article/view/115901>.
- [60] Ali, S.; Rech, K.S.; Badshah, G.; Soares, F.L.F.; Barison, A. 1H HR-MAS NMR-Based metabolomic fingerprinting to distinguish morphological similarities and metabolic profiles of *Maytenus ilicifolia*, a brazilian medicinal plant. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1707. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01094>.
- [61] Do Amaral, F.M.; Monteiro, S.S.R.; Fernandes, T.; Teixeira, D.F.; Lucchetti, L.; Jacob, S.C.; De Paiva, S.R.; Joffily, A. Pharmacobotanical characterization of *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reiss.) Biral leaves and its adulterants sold as medicinal tea in Brazil: a contribution to quality control. *Bol. Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas* **2021**, *20* (4), 386. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.4.28>.
- [62] Antunes, K.A.; Monteiro, M.L.; Howard, C.; Reich, E.; Heiden, G.; Guarino, E.S.G.; Santos, V.L.P.D.; Manfron, J.; Perera, W.H.; Comprehensive high-performance thin-layer chromatography analysis of *Monteverdia ilicifolia* leaf and its adulterants. *Nat. Prod. Res.* **2023**, *11*, 6 pp. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2289080>.
- [63] Dos Santos G.U.A.; Freitas, E.A.; Gomes, L.C.A.; Marcio Junio de Azevedo Goudard, M.J.A.; Guimarães F.G.; Silva, B.R.G.; Gomes, J.F.; Silva, Y.C.; Gonçalves, P.R.; Callado, H.C. Identificação anatômica de amostras comercializadas como espinheira-santa na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. *Paubrasília*, **2021**, *4*, e0064 <https://doi.org/10.33447/paubrasilia.2021.e0064>.
- [64] Calixto, J. B.; Messana, I.; Monache, F. D.; Ferrari, F.; Bisognin, T.; & Yunes, R. A. Pharmacological Analysis of The Methanolic Extract and Sorocein A, A New Diels-Alder Compound Isolated from The Roots of *Sorocea Bonplandii* Bailon in The Isolated Rat Uterus and Guinea Pig Ileum. *Pharmacol.: The Vascular System*, **1993**, *24* (4), 983. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(93\)90177-y](https://doi.org/10.1016/0306-3623(93)90177-y).
- [65] Antunes, K.A.; Monteiro, M.L.; Almeida, V.P.; Monchak, I.T.; Perera, W.H.; Heiden, G.; Guarino, E.S.G.; Santos, V.L.P.; Farago, P.V.; Raman, V.; Khan, I.A.; Manfron, J. Authentication and Quality Control of the Brazilian Traditional Herb "Espinheira-Santa" (*Monteverdia ilicifolia*) by Morpho-Anatomy and Microscopy. *J. Microsc. Microanal.*, **2023**, *29*(5), 1809. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad098>.
- [66] Soares, L. A.; Oliveira, A. L.; Ortega, G. G.; Petrovick, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2004**, *36* (4), 787. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.029>.

- [67] Hano, Y.; Yamanaka, J.; Nomuta, T.; Momose, Y. Sorocenois A and B, two new isoprenylated phenols from the root bark of *Sorocea bonplandii* bailu. *Heterocycles*, **1995**, 41 (5), 1035. Disponível em: <https://triggered.stanford.clockss.org/ServeContent?doi=10.3987%2Fcom-95-7040>.
- [68] Coulaud-Cunha, S.; Oliveira, R. S.; Waissmann, W. Venda livre de *Sorocea bomplandii* Bailon como Espinheira Santa no município de Rio de Janeiro- RJ. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, 14(supl.), <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000300019>.
- [69] Costa-Campos, L.; Ricken, D.G.; Scalco, S.R.; Citadini-Zanette, V. Antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Jacaranda puberula* Cham. (Bignoniaceae) and *Sorocea bonplandii* Baill. (Moraceae). *J. Med. Plants Res.* **2012**, 6(21), 3705. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.295>.
- [70] Caldas, D.K.; De Matos, W.R. Identificação das Espécies Comercializadas como “Espinheira-Santa” em Comércio Populares do Grande Rio e Baixada Fluminense – RJ, Brasil. *Uniciências* **2019**, 23(1), 57. <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2019v23n1p57-59>.
- [71] Gonzalez, F.G.; Portela, T.Y.; Stipp, E.J.; Di Stasi, L.C.; Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bonplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J Ethnopharmacol.* **2001**, 77(1), 41. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00268-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00268-9).
- [72] Bano, A.; Qadri, T.A.; Mahnoor; Khan, N. Bioactive metabolites of plants and microbes and their role in agricultural sustainability and mitigation of plant stress. *South African J. Bot.*, vol. 159, 2023, p. 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.049>.
- [73] Maleki, S. J.; Crespo, J. F.; Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.*, **2019**, 299, 125124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>.
- [74] Piza, W.A.; Silva, C.M.S.; Bruzadelli, R.F.D. Santini, A.T. Ribeiro, I.S. Estudo comparativo da composição fenólica e atividades antioxidante e antibacteriana de chás industrializados e artesanais. *Res. Soc. Develop.* **2021**, 10(7), e88107. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16295>.
- [75] Spence, C. Unveiling the Health-Promoting Power of Bioactive Compounds in Herbs and Spices. *Curr Food Sci Tech Rep* 3, 2, **2025**. <https://doi.org/10.1007/s43555-024-00046-4>.
- [76] Kisiriko, M.; Anastasiadi, M.; Terry, L.A.; Yasri, A.; Beale, M.H.; Ward, J.L. Phenolics from medicinal and Aromatic Plants: Characterisation and Potential as Biostimulants and Bioprotectants. *Molecules* **2021**, 26, 6343. DOI:10.3390/molecules26216343.
- [77] Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nat. Prod. Comm.* **2022**, 17, 14 pp. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>.
- [78] Sepahpour, S.; Selamat, J.; Abdul Manap, M.; Khatib, A.; & Abdull Razis, A. Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. *Molecules* **2018**, 23, 402. <https://doi.org/10.3390/molecules23020402>.
- [79] Lima, R.A.; Silva A.C. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. *Rev. Eletr. Gest. Edu. Tecnol. Amb.* **2015**, 20, 381. <https://doi.org/10.5902/2236117019537>.
- [80] Oliveira, C.C.A.; Santos, J.S. Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. *Res. Soc. Develop.* **2021**, 10(12), e263101220281. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20281>.
- [81] Llczbínski, P.; Bukowska, B. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Ind. Crops Prod.* **2022**, 175, 114265. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114265>.

- [82] Li, R.; Jia, K.; Chen, X-G.; Xiao, H-T. A novel curcuminoid-tea polyphenol formulation: Preparation, characterization, and in vitro anti-cancer activity. *J. Food Biochem.* **2016**, 41 (2), e12332. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12332>.
- [83] Pereira, J.A.M.; Casado, N.; Porto-Figueira, P.; Câmara, J.S. The Potential of Microextraction Techniques for the Analysis of Bioactive Compounds in Food. *Front. Nutr.* **2022**, 9, 825519. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.825519>.
- [84] Ting, Y. W.; Jiang, Y.; Ho, C. T.; Huang, Q. R. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *J. Funct. Foods* **2014**, 7, 112. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.010>.
- [85] Canuto, G.; Costa, J. L.; Cruz, P.; Souza, A.; Faccio, A.; Klassen, A.; Tavares, M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim. Nova*, **2018**, 41 (1), 75 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>.
- [86] Pilon, A.C.; Selegato, D.M.; Fernandes, R.P.; Bueno, P.C.P.; Pinho, D.R.; Neto, F.C.; Freire, R.T.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V.S. e Lopes, N.P. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. *Quim. Nova*, **2020**, 43 (3), 329. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>.
- [87] López-Lorente, A.I. Pena-Pereira, F. Pedersen-Bjergaard, S. Zuin, V.G. Ozkan, S.A. Psillakis, E. The ten principles of green sample preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, 148, 11653 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>.
- [88] Azorin, C.; Benedé, J.L.; Chisvert, A. Ultramicroextraction as a miniaturization of the already miniaturized. A step toward nanoextraction and beyond. *J. Sep. Sci.* **2023**, 46, 2300223. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300223>.
- [89] Reyes-Garcés, N.; Gionfriddo, E.; Gómez-Ríos, G.A.; Alam, N.; Boyacı, E.; Bojko, B.; Singh, V.; Grandy, J.; Pawliszyn, J. Advances in Solid Phase microextraction and Perspective on future directions. *Analytical Chemistry*. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (1), 302. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- [90] Speltini, A.; Scalabrini, A.; Maraschi, F.; Sturini, M.; Profumo, A. Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. *Anal. Chim. Acta.* **2017**, 974, 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.042>.
- [91] Gionfriddo, E. Development of Alternative Green Sample Preparation Techniques. *Separations*, **2020**, 7(2), 31. <https://doi.org/10.3390/separations7020031>.
- [92] Leite, J. P. V. Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, **2009**, 328 pp.
- [93] Silva, D. J.; De Queiroz, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: UFV, **2006**, 235 pp. ISBN: 85-7269-105-7.
- [94] Mazon, E.M.A; Roberto Sobrinho, M. Umidade in: In: Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. Editores, G.B. de Souza, M. Roberto Sobrinho, Y.; A.L.M. e Silva, **2016**, 5, 69. 1 Ed. São Paulo. ISBN 978-85-69725-00-8
- [95] Silva, A.L.M.; Carraro, C.I.; Pérez, M.A.R. Cinzas. In: Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal Editores, G.B. de Souza, M. Roberto Sobrinho, Y.; A.L.M. e Silva, **2016**, 5, 81. ISBN 978-85-69725-00-8.
- [96] Oreopoulou, A.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Extraction of Polyphenols from Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In: Watson, Ronald (ed.) *Polyphenols in Plants, 2nd edition.* **2019**, 15, 243. Academic Press. ISBN:978-0-12-813768-0.
- [97] Conrado, N.M., dos Santos, P.N.A., Dutra, M.C.P.; Krause, L.C.; Polidoro, A.S.; Lima, M.S.; dos Santos, A.L.; Caramão, E.B. Energized Dispersive Guided Extraction (EDGE), a New Extractive Approach of Phenolics from Açaí (E. oleracea) Seeds: Chemical

- Characterization, Antioxidant Properties, and Bioaccessibility of the Extracts. *Food Bioprocess Technol*, **2024**. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03490-1>.
- [98] C.E.M Corporation Automated Extraction System EDGE. Disponível em <http://cem.com/edge>, Acesso: 10/04/2024.
- [99] C.E.M Corporation Method Note Compendium Disponível em: https://cemcontenttype.s3.amazonaws.com/content/medialibrary/attachments/MetNote_EDGE_Compendium_v5.pdf. Acesso em: 15/04/2024.
- [100] Souza, M.R.R.; Santos, E.; Moraes, A.S.; Ribeiro, I.C.S.; Pinto, K.B.; Caramão, E.B.; Bjerk, T.R.; Krause, L.K. Green extraction of *Commiphora leptophloeos* Mart. – J. B. Gillett aiming to increase the content of hinokinin, an “emerging bioactive. *Sust. Chem. Pharm.* **2023**, 33, 1011128 <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101128>.
- [101] Black, G.P.; Woodward, E.E.; Sanders, C.J.; Gross, M.S.; Hladik, M.L. Multiresidue Extraction of current-use pesticides from complex solid matrices using energized dispersive guided Extraction with Analysis by gas and liquid Chromatography tandem mass spectroscopy. *Chemosphere* **2023**, 327, 138550. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138550>.
- [102] De Melo, A.P.Z.; Molognoni, L.M.; Daguer, H.; De Oliveira, T.; Hoff, R.B.; Barreto, P.L.M. A fast energized dispersive guided extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons for risk-based seafood monitoring after an oil spill. *Microchemical Journal*. **2024**, 196, 109714. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109714>.
- [103] Perez, M.; Dominguez-Lopez, I.; Lamuela-Raventos, Rosa M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, 71, 17543. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>.
- [104] Smeriglio, A.; Cornara, L.; Trombetta, D. Antioxidants in Diets and Food. *In: Handbook of Dietary Phytochemicals*. Xiao, J. Sarker, S.D., Asakawa, Y. **2021**, 2, 10. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4148-3_3.
- [105] Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; & Walker, R. B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58(11), 8139. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>.
- [106] Munteanu, I. G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Intern. J. Molec. Sci.* **2021**, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [107] Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth. Enzymol.* **1999**, 299, 152. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- [108] Samara, M.; Nasser, A.; Mingelgrin, U. Critical Examination of the Suitability of the Folin-Ciocalteu Reagent Assay for Quantitative Analysis of Polyphenols—The Case of Olive-Mill Wastewater. *Am. J. Anal. Chem.* **2022**, 13, 476. <https://doi.org/10.4236/ajac.2022.1311032>.
- [109] Kotha, R.R.; Tareq, F.S.; Yildiz, E.; Luthria, D.L. Oxidative Stress and Antioxidants - A Critical Review on *In Vitro* Antioxidant Assays. *Antioxidants* (Basel), **2022**, 11(12):2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>.
- [110] Sadeer, B.; N.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; & Mahomoodally, M. F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety - Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, **2020**, 9(8), 709. DOI:10.3390/antiox9080709
- [111] Vastrad, V.J.; Badanayak, P.; Goudar, G. Phenolic Compounds in Tea: Phytochemical, Biological, and Therapeutic Applications. *Phenolic Compounds* -

- Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Intechopen*. **2022**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98715>.
- [112] Sorrenti V.; Burò, I.; Consoli, V.; Vanella, L. Recent Advances in Health Benefits of Bioactive Compounds from Food Wastes and By-Products: Biochemical Aspects. *Int J Mol Sci*. **2023**. <https://doi.org/10.3390/ijms24032019>.
- [113] Ramphinwa, M.L.; Mchau, G.R.A.; Mashau, M.E.; Madala, N.E.; Chimonyo, V.G.P.; Modi, T.A.; Mabhaudhi, T.; Thibane, V.S.; Mudau, F. N. Eco-physiological response of secondary metabolites of teas: Review of quality attributes of herbal tea. *Front. Sustain. Food Syst.*, **2023**, 7:990334. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.990334>.
- [114] Mendonça, J.D.S.; Guimarães, R.D.C.A.; Zorgetto-Pinheiro, V.A.; Fernandes, C.D.P.; Marcelino, G.; Bogó, D.; Freitas, K.d.C.; Hiane, P.A.; de Pádua Melo, E.S.; Vilela, M.L.B.; Nascimento, V.A. . Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, **2022**, 27, 3563. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>.
- [115] Rumpf, J.; Burger, R.; Schulze, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol*. **2023** Apr 1;233:123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.
- [116] Liang, N.; Kitts D.D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* **2014**, 19, 19180. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>.
- [117] Kopjar, M.; Tadić, M.; Piližota, V. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *Chem. Biol. Technol. Agricul.* **2015**, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0028-7>.
- [118] Silveira, A.C.; Kassuia, Y.S.; Domahovski, R.C.; Lazzarotto, M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. *Comunicado Técnico nº 421*. **2018**, EMBRAPA. ISSN1980-3982.
- [119] Sadeer, B.; N.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; Mahomoodally, M. F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety - Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, **2020**, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>.
- [120] Rufino, M.S.M.; Alves, R. E.; De Brito, E. E.; De Moraes, S. S.; Sampaio, S.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. *Comunicado Técnico nº 128*, **2007**, EMBRAPA. ISSN1679-6535.
- [121] Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- [122] Rufino, M.S.M.; Alves, R.E. Brito, E.S.; Moraes, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico nº 125*, **2006**. ISSN 1679-6535.
- [123] Borlinghaus, J.; Reiter, J.; Ries, M.; Gruhlke, M. C. H. . Screening procedures and tests for antioxidants. *Pathology*, **2020** 389–395. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815972-9.00037-8> .
- [124] de Souza, A.L.C.; Pires, A.R.; Moraes, C.A.F.; de Matos, C.H.C.; dos Santos, K.I.P.; Silve, R.C.; Acuña, S.P.C.; Araújo, S.S. Chromatographic Methods for Separation and Identification of Bioactive Compounds. In: Cruz, J.N. (eds) *Drug Discovery and Design Using Natural Products*. Springer, Cham., **2023**. https://doi.org/10.1007/978-3-031-35205-8_6.

- [125] Lanças, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2ª Ed. **2016**, 13&14, 291. ISBN: 978-85-7670-269-6.
- [126] Cavaliere, C.; Capriotti, A.L.; La Barbera, G.; Montone, C.M.; Piovesana, S.; Laganà, A. Liquid Chromatographic Strategies for Separation of Bioactive Compounds in Food Matrices. *Molecules*, **2018**, 27;23(12):3091. <https://doi.org/10.3390/molecules23123091>.
- [127] Lanças, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, **2009**, 1(2), 35. <https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>.
- [128] Nie, Q.; Nie, S. High-performance liquid chromatography for food quality evaluation. *Eval. Technol. Food Qual.* **2019**, 267. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00013-5>.
- [129] Khoo, H. T.; Leow, C. H. Advancements in the preparation and application of monolithic silica columns for efficient separation in liquid chromatography. *Talanta*, **2021**, 224. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121777>
- [130] Mukherjee, P. K. High-Performance Liquid Chromatography for Analysis of Herbal Drugs. *Qual. Control Eval. Herbal Drugs*, **2019**, 421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00010-7>.
- [131] Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Sass-Kiss, A.; Segura-Carretero, A. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography *HPLC Modern Techniques for Food Authentication*, **2018**, second Edition, 459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00013-X>.
- [132] Majik, M. S.; Gawas, U. B.; Mandrekar, V. K. Analytical methods for natural products isolation: Principles and applications. *Adv. Biol. Sci. Res.* **2019**, 395. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00024-0>.
- [133] Hussain, C. M.; Keçili, R. Separation techniques for environmental analysis. *Modern Environ. Anal. Tech. Pollut.* **2020**, 163. 65 . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816934-6.00007-2>.
- [134] Nesterenko, P. N.; Palamareva, M. D. Liquid Chromatography: Overview. Reference Module in Chemistry, *Mol. Sci. Chem. Eng.* **2019**, 174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14214-3>.
- [135] Yabré, M.; Ferey, L.; Somé, I.T.; Gaudin, K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules*. **2018**, 2;23(5):1065. <https://doi.org/10.3390/molecules23051065>.
- [136] Lee, J.-E.; Jayakody, J.T.M.; Kim, J.-I.; Jeong, J.-W.; Choi, K.-M.; Kim, T.-S.; Seo, C.; Azimi, I.; Hyun, J.; Ryu, B. The Influence of Solvent Choice on the Extraction of Bioactive Compounds from Asteraceae: A Comparative Review. *Foods*, **2024**, 13, 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>.
- [137] Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D.G.; Lightfoot, D.A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, **2017**, 6, 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>.
- [138] Nagy, K.; Vékey, K. Separation methods. In: Medical Applications of Mass Spectrometry, **2008**, 61–92. <https://doi.org/10.1016/b978-044451980-1.50007-0>.
- [139] Hurkul, M.M.; Cetinkaya, A.; Yayla, S.; Ozkan, S.A. Advanced sample preparation and chromatographic techniques for analyzing plant-based bioactive chemicals in nutraceuticals, *J. Chrom. Open*, Volume 5, **2024**. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2024.100131>.
- [140] Soares, J.X.; Santos, Á.; Fernandes, C.; Pinto, M.M.M. Liquid Chromatography on the Different Methods for the Determination of Lipophilicity: An Essential Analytical Tool in Medicinal Chemistry. *Chemosensors*, **2022**, 10, 340. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10080340>

- [141] Cerqueira, U. M. F. M.; Bezerra, M. A.; Ferreira, S. L. C.; de Jesus Araújo, R.; da Silva, B. N.; & Novaes, C. G. Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. *Food Chem.* **2021**, 364, 130429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130429>.
- [142] Cornejo-Báez, A. A.; Peña-Rodríguez, L. M.; Álvarez-Zapata, R.; Vázquez-Hernández, M.; Sánchez-Medina, A. Chemometrics: A Complementary Tool to Guide the Isolation of Pharmacologically Active Natural Products. *Drug Discov. Today*, **2020**, 25, 27. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.016>.
- [143] Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; Carvalho, V. S.; Silva, E. G. P.; Queiroz, A. F. S.; Felix, C. S. A.; Silva, D. L. F.; Dourado, G. B.; & Oliveira, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchem. J.* **2018**, 140, 176. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>.
- [144] Barros Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. *Quím. Nova*, **2006**, 29, 1401 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042>.
- [145] Ferreira, M.M.C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações [online]. Campinas, SP. Editora da UNICAMP ISBN:978-85-268-1471-4. **2015**, 493 pp. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>.
- [146] Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S. Escaleira, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical Chemistry. *Talanta*, **2008**, 76, 965. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- [147] Pereira, L.M.S.; Milan, T.M.; Tapia-Blácido, D.R. Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biom. Bioenergy* **2021**, 151, 106166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106166>.
- [148] Mishra, P.; Roger, J.-M.; Jouan-Rimbaud-Bouveresse, D.; Biancolillo, A.; Marini, F.; Nordon, A.; Rutledge, D. N. Recent Trends in Multi-Block Data Analysis in Chemometrics for Multi-Source Data Integration. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, 137, 116206. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116206>
- [149] Novaes, C. G.; Bezerra, M. A.; da Silva, E. G. P.; Santos, A. M. P. D.; Romão, I. L. D. S.; Santos Neto, J. H. A Review of Multivariate Designs Applied to the Optimization of Methods Based on Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES). *Microchem. J.* **2016**, 128, 331. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.015>
- [150] Riswanto, F.D.O.; Rohman, A.; Pramono, S.; Martono, S. Application of response surface methodology as mathematical and statistical tools in natural product Research. *J. Applied Pharm. Sci.* **2019**, 9(10), 125. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.91018>
- [151] Tortorella, S.; Cinti, S. How Can Chemometrics Support the Development of Point of Need Devices? *Anal. Chem.* **2021**, 93(5), 2713. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04151>.
- [152] Hu, Y.; Massart, D. L. Uniform shell designs for optimization in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1989**, 485. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)89146-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)89146-9)
- [153] Ferreira, S.L.C.; dos Santos, W.N.L.; Quintella, C.M.; Neto, B.B.; Bosque-Sendra, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry. Review. *Talanta*, **2004**, 63(4), 1061. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015>.
- [154] Jana, D. K.; Roy, S.; Dey, P.; Bej, B. Utilization of a Linguistic Response Surface Methodology to the Business Strategy of Polypropylene in an Indian Petrochemical Plant. *Cleaner Chem. Eng.* **2022**, 2, 100010. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100010>.
- [155] Pokuah, A. A.; Atuna, R. A.; Akabanda, F.; Amagloh, F. K Enrichment of Bread with Soy milk Using Response Surface Methodology. *Food Chem. Adv.* **2024**, 4, 100570. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100010>.

- [156] Li, Z.; Lu, D.; & Gao, X. Optimization of mixture proportions by statistical experimental design using response surface method - A review. *J. Build. Eng.* **2021**, 36, 102101. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2022.119305>.
- [157] Moreira, G.C.; Dias, F.S. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. *Microchem. J.* **2018**, 141, 247. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.035>.
- [158] Santos, F.A.C.; Novaes, C.G.; Pires, R. M.; Barreto, G.E.; do Nascimento, B.B. Jr.; Giraldez, A.L.D. Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from *Spondias mombin* L Apple Bagasse Agroindustrial Residues. *Frontiers in Chemistry* **2018**, 5, 116. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00116>.
- [159] Skrypnik, L.; Novikova, A. Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple *Pomace* Based on Nonionic Emulsifiers. *Agronomy* **2020**, 10, 92. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010092>.
- [160] Alavi-Borazjani, S.A.; Gomes, H.G. M. de F., Tarelho, L.A.C.; Capela, M.I. Application of Doehlert design in optimizing the solid-state hydrogenogenic stage augmented with biomass fly ash in a two-stage biohythane production process. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2023**, 46, 879. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02873-6>.
- [161] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 519 de 26 de junho de **1998**. Acesso: 25/05/2024.
- [162] Farmacopéia Brasileira, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6ª Edição, Volume 1, **2024**.
- [163] Valentini, S. A.; Carneiro, A. L. C.; Carneiro, A. L. C. Avaliação dos parâmetros de qualidade de amostras de chás comerciais da região de campo mourão – Paraná. *SaBios*, **2018**, 13, 1-11. ISSN: 1980-0002.
- [164] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, 28, 25. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [165] Mukherjee, P.K. Qualitative Analysis for Evaluation of Herbal Drugs. In: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, chapter 4, **2019**, Pages 79-149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00004-1>.
- [166] Camargo, D. G. K.; Caetano, J. N.; Camargo, E. E. S. Identification and pharmacognostic control of the species: *Mentha x villosa*, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* and *Melissa officinalis*. *Brazilian Journal of Development*, **2022**, 8(10), 65329–65345. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n10-026>.
- [167] Wang, H.; Chen, Y.; Wang, L.; Liu, Q.; Yang, S.; Wang, C. Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices. *Front Pharmacol.* **2023**, 25;14:1265178. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1265178>.
- [168] Unuigbo, C.; Enahoro, J.; Erharuyi, O.; Okeri, H.A. Phytochemical analysis and antioxidant evaluation of lemon grass (*Cymbopogon citratus* DC.) Stapf leaves. *J. Appl. Sci. Environ Manag*, Vol. 23, n2. **2019**. <https://doi.org/10.4314/jasem.v23i2.4>.
- [169] Mabai, P.; Omolola, A.; Jideani, A. I. O. (2018). *Effect of Drying on Quality and Sensory Attributes of Lemongrass (Cymbopogon citratus) Tea*. *Journal of Food Research*, **2018**, 7(2), 68. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n2p68>.
- [170] Mazon, E.M.A.; Roberto Sobrinho, M. Umidade in: In: Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em Análise centesimal. Editores, G.B. de Souza, M.Roberto Sobrinho, Y.; A.L.M. e Silva, **2016**, 5, 69. 1 ed. São Paulo. ISBN 978-85-69725-00-8.
- [171] Gantner, M.; Kostyra, E.; Górski-Horczyzak, E.; Piotrowska, A. Effect of Temperature and Storage on Coffee's Volatile Compound Profile and Sensory Characteristics. *Foods*, **2024**, 13, 3995. <https://doi.org/10.3390/foods13243995>.

- [172] Ramphinwa, M.L.; Mchau, G.R.A.; Mashau, M.E.; Madala, N.E.; Chimonyo, V.G.P.; Modi, T.A.; Mabhaudhi, T.; Thibane, V.S.; Mudau, F.N. Eco-physiological response of secondary metabolites of teas: Review of quality attributes of herbal tea. *Front. Sustain. Food Syst.*, **2023**, 7:990334. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.990334>.
- [173] Valli, M.; Russo, H.M.; Bolzani, V.S. The potential of the Brazilian biodiversity for the development of novel natural products: Review of recent developments in the chemistry of natural products. *Rev Virt Quím.* v. 10, n. 6, p. 1624-1644, **2018**. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>.
- [174] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- [175] ElGamal, R.; Song, C.; Rayan, A.M.; Liu, C.; Al-Rejaie, S.; ElMasry, G. Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, **2023**, 13, 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>.
- [176] Kouassi, E.K.; Coulibaly, I.; Rodica, P.; Pintea, A.; Ouattara, S.; Odagiu, A. HPLC Phenolic Compounds Analysis and Antifungal Activity of extracts from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. against *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum sp tulipae*. *J. Scien. Res. Rep.* **2017**, 14, 1. ISSN:2320-0227.
- [177] Irfan, S.; Ranjha, M.M.A.N.; Nadeem, M.; Safdar, M.N.; Jabbar, S.; Mahmood, S.; Murtaza, M.A.; Ameer, K.; Ibrahim, S.A. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Sonication- and Maceration-Assisted Ethanol and Acetone Extracts of *Cymbopogon citratus* Leaves. *Separations*, **2022**, 9, 244. <https://doi.org/10.3390/separations9090244>.
- [178] Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Ukaegbu, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, **2021**, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.
- [179] Osorio-Tobón, J.F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *J Food Sci Technol* . **2020**, 57, 4299–4315. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2>.
- [180] Alirezalu, A.; Ahmadi, N.; Salehi, P.; Sonboli, A.; Alirezalu, K.; Mousavi Khaneghah, A.; Barba, F.J.; Munekeata, P.E.S.; Lorenzo, J.M. Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds of Hawthorn (*Crataegus* spp.) Fruits Species for Potential Use in Food Applications. *Foods*, **2020**, 9, 436. <https://doi.org/10.3390/foods9040436>.
- [181] Čulum, D.; Čopra-Janićjević, A.; Vidic, D. The investigation of selected bioactive compounds and antioxidant properties of *Crataegus monogyna* L. *Nat Prod Res.* 2024 Jul 1:1-5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2367009>.
- [182] Abu-Gharbieh, E.; Shehab, N.G. Therapeutic potentials of *Crataegus azarolus* var. *eu-azarolus* Maire leaves and its isolated compounds. *BMC Complement Altern Med.* 2017 Apr 18;17(1):218. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1729-9>.
- [183] Ferioli, F. ; Giambanelli, E.; D'Antuono, L. F. Application of different analytical methods for the determination of phenolics and antioxidant activity in hawthorn (*Crataegus* spp.) bud and sprout herbal extracts. *J Appl. Botany & Food Quality*, **2020**, Vol 93, p1. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.001>.
- [184] Borlinghaus, J.; Reiter, J.; Ries, M.; Gruhlke, M. C. H. Screening procedures and tests for antioxidants. *Pathology*, **2020**, 389–395. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815972-9.00037-8> .
- [185] Pérez M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R.M. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J Agric Food Chem.* **2023** Nov 22;71(46):17543-17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>.

- [186] Shi, L.; Zhao, W.; Yang, Z.; Subbiah, V.; Suleria, H.A.R. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ Sci Pollut Res* 29, 81112–81129, **2022**. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>.
- [187] Gulcin, İ.; Alwasel, S.H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* **2023**, *11*, 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>.
- [188] Belabdeli, F.; Bekhti, N.; Piras, A.; Benhafsa, F. M.; Ilham, M.; Adil, S.; Anes, L. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Crataegus monogyna* leaves' extracts. *Natural Product Research*, **2021**, *36*(12), 3234–3239. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1958215>.
- [189] Hamza, A.A.; Lashin, F.M.; Gamel, M.; Hassanin, S.O.; Abdalla, Y.; Amin, A. Hawthorn Herbal Preparation from *Crataegus oxyacantha* Attenuates In Vivo Carbon Tetrachloride -Induced Hepatic Fibrosis via Modulating Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants*, **2020**, *9*, 1173. <https://doi.org/10.3390/antiox9121173>.
- [190] Aris, H.M.; Mohd Kasim, Z.; Zubairi, S.I.; Babji, A.S. Antioxidant capacity and sensory quality of soy-based powder drink mix enriched with functional hydrolysates of swiftlet (*Aerodramus fuciphagus*). *Arabian J. Chem.*, **2023**, *16*, 104553. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104553>.
- [191] Mizzi, L.; Chatzitzika, C.; Gatt, R.; Valdramidis, V. HPLC Analysis of Phenolic Compounds and Flavonoids with Overlapping Peaks. *Food Technol. Biotechnol.* **2020**, *58*(1), 1. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.01.20.6395>. 68
- [192] Flandez, L.E.L.; Castillo-Israel, K.A.T.; Rivadeneira, J.P.; Tuaño, A.P.P.; Hizon-Fradejas, A.B. Development and Validation of an HPLC-DAD Method for the Simultaneous Analysis of Phenolic Compounds. *Malaysian J. Fund. Applied Sci.* **2023**, *19*, 855. DOI:10.17113/ftb.58.01.20.6395.
- [193] Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. **2010**, *21*;15(10):7313-52. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- [194] Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* **2009** Nov-Dec;2(5):270-8. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.
- [195] Valanciene, E.; Jonuskiene, I.; Syrpas, M.; Augustiniene, E.; Matulis, P.; Simonavicius, A.; Malys, N. Advances and Prospects of Phenolic Acids Production, Biorefinery and Analysis. *Biomolecules*. **2020**, *6*;10(6):874. <https://doi.org/10.3390/biom10060874>.
- [196] Huang, W.Y.; Cai, Y. Z.; Zhang, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*. **2010**;62(1):1-20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>.
- [197] Coelho, M.; Rocha, C.; Cunha, L. M.; Cardoso, L.; Alves, L.; Lima, R. C.; Pintado, M. Influence of harvesting factors on sensory attributes and phenolic and aroma compounds composition of *Cymbopogon citratus* leaves infusions. *Food Res. Inter.* **2016**, *89*, 1029. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.008>.
- [198] Zhang, L.L.; Zhang, L.F.; Xu, J.G. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8876. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65802-7>.
- [199] Abarikwu, S. O.; Olufemi, P. D.; Lawrence, C. J.; Wekere, F. C.; Ochulor, A. C.; Barikuma, A. M. Rutin, an antioxidant flavonoid, induces glutathione and glutathione peroxidase activities to protect against ethanol effects in cadmium-induced oxidative stress in the testis of adult rats. *Andrologia*, **2017**, *49*(7), 1. . <https://doi.org/10.1111/and.12696>.

- [200] Menhart, A.D.; Damin, F.M.; Caldeirão, L.; Teixeira-Filho, J.; Godoy, H.T. Rutin in herbs and infusions: screening of new sources and consumption estimation. *Food Sci. Technol*, Campinas, 40(Suppl. 1): 113-120, June **2020**. ISSN 1678-457X.
- [201] Wu, F.; Liu, R.; Shen, X.; Xu, H.; Sheng, L. Study on the interaction and antioxidant activity of theophylline and theobromine with SOD by spectra and calculation. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2019**, 215, 354. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.001>.
- [202] Meinhart, A.D.; Damin, F.M.; Caldeirão, L.; Godoy, H.T. Methylxanthines in 100 Brazilian herbs and infusions: determination and consumption. *Emirates J. Food Agric.* **2019**, 31(2), 1125. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i2.1916>.
- [203] Vastrad, J. V.; Byadgi, S. A.; Goudar, G.; Kotur, R. Characterization of phytoconstituents in leaf extracts of forest species for textile applications. *Forest Prod. J.* **2014**, 64(7-8), 259. <https://doi.org/10.13073/FPJ-D-13-00049> 69
- [204] Vastrad, V.J.; Badanayak, P.; Goudar, G. Chapter 20: Phenolic Compounds in Tea: Phytochemical, Biological, and Therapeutic Applications In: Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications **2021**, 20, Biochemistry. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98715>.
- [205] Wanasundara, U; Amarowicz, R; Shahidi, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *J Agric Food Chem* **1994**; 42 (6): 1285-90. ISSN 0021-8561.
- [206] Muflihah, Y.M.; Gollavelli, G.; Ling, Y.C. Correlation Study of Antioxidant Activity with Phenolic and Flavonoid Compounds in 12 Indonesian Indigenous Herbs. *Antioxidants* (Basel). 2021 Sep 27;10(10):1530. doi: 10.3390/antiox10101530.
- [207] Zeb, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem.* **2020**, 44(9):e13394. doi: 10.1111/jfbc.13394.
- [208] Grodowska K.; Parczewski, A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm.* **2010** Jan-Feb;67(1):3-12. PMID: 20210074. ISSN 0001-6837.
- [209] González-Montelongo, R.; Lobo, M.G.; González, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem.* **2010**; 119:1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>.
- [210] Kaczorová D.; Karalija E, Dahija S, Bešta-Gajević R, Parić A, Čavar Zeljković S. Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two Achillea Species. *Molecules*, **2021**, 13;26(6):1601. <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>.
- [211] Dorta, E.; Lobo, M.G.; Gonzalez, M. Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *J. Food Sci.* **2012**;77:80–88. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x.
- [212] Lafka T.-I.; Sinanoglou V.; Lazos E.S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **2007**; 104:1206–1214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.068>.
- [213] Calabrese, E.J.; Pressman, P.; Hayes, A.W.; Dhawan, G.; Kapoor, R.; Agathokleous, E.; Calabrese, V. Rutin, a widely consumed flavonoid, that commonly induces hormetic effects. *Food and Chemical Toxicology*, **2024**, v.187, 114626. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114626>.
- [214] Gao, Q.; Li, Y.; Li, Y.; ZHANG, Z.; LIANG, Y. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic acids commonly existed in vegetables and their relationship with structures. *Food Science and Technology*, Campinas, 42, e07622, **2022**. <https://doi.org/10.1590/fst.07622>.
- [215] Gullón, B.; Lú-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Lema, J. M.; Eibes, G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to

enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, **2017**, 67, 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>.

[216] Drinkwater, J.M.; Tsao, R.; Liu, R.; Defelice, C.; Wolyn, D.J. Effects of cooking on rutin and glutathione concentrations and antioxidant activity of green asparagus (*Asparagus officinalis*) spears. *J. FuncT.Foods*, **2015**, V.12, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.013>.

[217] Chaaban, H.; Ioannou, I.; Chebil, L.; Slimane, M.; Gérardin, C.; Paris, C.; Charbonnel, C.; Chekir, L.; Ghoul, M. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Processing and Preservation*, **2017**, 41(5), e13203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>.

[218] Lin, S.; Simal-Gandara, J.; Cao, H.; Xiao, J. The stability and degradation products of polyhydroxy flavonols in boiling water. *Current Research in Food Science*, **2023**, v.6, 100509. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100509>.

[219] Sun, C.; Wu, Z.; Wang, Z.; & Zhang, H. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Compl. and Altern. Med*, **2015**, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>.

[220] Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, A. E. M.; Rietjens, I. M. C. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol. and Med.*, **2001**, 31(7), 869–881. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00638-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00638-4).

[221] Nicolescu, A.; Babotă, M.; Barros, L.; Rocchetti, G.; Lucini, L.; Tanase, C.; Mocan A.; Bunea, C.I.; Crișan, G. Bioaccessibility and bioactive potential of different phytochemical classes from nutraceuticals and functional foods. *Front Nutr.* **2023**, 27;10:1184535. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1184535>.

[222] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso: 11/09/2024.

[223] Anandan, S.; Gowtham, H.G.; Shivakumara, C.S. *et al.* Integrated approach for studying bioactive compounds from *Cladosporium* spp. against estrogen receptor alpha as breast cancer drug target. *Sci Rep.*, **2022**, 12, 22446. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22038-x>.

[224] Friedman, M.; Jürgens, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric Food Chem*, **2000**, 48(6), 2101–2110. <https://doi.org/10.1021/jf990489j>.

[225] Barros, H. D. F. Q.; Baseggio, A. M.; Angolini, C. F. F.; Pastore, G. M.; Cazarin, C. B. B.; Marostica-Junior, M. R. Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International*, **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.010>.

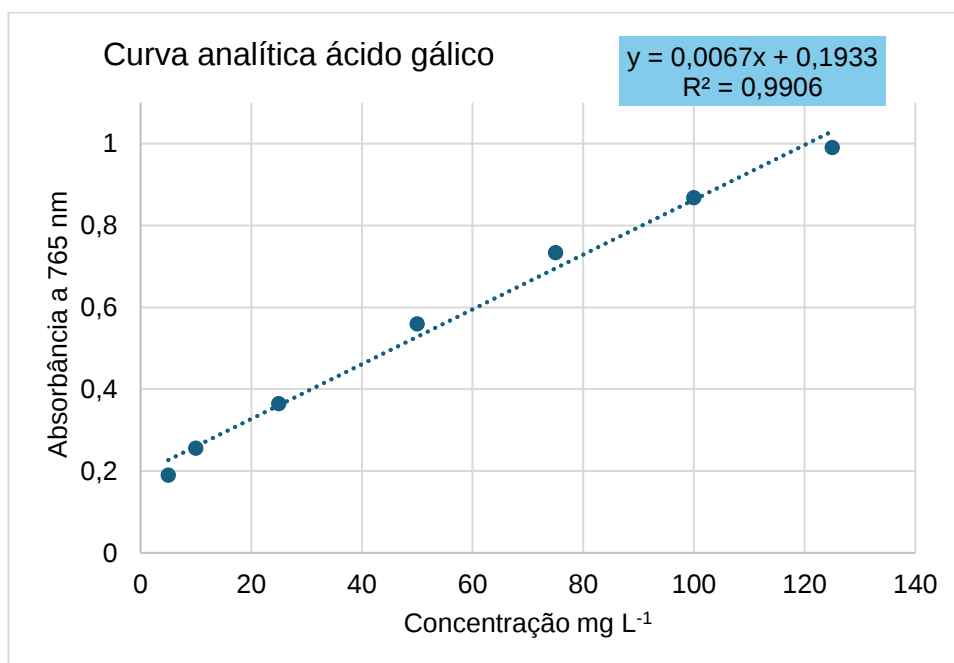
[226] Ossowski, T.; Goulart, M. O. F.; Abreu, F. C. de; Sant'Ana, A. E. G.; Miranda, P. R. B.; Costa, C. de O.; Liwo, A.; Falkowski, P.; Zarzeczanska, D. Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. *J Brazilian Chemical Society*, **2008**, 19(1), 175–183. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532008000100025>.

[227] Babić, S.; Horvat, A. J. M.; Mutavdžić Pavlović, D.; Kaštelan-Macan, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC*, **2007**, 26(11), 1043–1061. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>.

9 APÊNDICES

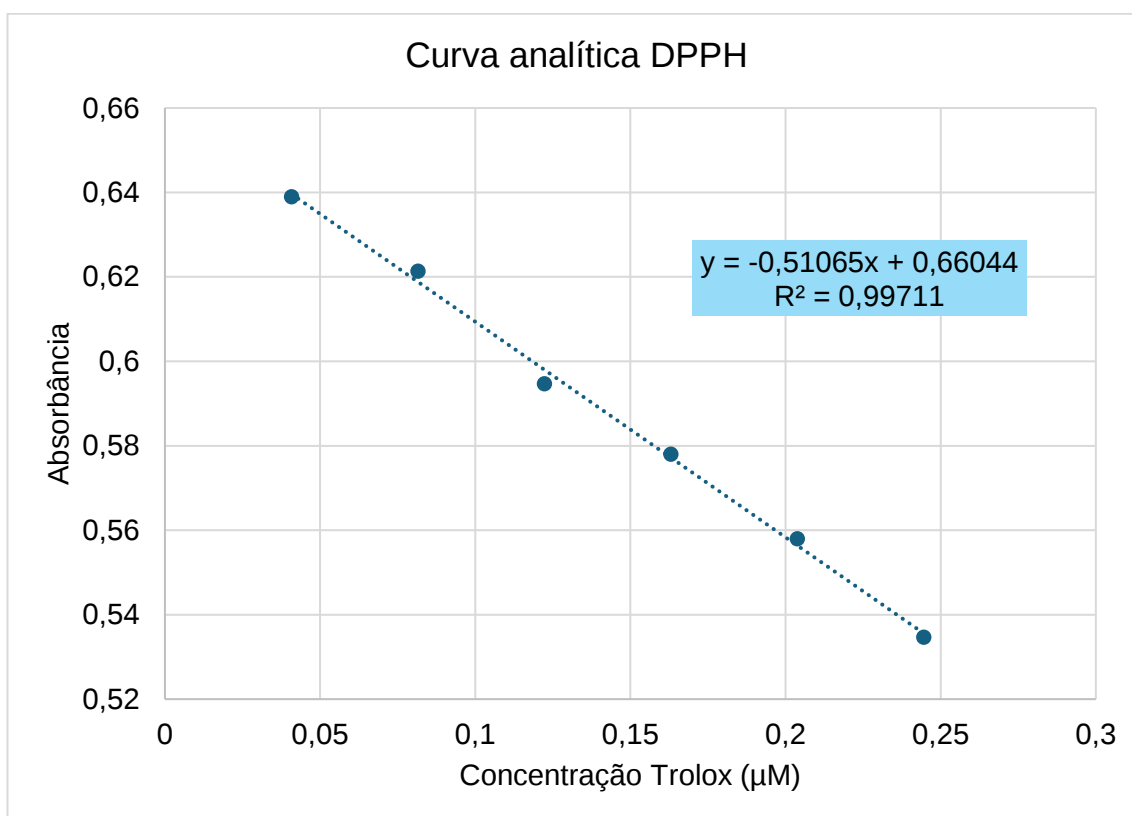
1: Curva analítica com padrão de ácido gálico para determinação de fenólicos totais por espectrofotometria. Leituras realizadas a 765 nm. Reações de Folin-Ciocalteu

Concentração (mg L ⁻¹)	Absorbância (nm)
5	0,190
10	0,256
25	0,365
50	0,560
75	0,734
100	0,868
125	0,991



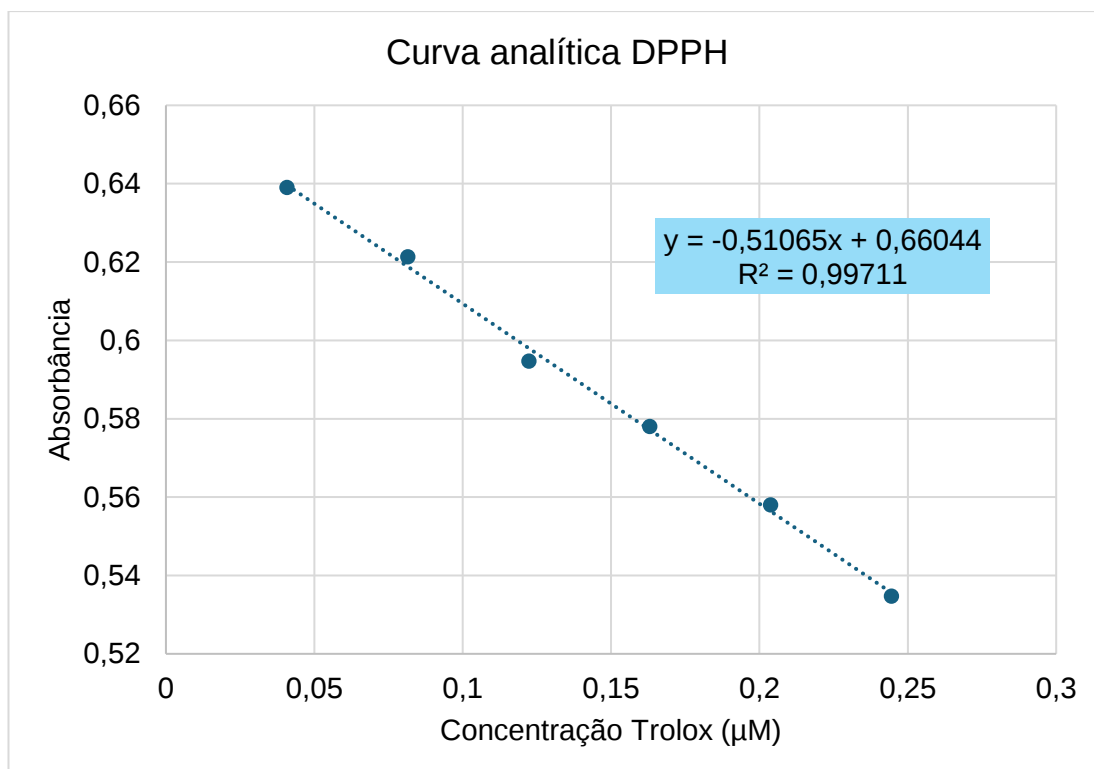
2: Curva analítica com padrão de Trolox para determinação de atividade antioxidante por espectrofotometria. Metodologia ABTS, Leituras realizadas a 734 nm.

Tubo	Conc (µM)	Absorbância (734 nm)
1	100	0,74
2	250	0,707
3	500	0,6311
4	750	0,554
5	1000	0,4895
7	1700	0,303
8	2000	0,2367



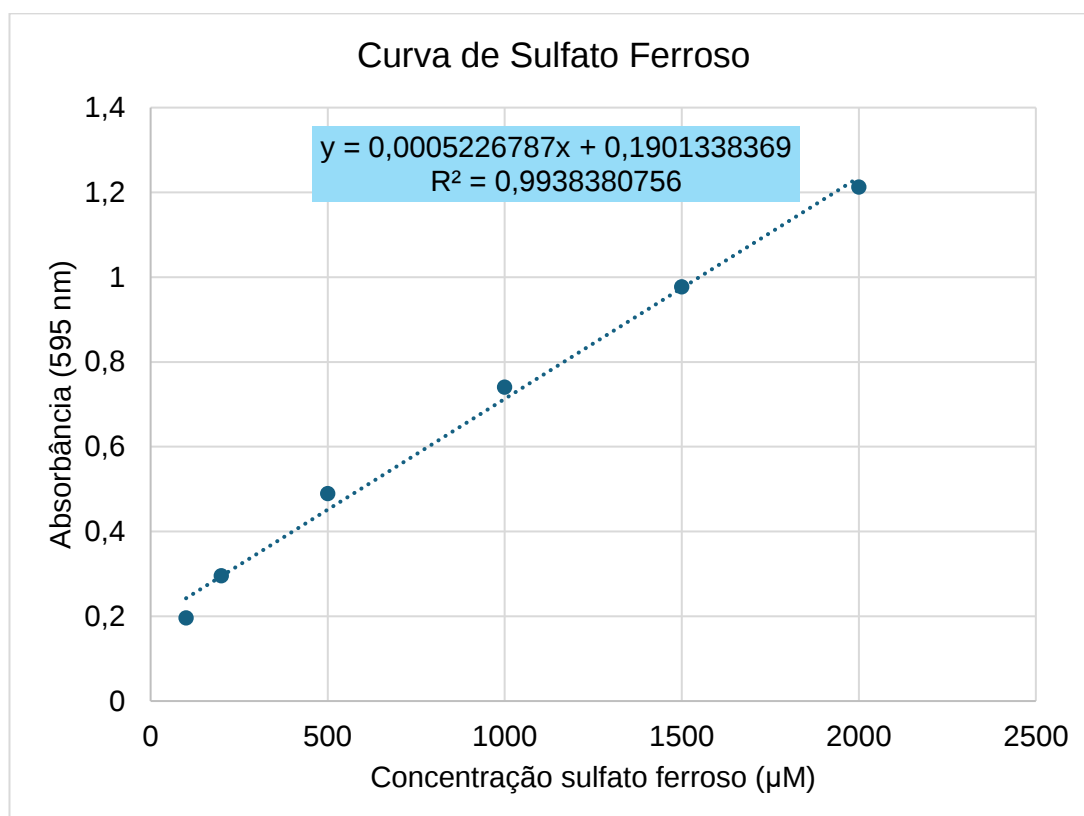
3: Curva analítica com padrão de Trolox para determinação de atividade antioxidante por espectrofotometria. Metodologia DPPH, Leituras realizadas a 515 nm.

Concentração (mM)	ABS1	ABS2	ABS3	ABS média
0,040751099		0,635	0,643	0,639
0,081502197	0,627	0,63	0,607	0,621333333
0,122253296	0,588	0,595	0,601	0,594666667
0,163004395	0,585	0,571	0,578	0,578
0,203755493	0,564	0,557	0,553	0,558
0,244506592	0,535	0,537	0,532	0,534666667
0,692768678	0,272	0,287	0,288	0,282333333

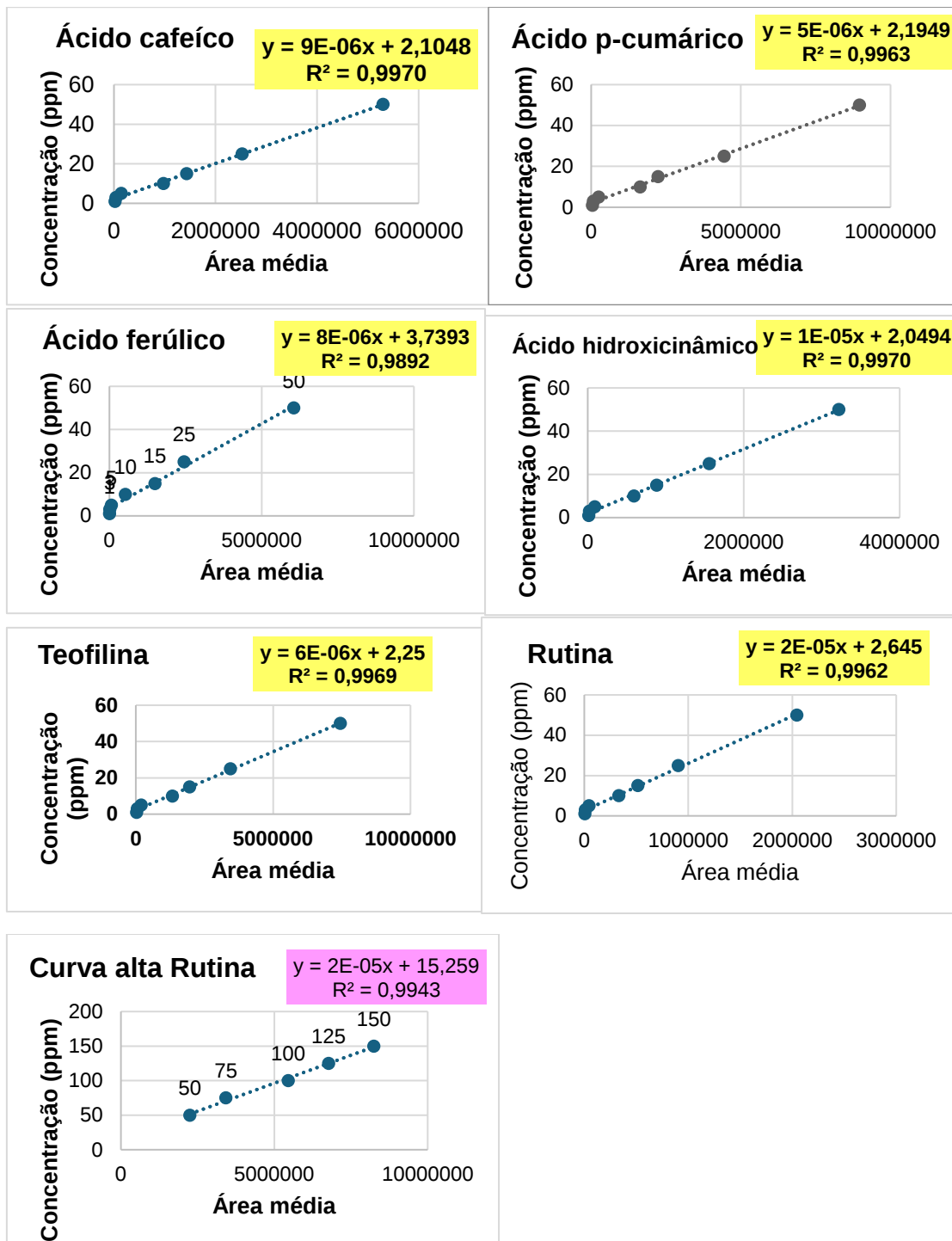


4: Curva analítica com padrão de Fe_2SO_4 para determinação de atividade antioxidante por espectrofotometria. Metodologia FRAP, Leituras realizadas a 595 nm.

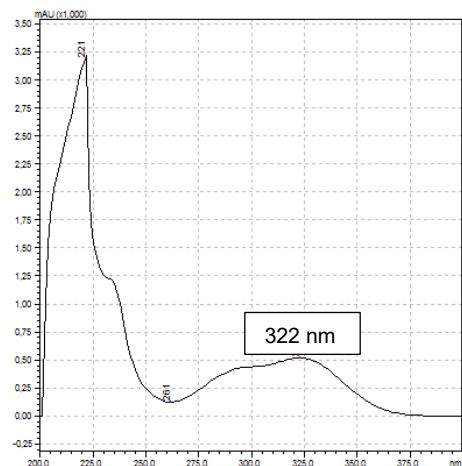
Tubo	Solução de sulfato ferroso (ml)	Água	Concentração (μM)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média
0	0,5	9,5	100	0,199	0,201	0,189	0,196333
1	1	9	200	0,299	0,301	0,287	0,295667
2	2,5	7,5	500	0,51	0,447	0,511	0,489333
3	5	5	1000	0,835	0,718	0,668	0,740333
4	7,5	2,5	1500	0,917	1,061	0,953	0,977
5	10	0	2000	1,229	1,215	1,193	1,212333



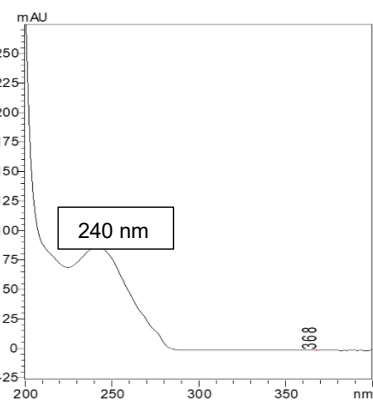
5: Curva analítica com padrões de fenólicos utilizada para quantificação cromatográfica por HPLC UV-Vis/DAD:



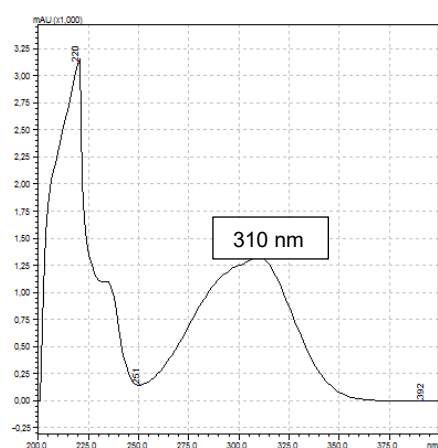
6: Espectros de comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) obtidos por análise de padrões certificados por HPLC/DAD



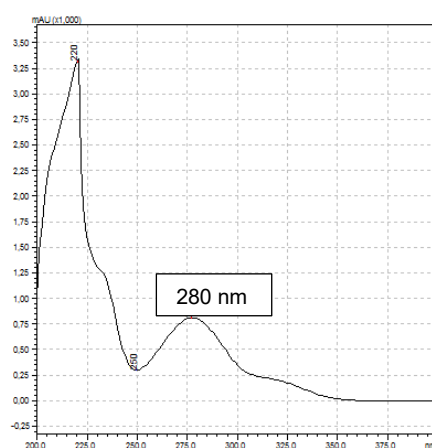
Ácido cafeíco



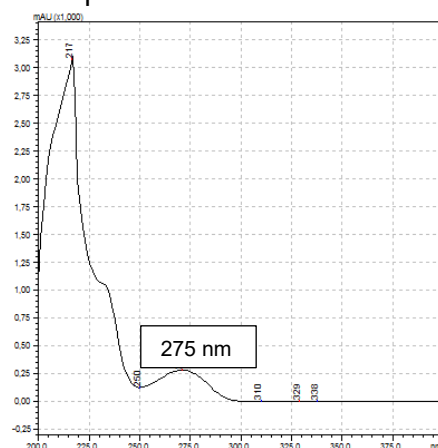
Ácido ferúlico



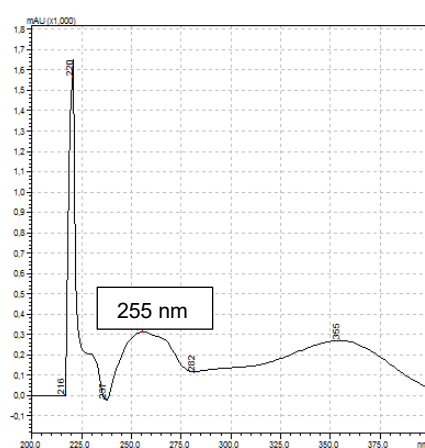
Ácido p-cumárico



Ácido cinâmico

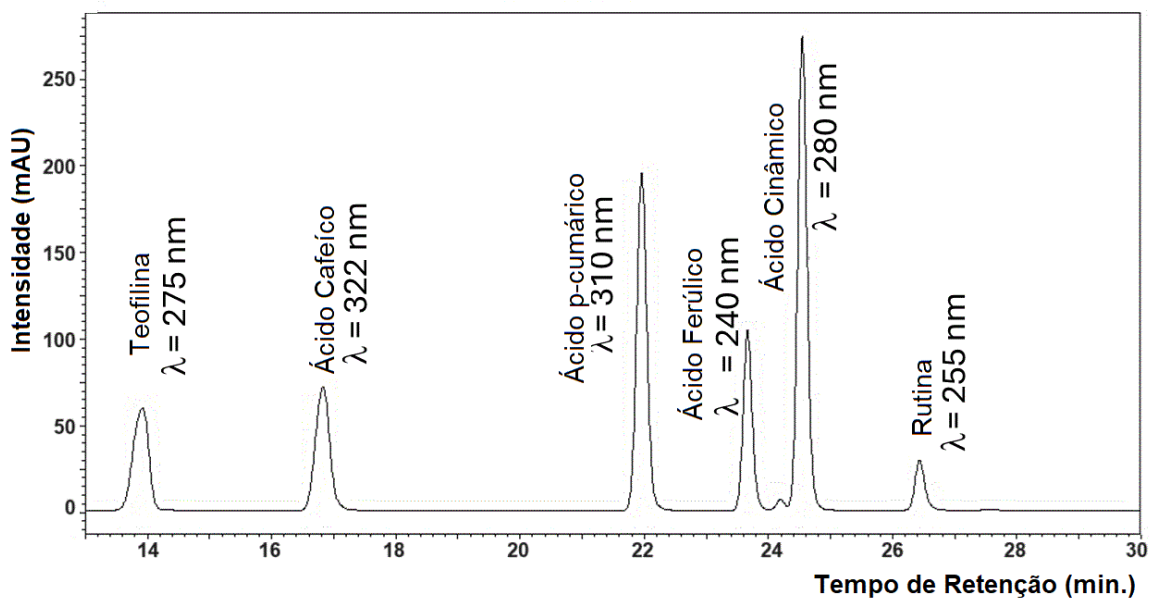


Teofilina



Rutina

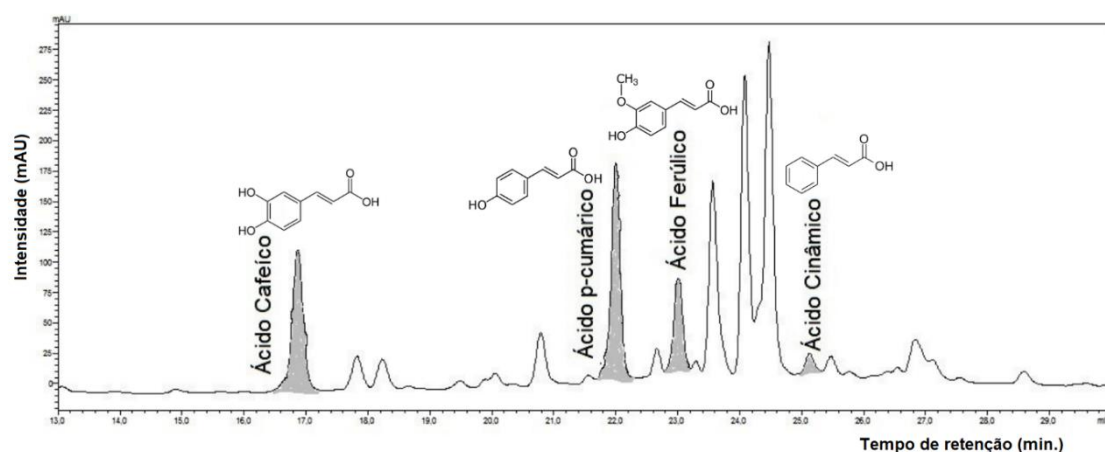
7: Cromatograma obtido por análise mix de padrões certificados por HPLC/DAD utilizados na curva analítica para a quantificação de compostos fenólicos.



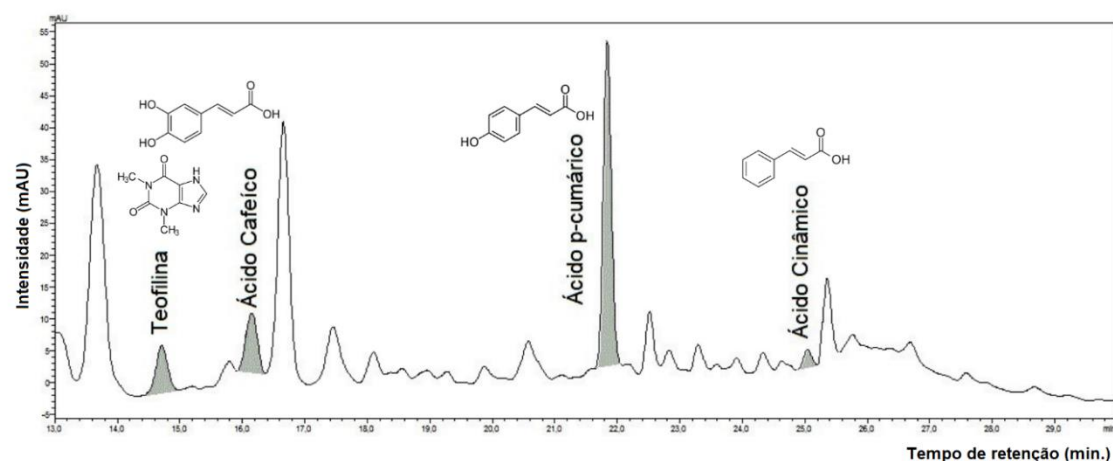
8. Tabela de padrões utilizados no mix de compostos fenólicos, tempos de retenção e comprimentos de onda de absorção máxima, massa molecular, fórmula molecular, constante de acidez e coeficiente de partição octanol-água.

Composto fenólico	Classe	Formula molecular	PM (g mol ⁻¹)	pKa	Log K _{ow}	T _R (min)	λ _{máx.} (nm)
Ácido cafeíco	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	4,62	1,15	16,79	322
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,64;9,45	1,79	21,98	310
Ácido cinâmico	Ácido fenólico	C ₉ H ₈ O ₂	148,16	4,45	2,07	25,24	280
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,58	1,51	23,54	240
Teofilina	Alcalóide	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,16	8,81	- 0,02	14,76	275
Rutina	Flavonóide	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	650,52	-	-	27,19	255

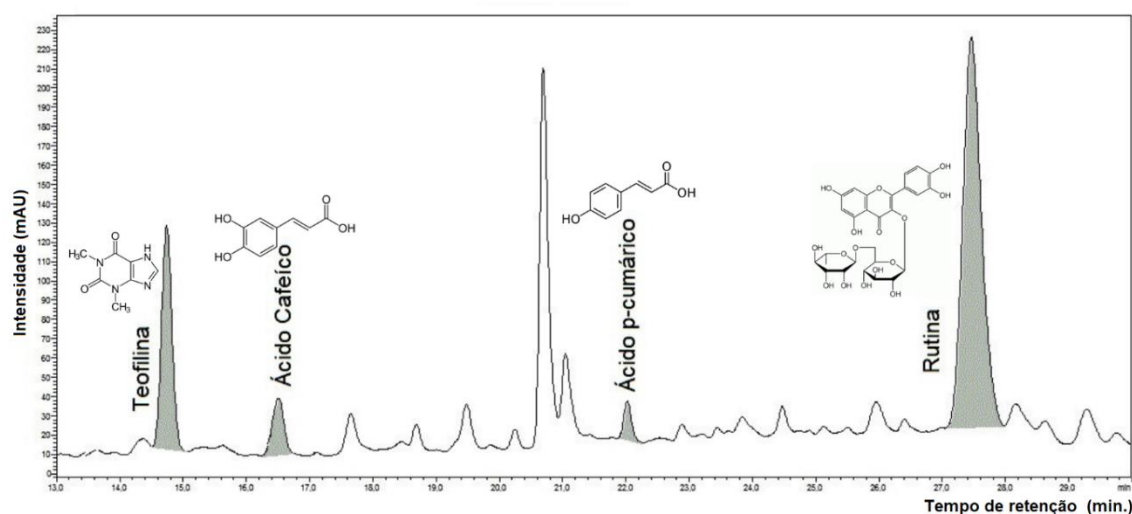
9: Cromatogramas obtidos para as análises dos extratos hidroetanólicos de folhas de chás Capim-limão, espinheira santa e espinheiro branco por HPLC/DAD identificando os compostos fenólicos observados.



Capim-limão.



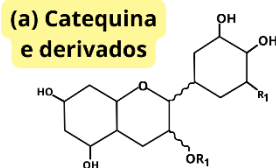
Espinheira santa



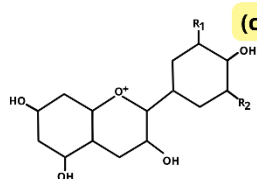
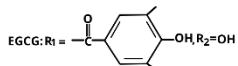
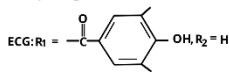
Espinheiro branco

10: Estruturas dos principais compostos fenólicos presentes em chás e infusões.

(a) Catequina e derivados



EC: $R_1 = R_2 = H$
EC: $R_1 = H, R_2 = OH$



(c) Antocianinas

Pelargonidina: $R_1 = R_2 = H$

Cianidina: $R_1 = OH, R_2 = H$

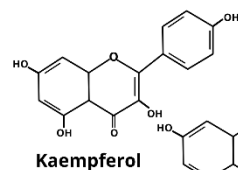
Peonidina: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Delfinidina: $R_1 = OH, R_2 = OH$

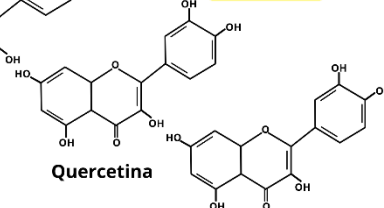
Petunidina: $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$

Malvadina: $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3$

(b) Flavonoides e Flavonóis

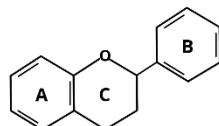


Kaempferol



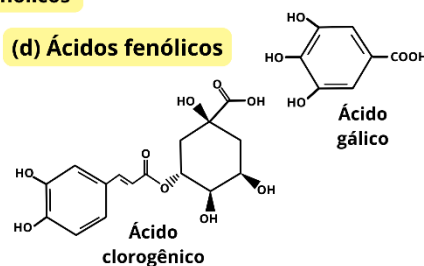
Quercetina

Quercitrina

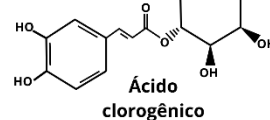


Esqueleto básico de compostos fenólicos
C6-C3-C6

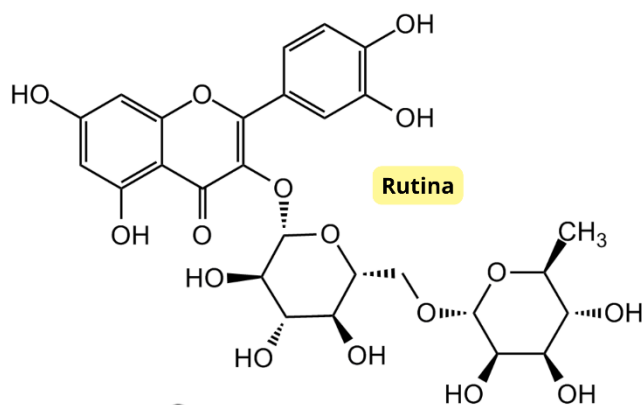
(d) Ácidos fenólicos



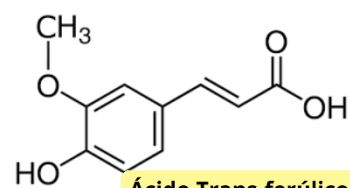
Ácido gálico



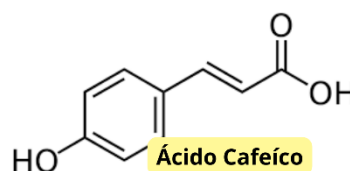
Ácido clorogênico



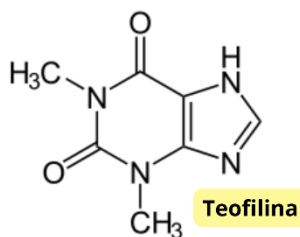
Rutina



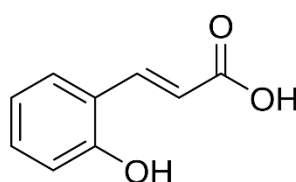
Ácido Trans-ferúlico



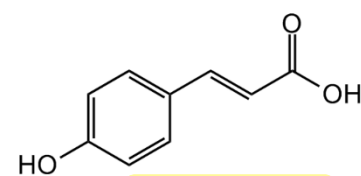
Ácido Cafeico



Teofilina



Ácido Hidroxi-cinâmico



Ácido p-Cumárico