



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAPHAEL AMANCIO DE JESUS

**Otimização de extração por ultrassom e micro-ondas de
compostos fenólicos das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E.
Brown e *Lantana camara* Linn.**

***Optimization of ultrasound and microwave extraction of
phenolic compounds from Lippia alba (Mill.) N. E. Brown and
Lantana camara Linn. leaves***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAPHAEL AMANCIO DE JESUS

Otimização de extração por ultrassom e micro-ondas de compostos fenólicos das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Lantana camara* Linn.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Regina de Souza Moraes

Optimization of ultrasound and microwave extraction of phenolic compounds from Lippia alba (Mill.) N. E. Brown and Lantana camara Linn. leaves

Thesis presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain Ph.D in Chemistry.



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

J58o Jesus, Raphael Amancio de
Otimização de extração por ultrassom e micro-ondas de compostos fenólicos das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Lantana camara* Linn / Raphael Amancio de Jesus ; orientadora Valéria Regina de Souza Moraes. - São Cristóvão, 2022.
212 f. :il.

Tese (doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Erva-cidreira. 2. Lantana. 3. Extração (Química). 4. Ultrassom. 5. Micro-ondas. 6. Fenóis. I. Moraes, Valéria Regina de Souza, orient. II. Título.

CDU 547



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 Tese de Doutorado de Raphael Amancio de Jesus apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 31/10/2022.

Prof.ª Dr.ª Valéria Regina de Souza Moraes
 Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene
 Departamento de Química - UFS

Documento assinado digitalmente



PERICLES BARRETO ALVES
 Data: 08/11/2022 10:31:48-0300
 Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Péricles Barreto Alves
 Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
 Embrapa Alimentos e Territórios

Prof.ª Dr.ª Quezia Bezerra Cass
 Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a otimização de extração por duas técnicas não convencionais, ultrassom (UAE) e micro-ondas (MAE), para a obtenção de extratos com melhores resultados de rendimento e conteúdo de fenólicos totais, de forma simultânea, a partir das folhas de *Lippia alba* e *Lantana camara*, separadamente, utilizando um planejamento Box-Behnken e metodologia de superfície de resposta (RSM). Os extratos de *L. alba* obtidos nas condições otimizadas por UAE (29% de etanol, 17,8 min e relação solvente para sólido de 71 mL/g) e MAE (43% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 600 W) resultaram em rendimentos de 20,33 e 26,94% e TPC de 30,86 e 41,13 mg EAG/g ms, respectivamente. Considerando a espécie *L. camara*, os extratos obtidos nas condições otimizadas por UAE (35% de etanol, 25 min e relação solvente para sólido de 60:1 mL/g) e MAE (53% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 300 W) forneceram rendimentos de 32,50 e 38,61% e TPC de 102,89 e 109,83 mg EAG/g ms, respectivamente. Os extratos obtidos por MAE a partir de cada espécie apresentaram maiores rendimentos de extração, conteúdo de fenólicos totais (TPC), conteúdo de flavonoides totais (TFC) e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) em relação aos respectivos extratos convencionais (maceração, infusão, decocção e Soxhlet), com destaque para os maiores resultados apresentados pela espécie *L. camara*. Os extratos obtidos por UAE a partir de cada espécie apresentaram maiores valores de TPC, TFC e de atividades antioxidantes em relação aos seus respectivos extratos de maceração e infusão. No entanto, os extratos obtidos a partir das duas espécies apresentaram baixas atividades citotóxicas frente a células tumorais e baixas atividades de inibição enzimática (AChE e BChE), indicando a necessidade de estudos mais aprofundados para se avaliar os seus reais potenciais biológicos com relação a essas atividades. Através das análises por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos foi possível verificar a presença de iridoides, ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides nos extratos de *L. alba* e *L. camara*, o que corrobora as elevadas atividades antioxidantes apresentadas pelos extratos dessas espécies.

Palavras-chave: *Lippia alba*; *Lantana camara*; Extração assistida por ultrassom; Extração assistida por micro-ondas, Compostos fenólicos.

ABSTRACT

In this work, extraction optimization was performed by two techniques, ultrasound (UAE) and microwave (MAE), to obtain, simultaneously, extracts with better results in yield and total phenolic content, from *Lippia alba* and *Lantana camara* leaves, separately, using a Box-Behnken design and response surface methodology (RSM). The extracts of *L. alba* obtained under the optimum conditions by UAE (29% ethanol, 17.8 min and solvent to solid ratio of 71 mL/g) and MAE (43% ethanol, 15 min and microwave power of 600 W) resulted in yields of 20.33 and 26.94% and TPC of 30.86 and 41.13 mg EAG/g ms, respectively. Considering the species *L. camara*, the extracts obtained under the optimum conditions by UAE (35% ethanol, 25 min and solvent to solid ratio of 60:1 mL/g) and MAE (53% ethanol, 15 min and microwave power of 300 W) provided yields of 32.50 and 38.61% and TPC of 102.89 and 109.83 mg EAG/g ms, respectively. The extracts obtained by MAE from each species showed higher extraction yields, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activities (DPPH, ABTS and FRAP) in relation to their respective conventional extracts (maceration, infusion, decoction and Soxhlet), highlighting the highest results presented by the species *L. camara*. The extracts obtained by UAE from each species showed higher values of TPC, TFC and antioxidant activities in relation to their respective maceration and infusion extracts. However, the extracts obtained from both species showed low cytotoxic activities against tumor cells and low enzymatic inhibition activities (AChE and BChE), indicating the need for further studies to evaluate their real biological potentials in relation to these activities. Through the analysis by Liquid Chromatography coupled to a Diode Array detector, it was possible to verify the presence of iridoids, phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids in the extracts of *L. alba* and *L. camara*, which corroborates the high antioxidant activities presented by the extracts of these species.

Keywords: *Lippia alba*; *Lantana camara*; Ultrasound-assisted extraction; Microwave-assisted extraction; Phenolic compounds

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	PLANTAS MEDICINAIS: FONTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS	23
1.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	27
1.2.1	Atividade antioxidante	27
1.2.2	Atividade citotóxica	31
1.2.3	Atividade anticolinesterásica.....	32
1.3	TÉCNICAS NÃO CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM MATRIZES VEGETAIS.....	34
1.3.1	Extração assistida por ultrassom (UAE)	35
1.3.2	Extração assistida por micro-ondas (MAE)	37
1.4	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	39
1.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (LC) E ANÁLISE DE EXTRATOS VEGETAIS.....	41
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	42
2.1	FAMÍLIA VERBENACEAE	42
2.1.1	Gênero Lippia: Lippia alba (Mill.) N. E. Brown	43
2.1.2	Gênero Lantana: Lantana camara Linn.	57
2.2	APLICAÇÃO DA UAE E DA MAE PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE MATRIZES VEGETAIS.	69
3	OBJETIVOS	72
3.1	GERAL	72
3.2	ESPECÍFICOS.....	72
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	74
4.2	REAGENTES E SOLVENTES	74
4.3	SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS	76
4.4	COLUNAS CROMATOGRÁFICAS E CAPILARES.....	77
4.5	MATERIAL VEGETAL: COLETA E PROCESSAMENTO DAS FOLHAS	77
4.6	PREPARO DOS EXTRATOS E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO	77
4.6.1	Extração assistida por ultrassom (UAE)	78
	Planejamento experimental de fator único.....	78
	Otimização de extração por planejamento Box-Behnken e RSM	79
4.6.2	Extração assistida por micro-ondas (MAE)	82
	Otimização de extração por planejamento Box-Behnken e RSM	82
4.6.3	Validação do procedimento de extração por UAE e MAE.....	84
4.6.4	Extração por maceração convencional (MC)	85
4.6.5	Extração por infusão (INF)	85
4.6.6	Extração por decocção (DEC)	86
4.6.7	Extração por Soxhlet (SOX).....	86
4.6.8	Rendimento de extração	87
4.7	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	87
4.8	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FLAVONOIDES TOTAIS	88
4.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH.....	88

4.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL ABTS	89
4.11	PODER ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO.....	89
4.12	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	90
4.13	ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA.....	91
4.14	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	92
4.14.1	LC-DAD dos extratos de <i>L. alba</i>	93
4.14.2	LC-DAD dos extratos de <i>L. camara</i>	93
4.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	94
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1	OTIMIZAÇÃO POR UAE A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>L. ALBA</i>	95
5.1.1	Experimento de fator único	95
5.1.2	Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM....	99
	Influência dos parâmetros da UAE no rendimento dos extratos	100
	Influência dos parâmetros da UAE no TPC dos extratos.....	106
5.1.3	Validação das condições otimizadas de forma simultânea por UAE	111
5.2	OTIMIZAÇÃO POR MAE A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>L. ALBA</i>	113
5.2.1	Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM	113
	Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos.....	114
	Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos	118
5.2.2	Validação das condições otimizadas de forma simultânea por MAE	122
5.3	OTIMIZAÇÃO POR UAE A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>L. CAMARA</i>	124
5.3.1	Experimento de fator único	124
5.3.2	Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM..	127
	Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos.....	128
	Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos	132
5.3.3	Validação das condições otimizadas de forma simultânea por UAE	136
5.4	OTIMIZAÇÃO POR MAE A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>L. CAMARA</i>	137
5.4.1	Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM..	137
	Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos.....	138
	Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos	142
5.4.2	Validação das condições otimizadas de forma simultânea por MAE	146
5.5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS FITOQUÍMICOS E DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DOS DIFERENTES EXTRATOS DE <i>L. ALBA</i> E <i>L. CAMARA</i>	147
5.5.1	Avaliação da correlação de Pearson (r).....	157
5.6	ATIVIDADES CITOTÓXICAS DOS EXTRATOS DE <i>L. ALBA</i> E <i>L. CAMARA</i>	160
5.7	ATIVIDADES DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS DE <i>L. ALBA</i> E <i>L. CAMARA</i>	175
5.8	PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS DE <i>L. ALBA</i> E <i>L. CAMARA</i>	160
6	CONCLUSÃO.....	178
7	PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	180

8	REFERÊNCIAS.....	181
	APÊNDICE.....	207

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e oportunidades concedidas;

À Universidade Federal de Sergipe, pela oportunidade na instituição, e ao Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química (UFS), pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Ao Centro de Laboratórios de química Multiusuários (CLQM) do Departamento de Química (UFS);

À Prof^a. Dr.^a Valéria Regina de Souza Moraes, pela orientação, incentivos e apoio durante o trabalho de doutorado;

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos durante minha jornada acadêmica;

Ao Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS, por fornecer os acessos de *Lippia alba* e *Lantana camara* e o equipamento de micro-ondas para as extrações;

À Prof^a. Dr.^a Carmen Lúcia Cardoso e a técnica Olímpia Paschoal Martins do GCBPN (Grupo de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais) da Universidade de São Paulo (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto) pela realização dos testes de atividade enzimática;

Aos professores Daniel Pereira Bezerra e Milena Botelho Pereira Soares e alunos Valdenizia Rodrigues Silva e Luciano de Souza Santos da FIOCRUZ - BA pela realização dos ensaios citotóxicos.

A todos os Professores do PPGQ (DQI-UFS), em especial a Prof^a. Dr.^a. Zaine Teixeira Camargo (Quibion), por ceder gentilmente o equipamento de ultrassom para os experimentos de extração;

À Prof^a. Dr.^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes e a Mestre Tamires do Laboratório de enzimologia do Departamento de Fisiologia da UFS por permitir gentilmente a utilização da leitora de microplaca para os ensaios fitoquímicos e biológicos;

À minha esposa, Patrícia de Sousa Silva, pela paciência, incentivo e cuidados de sempre;

Aos amigos e colegas pelos momentos de descontração, companheirismo e colaboração;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-Azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBD	Box-Behnken
BChE	Enzima butirilcolinesterase
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
CI ₅₀	Concentração inibitória
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de diodos
DEC	Extrato de decocção
DFMO	Difluorometilornitina
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ET	Equivalente de trolox
EtOH	Etanol
FRAP	<i>Ferric reducing ability power</i>
HEK-293	Linhagem celular normais de rim humano
HPLC	<i>High performance liquid chromatograph</i>
Hz	Hertz
ICER	<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>
INF	Extrato de infusão
LA	<i>Lippia alba</i>
LAC	<i>Lantana camara</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>

MAE	<i>Microwave assisted extraction</i>
MC	Extrato de maceração
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
PG	Propil Galato
PLE	<i>Pressurized liquid extraction</i>
R ²	Coeficiente de determinação
R ² _{ajustado}	Coeficiente de determinação ajustado
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RSM	<i>Response surface methodology</i>
SFE	<i>Supercritical fluid extraction</i>
SOX	Extrato de Soxhlet
SRB	Sulforrodamina B
SUS	Sistema Único de Saúde
TBHQ	<i>terc</i> -Butil-hidroquinona
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant Capacity</i>
TFC	<i>Total flavonoid contents</i>
TPC	<i>Total phenolic contents</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
UAE	<i>Ultrasound assisted extraction</i>
UV	Radiação Ultravioleta
UVB	Radiação Ultravioleta B
VIS	Radiação Visível
XDH	Enzima Xantina Desidrogenase
XOD	Enzima Xantina Oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos compostos fenólicos de quatro diferentes subclasses.	23
Figura 2: Estrutura do DPPH antes e após a reação com o antioxidante. A-H: antioxidante doador de hidrogênio.	28
Figura 3: Reação envolvida no ensaio ABTS para a preparação do cátion radical $ABTS^{+\cdot}$ - 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).	29
Figura 4: Redução do $[Fe^{3+}(TPTZ)]^{3+}$ à $[Fe^{2+}(TPTZ)]^{2+}$ através da doação de um elétron durante a reação com um antioxidante.	29
Figura 5: Fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer.	32
Figura 6: Ilustração do processo de formação de bolhas de cavitação no solvente de extração induzidas por ultrassom e seu colapso.	34
Figura 7: Ilustração do colapso das bolhas de cavitação induzidas por ultrassom na superfície do material vegetal, causando a liberação dos compostos químicos em seu interior.	35
Figura 8: Ilustração dos mecanismos de aquecimento envolvido na radiação por micro-ondas.	36
Figura 9: Ilustração do processo de ruptura da parede celular vegetal com o aumento da temperatura e pressão no interior da célula devido ao aquecimento do solvente em seu interior.	37
Figura 10: Fotografias da espécie <i>L. alba</i> .	51
Figura 11: Fotografias da espécie <i>L. camara</i> .	63
Figura 12: Sequência de realização dos experimentos por meio do planejamento experimental de fator único para determinar os intervalos adequados das variáveis concentração de etanol (10, 30, 50, 70, 90%), relação solvente para sólido (Rel. sol-sol, 20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1	77

mL/g) e tempo de extração (5, 10, 15, 20, 25, 30 min): a) *L. alba* e b) *L. camara*.

Figura 13: Efeito da relação solvente para sólido (a), da concentração de etanol (b) e do tempo de extração (c) no conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos das folhas de *L. alba* obtidos por UAE. Letras diferentes nas colunas significam que há diferença significativa entre os resultados segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). 93

Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE. 99

Figura 15: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido. 100

Figura 16: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE. 105

Figura 17: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido. 107

Figura 18: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3) no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE. 112

Figura 19: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 113
concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-
ondas no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE: (a)
concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol
e potência de micro-ondas e (c) tempo de extração e potência de micro-
ondas.

Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das 117
variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência
de micro-ondas (X_3) no TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE.

Figura 21: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 117
concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-
ondas no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE:
(a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de
etanol e potência de micro-ondas e (c) tempo de extração e potência de
micro-ondas.

Figura 22: Efeito da relação solvente para sólido (a), da concentração 122
de etanol (b) e do tempo de extração (c) no conteúdo de fenólicos totais
(TPC) dos extratos das folhas de *L. camara* obtidos por UAE. Letras
diferentes nas barras significam que há diferença significativa entre os
resultados segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 23: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das 127
variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação
solvente para sólido (X_3) no rendimento dos extratos de *L. camara*
obtidos por UAE.

Figura 24: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 129
concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente
para sólido no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE:
(a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de
etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação
solvente para sólido.

Figura 25: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das 131
variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação
solvente para sólido (X_3) no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por
UAE.

Figura 26: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 131
concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente
para sólido no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. camara* obtidos
por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b)
concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de
extração e relação solvente para sólido.

Figura 27: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das 136
variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência
de micro-ondas (X_3) no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos
por MAE.

Figura 28: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 137
concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-
ondas no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE: (a)
concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol
e potência de micro-ondas (c) tempo de extração e potência de micro-
ondas.

Figura 29: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das 140
variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência
de micro-ondas (X_3) no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.

Figura 30: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da 141
concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-
ondas no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. camara* obtidos por
MAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração
de etanol e potência de micro-ondas (c) tempo de extração e potência
de micro-ondas.

Figura 31: Comparação dos resultados de rendimento de extração, 145
conteúdo de fenólicos totais (TPC); conteúdo de flavonoides totais (TFC)

dos extratos obtidos, separadamente, das folhas de *L. alba* (a) e *L. camara* (b) por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando cada resposta separadamente. EAG: equivalente de ácido gálico; EC: equivalente de catequina.

Figura 32: Comparação dos resultados de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) dos extratos obtidos, separadamente, das folhas de *L. alba* (a) e *L. camara* (b) por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias segundo a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$), considerando cada resposta separadamente. ET: equivalente de Trolox. 152

Figura 33: Perfil cromatográfico ($\lambda = 240$ nm) do extrato das folhas de *L. alba* preparado por infusão. 159

Figura 34: Espectros de absorção no UV (210 a 400 nm) dos compostos químicos presentes no extrato das folhas de *L. alba* preparado por infusão, os quais estão numerados no cromatograma da Figura 33. 160

Figura 35: Perfil cromatográfico ($\lambda = 240$ nm) dos extratos das folhas de *L. alba* preparados por diferentes métodos de extração: ultrassom (UAE), micro-ondas (MAE), maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). 163

Figura 36: Perfil cromatográfico ($\lambda = 254$ nm) do extrato das folhas de *L. camara* preparado por infusão: a) cromatograma completo e b) expansão do cromatograma na região de absorbância entre 0 e 500 mAU. 165

Figura 37: Espectros de absorção no UV (210 a 400 nm) dos compostos químicos presentes no extrato das folhas de *L. camara* preparado por infusão, os quais estão numerados no cromatograma da Figura 36b. 166

Figura 38: Perfil cromatográfico ($\lambda = 254$ nm) dos extratos das folhas de *L. camara* preparados por diferentes métodos de extração: ultrassom (UAE), micro-ondas (MAE), maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). 169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de <i>L. alba</i> .	78
Tabela 2: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de <i>L. alba</i> . As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).	78
Tabela 3: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de <i>L. camara</i> .	79
Tabela 4: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de <i>L. camara</i> . As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).	79
Tabela 5: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na MAE.	80
Tabela 6: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na MAE das folhas de <i>L. alba</i> e <i>L. camara</i> . As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).	81
Tabela 7: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de <i>L. alba</i> .	98
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por UAE considerando a espécie <i>L. alba</i> . Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).	102
Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por UAE considerando a espécie <i>L. alba</i> . Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).	106

Tabela 10: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por UAE de <i>L. alba</i> : 29% de etanol, 17,8 min e relação solvente para sólido de 71:1 mL/g (desejabilidade de 0,9923).	109
Tabela 11: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por MAE a partir das folhas de <i>L. alba</i> .	111
Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por MAE considerando a espécie <i>L. alba</i> . Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).	115
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por MAE considerando a espécie <i>L. alba</i> . Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).	119
Tabela 14: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por MAE de <i>L. alba</i> : 43,30% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 600 W (desejabilidade de 0,9357).	120
Tabela 15: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de <i>L. camara</i> .	125
Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por UAE considerando a espécie <i>L. camara</i> . Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).	127
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por UAE considerando	133

a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Tabela 18: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por UAE de *L. camara*: 35% de etanol, 25 min e relação solvente para sólido de 60:1 mL/g (desejabilidade de 0,9950). 134

Tabela 19: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por MAE a partir das folhas de *L. camara*. 135

Tabela 20: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento obtida por MAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*). 138

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por MAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*). 142

Tabela 22: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por MAE de *L. camara*: 53% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 300 W (desejabilidade de 1.000). 144

Tabela 23: Comparação dos resultados de TPC apresentados pelos extratos de UAE e MAE obtidos a partir das espécies *L. alba* e *L. camara* neste trabalho com aqueles relatados na literatura. 150

Tabela 24: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre TPC, TPF, DPPH, ABTS e FRAP a partir dos extratos de *L. alba* e *L. camara* separadamente. 155

Tabela 25: Porcentagem de inibição da proliferação celular apresentada 171
pelos extratos de *L. alba* e *L. camara* preparados por UAE, MAE,
maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX) frente
a linhagens de células tumorais (HCT116 e HepG2) e normal (MRC-5).

Tabela 26: Porcentagem de inibição, frente às enzimas 174
acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), dos extratos de
L. alba e *L. camara* preparados por UAE, MAE, maceração (MC), infusão
(INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX).

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e seus derivados para o tratamento de diversos tipos de doenças é uma alternativa amplamente utilizada em vários países. Estudos relatados na literatura apontam que os efeitos terapêuticos atribuídos a essas plantas se devem a presença de diversas classes de compostos químicos [1, 2]. Entre eles estão os compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos e flavonoides, que se destacam entre as classes de compostos mais estudadas na área de produtos naturais devido a sua ampla gama de atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, anticolinesterásica e anticarcinogênica [3-8].

Estudos prévios realizados com as espécies *Lippia alba* e *Lantana camara*, ambas pertencentes à família Verbenaceae, têm demonstrado a grande diversidade química entre seus constituintes e o importante potencial biológico destas plantas medicinais [9-12].

A espécie *Lippia alba*, conhecida popularmente no Brasil como erva-cidreira-de-arbusto e alecrim-selvagem, é usada tradicionalmente como anti-inflamatória, antipirética, sedativa, tranquilizante, antiespasmódica e expectorante [13, 14], apresentando como constituintes químicos diversos compostos fenólicos comprovadamente bioativos como flavonoides e fenilpropanoides glicosilados [9, 15].

A espécie *Lantana camara*, conhecida no Brasil como camará-de-cheiro, é utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas como sarampo, dor de estômago, tumores, reumatismo e bronquite [16, 17]. Óleos essenciais e extratos obtidos dessa espécie têm demonstrado diversas atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, antiulcerogênica, citotóxica, antineoplásica e anti-hiperglicêmica [11, 12, 18-22]. Estas atividades estão, supostamente, relacionadas à presença de diversas classes de compostos químicos nestes óleos essenciais e extratos como ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides glicosilados e triterpenoides [11, 20].

Em geral, a composição química dos extratos obtidos de plantas medicinais depende, dentre outros fatores, do processo de extração pois essa

etapa pode influenciar, ainda, a bioatividade dos extratos obtidos. As técnicas de extração convencionais como maceração, percolação e Soxhlet são utilizadas há várias décadas e apresentam alguns inconvenientes, tais como a grande quantidade de tempo e de solvente. Além disso, algumas técnicas podem requerer aquecimento que, aliado a um longo tempo de extração, pode resultar na degradação de compostos termolábeis [23-25].

Dessa forma, como uma alternativa de extração mais eficiente, as técnicas não convencionais como a extração por fluido supercrítico – SFE (*supercritical fluid extraction*), extração assistida por micro-ondas – MAE (*microwave-assisted extraction*), extração assistida por ultrassom – UAE (*ultrasound-assisted extraction*) e extração por líquido pressurizado – PLE (*pressurized liquid extraction*) estão sendo cada vez mais utilizadas, possibilitando reduzir o volume de solvente usado, o tempo e/ou a temperatura de extração, ao mesmo tempo em que pode resultar em um aumento no rendimento de compostos extraídos e melhorar a seletividade do processo [24, 25].

Nesse sentido, a otimização das condições de extração dessas técnicas não convencionais é uma alternativa promissora para a obtenção de preparações mais eficientes do ponto de vista biológico e farmacológico, tendo em vista que as atividades biológicas apresentadas por um extrato vegetal estão diretamente relacionadas a sua composição química. Essas informações evidenciam a importância da escolha de métodos de extração e parâmetros de processamento adequados para favorecer preparações vegetais com alta atividade biológica e bom rendimento de extração [10, 23, 26-28].

Até o momento, não foram encontrados estudos na literatura sobre os efeitos dos parâmetros que afetam o rendimento de extração e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos das folhas das espécies *L. alba* e *L. camara* preparados por ultrassom e micro-ondas visando a otimização do processo de extração empregando planejamento de experimentos com o auxílio de metodologia de superfície de resposta – RSM (*response surface methodology*).

Diante do exposto, fica evidente a importância de se realizar estudos cujo objetivo seja otimizar as condições de extração para a recuperação de

compostos promissores do ponto de vista biológico a partir das espécies *L. alba* e *L. camara*.

1.1 Plantas medicinais: fonte de compostos fenólicos bioativos

A utilização de plantas medicinais é considerada uma das práticas mais antigas a ser realizada pelo homem para prevenir e tratar doenças. Entre os principais metabólitos comumente encontrados nestas plantas destacam-se os fenólicos, alcaloides e terpenoides, sendo, muitas vezes, os responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas a elas. Além disso, o conhecimento popular passado de geração em geração durante séculos justifica o fato de serem, atualmente, bastante utilizadas [1, 2, 29].

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é definida como a “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” [30]. Estimativas apontam que, até o ano de 2006, cerca de 25% de todas as drogas avaliadas como medicamentos de uso clínico no mundo eram obtidas a partir de plantas medicinais ou análogos sintéticos derivados destas ervas. Isso mostra que, apesar do grande desenvolvimento da medicina moderna, plantas medicinais têm um papel importante no tratamento de diversos tipos de doenças [31, 32].

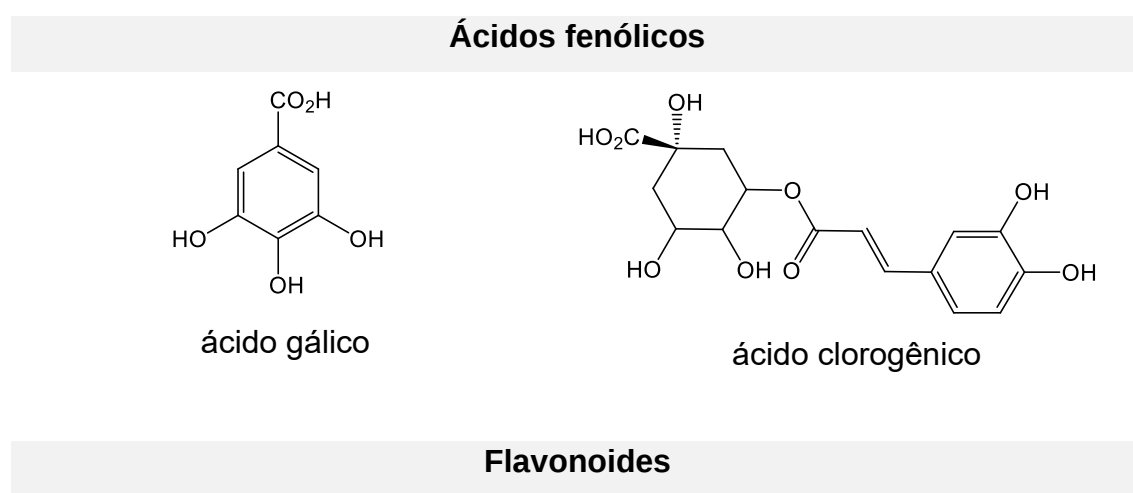
Ao longo dos anos, diversos fatores têm contribuído para o crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e seus derivados. Entre eles podemos destacar os conhecidos efeitos adversos causados por fármacos sintéticos, a preferência por tratamentos de saúde “naturais”, a comprovação, por meio de estudos científicos, das propriedades farmacológicas de algumas espécies vegetais, o desenvolvimento de novas metodologias destinadas ao controle de qualidade destas preparações, além de seu menor custo, em geral, quando comparadas aos fármacos sintéticos [32, 33].

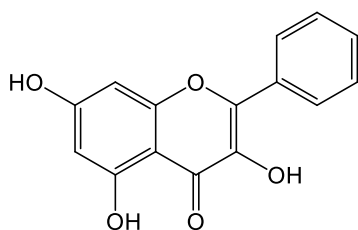
Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm concentrado esforços na busca por preparações vegetais ricas em compostos fenólicos devido a sua grande importância biológica e econômica [27, 34-36].

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários caracterizados pela presença de, ao menos, um anel aromático com um ou mais substituinte hidroxila. Nas plantas, estes compostos são responsáveis por diversas funções, tais como agentes atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes devido as suas colorações, auxiliando no processo de defesa em condições de estresse da planta (ferimentos e infecções causadas por patógenos, longos períodos sem chuva ou radiação UV excessiva), além de apresentarem papéis estruturais importantes, uma vez que unidades fenólicas dão origem a lignina que compõe a parede celular vegetal. Adicionalmente, eles podem contribuir para a estabilidade oxidativa, cor, odor e sabor dos alimentos de origem vegetal [37].

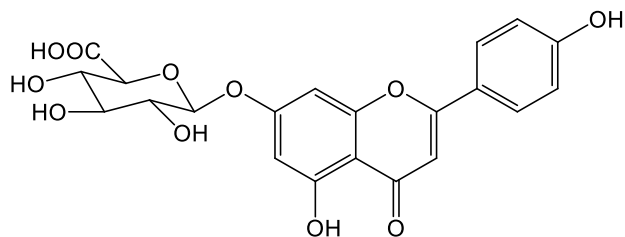
Os compostos fenólicos de plantas são sintetizados por diferentes rotas metabólicas: a do ácido chiquímico e a do ácido malônico. Estes compostos podem ser divididos em diferentes subclasses, de acordo com a sua unidade estrutural básica e o número de anéis fenólicos em sua estrutura, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos (hidrolisáveis e condensados) e cumarinas (Figura 1) [37-39].

Figura 1: Estrutura química dos compostos fenólicos de quatro diferentes subclasses.



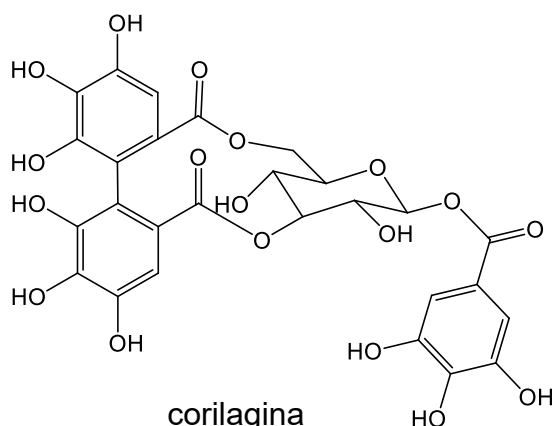


galangina

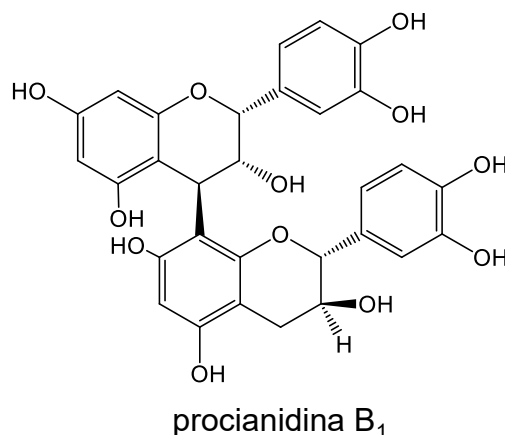


apigenina-7-O-glicuronídeo

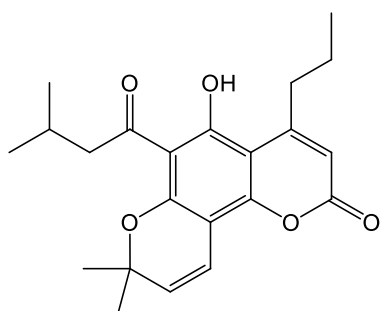
Taninos



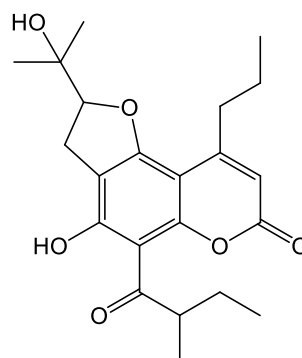
corilagina

procianidina B₁

Cumarinas



mammea B/AA Cyclo D



mammea B/BB Cyclo F

Existem duas classes de ácidos fenólicos encontrados em plantas, os derivados do ácido hidroxibenzóico (C₆-C₁), como o ácido gálico, e aqueles derivados do ácido hidroxicinâmico, conhecidos como fenilpropanóides (C₆-C₃), como o ácido clorogênico e as cumarinas (Figura 1) [39, 40].

Atualmente, a subclasse dos flavonoides representa cerca de 50% de todos os compostos fenólicos em plantas relatados na literatura, sendo, portanto,

a subclasse mais representativa dos compostos fenólicos em matrizes vegetais. Os flavonoides são compostos fenólicos constituídos por 15 átomos de carbono em sua estrutura base ($C_6-C_3-C_6$) distribuídos em três anéis como na estrutura da galangina representada na Figura 1, podendo ser divididos em diferentes subgrupos como flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, entre outros [41]. Esses compostos são biossintetizados por via mista de acordo com a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico [39].

Outra classe de compostos amplamente distribuídos em plantas são os taninos, compostos fenólicos que podem apresentar alta massa molecular (entre 500 e 3000 Dalton). Eles são comumente classificados como taninos hidrolisáveis e taninos condensados, representados na Figura 1 pela corilagina e procianidina B₁, respectivamente. Os taninos hidrolisáveis são classificados como galotaninos e elagitaninos, constituídos, respectivamente, de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, estes últimos sendo encontrados com mais frequência. Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros formados pela ligação entre unidades de flavonoides. Estes compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos como maçã e banana e produtos vegetais (chás), uma vez que são responsáveis pela precipitação de glicoproteínas salivares, ocasionando a perda do poder lubrificante [42, 43]. É importante mencionar que os diferentes ácidos fenólicos e flavonoides de plantas podem ser encontrados tanto na forma livre quanto na forma glicosilada [37].

Por apresentarem benefícios à saúde humana, na literatura se encontra um grande número de relatos de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, anticolinesterásica, anticarcinogênica, cardioprotetora, antibacteriana e antimutagênica relacionadas aos diversos tipos de compostos fenólicos encontrados em plantas medicinais, os quais podem, portanto, ser utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos [3, 4, 7, 34, 38]. Assim, pode-se observar que estudos relacionados a plantas medicinais são de grande importância na busca por preparações e compostos químicos bioativos que impactam também o setor econômico.

1.2 Atividades biológicas

1.2.1 Atividade antioxidante

No processo metabólico natural do organismo humano são geradas diversas espécies reativas de oxigênio – ROS (*reactive oxygen species*) e nitrogênio – RNS (*reactive nitrogen species*) como peróxido de hidrogênio, radical peroxil, radical hidroxil, óxido nítrico, peroxinitrito e ânion superóxido, as quais são capazes de induzir a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios presentes no organismo. Em condições normais, essas espécies oxidantes são produzidas e eliminadas de forma natural em um organismo saudável por antioxidantes e enzimas presentes. Entretanto, o desequilíbrio entre as ROS/RSN e o sistema de defesa antioxidante no organismo humano pode levar a um estado de estresse oxidativo devido ao excesso destas espécies oxidantes. Atualmente, sabe-se que diversas doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (como doença de Alzheimer e doença de Parkinson) e câncer estão relacionadas ao estresse oxidativo causado por essas espécies oxidantes no organismo humano [12, 23, 44-46].

A presença de espécies oxidantes em alimentos é responsável por diversos efeitos prejudiciais a eles, impactando muito o setor alimentício. A deterioração de óleos e gorduras que causa odores e sabores rançosos, reduzindo a qualidade e segurança nutricional dos alimentos devido a formação de produtos secundários potencialmente tóxicos e a degradação de vitaminas, são dois exemplos dos efeitos indesejáveis dessas espécies nos alimentos. Desta forma, uma das alternativas empregadas para prevenir essas degradações é a utilização de compostos antioxidantes [47].

Um antioxidante pode ser definido como uma molécula capaz de diminuir a velocidade de oxidação ou impedir a oxidação de outras moléculas. Outras definições podem ser utilizadas como a de um antioxidante biológico: qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação a um substrato oxidável, retarda ou impede a sua oxidação [48].

Na indústria de alimentos, os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados, sendo o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), o propil galato (PG), a *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e os sorbatos (2,4-hexadienoatos) os mais empregados [49]. Entretanto, o uso de antioxidantes sintéticos pode acarretar efeitos adversos a saúde humana, quando utilizados em quantidades excessivas, como efeitos carcinogênicos, irritação estomacal e intestinal, reações alérgicas, rinite e problemas respiratórios [50].

Por consequência, ao longo dos anos vem crescendo o número de estudos relacionados a busca de novas fontes de compostos antioxidantes, visando a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais, tendo em vista a importância destes para a saúde humana. Entre os antioxidantes naturais mais conhecidos e presentes na dieta humana estão a vitamina C, a vitamina E (α -tocoferol), os carotenoides (β -caroteno) e os compostos fenólicos, os quais podem ser extraídos de diversas fontes vegetais como frutas, verduras, resíduos agroindustriais (casca de goiaba, casca de romã, etc.) e plantas medicinais [9, 12, 23, 28, 34, 48].

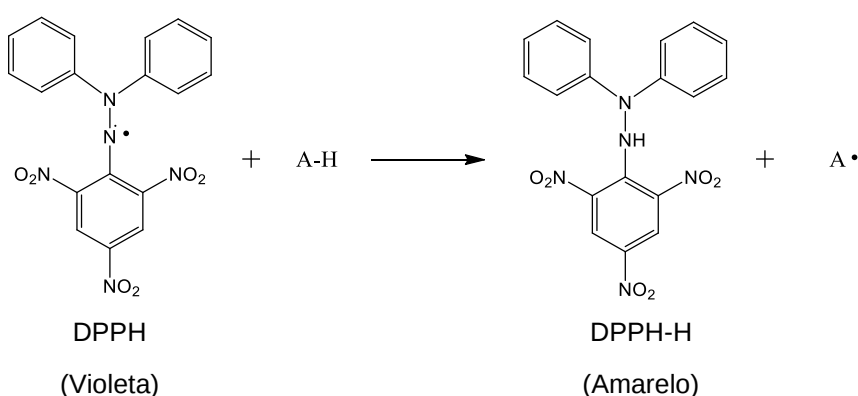
Os compostos antioxidantes de origem natural são de grande importância na prevenção de diversas doenças crônicas, mencionadas anteriormente, causadas pelo estresse oxidativo devido a sua capacidade de capturar radicais livres, como ROS e RNS, inibição de peróxidos, complexação de metais de transição e inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adicionalmente, os compostos de origem natural podem não apresentar os efeitos adversos causados pelos antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos industrializados [45, 47, 50, 51]. Isso mostra o grande potencial biológico/farmacológico e econômico dos antioxidantes fenólicos de origem natural, os quais podem ser comumente encontrados em plantas medicinais.

Diversos métodos são descritos na literatura para se avaliar a atividade antioxidantes *in vitro* de amostras vegetais como o método da captura do radical livre DPPH $\cdot$ – 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl); o método da captura do cátion radicalar ABTS $^{+\cdot}$ - 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico), conhecido também como capacidade

antioxidante de equivalente trolox – TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*), quando é utilizado o trolox como padrão; e o método do poder antioxidante redutor férrico – FRAP (*ferric reducing ability power*) que utiliza um complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina – $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})]^{3+}$ [52]. Esses métodos são estratégias importantes para a descoberta e seleção de novas preparações e/ou substâncias antioxidantes presentes em diversos tipos de preparações.

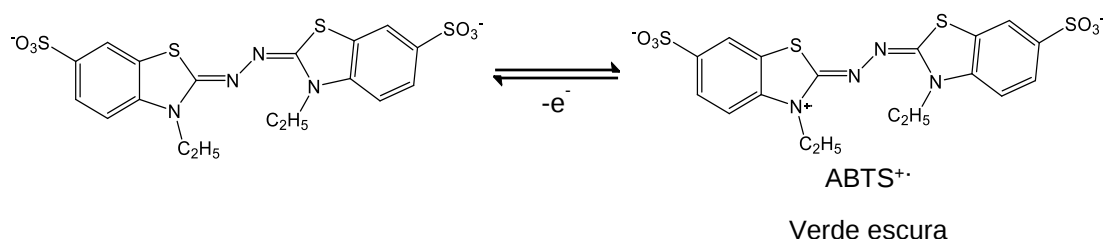
O radical DPPH contém em sua estrutura um átomo de nitrogênio com um elétron desemparelhado (Figura 2), que recebe um hidrogênio na reação com um antioxidante fenólico, sendo então estabilizado. A forma radicalar do DPPH possui coloração púrpura/violeta, apresentando um máximo de absorção em comprimento de onda de 517 nm, enquanto a forma do DPPH estabilizada pelo hidrogênio fornecido pelo antioxidante apresenta coloração amarela [46, 53].

Figura 2: Estrutura do DPPH antes e após a reação com o antioxidante. A-H: antioxidante doador de hidrogênio.



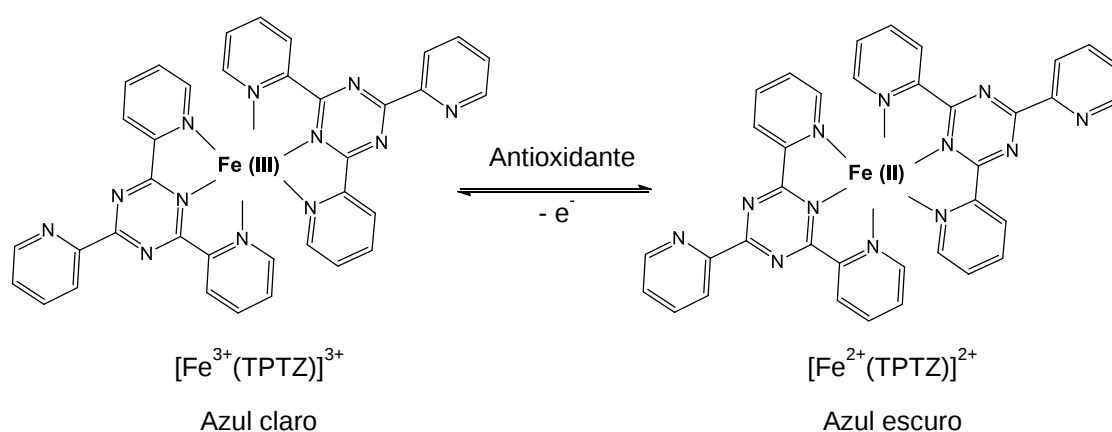
Na técnica de inibição do cátion radical ABTS, a solução preparada com esse cátion, que pode ser gerado por reações enzimáticas ou químicas, possui coloração verde escura (Figura 3), apresentando bandas de absorção em 414, 730 e 873 nm em meio alcoólico. Essa solução tende a se tornar mais clara à medida que o radical vai sendo convertido em sua forma neutra pela doação de um hidrogênio pelo antioxidante [44, 52].

Figura 3: Reação envolvida no ensaio ABTS para a preparação do cátion radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ - 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico).



No método do poder antioxidante redutor férrico - FRAP ocorre a redução em meio ácido (pH 3,6) do complexo $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})]^{3+}$ à $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})]^{2+}$ através da doação de um elétron pelo antioxidante no meio reacional. Após determinado tempo de reação, o meio reacional passa a apresenta coloração azul escura, com um máximo de absorção por volta de 593 nm (Figura 4). Assim, quanto maior for a atividade antioxidante de uma amostra, maior será a intensidade da coloração da solução em que a reação ocorre [53].

Figura 4: Redução do $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})]^{3+}$ à $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})]^{2+}$ através da doação de um elétron durante a reação com um antioxidante.



A utilização desses métodos colorimétricos permite avaliar a atividade antioxidante de compostos e extratos vegetais através de um espectrofotômetro de forma rápida e simples, uma vez que o potencial antioxidante de uma amostra está relacionado ao surgimento ou à modificação da coloração da solução em que a reação está ocorrendo após determinado tempo [44, 46].

Uma vez que cada técnica possui vantagens e desvantagens, é aconselhável utilizar mais de uma metodologia para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra de maneira a fornecer informações mais completas sobre sua atividade [52].

1.2.2 **Atividade citotóxica**

Em geral, estratégias como cirurgia, rádio e quimioterapia são empregadas no tratamento de diferentes tipos de câncer, uma doença que tem como característica o crescimento desordenado de células anormais que invadem tecidos e órgãos e que pode se espalhar para outras regiões do corpo. Essa doença está entre as três causas mais comuns de morte na maioria dos países desenvolvidos e sua incidência cresce cada vez mais nos países em desenvolvimento [54, 55]. Em muitos casos, as estratégias quimioterápicas têm apresentado diversos efeitos colaterais como queda de cabelo e toxicidade para o sistema nervoso central [56]. Dessa forma, se faz necessário a realização de estudos que busquem novas alternativas de prevenção e tratamento do câncer que apresentem eficácia e menores ou nenhum efeito colateral.

Nesse sentido, os óleos essenciais, extratos e compostos isolados de plantas medicinais são agentes promissores no combate a diversos tipos de doenças. Essas plantas são, portanto, fonte potencial de metabólitos secundários com potencial terapêutico contra o câncer [57-59]. Em geral, o processo de descoberta de novas preparações e compostos químicos com potencial antitumoral se inicia através de testes de citotoxicidade *in vitro* que têm como objetivo avaliar a sobrevivência de células expostas a uma amostra testada, sendo considerados métodos rápidos e simples [54].

Entre os vários métodos *in vitro* utilizados para a realização de ensaios citotóxicos em linhagens de células neoplásicas, que são colorimétricos, estão: Cristal violeta; MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium); Alamar blue; e SRB (sulforrodamina B) [60]. O método do alamar blue é amplamente utilizado para a avaliação da viabilidade celular devido à sua sensibilidade, baixo custo e rapidez. O alamar blue (resazurina) é um indicador

fluorescente/colorimétrico com propriedades redox cuja forma reduzida, indicando células em proliferação, apresenta coloração rósea (fluorescente/célula viável) e a forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) [61-63].

Considerando a grande biodiversidade brasileira, o estudo com plantas medicinais é de grande importância, uma vez que muitas delas não têm sido exploradas de forma efetiva para a obtenção de novas substâncias para prevenção e/ou tratamento de doenças como o câncer [54, 64].

1.2.3 Atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela degeneração progressiva da função neurológica. A DA é considerada, portanto, uma doença neurodegenerativa, causada por níveis reduzidos de acetilcolina no cérebro, principalmente de pessoas idosas, chegando a acometer cerca de 20 a 40% da população com mais de 85 anos e 5 a 10% com idade superior a 65 anos. A expectativa de vida dos pacientes com essa doença varia entre 3,3 e 11,7 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas [65-67].

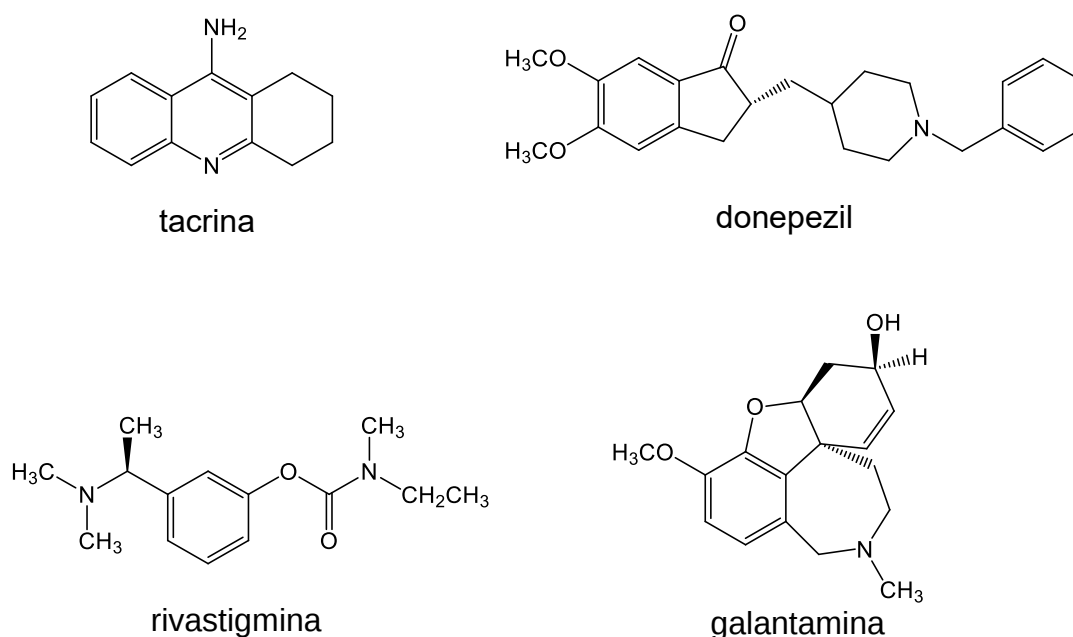
A DA é uma doença que afeta o paciente com redução progressiva da capacidade funcional, não possui cura e possui um tratamento caro [68]. À medida que a doença progride, devido a redução dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh), as funções motoras, cognitivas e da memória do paciente são prejudicadas [65, 66]. Além disso, com o seu avanço o paciente passa a não reconhecer seus familiares mais próximos, o que acarreta danos emocionais e psicológicos a estes [69].

Atualmente, a forma mais promissora para o tratamento da DA é através do aumento dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no cérebro dos pacientes através do uso de inibidores das enzimas que o degradam, a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), aumentando a capacidade da ACh de estimular os receptores cerebrais [67, 70, 71]. Os fármacos mais efetivos para o tratamento da DA são aqueles que inibem a AChE,

uma vez que no cérebro humano saudável a atividade da AChE predomina e a BChE desempenha um papel secundário na degradação da ACh [70, 72].

A Figura 5 mostra os fármacos aprovados e mais utilizados para o tratamento do Alzheimer, devido a capacidade de inibição da AChE: tacrina (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e galantamina (Reminyl®) [66, 69].

Figura 5: Fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer.



Apesar da sua aprovação e utilização, esses fármacos apresentam diversos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, náuseas, diarreia e hepatotoxicidade [73, 74]. Assim, fica evidente a necessidade de se encontrar novos agentes anticolinesterásicos que sejam eficazes, apresentem menores efeitos colaterais e sejam acessíveis do ponto de vista financeiro.

A busca de agentes anticolinesterásicos requer estratégias rápidas e eficazes. Resultados promissores com relação à descoberta de preparações e/ou substâncias com potencial de inibição da AChE têm sido obtidos através do emprego de reatores enzimáticos com a AChE imobilizada na superfície interna de capilares de sílica fundida, ICER-AChEs (ICER - Immobilized Capillary Enzyme Reactor), acoplados a instrumentos de Cromatografia Líquida [72, 75,

76]. Essa estratégia tem sido uma alternativa promissora aos métodos colorimétricos/espectrofotométricos baseados no reagente de Ellman, que consistem na avaliação qualitativa e/ou quantitativa da atividade de inibição enzimática apresentada por determinada amostra [77, 78].

Diante da necessidade de obtenção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da DA, os extratos obtidos de *Lippia alba* e *L. camara* podem se tornar fontes potenciais de preparações e/ou compostos químicos com capacidade de inibição da AChE, visto que tais espécies possuem uma grande variedade de compostos químicos como ácidos fenólicos, flavonoides e terpenoides [9, 11, 15, 20].

1.3 Técnicas não convencionais de extração de compostos bioativos presentes em matrizes vegetais

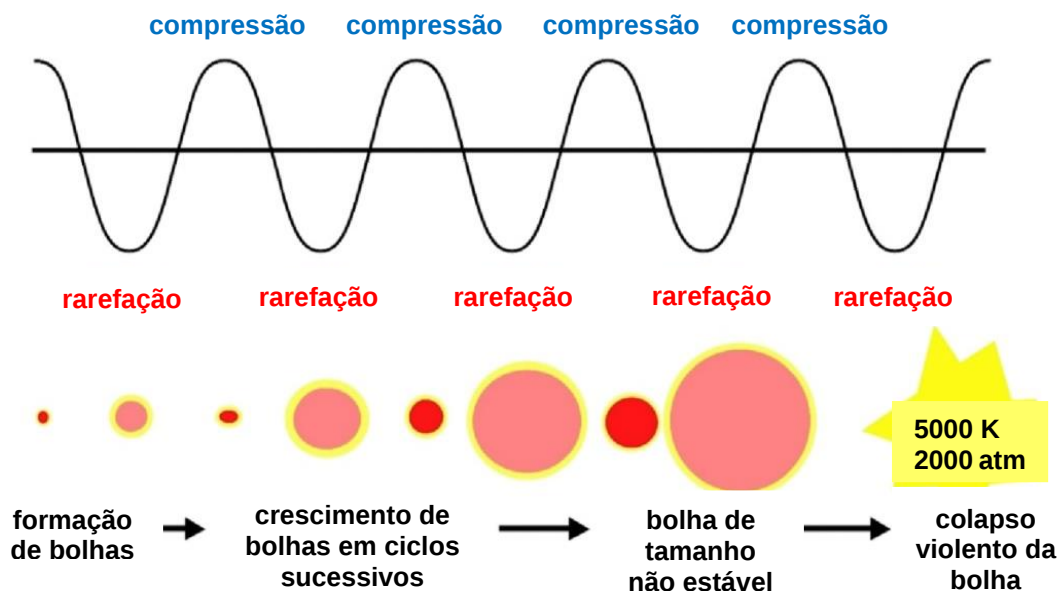
Atualmente, existe uma grande diversidade de estratégias que podem ser utilizadas para a extração de compostos fenólicos a partir de diferentes matrizes vegetais como frutas, cereais, resíduos agroindustriais (casca de goiaba, casca de romã e bagaço de uva) e plantas medicinais (folhas, flores e caules) [23, 28, 34]. De modo geral, as técnicas de extração podem ser divididas em dois tipos: convencionais como a extração por infusão, maceração, hidrodestilação e Soxhlet; e não convencionais (ou modernas) como a extração por fluido supercrítico (SFE), extração assistida por ultrassom (UAE), extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração por líquido pressurizado (PLE) [6, 28].

Os métodos de extração não convencionais estão sendo cada vez mais utilizados para extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais devido a maior eficiência e redução do tempo total de extração em comparação aos métodos convencionais. Essas vantagens estão relacionadas aos modos de funcionamento, e seus efeitos, envolvidos em cada técnica de extração, favorecendo também a redução dos impactos causados ao meio ambiente e a saúde humana devido ao consumo de solventes em menor quantidade e de menor toxicidade como a água e o etanol [79, 80].

1.3.1 Extração assistida por ultrassom (UAE)

A UAE está entre as técnicas de extração não convencionais mais utilizadas para a obtenção de compostos químicos de matrizes vegetais. Essa técnica tem como força motriz o fenômeno da cavitação acústica como resultado da propagação de ondas sonoras através de um meio líquido, gerando uma série de ondas de compressão e rarefação (expansão) induzidas nas moléculas do meio no qual ela se difunde (Figura 6) [81, 82]. Durante os ciclos de rarefação, as forças de atração entre as moléculas do líquido podem ser superadas, o que favorece a formação de bolhas de cavitação no solvente. Estas bolhas são formadas devido a presença de gases dissolvidos no meio e crescem por um processo denominado de difusão retificada, quando pequena quantidade de gás no meio entra na bolha durante a etapa de expansão e não é eliminada totalmente na fase de compressão [81, 83] (Figura 6).

Figura 6: Ilustração do processo de formação de bolhas de cavitação no solvente de extração induzidas por ultrassom e seu colapso.

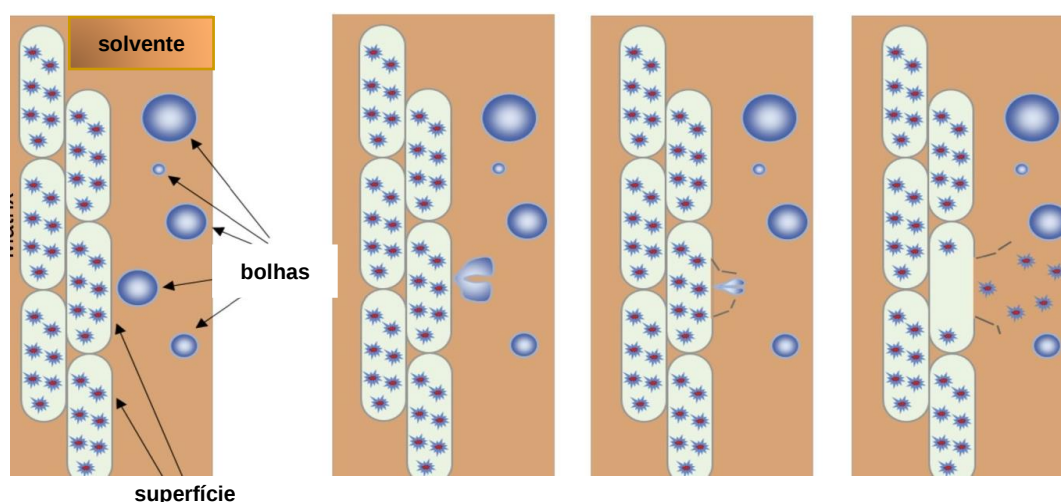


Fonte: Adaptado de Vinatoru *et al.* [83].

Quando as bolhas formadas atingem um tamanho crítico, elas colapsam durante um ciclo de compressão, liberando grande quantidade de energia, gerando condições locais extremas de pressão e temperatura (Figura 6). O

colapso das bolhas acústicas sobre, ou próximo, à superfície do material vegetal, podem, além de causar a ruptura parcial ou total da parede celular como resultado de impactos de micro jatos de solvente e ondas de choque induzidos pelo colapso, melhorar a penetração do solvente no material vegetal (Figura 7). Como resultado da combinação desses e de outros efeitos induzidos pelo processo de cavitação em UAE, tem-se o aumento da transferência de massa do processo, resultando em maior recuperação dos compostos químicos a partir de uma matriz vegetal [83, 84].

Figura 7: Ilustração do colapso das bolhas de cavitação induzidas por ultrassom na superfície do material vegetal, causando a liberação dos compostos químicos em seu interior.



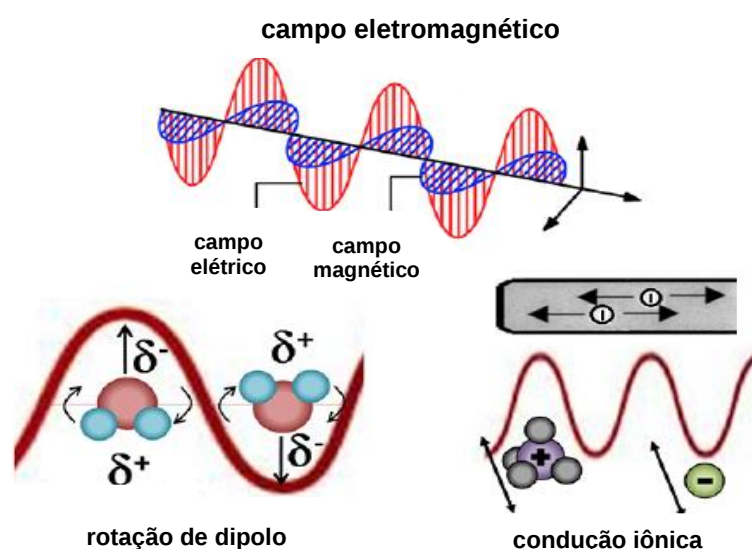
Fonte: Adaptado de Panja [79].

No entanto, para se alcançar a máxima eficiência de extração em UAE, diversos parâmetros devem ser considerados. Dentre eles podemos citar: o tipo e design do reator e a forma da sonda de ultrassom (quando usada), a frequência e a potência do ultrassom, o tipo e a composição do solvente, a temperatura de extração, a relação solvente para sólido, o tempo de extração e o tamanho de partícula da matriz [23, 36, 81, 85, 86]. Assim, a realização de um estudo cuidadoso com relação as condições de extração mais adequadas para o objetivo proposto se torna bastante interessante.

1.3.2 Extração assistida por micro-ondas (MAE)

Na técnica MAE, as micro-ondas geradas são campos eletromagnéticos na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz. A extração dos compostos químicos de determinada matriz vegetal por micro-ondas está relacionada ao princípio de aquecimento do solvente de extração e/ou do líquido presente na matriz vegetal, que está baseado em dois fenômenos: o aquecimento dielétrico (ou rotação de dipolo) e a condução iônica. Quando as micro-ondas atravessam um meio líquido, a energia pode ser absorvida e convertida em calor. No aquecimento dielétrico, o aquecimento do solvente se dá através da movimentação molecular de acordo com o seu momento de dipolo, de forma instantânea e aleatória com a frequência da radiação de micro-ondas. A oscilação induzida pelas micro-ondas leva a rotação molecular, fricção e colisão entre moléculas vizinhas e, portanto, gera calor (Figura 8). A condução iônica está relacionada a migração eletroforética dos íons em solução devido ao seu alinhamento com o campo eletromagnético da radiação de micro-ondas, o que resulta no atrito e colisões entre os íons em fluxo no solvente e as moléculas do solvente e, conseqüentemente, causa o seu aquecimento (Figura 8) [80, 83, 87-89].

Figura 8: Ilustração dos mecanismos de aquecimento envolvido na radiação por micro-ondas.



Fonte: Adaptado de Vinatoru *et al.* [83] e Sousa-Filho e Serra [88].

Desta forma, o aquecimento do solvente por micro-ondas depende da sua capacidade de absorver essa radiação eletromagnética, que está relacionada a sua polaridade e a presença de íons em solução, podendo então ocorrer simultaneamente por ambos os mecanismos descritos. Solventes como metanol e etanol apresentam alta capacidade de absorção da radiação de micro-ondas, enquanto solventes como hexano, tolueno e diclorometano não absorvem de forma significativa a radiação de micro-ondas e, portanto, não podem ser aquecidos por essa técnica. Por outro lado, butanol, água e as misturas água-etanol e água-metanol apresentam capacidade moderada em absorver a radiação por micro-ondas [79].

A força motriz que favorece o aquecimento localizado do solvente de extração e a destruição da matriz vegetal na MAE é a potência do micro-ondas. O superaquecimento interno da matriz vegetal pode causar a vaporização do líquido dentro de suas células, o que pode romper as paredes celulares e/ou as membranas plasmáticas (Figura 9). O rompimento da matriz favorece o processo de transferência de massa dos compostos químicos presentes através da sua dissolução e difusão no solvente extrator, aumentando a eficiência da extração em comparação a outras técnicas de extração como a maceração convencional e a decocção. [34, 83, 87, 90].

Figura 9: Ilustração do processo de ruptura da parede celular vegetal com o aumento da temperatura e pressão no interior da célula devido ao aquecimento do solvente em seu interior.



Fonte: Adaptado de Vinatoru *et al.* [83].

Adicionalmente, o aumento da temperatura do sistema de extração resulta na redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente extrator, favorecendo a difusão do solvente na matriz vegetal e a dissolução dos compostos químicos, contribuindo ainda mais para a transferência de massa do processo de extração. Uma característica importante na MAE é a inter-relação entre a potência do micro-ondas e a temperatura, uma vez que altas potências podem causar a elevação da temperatura do sistema de extração. Portanto, esses parâmetros devem ser controlados durante o processo de extração, pois temperaturas e potências de micro-ondas muito elevadas podem resultar na degradação dos compostos a serem extraídos. Uma alternativa para se evitar a degradação dos compostos é diminuir o tempo e a temperatura nesse tipo de extração [90, 91].

De forma similar à UAE, a eficiência máxima do processo de extração por MAE também é influenciada por diversos parâmetros: tipo e concentração do solvente, potência de micro-ondas, tempo de extração, temperatura, razão solvente para sólido e o tamanho de partícula do material vegetal. Esses são os fatores mais importantes a serem avaliados. Por isso, há a necessidade de um estudo de otimização para a escolha das condições de extração mais adequadas de acordo com o objetivo proposto em um trabalho científico [90-92].

1.4 Planejamento de experimentos

Considerando as particularidades de cada técnica de extração não convencional descrita anteriormente, fica evidente a necessidade de se selecionar a melhor condição para que se possa obter o melhor resultado após o processo de extração [81, 86]. A busca pela melhor condição de extração envolve a realização de uma série de experimentos para se avaliar as variáveis (ou fatores) que podem influenciar a extração. O número de experimentos realizados pode aumentar muito de acordo com o número de variáveis envolvidas, devendo-se, portanto, realizar uma busca prévia na literatura para conhecer as variáveis, bem como seus níveis, que podem ser mais significativas para o processo, considerando cada técnica de extração empregada [93].

Atualmente, um procedimento conhecido como planejamento experimental de fator único é muito utilizado para se determinar a melhor condição de extração. Ele se baseia na modificação de uma variável, enquanto o valor das demais permanece fixo. Ainda assim, essa estratégia resulta em muitos experimentos, além de desconsiderar a interrelação entre as variáveis, visto que estas podem se influenciar mutuamente, ou seja, o melhor resultado de extração obtido empregando uma determinada variável pode depender do valor da outra variável testada [23, 43, 94, 95].

Dessa forma, quando se deseja avaliar a influência que uma ou mais variáveis podem exercer sobre o resultado de um processo (a resposta), ou a interação entre elas, se recorre a um procedimento conhecido como planejamento de experimento [96]. Nesse sentido, diversas estratégias vêm sendo utilizadas como o planejamento fatorial completo, planejamento fatorial fracionário, planejamento composto central, planejamento Box-Behnken, entre outros; cada um deles com suas particularidades [97]. Adicionalmente, para auxiliar na determinação das condições ótimas de um processo, a metodologia de superfície de resposta vem sendo bastante utilizada, sendo uma ferramenta estatística empregada para a otimização dos parâmetros de extração e verificação de possíveis interações entre variáveis independentes [98].

Um planejamento experimental que altera simultaneamente os valores das variáveis estudadas em diferentes experimentos, é empregado para avaliar a dependência entre a resposta e os fatores que podem ser controlados, o que possibilita determinar quais deles são mais significativos para o processo, as interrelações entre eles e a melhor condição de extração [93]. Além disso, essa estratégia possui a vantagem de permitir a obtenção do máximo de informações possíveis a respeito de um sistema por meio da execução de um número reduzido de experimentos quando comparado com o procedimento onde se avalia uma variável por vez, o que resulta em economia de tempo e recursos financeiros, além de favorecer a obtenção de resultados mais confiáveis do ponto de vista químico e estatístico [97].

O planejamento de experimentos favorece ainda a obtenção de um modelo matemático (uma função) que expressam a relação entre as variáveis

independentes e as respostas avaliadas (variáveis dependentes), ou seja, estabelece uma relação entre fatores e respostas. De posse desta informação, se pode entender melhor o comportamento do processo em estudo (no caso particular o processo de extração) e, assim, escolher as melhores condições de operação [96].

Portanto, o emprego de planejamento experimental tem sido cada vez mais difundido nas mais diversas áreas de pesquisas científicas e na indústria para a obtenção de processos mais econômicos e eficientes, além de permitir a otimização das variáveis estudadas em busca das melhores respostas [97, 99].

1.5 Cromatografia líquida (LC) e análise de extratos vegetais

A cromatografia líquida – LC (*liquid chromatography*) é uma técnica de análise, separação e/ou purificação de amostras constituídas por diferentes compostos químicos não voláteis e/ou termicamente instáveis, como aqueles presentes em extratos polares encontrados em preparações vegetais. Devido a sua alta sensibilidade, seletividades, rapidez das análises e sua precisão, além de ser totalmente automatizável, a LC é amplamente utilizada em diversos tipos de análise químicas como na análise de pesticidas e preparações obtidas de plantas medicinais [10, 100-104].

Em geral, plantas medicinais apresentam composição química de grande complexidade, a qual pode ser afetada por diversos fatores como sazonalidade, genética da planta, origem geográfica e método de extração utilizado. Consequentemente, torna-se necessário a existência de metodologias analíticas rápidas e versáteis para que se possa estudar a composição química de suas preparações, o que pode contribuir para a descoberta dos constituintes responsáveis por determinada atividade biológica [10, 23, 104].

Atualmente, a cromatografia líquida com detectores de absorção de radiação ultravioleta e visível (UV-VIS) e de espectrometria de massas (EM) estão entre as estratégias mais utilizadas para a separação, identificação e/ou

quantificação de compostos fenólicos presentes em extratos vegetais [23, 36, 98, 101, 105-107].

A LC-UV-VIS/DAD se destaca entre as várias técnicas com relação a análise de extratos vegetais devido a sua grande eficiência, seu baixo custo, especialmente em comparação ao sistema de detecção por EM ou ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, uma grande quantidade de compostos que possuem grupos cromóforos absorve radiação na região do espectro eletromagnético UV-VIS, podendo ser, então, analisados dessa maneira [101, 107-110].

Diante do exposto, a utilização da LC com detector UV-VIS pode favorecer, de forma rápida e eficiente, a separação dos compostos químicos presentes em uma amostra vegetal, e ainda auxiliar na identificação e/ou na quantificação de compostos químicos presentes nela [10, 36, 107].

2 Revisão da literatura

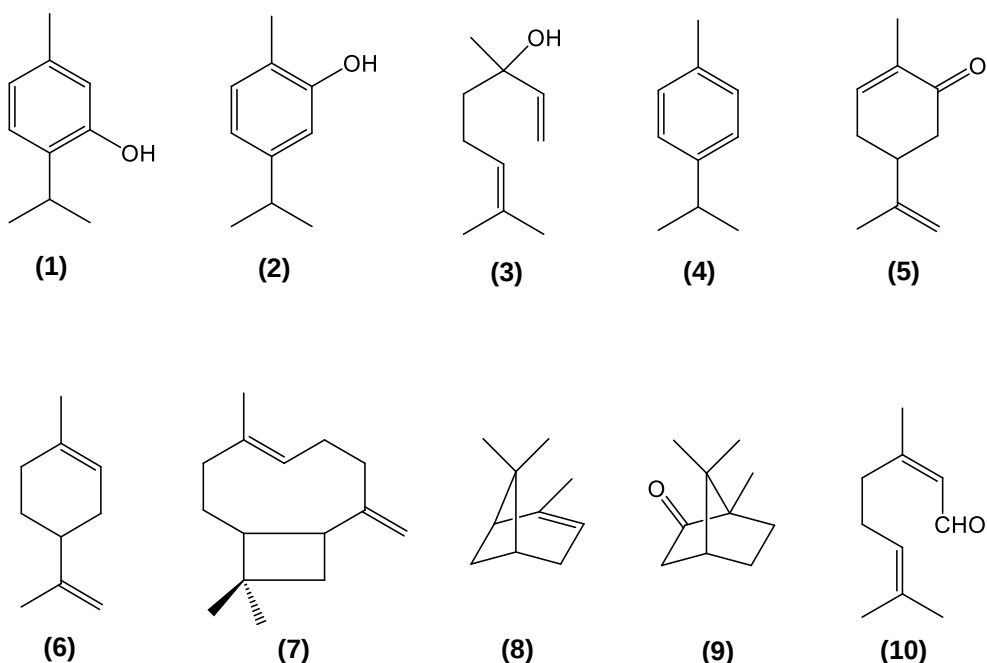
2.1 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae compreende cerca de 175 gêneros e 2.800 espécies de plantas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo e em regiões temperadas do hemisfério sul, sendo algumas delas encontradas também em regiões temperadas do hemisfério norte [111]. Diversos gêneros pertencentes a essa família têm apresentado grande potencial farmacológico atribuído às diversas propriedades biológicas relatadas na literatura. Entre estes gêneros podemos destacar o *Lippia* e o *Lantana*, os quais vêm sendo amplamente estudados tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico [11, 112].

2.1.1 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* possui aproximadamente 250 espécies de plantas herbáceas distribuídas principalmente em toda a América Central, América do Sul e em regiões tropicais da África [113]. Segundo a literatura, as espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de problemas gastrointestinais e respiratórios, sendo que algumas apresentaram também atividades antimaláricas e antivirais [14]. Folhas, flores e caules são as principais partes usadas, comumente preparadas nas formas de infusão ou decocção e administradas por via oral. Além disso, as folhas de várias espécies são utilizadas como tempero na preparação de alimentos [14, 114].

O gênero *Lippia* é caracterizado pela presença de óleos essenciais, extraídos principalmente de suas folhas e caules, que possuem grande potencial antimicrobiano [114, 115]. Entre os constituintes químicos comumente encontrados nos óleos essenciais das espécies desse gênero estão: timol (**1**), carvacrol (**2**), linalol (**3**), *p*-cimeno (**4**), carvona (**5**), limoneno (**6**), (*E*)-cariofileno (**7**), α -pineno (**8**), cânfora (**9**) e citral (**10**) [14, 112, 116].

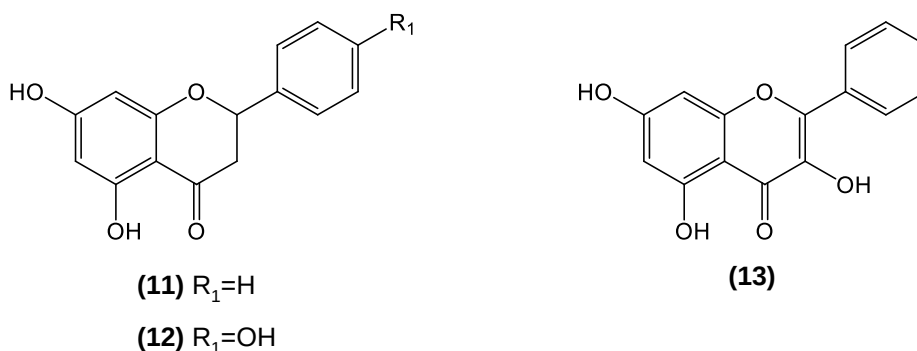


Adicionalmente, diversos compostos fenólicos têm sido relatados como constituintes não voláteis presentes em várias espécies de *Lippia* como

flavonoides, fenilpropanoides/feniletanoides glicosilados e naftoquinonas, além de diversos iridoides [9, 112, 117-121].

Ao longo dos anos, diversos estudos têm concentrado esforços em correlacionar a composição química das plantas medicinais com as propriedades biológicas/farmacológicas apresentadas por seus extratos vegetais e frações purificadas, tendo como base o extenso uso tradicional de muitas plantas [114]. Assim, estudos feitos com as espécies do gênero *Lippia* podem possibilitar a obtenção de preparações e compostos químicos com grande potencial biológico e econômico [116].

Em um estudo realizado por Bores *et al.* [122], o extrato metanólico das folhas de *L. graveolens* H.B.K. apresentou efeitos fotoprotetores em camundongos expostos a radiação Ultravioleta B (UVB) quando tratados por via tópica com essa preparação, prevenindo o surgimento de tumores nesses animais. Segundo os autores, essa proteção pode ser atribuída a presença dos flavonoides pinocembrina (**11**), naringenina (**12**) e galangina (**13**) nessa preparação.



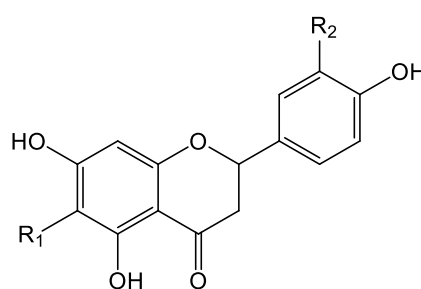
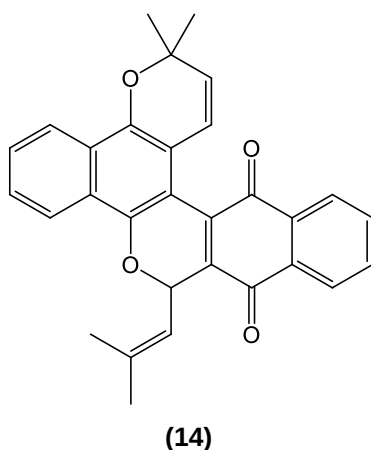
Trevisan *et al.* [123] relataram o efeito de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) apresentado pelo extrato bruto de *L. sidoides*, sugerindo sua importância como uma possível fonte de compostos químicos de origem natural com potencial anticolinesterásico a ser utilizada para o tratamento da DA.

Nos experimentos realizados por Fernandes *et al.* [124], foi possível observar que os extratos etanólicos das raízes e folhas de *L. gracilis*

apresentaram atividade de inibição *in vitro* do fungo *Monosporascus cannonballus*, que atinge principalmente culturas de melão, semelhante ao fungicida comercial Captan. Segundo os autores, a atividade antifúngica apresentada pelos extratos pode estar relacionada a presença de saponinas.

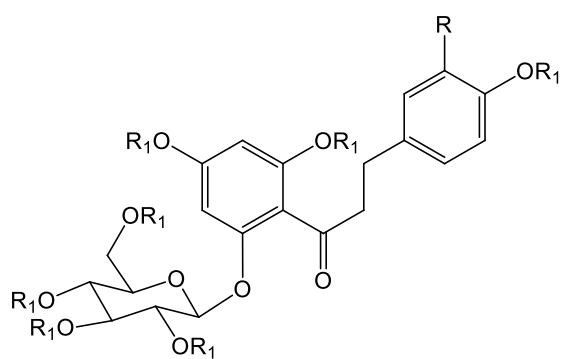
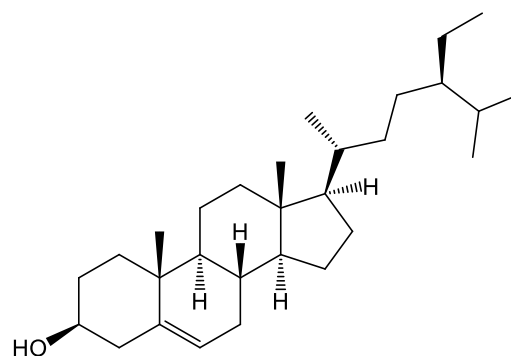
As atividades biológicas, comprovadas cientificamente, apresentadas por espécies do gênero *Lippia* tem motivado a realização de estudos relacionados a identificação e/ou isolamento de compostos químicos presentes em suas preparações que possam ser responsáveis por essas atividades.

No estudo realizado por Almeida *et al.* [125], com extratos etanólicos da espécie *L. sidoides*, foram isolados flavonoides e outros constituintes de diferentes partes dessa planta: naringenina (**12**), tecomaquinona (**14**), a mistura dos flavonoides 3',4',5,7-tetra-hidroxiflavanona (**15**) e 4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona (**16**), a mistura de di-hidrochalconas 2'-O- β -D-glicopiranosil-3,4,4',6'-tetra-hidroxi-di-hidrochalcona (**17**) e 2'-O- β -D-glicopiranosil-4,4',6'-tri-hidroxi-di-hidrochalcona (**18**), β -sitosterol (**19**) e carvacrol (**2**). Neste trabalho, foi observado que tanto o extrato etanólico das folhas quando os flavonoides e outros constituintes isolados apresentaram atividades antioxidantes semelhante à vitamina C e ao trolox.



(15) 2,3-di-hidro, $R_1 = H$, $R_2 = OH$

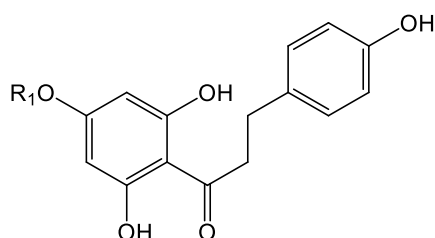
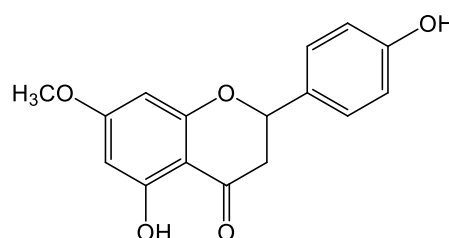
(16) $\Delta^{2,3}$, $R_1 = OMe$, $R_2 = H$

(17) R=OH, R₁=OH(18) R=R₁=H

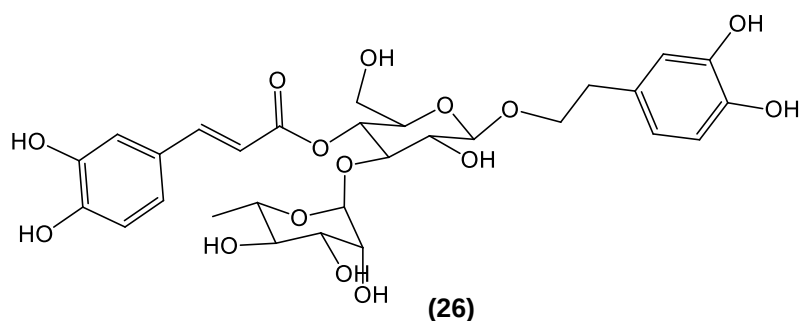
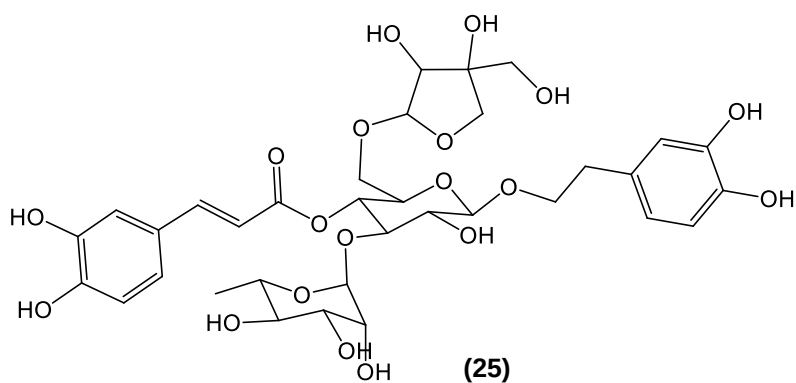
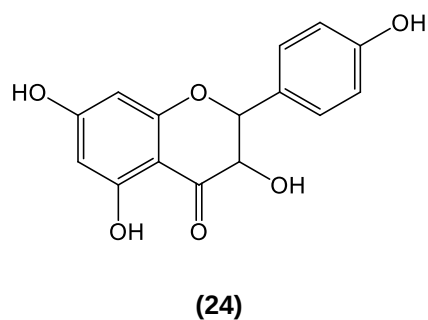
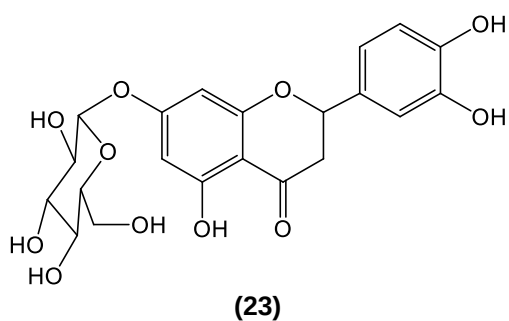
(19)

Segundo a literatura, a espécie *L. sidoides*, por ter seu uso comprovado na medicina popular como antisséptico e antimicrobiano, foi uma das plantas selecionadas pelo SUS para a produção de fitoterápicos no Brasil [118, 125].

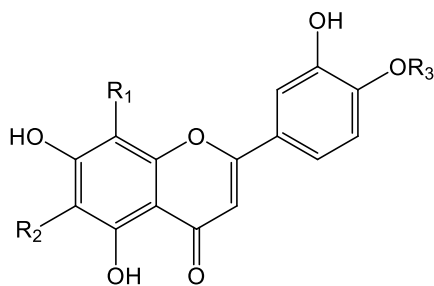
Em um estudo realizado por Funari *et al.* [117], os compostos naringenina (12), asebogenina (20), floretina (21), sakuranetina (22), eridictiol 7-O-β-D-glicopiranosídeo (23), aromadendrina (24) e dois fenilpropanoides glicosilados forsitosídeo B (25) e verbascosídeo (26) foram isolados do extrato etanólico das folhas de *L. salviaefolia*. Nesse estudo, os flavonoides floretina (21) e aromadendrina (24) apresentaram efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo oxidante *t*-butilhidroperóxido em células normais de rim humano (HEK-293). Adicionalmente, a floretina (21) apresentou atividade antineoplásica frente a linhagens de células de melanoma humano M14.

(20) R₁=CH₃(21) R₁=H

(22)



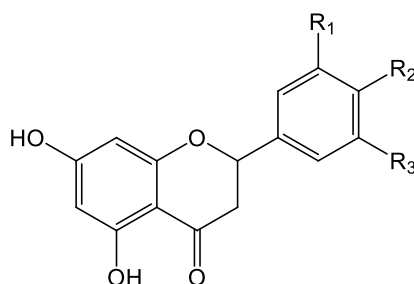
Moraes *et al.* [121] relataram o isolamento e identificação de sete compostos a partir da infusão das folhas de *L. gracilis*: carvacrol (**2**), naringenina (**12**), orientina (**27**), isoorientina (**28**), luteolina 4'-O- β -glicopiranosídeo (**29**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavanona (**30**) e o carvacrol 2-O- β -glicopiranosídeo (**31**). Segundo os autores, cinco destes compostos (**27** a **31**) não haviam sido relatados no gênero *Lippia* até então.



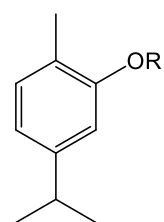
(27) R₁=Glucose, R₂=R₃=H

(28) R₁=H, R₂= Glucose, R₃=H

(29) R₁=R₂=H, R₃=Glucose

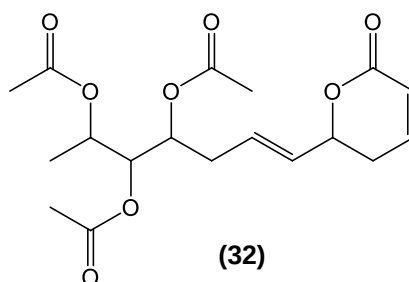


(30) R₁=R₃=OH, R₂=H



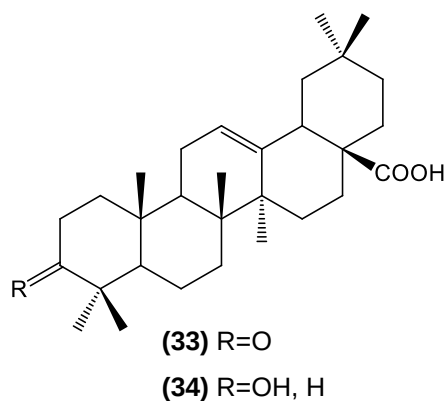
(31) R=Glucose

Em um estudo realizado por Ludere *et al.* [126], a lippialactona (**32**) foi isolada a partir do extrato acetato de etila das folhas de *L. javanica*. Esse composto apresentou atividade antimalárica frente ao protozoário *Plasmodium falciparum*, causador da malária em humanos, porém menor em comparação a Cloroquina, utilizado para combater esse parasita.

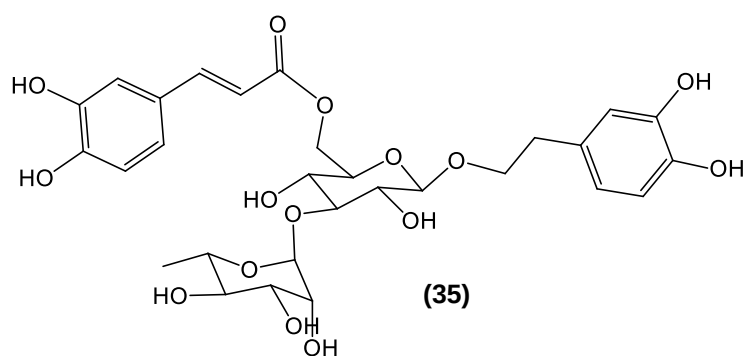


(32)

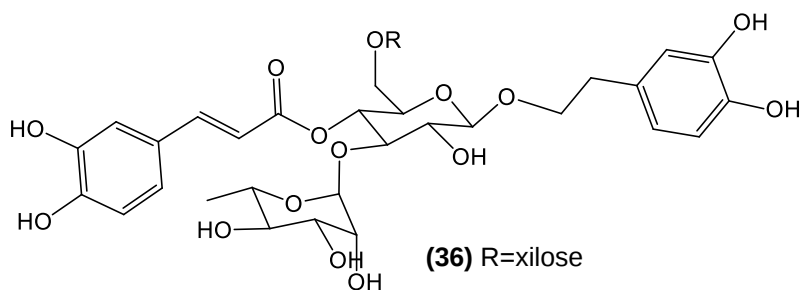
Funari *et al.* [119] isolaram os triterpenos ácido oleanônico (**33**) e ácido oleanólico (**34**) do extrato etanólico da raiz de *L. lupulina*. Nesse estudo, apenas o ácido oleanônico (**33**) apresentou atividade leishmanicida significativa contra o protozoário *Leishmania amazonenses* em comparação a Pentamidina, substâncias utilizadas contra esse protozoário. Além disso, esse composto apresentou atividade tripanocida, frente ao *Trypanosoma cruzi*, maior do que o benzonidazol, um agente terapêutico utilizado no tratamento da Doença de Chagas.

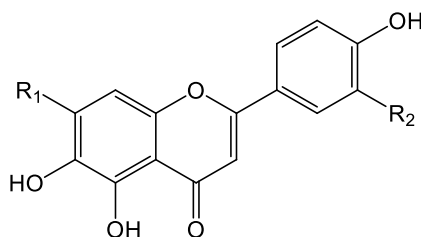


Em estudo realizado com as partes aéreas de *L. javanica*, Olivier *et al.* [127] isolaram e identificaram dois fenilpropanoides glicosilados, verbascosídeo (26) e isoverbascosídeo (35), do extrato metanólico dessa espécie.



Cheng *et al.* [128] isolaram e identificaram de uma fração obtida do extrato metanólico de *L. nodiflora* os compostos verbascosídeo (26), arenariosídeo (36), 6-hidroxluteolina (37), 6-hidroxluteolina-7-O-glicosídeo (38) e nodifloreтина (39).





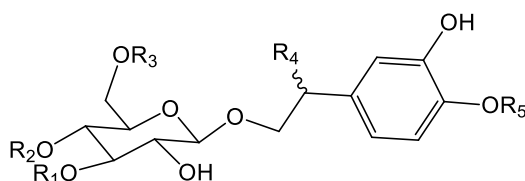
(37) $R_1=OH$, $R_2=OH$

(38) $R_1=O\text{-Glucose}$, $R_2=OH$

(39) $R_1=OH$, $R_2=OCH_3$

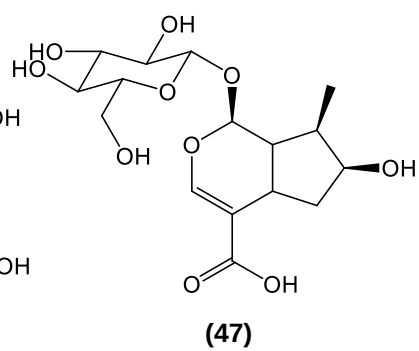
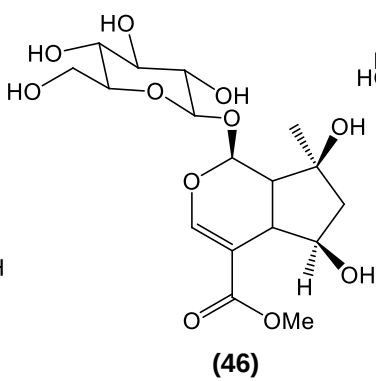
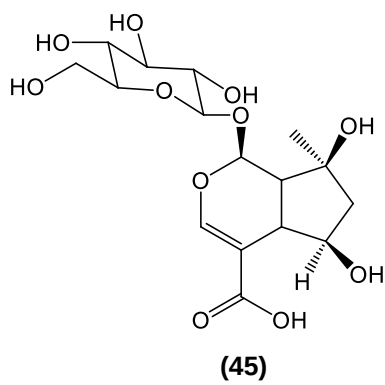
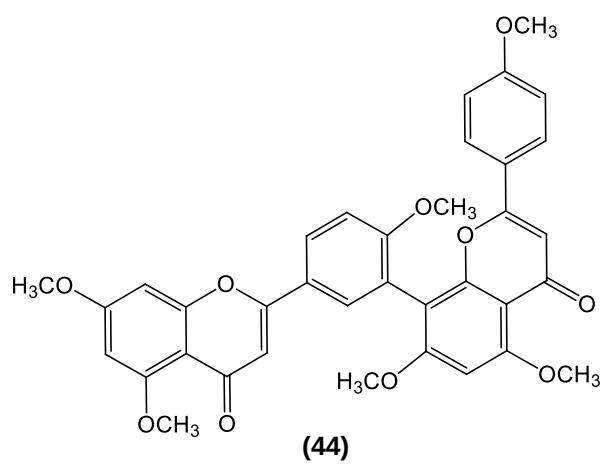
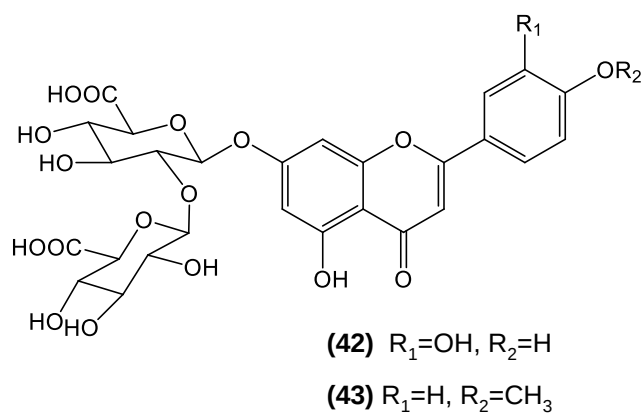
Nesse estudo, Cheng *et al.* [128] evidenciaram que a fração contendo os compostos **26**, **36**, **37**, **38** e **39** apresentou melhores resultados de inibição enzimática *in vivo* frente às enzimas xantina desidrogenase (XDH) e xantina oxidase (XOD), presentes no fígado de ratos, em comparação ao extrato bruto. Além disso, os flavonoides **37**, **38** e **39**, avaliados separadamente, mostraram potencial de inibição enzimática comparável ao controle positivo Alopurinol, na mesma concentração testada, e maior atividade em relação à fração contendo esses compostos.

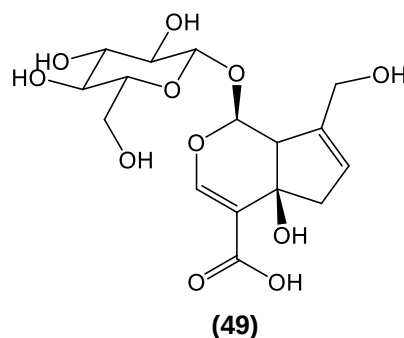
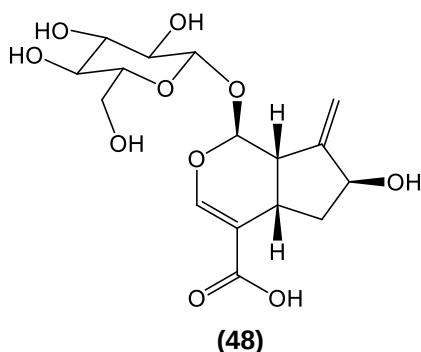
No trabalho desenvolvido por Cádiz-Gurrea *et al.* [129] foi relatado a presença de diversos compostos polares em um extrato comercial de *L. citriodora* com 10% de verbascosídeo (**26**), o que inclui os fenilpropanoides isoverbascosídeo (**35**), leucosceptosídeo A (**40**) e martinosídeo (**41**); os flavonoides luteolina-7-*O*-diglicuronídeo (**42**), acacetina-7-*O*-diglicuronídeo (**43**) e diooflavona (**44**); e os iridoides shanzhisídeo (**45**), éster metílico shanzhisídeo (**46**), ácido logânico (**47**), gardosídeo (**48**) e tevesídeo (**49**).



(40) $R_1=\alpha\text{-L-ramnose}$, $R_2=(E)\text{-feruloil}$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=H$

(41) $R_1=\alpha\text{-L-ramnose}$, $R_2=(E)\text{-feruloil}$, $R_3=H$, $R_4=H$, $R_5=CH_3$





Os resultados promissores demonstrados acima não deixam dúvida de que espécies do gênero *Lippia* apresentam um grande potencial biológico e econômico, podendo se tornar fontes importantes de preparações e/ou substâncias de uso farmacológico.

***Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

Entre os principais representantes do gênero *Lippia*, a espécie *L. alba* destaca-se por seu potencial farmacológico relacionado, principalmente, a grande variabilidade química dos seus óleos essenciais [111, 130]. A espécie *L. alba* (Figura 10), nativa de quase todo o território brasileiro, é um subarbusto de morfologia variável que pode atingir até 1,5 metro de altura. Essa planta possui ramos finos e esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços, folhas inteiras de bordos serrados e ápice agudo de 3-6 cm de comprimento. As suas flores são azul-arroxeadas reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável, os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadada [131].

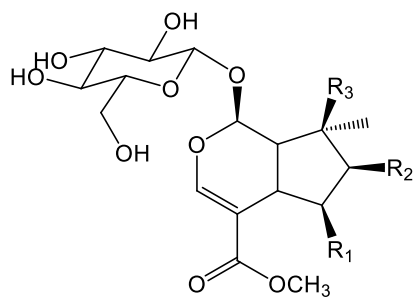
Figura 10: Fotografias da espécie *L. alba*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

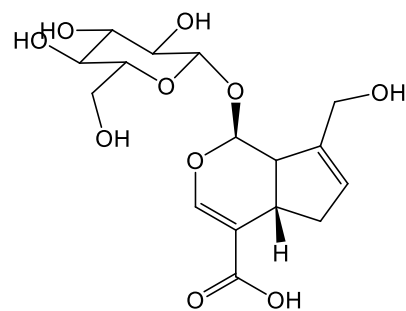
A espécie *L. alba*, conhecida popularmente por diversos nomes como erva-cidreira e erva-cidreira-de-arbusto, é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, tranquilizante, analgésica, antipirética, sedativa, antiespasmódica e expectorante [13, 14]. Folhas e caules são as partes mais utilizadas dessa espécie, sendo preparados principalmente na forma de chás (infusão ou decocção), macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos. Suas folhas também são utilizadas no preparo de alimentos [13].

A espécie *L. alba* possui comprovadas propriedades antifúngicas, inseticidas e repelentes, relacionadas principalmente aos componentes majoritários encontrados em seus óleos essenciais como carvacrol (2), citral (10), limoneno (6) e carvona (5), apresentando grande potencial para as indústrias farmacêuticas, de alimentos e de produtos agrícolas [10, 111, 132]. Por outro lado, flavonoides, fenilpropanoides glicosilados e iridoides estão entre as principais classes de compostos não voláteis comumente encontrados em seus extratos [3, 9, 15]. Tais classes de metabólitos secundários foram previamente relatadas por Timóteo *et al.* [3] no extrato aquoso das folhas de *L. alba* preparado por decocção, sendo identificadas como tevesídeo (49), 8-epiloganina (50), mussaenosídeo (51), ácido geniposídico (52), cistanosídeo (53), apigenina-7-*O*-diglicuronídeo (54), crisoeriol-7-*O*-diglicuronídeo (55), tricina-7-*O*-diglicuronídeo (56), luteolina-7-*O*-glicuronídeo (57) e tricina-7-*O*-glicuronídeo (58), forsitósídeo B (25), verbascosídeo (acteosídeo) (26), isoverbascosídeo (isoacteosídeo) (35), leucosceptosídeo A (40), martinósídeo (41), β -OH-acteosídeo (59a, 59b, diastereoisômeros) e calceolariosídeo E (60).

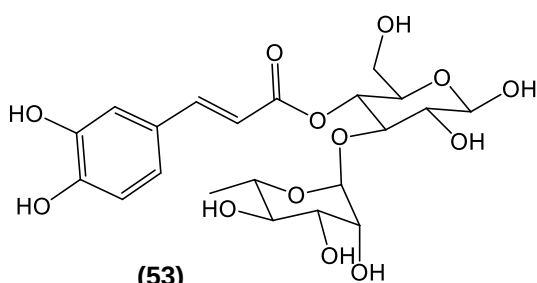


(50) R₁=H, R₂=OH, R₃=H

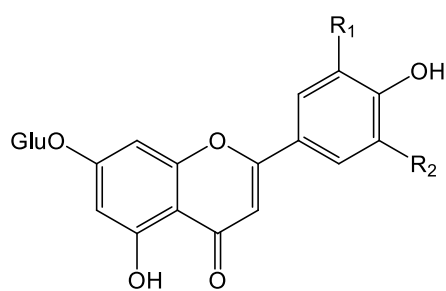
(51) R₁=R₂=H, R₃=OH



(52)

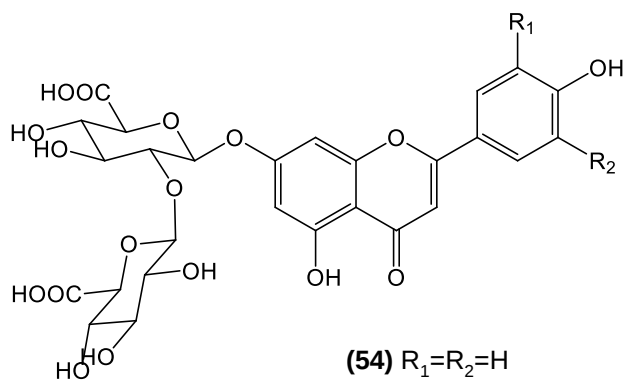


(53)



(57) R₁=OH, R₂=H

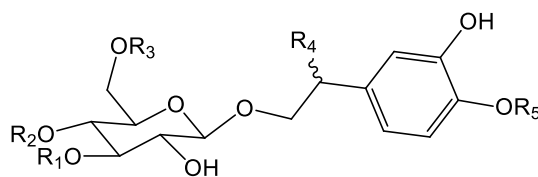
(58) R₁=R₂=OCH₃



(54) R₁=R₂=H

(55) R₁=OH, R₂=H

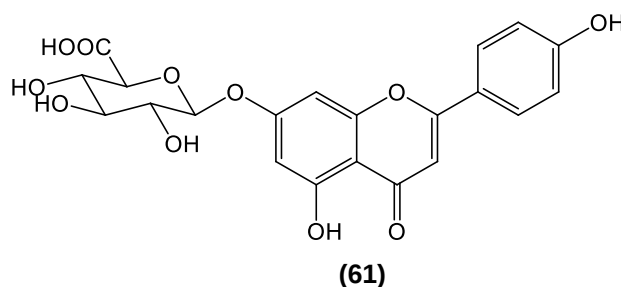
(56) R₁=R₂=OCH₃



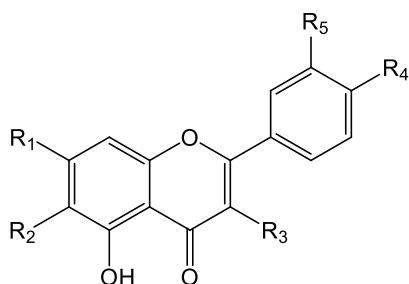
(59a, 59b) $R_1 = \alpha\text{-L-ramnose}$, $R_2 = (E)\text{-caffeoil}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$

(60) $R_1 = \beta\text{-apiose}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = (E)\text{-caffeoil}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{H}$

Gomes *et al.* [15] isolaram e identificaram a partir do extrato hidroetanólico (80%) das folhas de *L. alba* dois fenilpropanoides glicosilados isoméricos: verbascosídeo (**26**) e isoverbascosídeo (**35**); cinco flavonoides glicosilados: crisoeriol-7-*O*-diglucuronídeo (**55**), tricina-7-*O*-diglicuronídeo (**56**), luteolina-7-*O*-glicuronídeo (**57**), tricina-7-*O*-glicuronídeo (**58**) e apigenina-7-*O*-glicuronídeo (**61**); e três iridoides: 8-*epi*-loganina (**50**), mussaenosídeo (**51**) e ácido geniposídico (**52**).



Diversos flavonoides foram identificados do extrato etanólico das folhas de *L. alba* por Trevisan *et al.* [9]: naringenina (**12**); luteolina (**62**); spinacetina (**63**); apigenina (**64**); hispudulina (**65**); 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (**66**); 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**67**); santina (**68**) e pectolinarigenina (**69**). Além disso, foram identificados nesse extrato o verbascosídeo (**26**), o isoverbascosídeo (**35**) e o calceolariosídeo E (**60**).



(62) $R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH$

(63) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=OH, R_5=OH$

(64) $R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=H$

(65) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=OH, R_5=H$

(66) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=OH$

(67) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=OH, R_5=H$

(68) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OCH_3, R_4=OCH_3, R_5=H$

(69) $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=OCH_3, R_5=H$

Atualmente, grande parte dos trabalhos que relatam atividades biológicas de *L. alba*, tais como acaricida, sedativa, antifúngica, antiespasmódica, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral estão relacionados, principalmente, aos óleos essenciais dessa espécie ou aos extratos preparados por métodos de extração convencionais como infusão, decocção e maceração [3, 10, 14, 131-136].

No trabalho realizado por Jesus *et al.* [10] foi avaliada a atividade de inibição enzimática, frente a enzima acetilcolinesterase, e a atividade citotóxica, frente a linhagens de células tumorais, dos extratos preparados por infusão e maceração hidroetanólica (1:1) a partir das folhas de diferentes acessos de *L. alba*. Segundo os autores, os extratos de alguns acessos apresentaram atividade citotóxica promissoras, sugerindo a presença de compostos com potencial antitumoral. Por outro lado, considerando a atividade anticolinesterásica, os extratos apresentaram baixa atividade de inibição enzimática.

A atividade antioxidante do extrato etanólico preparado por maceração a partir das folhas de *L. alba* foi avaliada por Trevisan *et al.* [9]. Nesse estudo, os pesquisadores relataram que a atividade antioxidante apresentada por essa preparação está relacionada aos compostos polares como os diversos iridoides, flavonoides e fenilpropanoides identificados na planta.

No trabalho desenvolvido por Timóteo *et al.* [3] foi possível relacionar o potencial antioxidante dos extratos aquosos preparados por infusão e decocção

a partir das folhas de *L. alba* aos diversos compostos identificados nessas preparações como flavonoides e fenilpropanoides.

Considerando os potenciais biológicos de *L. alba*, Gomes *et al.* [137] desenvolveram uma formulação fitoterápica, em forma de comprimidos de liberação rápida, contendo o extrato hidroetanólico seco das folhas dessa espécie. Essa formulação possui propriedades gastroprotetoras e sedativas importantes. Segundo os autores, devido aos efeitos promissores da preparação obtida, ensaios clínicos e pré-clínicos futuros devem ser realizados para avaliar sua eficácia e segurança.

No estudo de preparação de filmes bucais a base de ervas com propriedades anti-inflamatório e antibacterianos, Zamora *et al.* [138] observaram a importante atividade anti-inflamatória de uma combinação de extratos preparada a partir de *L. alba* e *L. turbinata*. Esse resultado promissor está relacionado ao efeito sinérgico apresentado pelo extrato resultante dessa combinação, fornecendo uma preparação rica em diversos compostos fenólicos bioativos.

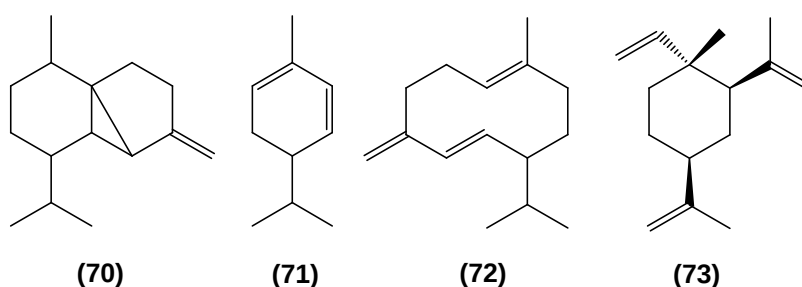
Os trabalhos citados reforçam a importância de estudos relacionados a esta espécie como fonte de compostos biologicamente ativos, especialmente quando se tem como objetivo a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos.

2.1.2 Gênero *Lantana*

O gênero *Lantana* compreende mais de 150 espécies de plantas herbáceas e arbustivas, que podem atingir mais de 2 m de altura, sendo muitas vezes utilizadas para fins decorativos devido à beleza de suas flores. Estas espécies são nativas principalmente da América subtropical e tropical, sendo algumas delas encontradas na Ásia tropical e África, estando distribuídas em aproximadamente 50 países [11, 16].

Segundo a literatura, as espécies do gênero *Lantana* são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, tais como tuberculose, bronquite, tumores, malária, úlcera e diarreia. Estudos realizados com extratos e óleos essenciais obtidos de *Lantana* têm demonstrado a grande diversidade química e biológica de várias espécies desse gênero [11].

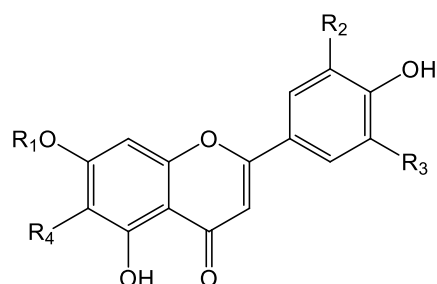
Considerando a composição química dos óleos essenciais, (*E*)-cariofileno (7), β -cubebeno (70), α -felandreno (71), germacreno D (72) e β -elemeno (73), estão entre os principais constituintes voláteis mais citados no gênero *Lantana* [139, 140]. Em contrapartida, furanonaftoquinonas, ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides glicosilados e iridoides glicosilados estão entre as classes de metabólitos secundários não voláteis comumente encontradas nas espécies desse gênero, assim como os lantadenos (triterpenos pentacíclicos) e esteroides [11, 141, 142].



Sabendo que o conhecimento popular sobre os usos tradicionais de plantas medicinais tem contribuído significativamente para descobertas de novas preparações e/ou compostos químicos bioativos de origem natural [142] e que o efeito biológico apresentado por um extrato vegetal está relacionado a sua composição química, é de suma importância a caracterização química dessas preparações na busca pelos compostos possivelmente responsáveis por determinada atividade.

Neste sentido, Julião *et al.* [141] isolaram e identificaram de uma fração de acetato de etila proveniente do extrato etanólico das folhas de *L. trifolia* diversos compostos fenólicos: verbascosídeo (26), martinosídeo (41), scutellareína-7-*O*- β -D-apiofuranosídeo (74), 5,6,4',5'-tetrahidroxi-7,3'-dimetoxiflavona (75), apigenina-7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-apiofuranosídeo (76), scutellareína-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo (77), sorbifolina

(78), ácido vanílico (79), ácido protocatecuico (80), 4-ácido hidroxibenzóico (81), ácido cafeico (82), ácido coumárico (83), betoniosídeo F (84) e samiosídeo (85).



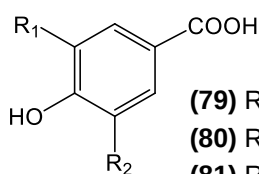
(74) $R_1 = \beta\text{-D-apiose}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$

(75) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{OH}$

(76) $R_1 = \beta\text{-D-apiose}$ (1 $\rightarrow$ 2) $\beta\text{-D-apiose}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

(77) $R_1 = \beta\text{-D-glicose}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$

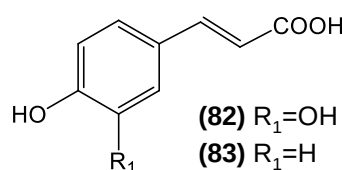
(78) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$



(79) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OCH}_3$

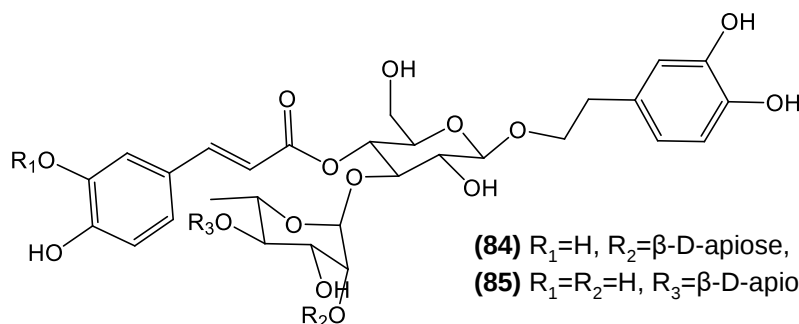
(80) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

(81) $R_1 = R_2 = \text{H}$



(82) $R_1 = \text{OH}$

(83) $R_1 = \text{H}$

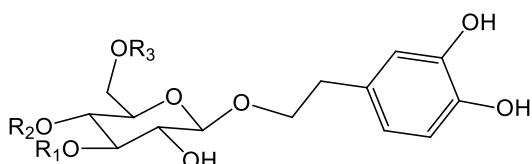
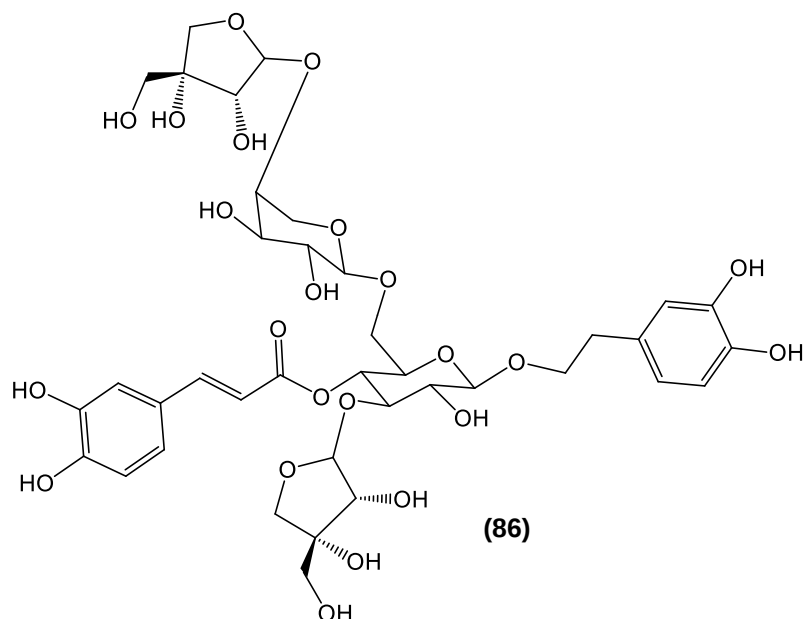


(84) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \beta\text{-D-apiose}$, $R_3 = \text{H}$

(85) $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \beta\text{-D-apiose}$

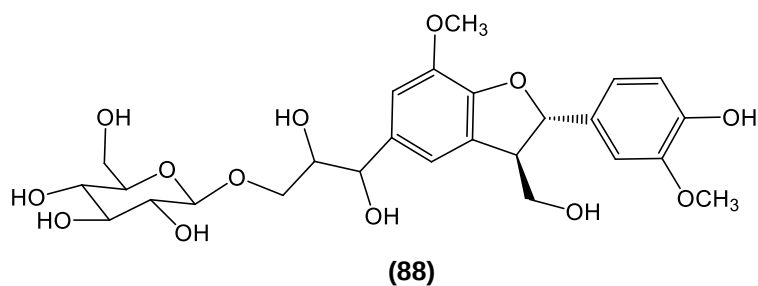
Segundo Julião *et al.* [141], tanto o extrato etanólico quanto a sua fração de acetato de etila, rica nestes compostos, apresentaram intensa ação sedativa em camundongos, comprovando o uso popular desta espécie como sedativa. Nesse estudo, a scutellareina-7-O- $\beta\text{-D-apiofuranosídeo}$ (74) foi a substância mais ativa entre os compostos isolados testados separadamente, porém muito menos potente do que o clonazepam e o Diazepam, que são sedativos potentes.

Sena-Filho *et al.* [143] isolaram diversos fenilpropanoides glicosilados a partir do extrato etanólico das raízes de *L. radula*. Esses compostos foram identificados como verbascosídeo (26), arenariosídeo (36), calceolariosídeo E (60), samiosídeo (85), radulosídeo (86) e isonuomiosídeo A (87). Além disso, foi relatado o isolamento da radulignana (88) deste extrato e o alissonosídeo (89) do extrato etanólico das raízes de *L. canescens*.



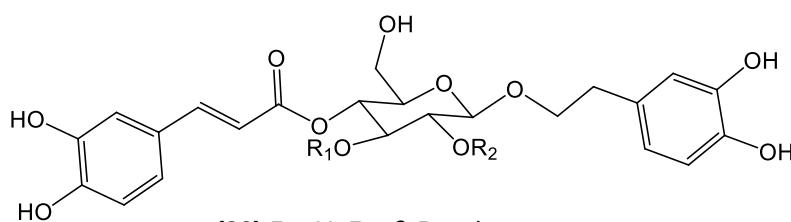
(87) $R_1=(3\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-D-apiose}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=(E)\text{-caffeoyl}$

(89) $R_1=(3\rightarrow1)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose}$, $R_2=(E)\text{-3-O-metil-caffeoyl}$, $R_3=(6\rightarrow1)\text{-}\beta\text{-D-apiose}$



Em outro estudo realizado por Julião *et al.* [144], foi relatado o isolamento e identificação de quatro fenilpropanoides glicosilados da fração de acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *L. fucata*: fucatosídeo A (**90**), fucatosídeo B (**91**), fucatosídeo C (**92**) e parviflorosídeo A (**93**), bem como seis metoxiflavonas: 4'-O-metilscutellareina (**94**), nepetina (**95**), 5,3',4'-trihidroxí-6,7,5'-trimetoxiflavona (**96**), cirsiol (**97**), salvigenina (**98**) e 5,3',5'-trihidroxí-6,7,4'-trimetoxiflavona (**99**). Através de ensaios *in vitro*, foi possível observar que

o extrato etanólico e o fucatosídeo C **(92)** apresentaram significativa atividade anti-inflamatória.

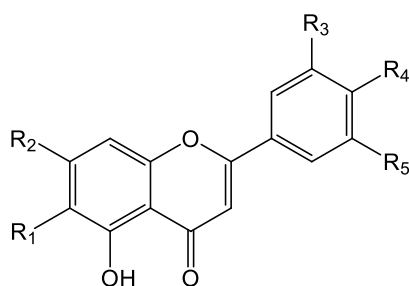


(90) $R_1=H$, $R_2=\beta$ -D-apiose

(91) $R_1=\beta$ -D-apiose, $R_2=\beta$ -D-xilose

(92) $R_1=\alpha$ -L-apiose, $R_2=\alpha$ -L-apiose

(93) $R_1=H$, $R_2=\alpha$ -L-ramnose



(94) $R_1=R_2=OH$, $R_3=R_5=H$, $R_4=OCH_3$

(95) $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=R_5=OH$

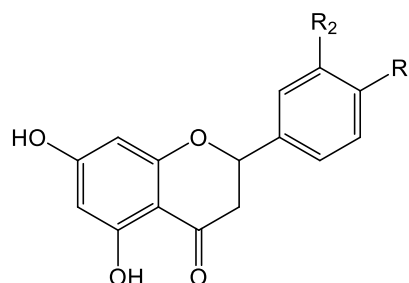
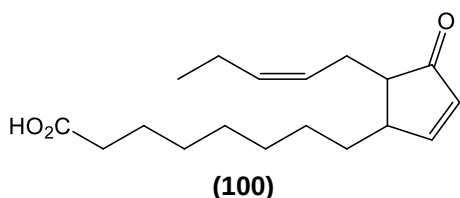
(96) $R_1=R_2=OCH_3$, $R_3=R_4=OH$, $R_5=OCH_3$

(97) $R_1=R_2=OCH_3$, $R_3=R_4=OH$, $R_5=H$

(98) $R_1=R_2=OCH_3$, $R_3=R_5=H$, $R_4=OCH_3$

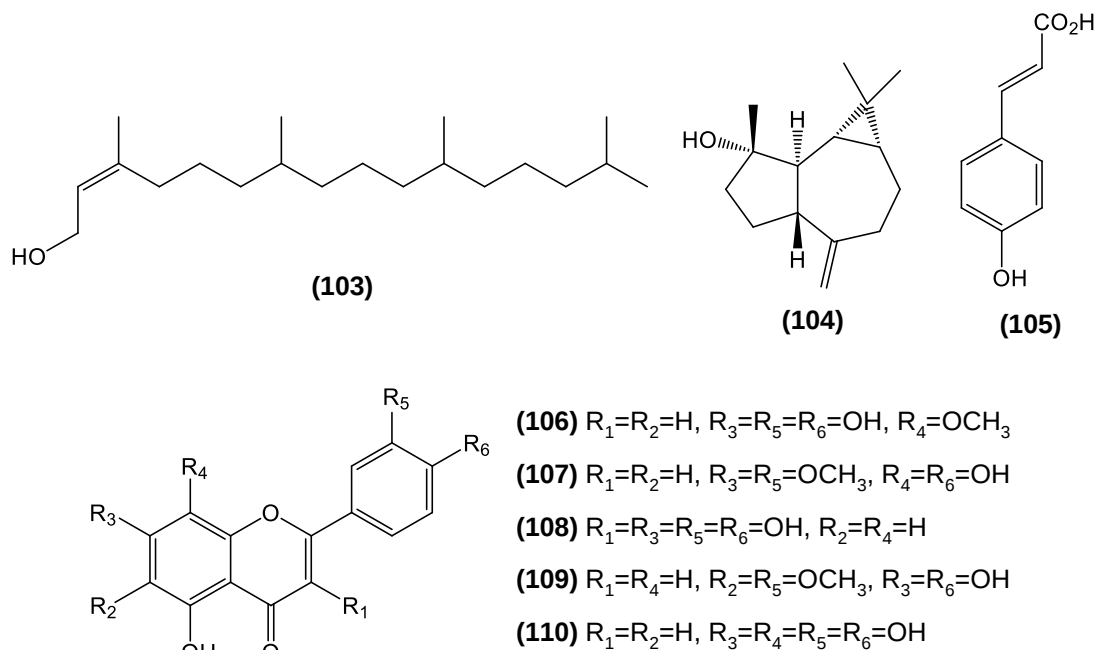
(99) $R_1=R_2=OCH_3$, $R_3=R_5=OH$, $R_4=OCH_3$

No estudo realizado por Maldonado *et al.* [142], foi relatado o isolamento e identificação de onze compostos do extrato etanólico das partes aéreas de *L. balansae*: ácido 12-oxo-fitodienóico **(100)**, persicogenina **(101)**, éter 3',4',7-trimetil-eriodictiol **(102)**, fitol **(103)**, espatulenol **(104)**, ácido 4-hidroxicinâmico **(105)**, onopordina **(106)**, 5,8,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona **(107)**, quercetina **(108)**, jaceosidina **(109)** e 8-hidroxiluteolina **(110)**.



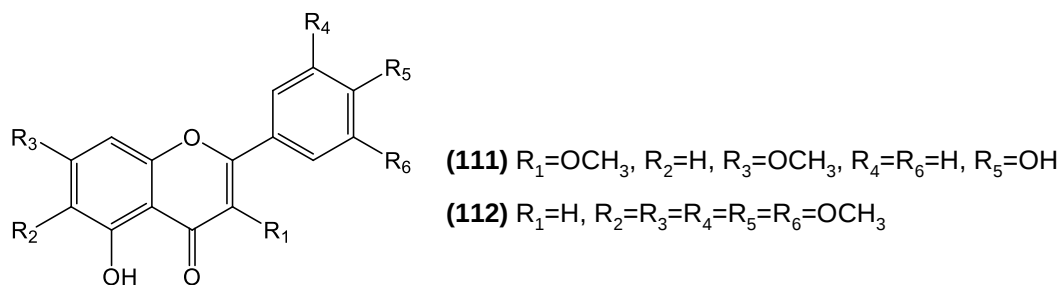
(101) $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$

(102) $R_1=R_2=OCH_3$

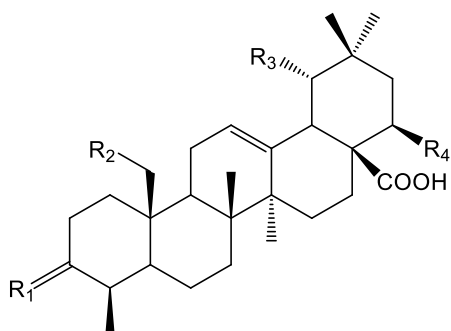
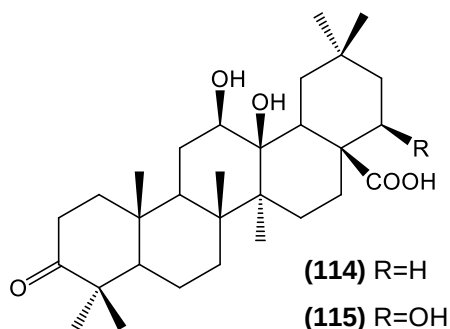
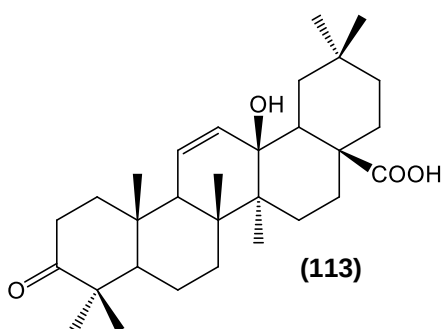


Nesse trabalho, foi possível observar que o extrato e duas frações (hexânica e acetato de etila) apresentaram importantes atividades antileishmaniose frente aos protozoários *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. O ácido 12-oxo-fitodienóico (**100**) se mostrou mais ativo em comparação ao extrato, às frações e aos outros compostos isolados testados separadamente, apesar de ser menos potente do que o controle positivo Anfotericina B.

Imbenzi *et al.* [145] evidenciaram o grande potencial antioxidante da fração de acetato de etila obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *L. trifolia*, a qual apresentou resultado semelhante ao padrão testado (vitamina C). Segundo os autores, esses resultados estão diretamente relacionados ao conteúdo fenólico dessa preparação, da qual foram isolados e identificados cinco flavonoides e um fenilpropanoide glicosilado: verbascosídeo (**26**), apigenina (**64**), scutellareina-7-O- β -D-apiofuranosídeo (**74**), sorbifolina (ladanetina, **78**), éter 3,7-dimetilcanferol (**111**) e umuhengerina (**112**).



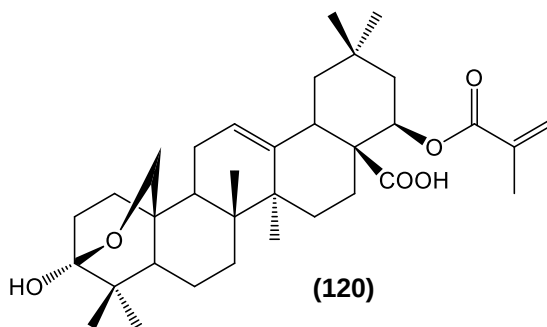
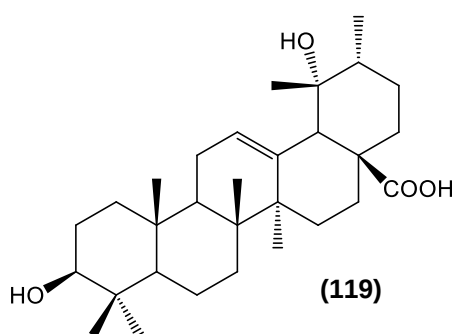
Mohamed *et al.* [146] avaliaram as atividades antiprotozoária e antimicrobiana de extratos e triterpenos isolados por fracionamento bioguiado a partir das raízes de *L. montevidensis*. Os triterpenos isolados foram ácido oleanônico (33), ácido oleanólico (34), ácido 13 β -hidroxi-3-oxo-olean-11-en-28-óico (113), ácido 12 β ,13 β -dihidroiolean-3-oxo-28-óico (114), ácido 12 β ,13 β ,22 β -trihidroiolean-3-oxo-28-óico (115), ácido 3 β ,25 β -dihidroxi-olean-12-en-28-óico (116), lantadeno A (117), ácido 19 α -hidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-óico (118), ácido pomólico (119) e ácido camárico (120).



(116) $R_1=R_2=OH$, $R_3=R_4=H$

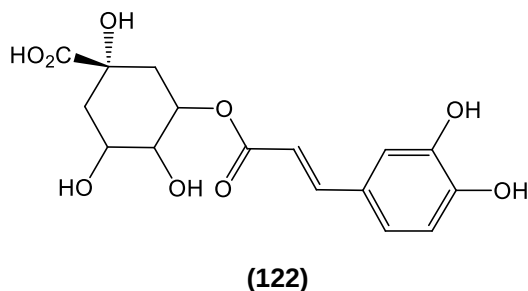
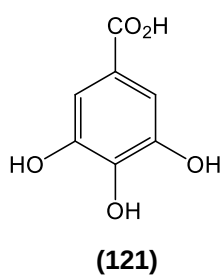
(117) $R_1=O$, $R_2=R_3=H$, $R_4=Angelol$

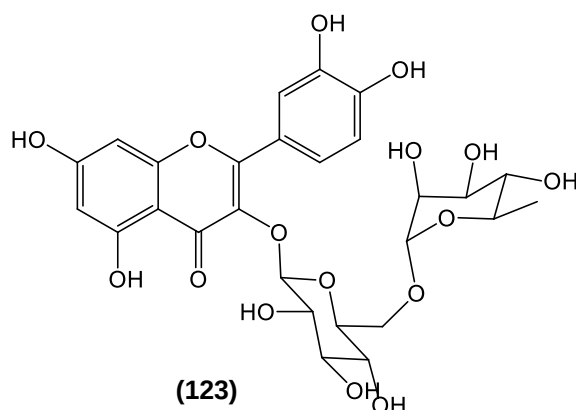
(118) $R_1=O$, $R_2=H$, $R_3=OH$, $R_4=H$



O ácido 12 β ,13 β -dihidroiolean-3-oxo-28-óico (**114**) e o ácido camárico (**120**) apresentaram importantes efeitos antibacterianos frente ao *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Além disso, os ácidos oleanônico (**33**), oleanólico (**34**), 13 β -hidroxi-3-oxo-olean-11-en-28-óico (**113**), 3 β ,25 β -dihidroxi-olean-12-en-28-óico (**116**) e camárico (**120**) apresentaram atividade antileishmaniose moderada e atividade antitripanossoma potente, sendo mais ativos do que o fármaco utilizado como padrão, a difluorometilornitina.

Sousa *et al.* [12] relataram a atividades antioxidantes dos extratos etanólicos das folhas e raízes de *L. montevidensis*. Diferentes compostos fenólicos foram identificados e quantificados nesses extratos: ácido cafeico (**82**), quercetina (**108**), ácido gálico (**121**), ácido clorogênico (**122**) e rutina (**123**).





Com base na diversidade química e biológica apresentada pelos extratos, frações e/ou compostos isolados de várias espécies do gênero *Lantana*, fica evidente a importância de estudos com essas espécies na busca por compostos com atividades farmacológicas.

***Lantana camara* Linn.**

A espécie *Lantana camara* (Figura 11) está entre as espécies mais estudadas do gênero *Lantana*, caracterizando-se como um arbusto pequeno, nativo da América tropical e subtropical, podendo atingir até 3 m de altura e 2,5 m de largura [16, 147]. As folhas dessa espécie são ovais, serrilhadas, podendo medir de 3 a 8 cm de comprimento por 3 a 6 cm de largura e apresentar em seus caules e galhos pequenos espinhos. Suas flores são pequenas e podem assumir diversas colorações (vermelha, violeta, amarela, rosa e branca) a depender da idade da planta, enquanto os frutos são de cor azul-esverdeada (5 a 7 mm de diâmetro) [17, 147].

Figura 11: Fotografias da espécie *L. camara*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A espécie *L. camara*, conhecida no Brasil como camará-de-cheiro e camará-de-chumbo, tem sido utilizada tradicionalmente para o tratamento de enfermidades como sarampo, febre, dor de estômago, tumores, reumatismo e bronquite. As folhas são as partes da planta mais utilizadas, sendo preparadas principalmente na forma de chás (infusão ou decocção) e/ou cataplasma. É também bastante utilizada como planta ornamental devido a beleza de suas flores [16, 17, 147].

Estudos fitoquímicos realizados com *L. camara* relataram a presença de diversas classes de metabólitos secundários em sua composição como ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides glicosilados e triterpenoides, descrevendo ainda importantes atividades biológicas apresentadas por seus óleos essenciais, extratos e compostos isolados [12, 20, 148].

No trabalho realizado por Naz e Bano [18], foi relatada a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *L. camara*. Esta preparação se mostrou ativa tanto do ponto de vista antibacteriano, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, quanto antifúngico, frente a *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*. Considerando estes resultados, os autores sugerem que essa planta poderia ser uma importante fonte de compostos antimicrobianos a ser utilizada por indústrias farmacêuticas.

Mahdi-Pour *et al.* [149] relataram que extratos metanólicos preparados a partir de diversas partes de *L. camara* (flores, folhas, raízes, caule e frutos) apresentaram interessantes atividades antioxidantes, com destaque para aquele

obtido a partir de suas folhas. Em outro estudo, Kalita *et al.* [150] relataram que o extrato aquoso das folhas de *L. camara* apresentou atividades antioxidante e de inibição contra o dano oxidativo causado ao DNA. A atividade antioxidante do extrato etanólico obtido das folhas de *L. camara* também foi evidenciada em estudo realizado por Sousa *et al.* [12], no qual diversos compostos fenólicos foram identificados e quantificados, sendo eles ácido cafeico (**82**), quercetina (**108**), ácido gálico (**121**), ácido clorogênico (**122**) e rutina (**123**); destacando a importância desta espécie como fonte de compostos fenólicos antioxidantes.

Em estudo realizado por Sathish *et al.* [19], foi possível observar a significativa atividade antiulcerogênica em ratos apresentada pelo extrato metanólico das folhas de *L. camara*. Essa atividade pode estar relacionada a presença de flavonoides, triterpenos, taninos, saponina e fenilpropanoides detectados nessa preparação. Esse extrato apresentou ainda importante atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori*, microrganismo associado à etiologia das úlceras.

Alguns estudos têm mostrado o potencial anticâncer de extratos e compostos isolados de *L. camara*. Badakhshan *et al.* [21] relataram em seu estudo que os extratos metanólicos das folhas e raízes dessa espécie apresentaram efeito antineoplásico moderado frente a células leucêmicas humanas em comparação à carboplatina (uma droga anticâncer). Em um estudo realizado por Ghosh *et al.* [20] foi observado que o ácido oleanônico (**33**), isolado do extrato metanólico da raiz de *L. camara*, apresentou promissora atividade citotóxica frente a células tumorais A375 (melanoma).

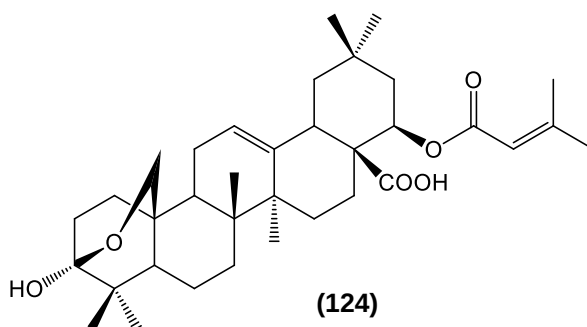
Ganesh *et al.* [22] relataram que o extrato metanólico das folhas de *L. camara* apresentou atividade anti-hiperglicêmica em ratos com diabetes induzida por aloxana em comparação a glibenclamida, princípio ativo de um medicamento utilizado para o controle da diabetes. Através da investigação fitoquímica desse extrato foi possível observar a presença de diversos compostos químicos como saponinas, taninos, flavanoides, esteroides e triterpenoides, os quais podem estar relacionados ao efeito antidiabético observado.

Em seus experimentos, Nirmal *et al.* [151] observaram que o extrato metanólico das folhas de *L. camara* apresentaram importante atividade

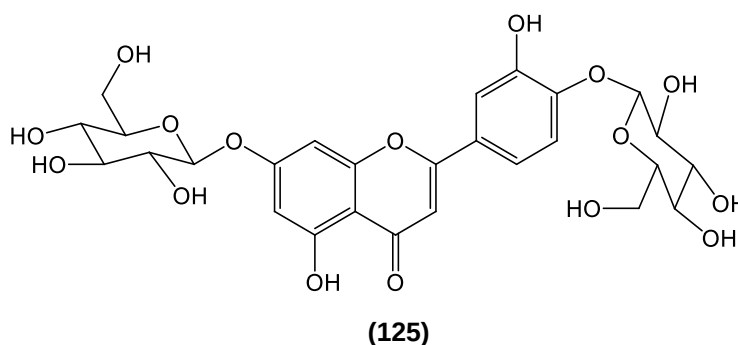
antituberculose *in vitro* frente a *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a multidrogas. Nesse estudo, os autores sugerem que as atividades apresentadas pelos extratos brutos podem estar relacionadas a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides, bem como pela presença do álcool diterpênico fitol (**103**) e seus derivados.

Hiremath *et al.* [152] purificaram e caracterizaram uma lectina (uma glicoproteína com 10% de carboidrato) a partir do extrato acetato tamponado das folhas de *L. camara*. Essa proteína apresentou promissoras atividades antifúngicas, frente a *Aspergillus niger*, *Metarhizium anisopliae* e *Purpureocillium lilacinum*, e antibacterianas, frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, inibindo o crescimento de todas as espécies de fungo e bactérias testadas de forma semelhante aos padrões Ampicilina e Clotrimazol.

Em estudo realizado por Delgado-Altamirano *et al.* [153], foi possível observar a atividade antileishmanicida de diferentes extratos de diclorometano obtidos a partir das folhas de *L. camara* coletadas em diferentes meses. Segundo os autores, essa atividade está relacionada a presença de alguns terpenoides nessas preparações como o ácido camárico (**120**) e ácido lantanílico (**124**).



Darwish *et al.* [154] relataram pela primeira vez o potencial das flores e folhas de *L. camara* como fonte de metabólitos secundários com atividade inibitória do vírus da COVID-19 como o isoverbascosídeo (**35**) e a luteolina-7,4'-O-diglicosídeo (**125**).



Diante dos resultados citados, percebe-se a potencialidade biológica, farmacológica e econômica da espécie *L. camara*, justificando o interesse deste trabalho na busca por preparações e/ou compostos que sejam úteis na área da saúde.

2.2 Aplicação da UAE e da MAE para obtenção de compostos fenólicos de matrizes vegetais.

A composição química de cada matriz vegetal é única, se fazendo necessário avaliar qual técnica e/ou condições de extração são as mais apropriadas para a obtenção de um produto com maior potencial bioativo [34]. Nesse sentido, diversos estudos relatados na literatura mostram que as técnicas não convencionais são mais eficientes do que as técnicas tradicionais para a obtenção de diversas classes de compostos químicos presentes em diferentes matrizes vegetais.

Os extratos obtidos por UAE têm apresentado resultados melhores em comparação aos extratos obtidos pelas técnicas convencionais. Isso foi observado por Ali *et al.* [82] no estudo de extração de compostos fenólicos das folhas de *Piper betle* empregando a condição de extração otimização por UAE. A UAE gerou um extrato com maior rendimento, maior conteúdo de fenólicos totais e maior atividade antioxidante em comparação ao extrato obtido por maceração.

Goltz *et al.* [155] demonstraram em seus experimentos com a espécie *Achyrocline satureioides* que a utilização da técnica UAE gerou melhor resultado de recuperação de compostos fenólicos, aproximadamente 6 vezes maior em comparação a extração por maceração empregando o mesmo tempo de

extração. Como consequência disso, foi observada também uma atividade antioxidante 3 vezes maior do extrato etanólico preparado por UAE em relação àquele preparado por maceração.

No estudo realizado por Saifullah *et al.* [98], foi relatado o maior conteúdo de fenólicos totais e a maior atividade antioxidante do extrato das folhas de *Leptospermum petersonii* obtidos por UAE em comparação ao extrato obtido por maceração com agitação. Segundo os autores, os compostos fenólicos presentes são os principais responsáveis pelas atividades antioxidantes apresentadas pelos extratos obtidos.

Em um trabalho realizado por Iftikhar *et al.* [156], o extrato obtido a partir do farelo de centeio (*Secale cereale* L.) por UAE, na condição ótima de extração, apresentou maior conteúdo de fenólicos totais e maior conteúdos de flavonoides totais em comparação ao extrato obtido por maceração convencional empregando as mesmas condições de extração. Além disso, o extrato de UAE apresentou maior atividade antioxidante (por diferentes metodologias) do que o de maceração.

Com o intuito de maximizar a extração de compostos fenólicos da casca de ciriguela (*Spondias purpurea* L.), Silva Júnior *et al.* [157] otimizaram um processo de extração por UAE. Nesse estudo o extrato de UAE apresentou conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método do DPPH superiores aos obtidos pelos extratos de MAE e maceração. A maior eficiência de extração da UAE em comparação a MAE e maceração foi atribuída a ocorrência do efeito de cavitação durante a extração por ultrassom, o que favorece, entre outros fatores, a ruptura da parede celular vegetal e, portanto, o aumento da transferência de massa do processo.

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é outra técnica que vem sendo muito utilizada na recuperação de metabólitos secundários de origem vegetal. Em um estudo realizado com diferentes partes de *Malus domestica*, o extrato obtido por MAE a partir das raízes dessa espécie, nas condições ótimas de extração, apresentou maior conteúdo de fenólicos totais em relação a maceração convencional em um tempo de extração 6 vezes menor [158].

Em estudo recente realizado por Dairi *et al.* [159], para a obtenção de compostos fenólicos antioxidantes de cebola vermelha (*Allium cepa* L.), foi observado que o extrato obtido por MAE, empregando as condições otimizadas durante o trabalho, apresentou maiores atividades antioxidantes, através de ensaios DPPH e ABTS, em relação àquelas da extração convencional com agitação magnética, apesar de ambos os extratos apresentarem conteúdo de fenólicos totais semelhantes. Nesse estudo, o extrato de MAE foi obtido empregando tempo de extração muito menor do que o extrato obtido por agitação magnética.

Em um estudo realizado com a espécie *Humulus lupulus*, foi evidenciada a maior eficiência da MAE na recuperação de compostos fenólicos em comparação aos extratos obtidos por UAE [160]. Nesse estudo, o extrato etanólico preparado por MAE apresentou maior conteúdo de fenólicos totais e maior atividade antioxidante em comparação àqueles preparados por UAE utilizando diferentes solventes. Os extratos obtidos apresentaram como compostos majoritários a catequina, a rutina e o ácido clorogênico.

A otimização de extração por micro-ondas para maximizar a recuperação de compostos fenólicos a partir das cascas de toranja (*Citrus × paradisi*) foi realizada por Kaanin-Boudraa *et al.* [161]. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de MAE, empregado as condições ótimas de extração, apresentou maior conteúdo de fenólicos totais em comparação ao extrato obtido por maceração empregando a mesmo solvente de extração e relação solvente para sólido otimizada na MAE. Mesmo utilizando um tempo de extração de 30 s, muito menor do que aquele empregado na maceração (2 h), o extrato de MAE apresentou maior potencial antioxidante em comparação ao da maceração, mostrando a maior eficiência da técnica de micro-ondas.

Abbas *et al.* [162] realizaram um estudo comparativo entre MAE, UAE e Soxhlet, empregando acetato de etila como solvente de extração, visando a obtenção de maior rendimento de extração, conteúdo de fenólicos totais (TPC) e conteúdo de flavonoides totais (TFC) a partir dos frutos da espécie *Lagenaria siceraria*. Os extratos de MAE e UAE, empregando as respectivas condições de extração otimizadas, apresentaram resultados de rendimento, TPC e TFC

semelhantes, porém muito superiores ao extrato de Soxhlet, mesmo sendo obtidos empregando tempo de extração inferior ao deste último: MAE, 40 s; UAE, 30 min; e Soxhlet, 1 h.

Até onde é de nosso conhecimento, nenhum trabalho na literatura relata a atividade biológica de extratos de *L. alba* preparados por métodos de extração não convencionais como MAE e UAE, os quais vêm ganhando destaque por apresentarem algumas vantagens em relação às técnicas convencionais, podendo fornecer a obtenção de extratos com maior potencial biológico [23, 24, 28]. Este fato despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa em estudar as técnicas de extração não convencionais comparando-as entre si e com as convencionais (maceração, infusão, decocção e Soxhlet) quanto a recuperação de compostos fenólicos, que têm se mostrado bioativos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Realizar a otimização de extração por UAE e MAE de compostos fenólicos das folhas de *L. alba* e *L. camara* visando o maior rendimento de extração e o maior conteúdo de fenólicos totais, comparando os resultados fitoquímicos e de atividades biológicas dos extratos nas respectivas condições otimizadas com aqueles dos extratos obtidos pelos métodos convencionais (maceração, infusão, decocção e Soxhlet).

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no conteúdo de fenólicos totais das folhas de *L. alba* e *L. camara* por UAE por meio de um planejamento de fator único para determinar o intervalo de cada variável de extração que favoreça o maior conteúdo de fenólicos totais;
- Empregar um planejamento Box-Behnken e metodologia de superfície de resposta para determinar a melhor condição de extração para a obtenção do maior rendimento de extração e maior conteúdo de fenólicos totais das

folhas de *L. alba* e *L. camara* por UAE, avaliando o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido;

- Empregar um planejamento Box-Behnken e metodologia de superfície de resposta para determinar a melhor condição de extração para a obtenção do maior rendimento de extração e maior conteúdo de fenólicos totais das folhas de *L. alba* e *L. camara* por MAE, avaliando o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas;
- Preparar extratos de *L. alba* e *L. camara* por maceração, infusão, decocção e Soxhlet;
- Determinar o rendimento de extração de todos os extratos;
- Determinar o conteúdo de fenólicos totais de todos os extratos;
- Determinar o conteúdo de flavonoides totais e as atividades antioxidantes dos extratos obtidos de cada espécie na condição ótima de extração por UAE e MAE, bem como dos extratos de maceração, infusão, decocção e Soxhlet;
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais de todos os extratos obtidos por UAE e MAE, bem como dos extratos de maceração, infusão, decocção e Soxhlet;
- Determinar a atividade de inibição enzimática *in vitro*, frente às enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, dos extratos obtidos por UAE e MAE, bem como dos extratos de maceração, infusão, decocção e Soxhlet;
- Determinar a metodologia mais promissora para a obtenção de extratos bioativos a partir das folhas das espécies estudadas;
- Identificar as principais classes de compostos químicos presentes nos extratos por LC-DAD.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

- Estufa de circulação forçada Marconi (MA 035, Piracicaba, SP, Brasil);
- Balança analítica Denver Instrument Company – modelo APX-200;
- Liquidificador doméstico Britânia – modelo Eletronic;
- Peneiras para análise granulométrica Bertel (Caieiras, SP, Brasil);
- Equipamento de Micro-ondas (NEOS-GR, Milestone, Itália);
- Banho de ultrassom Elma (Elmasonic P 60H, Alemanha);
- Forno de micro-ondas Electrolux – modelo ME28S;
- Evaporador rotatório BUCHI (modelo R-3), acoplado a uma bomba de vácuo da mesma marca (modelo V-700); com um sistema de refrigeração da marca Microquímica Equipamentos Ltda (modelo MQBTC99-20);
- Ultrafreezer Liotop UFR30 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil);
- Liofilizador de bancada Liotop L101 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil);
- Freezer Electrolux – modelo FFE24;
- Leitora de microplacas BioTek™ – modelo Synergy H1;
- Papel filtro qualitativo Macherey-Nagel (MN 615);
- Microplacas Kasvi (São José do Pinhais, PR, Brasil);
- Filtro seringa PVDF 0,45 µm VALUPREP (Hexis, Jundiaí, SP, Brasil);

4.2 Reagentes e Solventes

- Reagente de Folin & Ciocalteu's (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);

- Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) grau analítico (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Tricloreto de alumínio hexa-hidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) grau analítico (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Hidróxido de sódio grau analítico (Mallinckrodt Baker, Suécia);
- Nitrito de sódio (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil);
- DPPH – 2,2-Difenil-1-picril hidrazil (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- ABTS – 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- Ácido clorídrico – (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina – TPTZ (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- Cloreto férrico hexa-hidratado (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil);
- Acetato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil);
- Sulfato Ferroso hepta-hidratado (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil);
- Ácido gálico (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- Catequina (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma Aldrich, St. Louis, Co, USA);
- Corante Hoechst (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Doxorrubicina (IMA, Buenos Aires, Argentina);
- Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Butirilcolinesterase de humanos
- Iodeto de acetilcolina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Acetato de amônio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Galantamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);

- Alamar Blue (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Etanol grau analítico (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Metanol grau analítico (NEON, São Paulo, SP, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Honeywell, St. Muskegon, MI, EUA);
- Metanol grau HPLC (ASC Científica, Sumaré, SP, Brasil);
- Ácido fórmico grau analítico, 85% (v/v) (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil);
- Água deionizada – Milli-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil);

4.3 Sistemas cromatográficos

- Cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A3, sistema binário de bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas CTO-20A;
- Sistema de cromatografia líquida de altíssima eficiência e velocidade modelo Nexera XR equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20ADXR, uma bomba modelo LC-20AD, câmara de mistura modelo MR180uLII (volume interno de 180 μ L), degaseificador de membrana (*on-line*) modelo DGU-20A3R, um auto injetor modelo SIL-20A, um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável modelo SPDM20A, forno de colunas modelo CTO-20A e uma interface SHIMADZU CBM-20A. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas Bruker modelo *AmaZon Speed* com fonte tipo ESI (*Electrospray Ion Source*), duplo funil de íons e analisador do tipo *Ion Trap* controlado pelo *software Compass 1.7*.

4.4 Colunas cromatográficas e capilares

- Coluna cromatográfica Kinetex C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm, 100 Å, Phenomenex), acoplada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária;
- Capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375 mm x 100 µm d.i.), tendo a AChE imobilizada covalentemente em sua superfície interna.
- Capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375 mm x 100 µm d.i.), tendo a BChE imobilizada covalentemente em sua superfície interna.

4.5 Material vegetal: coleta e processamento das folhas

Folhas das espécies *L. alba* e *L. camara* foram coletadas em abril de 2019 na Fazenda Experimental “Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe (UFS)” onde foram cultivadas. Essas plantas pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS (número de registro SisGen: A8CCB3B), que tem a supervisão do Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS que é coordenador do Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais e Melhoramento Vegetal (UFS). Exsicatas das espécies foram depositadas no Herbário da UFS com número de registro 13466 para *L. alba* (acesso LA-03) e 38273-2 para *L. camara* (acesso LAC-038).

Após a coleta, as folhas foram secas separadamente em estufa de circulação forçada a 40 °C durante 50 horas e trituradas em um processador comercial. O material triturado foi classificado utilizando-se peneiras para análise granulométrica a um tamanho de partícula entre 35 e 60 mesh (segundo o sistema Tyler) e armazenado em frascos de vidro com tampa a temperatura ambiente.

4.6 Preparo dos extratos e rendimento de extração

Para a recuperação dos metabólitos secundários das folhas de *L. alba* e *L. camara*, foram utilizados dois diferentes métodos de extração não convencionais

(UAE e MAE) e diferentes métodos de extração convencionais (maceração, infusão, decocção e Soxhlet) utilizados para a comparação.

4.6.1 *Extração assistida por ultrassom (UAE)*

A extração assistida por ultrassom de cada planta foi realizada em um banho de ultrassom (volume de trabalho de 4,3 L) a uma frequência de 37 kHz (potência nominal de operação de 150 W) e temperatura de 30 ± 1 °C. O material (0,5 g) foi colocado em um frasco de vidro cilíndrico (100 mL) com tampa e extraído de acordo com as condições especificadas de concentração de etanol em água, tempo de extração e relação solvente para sólido de acordo com cada planejamento de experimento utilizado. A temperatura e o tempo de extração foram continuamente monitorados através do painel do equipamento. Para manter a temperatura do banho constante (± 1 °C), quando necessário, pequenos volumes de água destilada foram retirados do banho e substituídos por volumes iguais de água destilada gelada.

Após a extração, todos os extratos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel filtro para a remoção de material particulado. Posteriormente, os extratos hidroetanólicos foram submetidos a evaporação a pressão reduzida para a remoção do solvente orgânico a 45 °C, congelados em ultrafreezer a -80 °C e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para a remoção do solvente aquoso remanescente. Os extratos brutos foram armazenados em potes de vidro fechados e estocados em freezer a uma temperatura abaixo de -10 °C ao abrigo da luz.

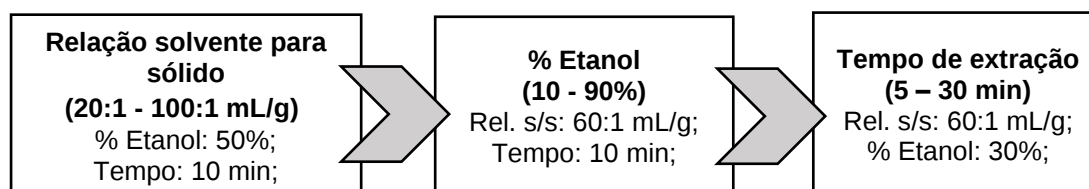
Planejamento experimental de fator único

Previamente, um planejamento experimental de fator único foi realizado para se determinar o intervalo mais adequado das variáveis que serão avaliados posteriormente por meio de um planejamento Box-Behnken (BBD): concentração de etanol em água (10, 30, 50, 70, 90%), relação solvente para sólido (20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1 mL/g) e tempo de extração (5, 10, 15, 20,

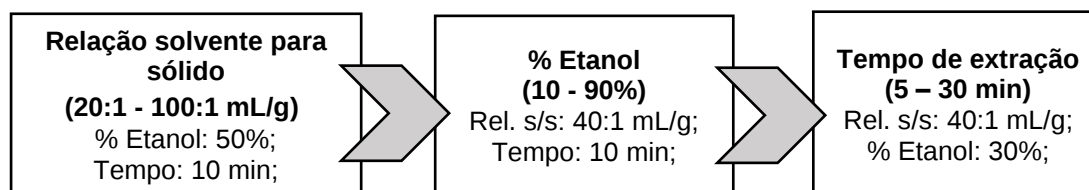
25, 30 min). A resposta estudada (variável dependente) nesse planejamento foi o conteúdo de fenólicos totais. Todos os experimentos foram realizados em duplicata seguindo a sequência experimental, para cada planta, ilustrada na Figura 12(a e b).

Figura 12: Sequência de realização dos experimentos por meio do planejamento experimental de fator único para determinar os intervalos adequados das variáveis concentração de etanol (10, 30, 50, 70, 90%), relação solvente para sólido (Rel. sol-sol, 20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1 mL/g) e tempo de extração (5, 10, 15, 20, 25, 30 min): a) *L. alba* e b) *L. camara*.

a) *L. alba*



b) *L. camara*



Otimização de extração por planejamento Box-Behnken e RSM

A otimização de extração assistida por ultrassom de cada espécie, auxiliada por metodologia de superfície de resposta (RSM), foi realizada de acordo com as condições especificadas de concentração de etanol, tempo e relação solvente para sólido seguindo um planejamento Box-Behnken com três variáveis e três níveis, totalizando 15 experimentos. Para a espécie *L. alba*, as três variáveis independentes estudadas, cujos intervalos foram determinados com base em um planejamento experimental de fator único, foram (Tabela 1): concentração de etanol (X_1 : 10, 30 e 50%, v/v), tempo de extração (X_2 : 10, 15 e 20 min) e relação solvente para sólido (X_3 : 40:1, 60:1 e 80:1 mL/g).

Tabela 1: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de *L. alba*.

Variáveis (Símbolos)	Níveis		
	Baixo (-)	Intermediário (0)	Alto (+)
Concentração de etanol (%), X_1	10	30	50
Tempo de extração (min), X_2	10	15	20
Relação solvente para sólido (mL/g), X_3	40:1	60:1	80:1

As combinações experimentais de acordo com os intervalos determinados das variáveis estudadas para a espécie *L. alba* estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de *L. alba*. As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).

Ensaio	X_1 (%)	X_2 (min)	X_3 (mL/g)
1	10 (-1)	10 (-1)	60:1 (0)
2	50 (1)	10 (-1)	60:1 (0)
3	10 (-1)	20 (1)	60:1 (0)
4	50 (1)	20 (1)	60:1 (0)
5	10 (-1)	15 (0)	40:1 (-1)
6	50 (1)	15 (0)	40:1 (-1)
7	10 (-1)	15 (0)	80:1 (1)
8	50 (1)	15 (0)	80:1 (1)
9	30 (0)	10 (-1)	40:1 (-1)
10	30 (0)	20 (1)	40:1 (-1)
11	30 (0)	10 (-1)	80:1 (1)
12	30 (0)	20 (1)	80:1 (1)
13 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)
14 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)
15 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)

X_1 : concentração de etanol em água; X_2 : tempo de extração; X_3 : relação solvente para sólido.

^c ponto central.

Para a espécie *L. camara*, as três variáveis independentes estudadas, cujos intervalos foram determinados com base em um planejamento experimental de fator único, foram (Tabela 3): concentração de etanol (X_1 : 10, 30 e 50%, v/v), tempo de extração (X_2 : 15, 20 e 25 min) e relação solvente para sólido (X_3 : 20:1, 40:1 e 60:1 mL/g).

Tabela 3: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de *L. camara*.

Variáveis (Símbolos)	Níveis		
	Baixo (-)	Intermediário (0)	Alto (+)
Concentração de etanol (% , X_1)	10	30	50
Tempo de extração (min, X_2)	15	20	25
Relação solvente para sólido (mL/g, X_3)	20:1	40:1	60:1

As combinações experimentais de acordo com os intervalos determinados das variáveis estudadas para a espécie *L. camara* estão mostradas na Tabela 4.

Tabela 4: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na UAE das folhas de *L. camara*. As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).

Ensaio	X_1 (%)	X_2 (min)	X_3 (mL/g)
1	10 (-1)	15 (-1)	40:1 (0)
2	50 (1)	15 (-1)	40:1 (0)
3	10 (-1)	25 (1)	40:1 (0)
4	50 (1)	25 (1)	40:1 (0)
5	10 (-1)	20 (0)	20:1 (-1)
6	50 (1)	20 (0)	20:1 (-1)
7	10 (-1)	20 (0)	60:1 (1)
8	50 (1)	20 (0)	60:1 (1)
9	30 (0)	15 (-1)	20:1 (-1)
10	30 (0)	25 (1)	20:1 (-1)
11	30 (0)	15 (-1)	60:1 (1)
12	30 (0)	25 (1)	60:1 (1)
13 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)
14 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)

Ensaio	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (mL/g)
15 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)

X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: relação solvente para sólido.

^c ponto central.

As respostas estudadas por UAE em cada planejamento Box-Behnken foram rendimento de extração e conteúdo de fenólicos totais. Três réplicas no ponto central foram utilizadas para estimativa do erro experimental e os experimentos, de cada planejamento, foram realizados de forma aleatória.

4.6.2 Extração assistida por micro-ondas (MAE)

Otimização de extração por planejamento Box-Behnken e RSM

Na extração por micro-ondas de cada planta, 0,4 g de material triturado foi colocado em um balão volumétrico (250 mL) e extraído com 20 mL de solvente apropriado, mantendo a relação solvente para sólido de 50 mL/g, seguindo um planejamento Box-Behnken com três variáveis independentes (Tabela 5): concentração de etanol em água (X₁: 0, 35 e 70%, v/v), tempo de extração (X₂: 2, 8,5 e 15 min) e potência de micro-ondas (X₃: 300, 450 e 600 W), e duas variáveis dependentes, as respostas: rendimento de extração e conteúdo de fenólicos totais. Três réplicas no ponto central foram utilizadas para a estimativa do erro experimental.

Tabela 5: Valores experimentais, símbolos e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento Box-Behnken na MAE.

Variáveis (Símbolos)	Níveis		
	Baixo (-1)	Intermediário (0)	Alto (1)
Concentração de etanol (% , X ₁)	0	35	70
Tempo de extração (min, X ₂)	2	8,5	15
Potência de micro-ondas (W, X ₃)	300	450	600

A temperatura (80 ± 10 °C), o tempo e a potência de micro-ondas foram continuamente monitorados através do painel do equipamento. Antes de contabilizar o tempo de extração, foi realizado o preaquecimento da mistura a 200 W de potência durante 1 min. Ao término da extração, cada amostra foi resfriada a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 2 min. Todos os experimentos foram executados em ordem aleatória e a configuração experimental está mostrada na Tabela 6. Os solventes utilizados foram escolhidos por serem reconhecidos como seguro e ambientalmente amigáveis [23, 34, 36, 163, 164]. O intervalo de tempo de extração e potência de micro-ondas foram escolhidos com base em estudos prévios relatados na literatura [165, 166].

Tabela 6: Configuração dos 15 ensaios do planejamento Box-Behnken na MAE das folhas de *L. alba* e *L. camara*. As variáveis codificadas estão nos níveis baixo (-1), intermediário (0) e alto (1).

Ensaio	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (W)
1	0 (-1)	2 (-1)	450 (0)
2	70 (1)	2 (-1)	450 (0)
3	0 (-1)	15 (1)	450 (0)
4	70 (1)	15 (1)	450 (0)
5	0 (-1)	8,5 (0)	300 (-1)
6	70 (1)	8,5 (0)	300 (-1)
7	0 (-1)	8,5 (0)	600 (1)
8	70 (1)	8,5 (0)	600 (1)
9	35 (0)	2 (-1)	300 (-1)
10	35 (0)	15 (1)	300 (-1)
11	35 (0)	2 (-1)	600 (1)
12	35 (0)	15 (1)	600 (1)
13 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)
14 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)
15 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)

X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: potência de micro-ondas.

^c ponto central.

Após a etapa de resfriamento, todos os extratos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel filtro para a remoção do particulado. Posteriormente, os extratos aquosos foram congelados em ultrafreezer a -80 °C

e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para remoção do solvente aquoso. Os extratos hidroetanólicos foram submetidos a evaporação a pressão reduzida para a remoção do solvente orgânico a 45 °C, congelados em ultrafreezer a -80 °C e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para a remoção do solvente aquoso remanescente. Todos os extratos brutos foram armazenados em potes de vidro fechados e estocados em freezer abaixo de -10 °C ao abrigo da luz.

4.6.3 Validação do procedimento de extração por UAE e MAE

A relação entre as variáveis dependentes e independentes em cada planejamento foi explicada por uma função polinomial do segundo grau (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

onde Y corresponde a variável resposta medida; X_i e X_j (n entre 1 e 3) correspondem às variáveis independentes avaliadas em cada planejamento; β_0 é uma constante; β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de regressão do modelo: β_i para os termos lineares; β_{ii} para o termos quadráticos; e β_{ij} para os termos de interação.

Para os cálculos utilizados na determinação das condições ótimas de extração por UAE ou MAE, considerando a maximização simultânea do rendimento de extração e do TPC das folhas das espécies estudadas, foi adotada a seguinte consideração: todas as variáveis possuem igual importância, ou seja, mesmo fator de peso e impacto [167]. Para a validação das condições de extração otimizadas para cada espécie, foram realizadas extrações em triplicata por UAE e MAE, separadamente, empregando as respectivas condições ótimas previstas por meio do planejamento BBD de acordo com cada metodologia de extração.

4.6.4 **Extração por maceração convencional (MC)**

Os extratos obtidos por maceração hidroetanólica foram preparados seguindo condições semelhantes às otimizadas no processo de ultrassom de cada planta.

Para a espécie *L. alba*, 0,5 g de material triturado foi colocado em um frasco de vidro cilíndrico (100 mL) com tampa e extraído com 35,5 mL de solução etanólica em água (29%, v/v) (mesma relação solvente para sólido da UAE, 71:1 mL/g) a uma temperatura de 30 °C durante 17,8 min.

Para a espécie *L. camara*, 0,5 g de material triturado foi colocado em um frasco de vidro cilíndrico (100 mL) com tampa e extraído com 30 mL de solução etanólica em água (35%, v/v) (mesma relação solvente para sólido da UAE, 60:1 mL/g) a uma temperatura de 30 °C durante 25 min.

Os extratos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel filtro, evaporados a pressão reduzida para a remoção do solvente orgânico a 45 °C, congelados em ultrafreezer a -80 °C e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para a remoção do solvente aquoso remanescente. Os extratos brutos foram armazenados em potes de vidro fechados e estocados em freezer a uma temperatura abaixo de -10 °C ao abrigo da luz. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.6.5 **Extração por infusão (INF)**

Os extratos aquosos preparados por infusão de cada planta foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Jesus *et al.* [10] com algumas modificações: 0,4 g de material triturado foi colocado em um béquer (25 mL) e extraído com 20 mL de água ultrapura (relação solvente para sólido de 50:1 mL/g) aquecida a 92 °C, em forno de micro-ondas, e deixado em repouso durante 10 min a temperatura ambiente (26 ± 1 °C). Os extratos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel filtro, congelados em ultrafreezer (-80 °C) e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para a remoção do solvente aquoso. Os extratos brutos foram armazenados em potes de vidro

fechados e estocados em freezer a uma temperatura abaixo de -10 °C ao abrigo da luz. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.6.6 Extração por decocção (DEC)

Os extratos aquosos preparados por decocção de cada planta foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Prado *et al.* [107] com algumas modificações: 0,4 g de material triturado foi colocado em um béquer (25 mL) contendo 20 mL de água ultrapura (relação solvente para sólido de 50:1 mL/g) em ebulição (92 °C) sobre uma placa de aquecimento e deixado sob aquecimento por 2 min. Na sequência, a mistura foi retirada da placa de aquecimento e mantida em repouso durante 8 min a temperatura ambiente (26 ± 1 °C), totalizando 10 min de extração. Os extratos obtidos foram filtrados sob pressão reduzida através de papel filtro, congelados em ultrafreezer (-80 °C) e liofilizados (a -58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 48 horas para a remoção do solvente aquoso. Os extratos brutos foram armazenados em potes de vidro fechados e estocados em freezer a uma temperatura abaixo de -10 °C ao abrigo da luz. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.6.7 Extração por Soxhlet (SOX)

Os extratos preparados por Soxhlet de cada planta foram obtidos empregando a seguinte metodologia: 3 g de material, seco e triturado, foram colocados dentro de um cartucho de papel filtro qualitativo de 12 cm de diâmetro e colocado no extrator protegido da luminosidade. Foram utilizados 150 mL de solução de etanol em água como solvente de extração, determinado a partir da otimização por MAE de cada espécie estudada (*L. alba* - 43% de etanol em água; *L. camara* - 53% de etanol em água), empregando uma relação solvente para sólido de 50:1 mL/g e tempo de extração de 1 h. Os extratos obtidos foram evaporados a pressão reduzida para a remoção do solvente orgânico a 45 °C, congelados em ultrafreezer a -80 °C e liofilizados (-58 °C e pressão abaixo de 100 µHg) por 96 horas para a remoção do solvente aquoso remanescente. Os

extratos brutos foram armazenados em potes de vidro fechados e estocados em freezer a uma temperatura abaixo de -10 °C ao abrigo da luz. As extrações foram realizadas em duplicata.

4.6.8 *Rendimento de extração*

O rendimento dos extratos obtidos das folhas de *L. alba* e *L. camara* foram calculados de acordo com a Equação (2):

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{folhas}}} \times 100\% \quad (2)$$

onde m_{extrato} é a massa de extrato seco (em g) e m_{folhas} é a massa de folhas secas e trituradas (em g) utilizadas na extração.

4.7 *Determinação do conteúdo de fenólicos totais*

O conteúdo de fenólicos totais – TPC (*total phenolic content*) dos extratos foram avaliados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu seguindo a metodologia descrita por Luo *et al.* [36] com pequenas modificações. Para o ensaio, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg/mL e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. Na sequência, 25 µL do sobrenadante de cada extrato foram misturados com 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%, v/v, em água) em uma placa de 96 poços. Após 5 min, 100 µL de carbonato de sódio (7,5%, m/v) foram adicionados à mistura. Na sequência, a solução foi incubada durante 1 h a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) sob proteção da luz. Após esse período a absorbância da mistura foi medida no comprimento de onda de 765 nm em uma leitora de microplaca. O TPC foi expresso como miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de material seco (mg EAG/g ms) empregando uma curva de calibração de ácido gálico (0–200 mg/L). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.8 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais – TFC (*total flavonoid content*) dos extratos foram avaliados por meio da reação de complexação empregando tricloreto de alumínio hexa-hidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) seguindo a metodologia descrita por Lenucci *et al.* [168] com adaptações. Preliminarmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg/mL e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. Na sequência, 25 μL do sobrenadante de cada extrato foram misturados com 25 μL de uma solução aquosa de NaNO_2 (5%, m/v) em uma placa de 96 poços e deixado em repouso durante 5 min. Após esse tempo, 50 μL de uma solução aquosa de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10%, m/v) foram adicionados à mistura e deixado em repouso. Após 5 min, foram adicionados 200 μL de uma solução aquosa de NaOH (5%, m/v) nos poços contendo a mistura reacional e incubados durante 20 min a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) sob proteção da luz. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 510 nm em uma leitora de microplaca. O TFC foi expresso como miligrama de equivalente de catequina por grama de material seco (mg EC/g ms), empregando uma curva de calibração de catequina (0–300 mg/L). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.9 Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

Os ensaios de atividades antioxidantes, pelo método da inibição do radical DPPH, foram realizados seguindo metodologias descritas na literatura com algumas modificações [34, 36]. Inicialmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg/mL e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. Na sequência, 25 μL de cada extrato foi misturado com 150 μL de solução etanólica de DPPH (400 $\mu\text{mol/L}$) em uma microplaca de 96 poços. Após o período de incubação (30 min sob proteção da luz), a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), a absorbância de cada amostra foi medida no comprimento de onda de 517 nm utilizando uma leitora de microplaca. A capacidade antioxidante de

cada extrato foi expressa como micromol de equivalente de Trolox por grama de material seco ($\mu\text{mol ET/g ms}$) empregando uma curva de calibração de Trolox (0–700 $\mu\text{mol/L}$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.10 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS

Os ensaios de atividades antioxidantes pelo método do radical ABTS foram realizados seguindo metodologias descritas na literatura com algumas modificações [23, 52]. Inicialmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg/mL e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. A solução do cátion radicalar ABTS foi preparada a partir da mistura de 22 μL de solução de persulfato de potássio (140 mmol/L) com 1,25 mL de solução estoque ABTS (7 mmol/L). Antes da análise, a solução foi mantida sob proteção da luz durante 16 horas. Após esse período, essa solução foi diluída em etanol até se obter uma absorbância de $0,71 \pm 0,05$ em um comprimento de onda de 734 nm. Em seguida, 10 μL de cada extrato foi misturado com 300 μL da solução de ABTS diluída. A mistura foi mantida por 6 min em ambiente escuro e a leitura foi realizada a 734 nm utilizando uma leitora de microplaca. A atividade antioxidante de cada extrato foi expressa como micromol de equivalente de Trolox por grama de material seco ($\mu\text{mol ET/g ms}$), empregando uma curva de calibração de Trolox (0–700 $\mu\text{mol/L}$). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.11 Poder antioxidante redutor férrico

Os ensaios de atividades antioxidantes pelo método do poder antioxidante redutor férrico – FRAP (*ferric-reducing antioxidant power*) foi realizado seguindo a metodologia descrita por Boroski *et al.* [52] com algumas modificações. Inicialmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg/mL e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. A solução do reagente FRAP foi

preparada a partir de uma mistura de tampão acetato (0,3 mol/L), solução de TPTZ (10 mmol/L) e solução de cloreto férrico (20 mmol/L) na proporção de 10:1:1. Na sequência, 9 µL de cada extrato foram misturados com 27 µL de água destilada e 270 µL do reagente FRAP, nessa ordem, em microplaca de 96 poços. A mistura foi mantida em repouso sob a proteção da luz a 37 °C durante 30 min. Após esse período, a absorbância da mistura reacional foi verificada no comprimento de onda de 595 nm utilizando uma leitora de microplaca. O poder antioxidante redutor férrico de cada extrato foi expresso como micromol de equivalente de Trolox por grama de material seco (µmol ET/g ms) empregando uma curva de calibração de Trolox (0–2000 µmol/L). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.12 Atividade citotóxica

Para a análise citotóxica, os extratos de *L. alba* e *L. camara* testados foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL e diluídos para serem testados na concentração única de 50 µg/mL.

As atividades citotóxicas dos extratos foram avaliadas frente a células tumorais HCT116 (carcinoma de colón humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Diariamente, acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas, utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se desprendessem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com o corante Hoechst.

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição [169]. Inicialmente, as células foram

plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma solução $0,7 \times 10^5$ células/mL). Após 24 h de incubação, as amostras testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubadas por 72 h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando uma leitora de microplaca [169].

4.13 Atividade anticolinesterásica

Os ensaios de inibição com os diferentes extratos de *L. alba* e *L. camara* frente às enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}) foram realizados em biorreatores enzimáticos, denominados de ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}, respectivamente [76, 170, 171].

Para a realização dos ensaios, foram preparadas soluções estoques de 10 mg/mL em metanol de cada extrato, sendo solubilizados com o auxílio de um banho de ultrassom durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, cada solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm e diluída para 2 mg/mL. Na sequência, as soluções foram novamente centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm.

Os biorreatores enzimáticos foram acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta performance e um espectrômetro de massas, formando um sistema *on-flow* para a realização dos ensaios. Nesse sistema, a reação enzimática é monitorada pela quantificação direta do produto de hidrólise enzimática, a colina (m/z 104).

Os extratos foram testados utilizando as seguintes condições de análise: fase móvel constituída por solução de acetato de amônio 15 mmol/L (pH 8,0) na vazão de 0,05 mL/min; volume de injeção de 10 µL da solução contendo 70 µmol/L de acetilcolina (ACh) ou 70 µmol/L de butirilcolina (BCh), para os testes com a AChE e BChE, respectivamente. A Galantamina (100 µmol/L) foi utilizada como inibidor padrão dessas enzimas.

A partir da solução estoque de cada um dos extratos (2 mg/mL), foram aliquoteados 10 µL e adicionados 20 µL da solução estoque de ACh ou BCh a 350 µmol/L (concentração final de 70 µmol/L) e 70 µL da solução de acetato de amônio a 15 mmol/L (pH 8,0). O volume final do meio reacional foi de 100 µL, obtendo uma concentração final de cada extrato de 200 µg/mL. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas no sistema cromatográfico contendo os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}.

Entre as análises de cada amostra, foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o extrato candidato a inibidor, sendo o meio reacional constituído por 70 µL da solução de acetato de amônio a 15 mmol/L (pH 8,0), 20 µL da solução de ACh e 10 µL do solvente de solubilização das amostras (metanol). Posteriormente ao ensaio de cada amostra, foi realizado um controle negativo, que consiste na avaliação de um branco de cada extrato na presença do substrato da enzima, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada. Esse ensaio foi realizado para avaliar a interferência de cada extrato na auto hidrólise do substrato.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (Pi) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P0), de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left[\left(\frac{P_i - Sb}{P_0 - Sb} \right) \times 100 \right] \quad (3)$$

onde *Sb* representa a área da colina resultante da hidrólise espontânea do substrato; um capilar vazio foi utilizado para esse controle.

4.14 Análises cromatográficas

As análises dos perfis químicos dos extratos das espécies *L. alba* e *L. camara* foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão). O *software LC Solution* foi utilizado para a aquisição e tratamento dos dados.

4.14.1 LC-DAD dos extratos de *L. alba*

Todos os extratos analisados foram preparados na concentração de 5 mg/mL. Os extratos de UAE e maceração foram dissolvidos em uma solução de acetonitrila (29%) em solução de ácido fórmico a 0,5% (v/v). Os extratos de MAE e Soxhlet foram dissolvidos em uma solução de acetonitrila (43%) em ácido fórmico a 0,5% (v/v). Os extratos de infusão e decocção foram dissolvidos em uma solução de ácido fórmico a 0,5% (v/v). Na sequência, cada extrato solubilizado foi filtrado através de filtro seringa (0,45 µm) e transferido para o *vial* de análise.

A condição de separação cromatográfica foi realizada segundo metodologia desenvolvida por Jesus *et al.* [10], com pequenas modificações, utilizando-se uma coluna analítica Kinetex C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex) acoplada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária, ambas a uma temperatura de 45 °C, com volume de injeção da amostra de 15 µL. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura binária de acetonitrila (B) e uma solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) a 0,5% (v/v) (A) na vazão de 0,8 mL/min, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: 5-15% de B em 20 min; 15-19% de B em 40 min; 19-100% de B em 5 min; isocrático em 100% de B durante 10 min; retornando para a condição inicial variando-se de 100 a 5% de B em 5 min. O tempo de acondicionamento da coluna entre as análises foi de 40 min mantendo 5% de B.

4.14.2 LC-DAD dos extratos de *L. camara*

Todos os extratos analisados foram preparados na concentração de 5 mg/mL. Os extratos de UAE e MC foram dissolvidos em uma solução de metanol (35%) em ácido fórmico a 0,5% (v/v). Os extratos de MAE e Soxhlet foram dissolvidos em uma solução de metanol (90%) em ácido fórmico a 0,5% (v/v). Os extratos de infusão e decocção foram dissolvidos em uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,5% (v/v). Na sequência, cada extrato solubilizado foi filtrado através de filtro seringa (0,45 µm) e transferido para o *vial* de análise.

A condição de separação cromatográfica foi realizada com uma coluna analítica Kinetex C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex) acoplada a uma coluna de guarda de mesma fase estacionária, ambas a uma temperatura de 40 °C, com volume de injeção da amostra de 15 µL. A fase móvel foi constituída por uma mistura binária de metanol (B) e uma solução aquosa de ácido fórmico (HCOOH) a 0,5% (v/v) (A) na vazão de 0,8 mL/min, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: 5-70% de B em 41 min; 70-100% de B em 5 min; isocrático em 100% de B durante 10 min; retornando para a condição inicial variando-se de 100 a 5% de B em 5 min. O tempo de acondicionamento da coluna entre as análises foi de 40 min mantendo 5% de B.

4.15 Análises estatísticas

A análise de regressão dos dados experimentais foi realizada usando o software Minitab v19 (Minitab, LLC., State College, PA, USA) versão teste. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a significância estatística das variáveis independentes analisadas ($p < 0,05$). Os parâmetros estatísticos coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}), teste de Fisher (teste F) e coeficiente de variação (C.V.) foram usados para verificar a adequação dos modelos propostos aos dados obtidos. O software Excel (Microsoft, Washington, USA) foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos de média e desvio padrão, bem como para a elaboração dos gráficos de fator único e de resultados fitoquímicos e antioxidantes. Para avaliar a diferença estatística entre os resultados obtidos empregando diferentes condições e/ou técnicas de extração foi utilizado a ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) realizados no software PAST v. 3.0 (Oslo, Noruega).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

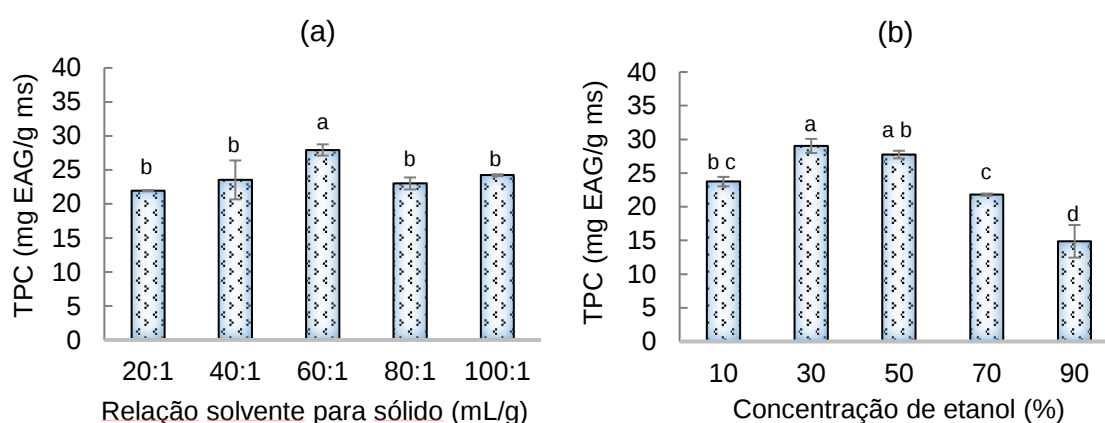
5.1 Otimização por UAE a partir das folhas de *L. alba*

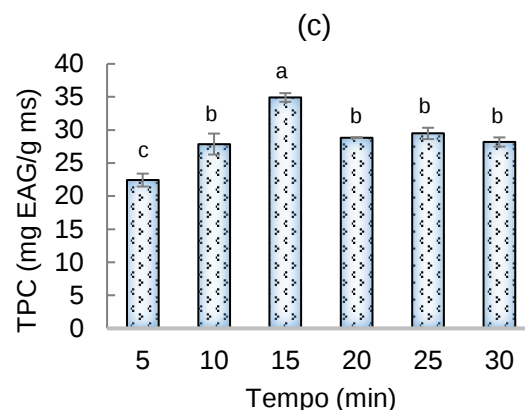
5.1.1 Experimento de fator único

Inicialmente, um planejamento de fator único foi utilizado para avaliar o efeito individual das variáveis relação solvente para sólido, concentração de etanol e tempo de extração no conteúdo de fenólicos totais dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de *L. alba* (Figura 13a-c).

A Figura 13a mostra o efeito da relação solvente para sólido no conteúdo de fenólicos totais (TPC), mantendo as demais variáveis de extração constantes: 50% de etanol e tempo de extração de 10 min. A forma como o solvente de extração interage com a matriz vegetal sólida durante a extração exerce grande influência nesse processo. O volume de solvente adequado possibilita o intumescimento da matriz sólida de maneira mais eficiente, o que favorece a liberação dos compostos do material vegetal inchado para o solvente de extração e, conseqüentemente, o aumento na recuperação dos compostos químicos desejados [83, 172]. Além disso, conhecer o volume ideal de solvente a ser utilizado em uma extração é muito relevante do ponto de vista econômico [173].

Figura 13: Efeito da relação solvente para sólido (a), da concentração de etanol (b) e do tempo de extração (c) no conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos das folhas de *L. alba* obtidos por UAE. Letras diferentes nas colunas significam que há diferença significativa entre os resultados segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).





Como pode ser observado na Figura 13a, houve um aumento no TPC com o aumento da relação solvente para sólido de 20:1 até 60:1 mL/g, atingindo um valor de máximo no gráfico. Com o aumento do volume de solvente no meio de extração (acima de 60:1 mL/g), observa-se uma leve redução do TPC. Assim, o valor da relação solvente para sólido de 60:1 mL/g será utilizado nos experimentos subsequentes do planejamento de fator único.

Em geral, uma maior relação solvente para sólido favorece o aumento da dissolução dos compostos químicos e a melhora da difusão deles no meio devido a uma maior diferença no gradiente de concentração entre o interior da célula vegetal e o solvente em seu exterior. Isso leva a um aumento do processo de transferência de massa dos compostos desejados [85, 174]. Além disso, o aumento da relação solvente para sólido causa redução da viscosidade da solução, o que favorece um aumento no efeito de cavitação acústica sobre o material vegetal, como maiores efeitos de fragmentação, erosão e sonoporação, resultando em um aumento da eficiência de extração [174]. Por outro lado, a redução do TPC na UAE em valores muito elevados de relação solvente para sólido podem ser atribuído, principalmente, a dois fatores: aumento do efeito de cavitação a ponto de causar a degradação dos compostos químicos extraídos; e/ou redução da intensidade de energia efetiva de ultrassom disponível para extração causado pelo aumento exagerado do volume de solvente no sistema de extração [82, 174]. Comportamento semelhante foi observado por Bouafia *et al.* [175], nos resultados da extração de compostos fenólicos a partir de *Centaurea* sp. por UAE, nos estudos de Zhong *et al.* [176] com a espécie *D. indicum* var. e no estudo realizado por Lin *et al.* [177] com a espécie *Moringa oleifera*. É importante mencionar que em todos estes estudos, os autores

avaliaram como resposta o conteúdo de flavonoides totais, uma classe de compostos fenólicos.

A Figura 13b mostra o efeito da concentração de etanol no TPC, mantendo as demais variáveis de extração avaliadas constantes: relação solvente para sólido de 60:1 mL/g e tempo de extração de 10 min. A escolha do solvente de extração é feita levando em consideração, principalmente, a polaridade dos compostos químicos desejados, as características do solvente como segurança e toxicidade ao meio ambiente, o custo do processo de extração e o uso final dos extratos [163, 175, 178].

Nesse sentido, etanol vem sendo cada vez mais utilizado para a extração de diversas classes de compostos químicos de matrizes vegetais como alternativa a diversos solventes orgânicos que possuem alta toxicidade, como é o caso do metanol. A mistura entre etanol e água, em diferentes proporções, também vem sendo amplamente utilizada para a extração de compostos polares como os derivados fenólicos, permitindo reduzir o volume de solvente orgânico utilizado na extração e favorecendo a obtenção de melhores resultados de extração em relação a utilização de um solvente orgânico puro. Isso pode ocorrer porque um dos solventes da mistura pode melhorar a solubilidade do soluto, enquanto o outro pode favorecer a dessorção dos compostos da matriz, como é o caso da água, contribuindo para romper as ligações entre os compostos e a matriz vegetal [28]. Além disso, o etanol apresenta baixa toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente [23, 36, 82, 163, 164].

Na Figura 13b pode ser observado um aumento inicial do TPC com aumento da concentração de etanol de 10% para 30%, seguida de redução da resposta com o aumento da concentração do solvente orgânico até atingir o menor valor em 90% de etanol. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que a eficiência de extração depende fortemente da semelhança de polaridade entre o solvente de extração e os compostos a serem extraídos, o que se relacionado ao grau de solubilidade desses compostos químicos no solvente. Entretanto, uma alta concentração de etanol pode causar desnaturação de proteínas, o que pode impedir a dissolução dos compostos fenólicos presentes na matriz vegetal e influenciar, portanto, o processo de

transferência de massa [179]. Isso explica a redução do TPC com o aumento da concentração de etanol acima de 50%.

Assim, percebe-se que os compostos fenólicos presentes em *L. alba* possuem polaridades que se assemelham às aquelas das soluções de 30 e 50% de etanol em água, visto que as respostas não diferiram significativamente, sendo, portanto, mais facilmente solubilizados e extraídos nesse intervalo de concentração [177]. Os compostos extraídos apresentam uma polaridade relativamente alta, sendo a concentração de 30% de etanol a mais adequada para os experimentos posteriores, pois resultou em um maior valor médio de TPC, empregando menor volume do solvente orgânico.

Comportamento semelhante foi observado em diversos estudos na literatura. O efeito do solvente na extração de compostos fenólicos antioxidante a partir das flores de *Jatropha integerrima* foi observado por Xu *et al.* [180]. A atividade antioxidante dos extratos obtidos aumentou com o aumento da concentração de etanol em água de 10 até 50% e diminuiu com o aumento posterior da concentração desse solvente até 90%. Zhou *et al.* [51] observaram, em estudo realizado com frutos de *Melastoma sanguineum* Sims para a recuperação de compostos fenólicos antioxidantes, que 50% de etanol em água foi a proporção etanol-água que resultou em maior atividade antioxidante do extrato.

O tempo em que a matriz vegetal permanece em contato com o solvente extrator, para que o equilíbrio de extração seja atingido, é outro fator determinante para a eficiência do processo de extração [83]. O efeito do tempo de extração no TPC está mostrado na Figura 13c, mantendo as demais variáveis de extração avaliadas constantes: relação solvente para sólido de 60:1 g/mL e 30% de etanol. Observa-se um aumento inicial do TPC com o aumento do tempo de extração até 15 min, seguido de redução até atingir um equilíbrio entre 20 e 30 min. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que o aumento inicial do tempo de extração favoreceu um maior grau de intumescimento da matriz vegetal, além da maior eficiência da cavitação e, conseqüentemente, maior grau de exposição do material vegetal ao solvente de extração, auxiliando na sua difusão para o solvente, aumentando assim a recuperação dos

compostos fenólicos desejados [43]. No entanto, o aumento adicional do tempo de extração resultou em uma exposição prolongada dos compostos extraídos aos efeitos de cavitação acústica ou, ainda, a exposição a espécies oxidantes em grande quantidade formadas no meio de extração, o que pode ter causado a degradação desses compostos fenólicos previamente extraídos [83, 174, 181]. Assim, o tempo de extração deve ser avaliado adequadamente durante a extração por ultrassom, sendo que nessa etapa o tempo mais adequado foi 15 min.

A degradação de compostos químicos como flavonoides, quando submetido a energia de ultrassom, foi observada em estudo realizado por Zhong *et al.* [176] para a recuperação de flavonoides de *D. indicum* var. por UAE; tempo de extração acima de 40 min resultou na degradação dos flavonoides extraídos. Luo *et al.* [36] relataram o efeito do tempo de extração na degradação dos compostos fenólicos extraídos de *Sorghum bicolor* por UAE após 20 min de extração.

Com base no exposto, o planejamento de fator único permitiu avaliar o efeito das variáveis de forma independente e funcionou como uma ferramenta preliminar para a escolha do intervalo mais adequado das variáveis estudadas para serem otimizadas posteriormente por meio de um planejamento Box-Behnken (BBD) com o auxílio da metodologia de superfície de resposta. De acordo com os resultados observados (Figura 13a-c), os intervalos escolhidos foram: relação solvente para sólido entre 40:1 e 80:1 mL/g; concentração de etanol entre 10 e 50% e tempo de extração entre 10 e 20 min. O BBD permite avaliar possíveis efeitos de interação entre as variáveis estudadas, o que não foi possível através do planejamento de fator único, além de permitir determinar as condições ótimas de extração de compostos fenólicos da espécie estudada.

5.1.2 Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM

Para determinar as condições ótimas de extração e avaliar os efeitos das variáveis estudadas no rendimento e no TPC dos extratos obtidos das folhas de *L. alba* por UAE, foi utilizado um planejamento Box-Behnken. Esse planejamento

e as respostas obtidas nas diferentes condições de extração avaliadas estão mostrados na Tabela 7, onde pode ser observado que os rendimentos de extração variaram entre 14,00 e 20,90% e os resultados de TPC variaram entre 20,64 e 29,45 mg EAG/g ms.

Tabela 7: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de *L. alba*.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (mL/g)	Rend. (Y ₁ , %)	TPC (Y ₂ , mg EAG/g ms)
1	10 (-1)	10 (-1)	60:1 (0)	18,31	21,18
2	50 (1)	10 (-1)	60:1 (0)	14,00	21,06
3	10 (-1)	20 (1)	60:1 (0)	19,33	23,20
4	50 (1)	20 (1)	60:1 (0)	19,57	28,92
5	10 (-1)	15 (0)	40:1 (-1)	17,12	20,64
6	50 (1)	15 (0)	40:1 (-1)	16,24	26,34
7	10 (-1)	15 (0)	80:1 (1)	20,07	27,49
8	50 (1)	15 (0)	80:1 (1)	16,21	23,39
9	30 (0)	10 (-1)	40:1 (-1)	17,27	24,59
10	30 (0)	20 (1)	40:1 (-1)	18,74	25,57
11	30 (0)	10 (-1)	80:1 (1)	18,59	26,19
12	30 (0)	20 (1)	80:1 (1)	20,31	27,77
13 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)	20,90	29,05
14 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)	20,40	29,45
15 ^c	30 (0)	15 (0)	60:1 (0)	19,37	27,69

X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: relação solvente para sólido; Rend.: rendimento de extração; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; ms: material seco.

^c ponto central.

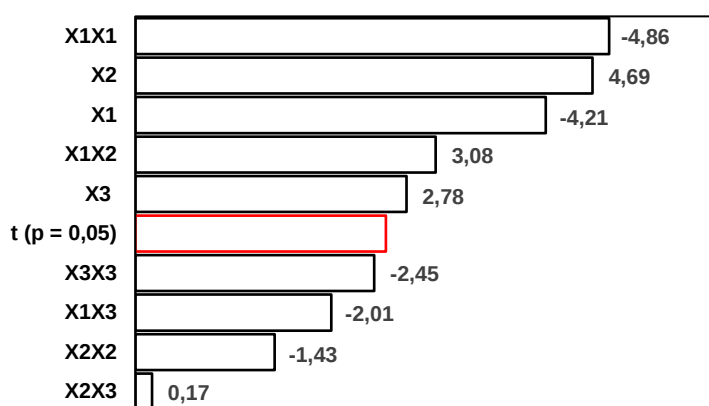
Influência dos parâmetros da UAE no rendimento dos extratos

Considerando a aplicação de preparações vegetais em escala industrial, o rendimento de extração é uma resposta de grande importância do ponto de vista econômico [28]. Assim, neste trabalho buscou-se otimizar as condições de extração para a obtenção do melhor rendimento de extração.

Pode-se observar na Tabela 7 que os valores de rendimento dos extratos das folhas de *L. alba* por UAE variaram de acordo com as condições de extração, o que sugere influência de alguma variável nessa resposta. No entanto, para avaliar qual variável apresenta influência significativa nos resultados recorre-se ao gráfico de Pareto (Figura 14), o qual apresenta os termos significativos ($p < 0,05$) referentes às variáveis estudadas e efeito relativo (positivo ou negativo) de cada um no valor do rendimento de extração.

O gráfico de Pareto (Figura 14) informa quais termos são significativos ou não para o processo de extração. As barras relacionadas as variáveis que ultrapassam a barra destacada em vermelho, correspondente ao valor de *t-student* crítico ($p = 0,05$; 95% de confiança), indicam que há influência significativa de determinada variável ou efeito quadrático, bem como efeito de interação significativo entre duas variáveis. Os valores negativos ou positivos ao lado de cada coluna indicam que os efeitos dessas variáveis no processo são negativos ou positivos, respectivamente; quanto maior esse valor, maior a influência do efeito [35].

Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE.

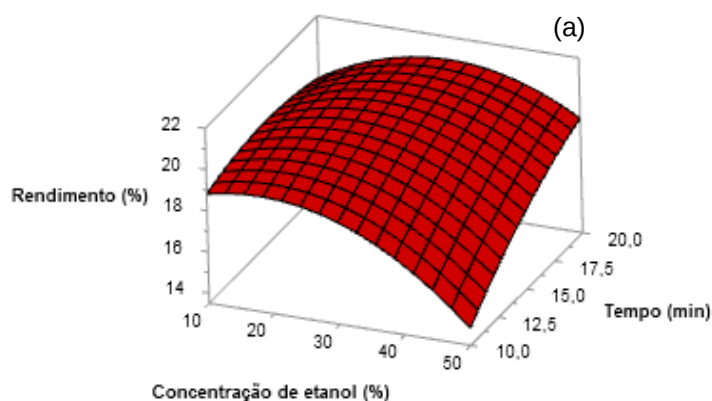


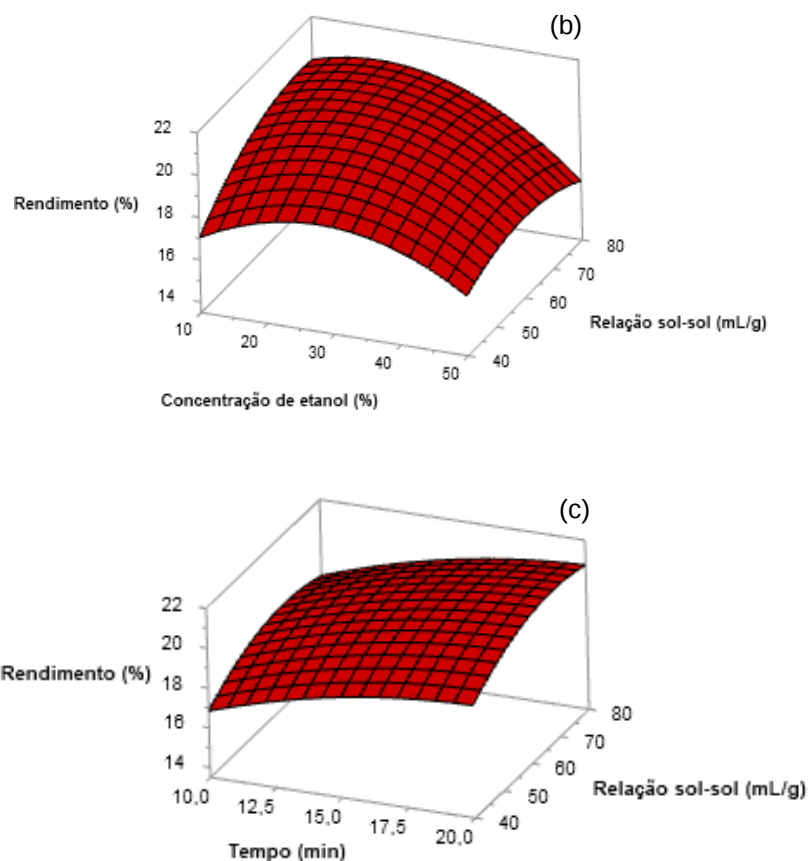
Como pode ser observado na Figura 14, os termos referentes às variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração e relação solvente para sólido (X_3) apresentaram efeitos significativos no rendimento de extração: X_1 possui efeito negativo, X_2 e X_3 possuem efeito positivo. O termo quadrático (X_1X_1)

apresentou efeito negativo. O termo de interação X_1X_2 também foi significativo, apresentando efeito positivo. Os demais termos não foram significativos. Um efeito linear negativo de uma variável isolada (como aquele apresentado por X_1) indica que a resposta sofre uma redução com a variação dessa variável do nível baixo para o alto. Um efeito linear positivo (como aqueles apresentados por X_2 e X_3) indica que a resposta sofre um aumento com a variação dessa variável do nível baixo para o alto. Um efeito quadrático negativo (como observado para X_1X_1) indica um ponto de máximo de recuperação dos compostos extraídos com a modificação dessa variável [23, 82].

A Figura 15a-c ilustra o efeito das variáveis independentes no rendimento de extração por meio de um gráfico de superfície de resposta tridimensional analisando-se duas variáveis de cada vez.

Figura 15: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido.





Na Figura 15 (gráficos a e b) pode ser observado o efeito significativo da concentração de etanol no rendimento de extração. O rendimento de extração aumenta levemente com o aumento da concentração de etanol de 10 até cerca de 30% e então ocorre uma redução com o aumento dessa variável até 50%. O aumento inicial do rendimento com aumento da concentração de etanol até cerca de 30% pode ser atribuído à semelhança entre a polaridade dos compostos presentes na matriz com a polaridade da solução extratora [82, 177, 182]. Liu *et al.* [183] observaram comportamento semelhante ao estudarem o efeito da concentração de etanol (30 a 70%) no rendimento dos extratos ricos em compostos fenólicos de *Euryale ferox* obtidos por UAE. O maior rendimento de extração foi obtido na concentração de etanol de 50%.

Na Figura 15 (gráficos a e c) está mostrado o efeito do tempo de extração. Como pode ser observado, o rendimento de extração aumenta com o aumento do tempo de extração de 10 para 20 min, provavelmente devido ao maior tempo de contato entre a matriz e o solvente de extração e o maior grau de

intumescimento da matriz vegetal [36, 43, 184]. Esses resultados estão de acordo com aquele observado por Liu *et al.* [183], em que 21 min foi o tempo de extração que resultou em maior rendimento de extração dos metabólitos secundários de *Euryale ferox* por UAE.

O efeito significativo da relação solvente para sólido, porém menor em relação as outras variáveis, está mostrado na Figura 15 (gráficos b e c). Como pode ser observado, a mudança dessa variável do seu nível baixo para o alto resulta em um aumento no valor do rendimento, o que pode ser atribuído ao maior gradiente de concentração entre o interior da célula vegetal e o solvente em seu exterior, com o aumento do volume de solvente, e aos maiores efeitos de cavitação acústica sobre a célula vegetal [85, 174].

Na Tabela 8 estão mostrados os valores obtidos através da análise de variância (ANOVA) para a resposta rendimento de extração. Os termos que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*), o que corrobora os resultados observados no gráfico de Pareto (Figura 14).

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por UAE considerando a espécie *L. alba*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	48,9906	9	5,4434	9,98	0,010*
X_1 (concentração de etanol)	9,6802	1	9,6802	17,75	0,008*
X_2 (tempo)	11,9819	1	11,9819	21,97	0,005*
X_3 (relação solvente para sólido)	4,2124	1	4,2124	7,72	0,039*
X_1X_2	5,1737	1	5,1737	9,49	0,027*
X_1X_3	2,2126	1	2,2126	4,06	0,100
X_2X_3	0,0166	1	0,0166	0,03	0,868
X_1^2	12,8890	1	12,8890	23,64	0,005*
X_2^2	1,1155	1	1,1155	2,05	0,212
X_3^2	3,2797	1	3,2797	6,01	0,058
Erro	2,7265	5	0,5453		
Falta de ajuste	1,5027	3	0,5009	0,82	0,591
Erro puro	1,2239	2	0,6119		
SQ Total	51,7171	14			

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
R ²	0,9473				
R ² _{ajustado}	0,8524				
C.V. (%)	4,01				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R²: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

O modelo proposto foi considerado significativo, apresentando um alto valor de F (9,98) e baixo *p*-valor (< 0,01) (Tabela 8). O modelo apresentou bom ajuste às respostas observadas como evidenciado pelo alto valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9473$), onde 94,73% da variação dos dados de rendimento de extração pode ser explicada pelo modelo proposto; quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , melhor será o ajuste do modelo às respostas. Adicionalmente, o alto valor do coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,8524$), próximo ao R^2 , confirma a grande significância do modelo obtido e o alto grau de correlação entre os valores experimentais e os preditos. Esses resultados indicam uma alta capacidade do modelo em prever a relação entre as variáveis independentes e dependentes (respostas). Adicionalmente, o valor do coeficiente de variação menor que 10% (C.V.: 4,01%) indica que há uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais e uma baixa variação das respostas em relação ao valor médio dos experimentos [82, 185]. Esses resultados indicam que o modelo estimado pode ser adequadamente utilizado para prever o rendimento de extração dos compostos químicos presentes na espécie *L. alba* [23, 36, 82, 185].

Com base na análise de regressão, a relação entre as variáveis independentes e o rendimento de extração pode ser descrita por uma equação polinomial quadrática (Equação 4).

$$\begin{aligned} \text{Rendimento } (Y_1) = & 20,220 - 1,100X_1 + 1,224X_2 + 0,726X_3 + 1,137X_1X_2 - \\ & 0,744X_1X_3 + 0,064X_2X_3 - 1,868X_1^2 - 0,550X_2^2 - 0,942X_3^2 \end{aligned} \quad (4)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e relação solvente para sólido, respectivamente.

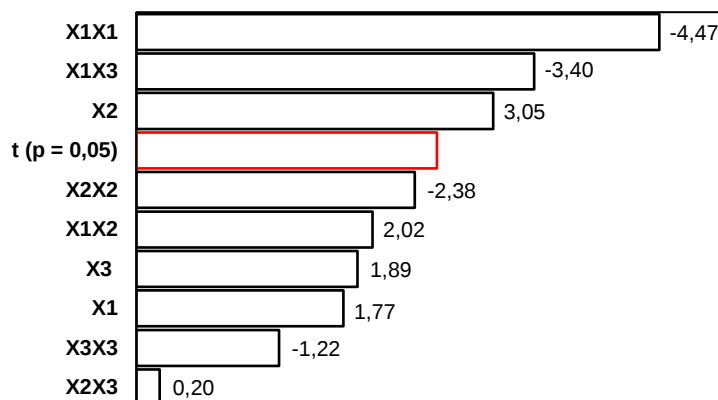
Com base nos resultados estatísticos, o rendimento de extração ótimo previsto pelo modelo utilizando as condições otimizadas de extração por UAE (28,59% de etanol, 20 min e 69,09 mL/g) foi de 21,07%. Através destes resultados, pode-se verificar a importância do planejamento de experimento e análises estatísticas na otimização de experimentos, pois além de se determinar a melhor condição de extração, é também possível avaliar quais variáveis são significativas e como elas afetam o processo estudado. Assim, foi possível observar que as três variáveis estudadas influenciaram no rendimento dos extratos de *L. alba*, com destaque para o efeito da concentração de etanol.

Influência dos parâmetros da UAE no TPC dos extratos

Os diferentes parâmetros envolvidos na extração por ultrassom podem influenciar o processo de diferentes formas a depender da resposta desejada [186, 187]. Portanto, neste estudo foi avaliado também o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE empregando um planejamento Box-Benhken (Tabela 7).

Na Tabela 7 estão mostradas as respostas de TPC obtidas nas diferentes condições de extração. Como pode ser observado, os resultados de TPC variaram entre 20,64 e 29,45 mg EAG/g ms, o que indica influência significativa de alguma variável nessa resposta. No gráfico de Pareto (Figura 16) estão mostradas as variáveis que apresentaram influência significativa no TPC dos extratos de *L. alba*, bem como quais efeitos quadráticos e de interação foram significativos.

Figura 16: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE.



Como pode ser observado na Figura 16, o termo referente ao tempo de extração (X_2) exerce influência significativa no TPC, sendo seu efeito positivo. Além disso, os termos quadrático e de interação entre duas variáveis também foram significativos, onde os termos quadrático da concentração de etanol (X_1X_1) e de interação X_1X_3 apresentaram efeitos negativos. Esses resultados mostram que essas variáveis, nos níveis testados, apresentam influência na extração de compostos fenólicos por ultrassom das folhas de *L. alba*. Os demais termos não foram significativos.

Considerando a análise de variância (Tabela 9), o modelo desenvolvido foi considerado significativo (F-valor de 6,26 e p -valor de 0,029), o qual se mostrou adequado para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta ($R^2 = 0,9185$) e de grande significância para prever a relação entre essas variáveis ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,7717$), além de apresentar um baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 5,66%), indicando uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais [23, 36]. Os termos que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*) na Tabela 9.

Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por UAE considerando a espécie *L. alba*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	117,186	9	13,0207	6,26	0,029*
X_1 (concentração de etanol)	6,483	1	6,4825	3,12	0,138
X_2 (tempo)	19,345	1	19,3454	9,30	0,028*
X_3 (relação solvente para sólido)	7,404	1	7,4044	3,56	0,118
X_1X_2	8,494	1	8,4941	4,08	0,099
X_1X_3	24,011	1	24,0110	11,54	0,019*
X_2X_3	0,086	1	0,0865	0,04	0,846
X_1^2	41,559	1	41,5592	19,98	0,007*
X_2^2	11,801	1	11,8009	5,67	0,063
X_3^2	3,079	1	3,0787	1,48	0,278
Erro	10,403	5	2,0805		
Falta de ajuste	8,695	3	2,8984	3,40	0,236
Erro puro	1,707	2	0,8537		
SQ Total	127,589	14			
R^2	0,9185				
R^2_{ajustado}	0,7717				
C.V. (%)	5,66				

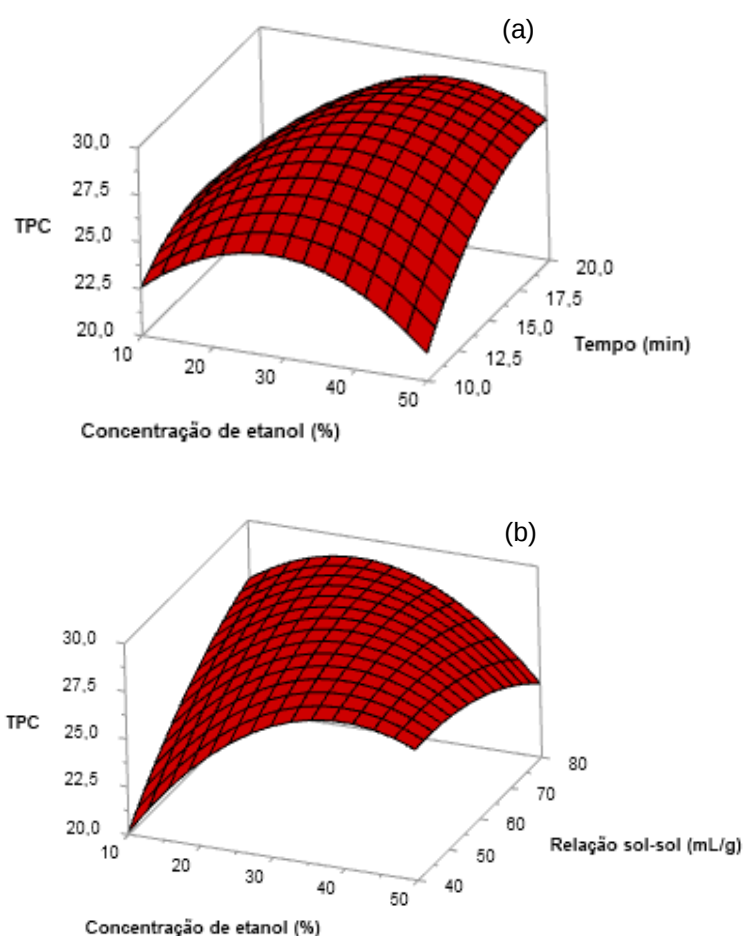
SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R^2 : coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

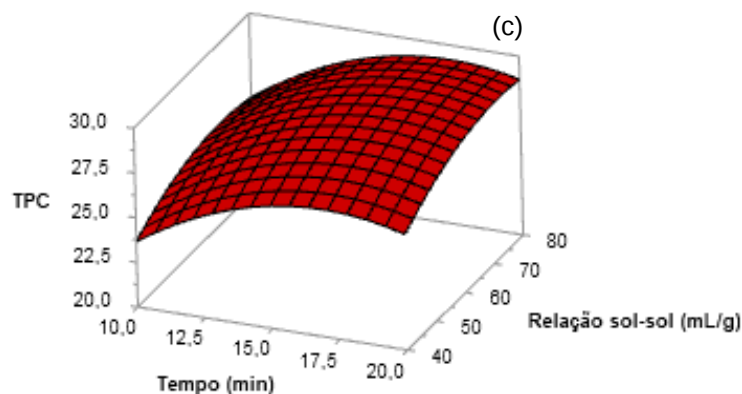
Para ilustrar o efeito das variáveis sobre o TPC, foram utilizados gráficos de superfície de resposta tridimensional (Figura 17, gráficos a-c). Na Figura 17 (gráficos a e b) pode ser observado o efeito quadrático significativo da concentração de etanol no TPC dos extratos de *L. alba*. O TPC aumenta até um valor de máximo com o aumento da concentração de etanol entre 30 e 40% e diminui com o aumento posterior dessa variável até 50%. Esse comportamento, como relatado anteriormente, pode ser atribuído, principalmente, à semelhança entre a polaridade dos compostos fenólicos presentes na matriz com a polaridade do solvente de extração na concentração entre 30% e 40% [82, 177, 179].

No estudo realizado por Brahmi *et al.* [188] para a recuperação de compostos fenólicos a partir das flores de *Opuntia ficus-indica* por UAE, o maior

valor de TPC foi obtido empregando concentração de etanol de 40%. Tendência semelhante foi observada por Luo *et al.* [36] na recuperação de compostos fenólicos a partir de *Sorghum bicolor* por UAE; o maior TPC foi obtido com solução de etanol a 50%.

Figura 17: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido.





Na Figura 17 (gráficos a e c) está mostrado o efeito significativo do tempo de extração no TPC, que aumenta com o aumento do tempo de extração de 10 para 20 min, o que está principalmente relacionado ao maior tempo de contato entre a matriz e o solvente extrator [43, 36].

Apesar da relação solvente para sólido (60:1 mL/g, Figura 13a) e do tempo de extração (15 min, Figura 13c) terem apresentado um valor de máximo de TPC no experimento de fator único, seus efeitos quadráticos não foram significativos para essa resposta segundo a ANOVA do planejamento Box-Benhken (Tabela 9), apesar de ser observada uma leve curvatura nos gráficos dessas variáveis (Figura 17). Isso pode ocorrer devido ao efeito de interação entre as diferentes variáveis, uma vez que uma pode interferir no efeito da outra. Comportamento semelhante para o tempo de extração foi observado por Bouafia *et al.* [175] na otimização de extração de compostos fenólicos de *Centaurea sp.* por UAE.

Com base na análise de regressão, a relação entre as variáveis estudadas e o TPC pode ser descrita por uma equação polinomial quadrática (Equação 5):

$$\text{TPC } (Y_2) = 28,731 + 0,900X_1 + 1,555X_2 + 0,962X_3 + 1,457X_1X_2 - 2,450X_1X_3 + 0,147X_2X_3 - 3,355X_1^2 - 1,788X_2^2 - 0,913X_3^2 \quad (5)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e relação solvente para sólido, respectivamente.

Segundo o modelo, as condições ótimas de extração foram: 31,01% de etanol, 17,37 min e 69,90:1 mL/g. O TPC ótimo previsto pelo modelo foi de 29,36 mg EAG/g ms. As três variáveis estudadas influenciaram no TPC dos extratos

de *L. alba*, sendo a concentração de etanol e o tempo as que mais afetaram essa resposta.

5.1.3 Validação das condições otimizadas de forma simultânea por UAE

Como foi observado, as condições de extração ótimas previstas para cada resposta separadamente (rendimento: 28,59% de etanol, 20 min e 69,09 mL/g; TPC: 31,01% de etanol, 17,37 min e 69,90:1 mL/g) são diferentes daquelas previstas para a maximização das duas respostas simultaneamente por UAE: 29% de etanol, 17,8 min e relação solvente para sólido de 71:1 mL/g. Isso mostra que a otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC requer condições de extração diferentes em comparação as condições de otimização de cada resposta separadamente.

Dessa forma, para a validação das condições ótimas de extração para as respostas avaliadas, foram realizadas três extrações utilizando as condições otimizadas de forma simultânea: 29% de etanol, 17,8 min e relação solvente para sólido de 71:1 mL/g. A Tabela 10 mostra os valores experimentais e preditos de rendimento de extração e TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por UAE nessas condições.

Tabela 10: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por UAE de *L. alba*: 29% de etanol, 17,8 min e relação solvente para sólido de 71:1 mL/g (desejabilidade de 0,9923).

Resposta	Experimental	Predito	RSD%*
Rendimento (%)	20,33 ± 0,15	20,90	1,96
TPC (mg EAG/g ms)	30,86 ± 0,33	29,32	3,62

*Desvio padrão relativo - RSD entre os valores preditos e experimentais (média de três extratos independentes obtidos nas mesmas condições de extração).

Os valores de rendimento de extração e de TPC experimentais e preditos mostrados na Tabela 10 foram muito próximos, apresentando baixos desvios

relativos de 1,96% e 3,62%, respectivamente. Esses resultados indicam que o modelo explica adequadamente o processo de extração e possui alta capacidade de prever o rendimento de extração e o TPC dos extratos obtidos das folhas de *L. alba* por UAE, de forma simultânea, além de prever a concentração de etanol, o tempo de extração e a relação solvente para sólido ideais nas condições testadas [167, 189].

5.2 Otimização por MAE a partir das folhas de *L. alba*

5.2.1 Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM

Sabe-se que diversos fatores podem afetar a extração por micro-ondas, o que torna necessário a determinação da condição de extração mais adequada para esse processo [83, 91, 92, 165, 167]. Para isso, neste trabalho verificou-se o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no rendimento e no TPC dos extratos de *L. alba* por MAE empregando um planejamento Box-Behnken, o qual está mostrado na Tabela 11 juntamente com os valores de rendimento e TPC obtidos como respostas.

Tabela 11: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por MAE a partir das folhas de *L. alba*.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (W)	Rend. (Y ₃ , %)	TPC (Y ₄ , mg EAG/g ms)
1	0 (-1)	2 (-1)	450 (0)	22,12	33,71
2	70 (1)	2 (-1)	450 (0)	22,74	39,09
3	0 (-1)	15 (1)	450 (0)	22,86	36,65
4	70 (1)	15 (1)	450 (0)	25,98	38,55
5	0 (-1)	8,5 (0)	300 (-1)	22,40	33,26
6	70 (1)	8,5 (0)	300 (-1)	24,82	42,01
7	0 (-1)	8,5 (0)	600 (1)	22,14	36,67
8	70 (1)	8,5 (0)	600 (1)	25,34	40,36
9	35 (0)	2 (-1)	300 (-1)	25,16	37,17
10	35 (0)	15 (1)	300 (-1)	27,01	41,16
11	35 (0)	2 (-1)	600 (1)	25,17	35,54
12	35 (0)	15 (1)	600 (1)	28,66	44,21
13 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	26,56	39,94
14 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	26,79	39,99
15 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	26,86	41,31

X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: potência de micro-ondas; Rend.: rendimento de extração; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; ms: material seco.

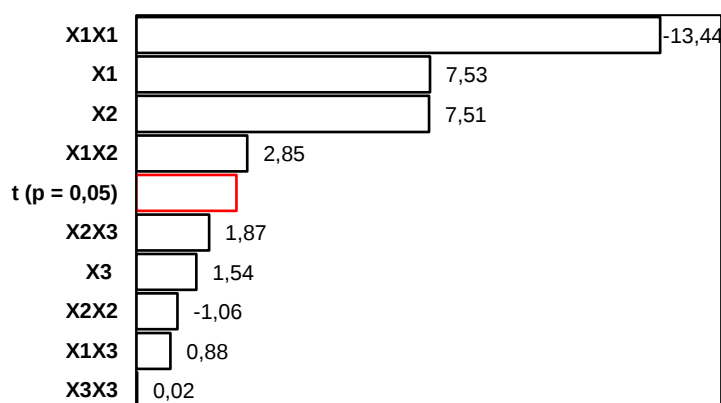
^c ponto central.

Na Tabela 11 pode-se observar que os rendimentos de extração variaram entre 22,12 e 28,66% e os resultados de TPC variaram entre 33,26 e 44,21 mg EAG/g ms, o que indica que há influência de alguma variável no processo de extração.

Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos

As variáveis que influenciam de forma significativa o rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE estão mostradas no gráfico de pareto da Figura 18, bem como a influência dos efeitos quadráticos e de interação.

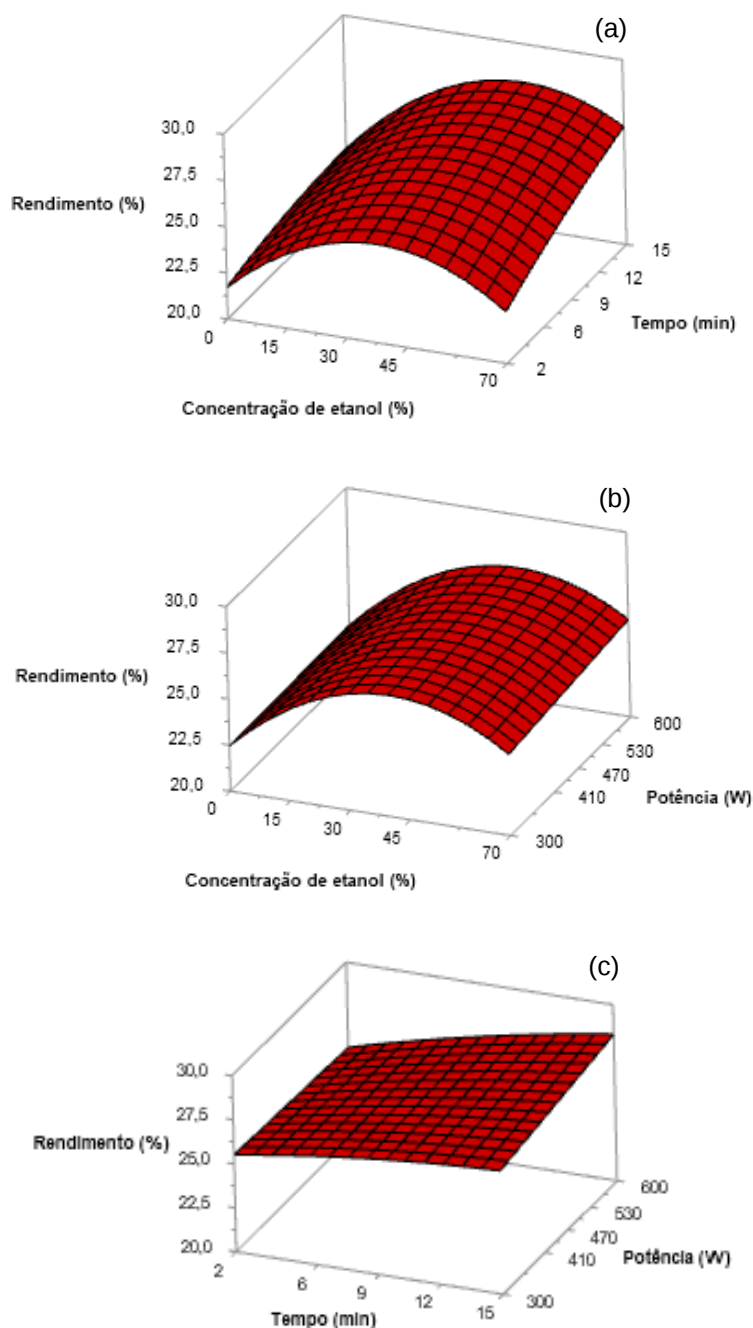
Figura 18: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3) no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE.



Como pode ser observado na Figura 18, os termos referentes a concentração de etanol (X_1) e ao tempo de extração (X_2) exercem influência significativa no rendimento de extração, sendo seus efeitos positivos. Os termos quadrático (X_1X_1) e de interação entre duas variáveis (X_1X_2) também foram significativos, apresentando efeito negativo e positivo, respectivamente. Os demais termos não foram significativos.

Na Figura 19 (gráficos a-c) está ilustrado o efeito das variáveis independentes no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE por meio de gráficos de superfície de resposta tridimensionais analisando-se duas variáveis de cada vez.

Figura 19: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no rendimento dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e potência de micro-ondas e (c) tempo de extração e potência de micro-ondas.



Na Figura 19 (gráficos a e b) pode ser observado o efeito significativo da concentração de etanol no rendimento de extração e o efeito quadrático dessa

variável. O rendimento de extração aumenta inicialmente com o aumento da concentração de etanol até cerca de 37% e então ocorre uma redução com o aumento da concentração de etanol até 70%. O aumento inicial do rendimento com aumento da concentração de etanol até cerca de 37% pode ser atribuído à semelhança entre a polaridade dos compostos presentes na matriz com a polaridade da solução extratora, como relatado anteriormente [165, 179, 185].

Akbari *et al.* [165] observaram resultados semelhantes de rendimento de extração em seus estudos relacionados à recuperação de compostos químicos polares a partir das folhas de *Aloe vera* por MAE, alcançando o maior rendimento em torno de 40% de etanol em água, avaliando um intervalo de concentração entre 20 e 100% de etanol.

Na Figura 19 (gráficos a e c) está mostrada o efeito do tempo de extração. Como pode ser observado, o rendimento de extração aumenta com o aumento do tempo de extração de 2 para 15 min. Em geral, um aumento no tempo de extração resulta em maior extração de compostos químicos devido ao maior tempo de contato entre a matriz e o solvente de extração [43]. Além disso, o aumento do tempo de extração por micro-ondas pode resultar em maior eficiência de aquecimento, o que pode contribuir para uma maior transferência de calor para o solvente e assim aumentar a recuperação dos compostos presentes na matriz [190].

Como pode ser observado na Figura 19 (gráficos b e c), a potência de extração não exerce efeito significativo no rendimento dos extratos de *L. alba*, uma vez que a variação da potência, fixando o valor da outra variável, não proporciona um aumento significativo do rendimento de extração.

Na Tabela 12 estão mostrados os valores obtidos através da análise de variância para a resposta rendimento de extração. Os termos que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por MAE considerando a espécie *L. alba*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	59,6234	9	6,6248	34,39	0,001*
X_1 (concentração de etanol)	10,9340	1	10,9340	56,75	0,001*
X_2 (tempo)	10,8544	1	10,8544	56,34	0,001*
X_3 (potência de micro-ondas)	0,4582	1	0,4582	2,38	0,184
X_1X_2	1,5605	1	1,5605	8,10	0,036*
X_1X_3	0,1495	1	0,1495	0,78	0,419
X_2X_3	0,6718	1	0,6718	3,49	0,121
X_1^2	34,7789	1	34,7789	180,52	<0,001*
X_2^2	0,2179	1	0,2179	1,13	0,336
X_3^2	0,0001	1	0,0001	0,00	0,987
Erro	0,9633	5	0,1927		
Falta de ajuste	0,9139	3	0,3046	12,33	0,076
Erro puro	0,0494	2	0,0247		
SQ Total	60,5867	14			
R^2	0,9841				
$R^2_{ajustado}$	0,9555				
C.V. (%)	1,76				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R^2 : coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

Considerando a ANOVA (Tabela 12), o modelo desenvolvido foi considerado significativo (F-valor de 34,39 e p -valor de 0,001), o qual se mostrou adequado para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta ($R^2 = 0,9841$) e de grande significância para prever a relação entre essas variáveis ($R^2_{ajustado} = 0,9555$), além de apresentar um baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 1,76%), indicando uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais [36, 82, 165]

Com base na análise de regressão, a relação entre as variáveis independentes e o rendimento de extração pode ser descrita por uma equação polinomial quadrática (Equação 6).

$$\text{Rendimento } (Y_3) = 26,739 + 1,169X_1 + 1,165X_2 + 0,239X_3 + 0,625X_1X_2 + 0,193X_1X_3 + 0,410X_2X_3 - 3,069X_1^2 - 0,243X_2^2 + 0,004X_3^2 \quad (6)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e potência de micro-ondas, respectivamente.

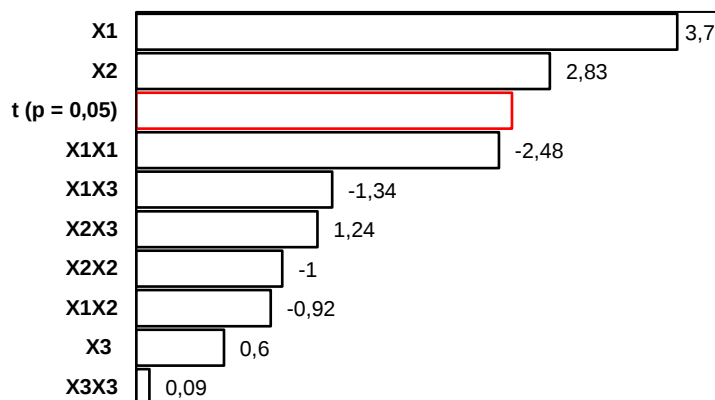
O rendimento de extração ótimo predito pelo modelo utilizando as condições otimizadas de extração por MAE (46,24% de etanol, 15 min e 600 W) foi de 28,64%. Adicionalmente, com base nos resultados estatísticos, as variáveis que afetaram o rendimento dos extratos de *L. alba* de forma significativa foram a concentração de etanol e o tempo de extração.

Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos

A otimização das condições de extração por MAE de compostos fenólicos a partir das folhas de *L. alba* também foi realizada por meio de um planejamento Box-Benhken e metodologia de superfície de resposta, avaliando-se o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas. Na Tabela 11 estão mostrados os valores de TPC nas diferentes condições experimentais executadas de acordo com esse planejamento.

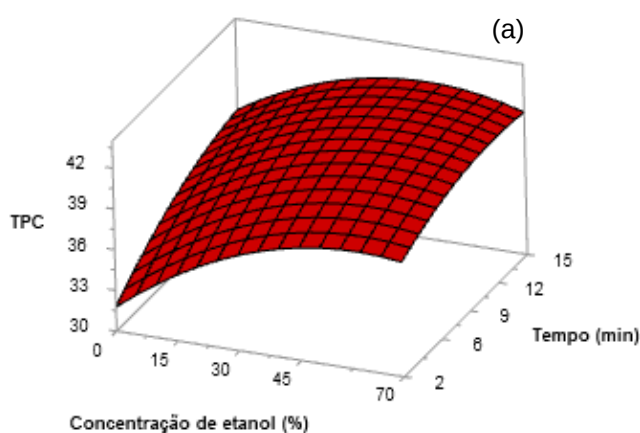
Como pode ser observado no gráfico de Pareto da Figura 20, os termos referentes a concentração de etanol (X_1) e tempo de extração (X_2) apresentaram influência significativa no TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE, ambos positivos. Os demais termos não foram significativos.

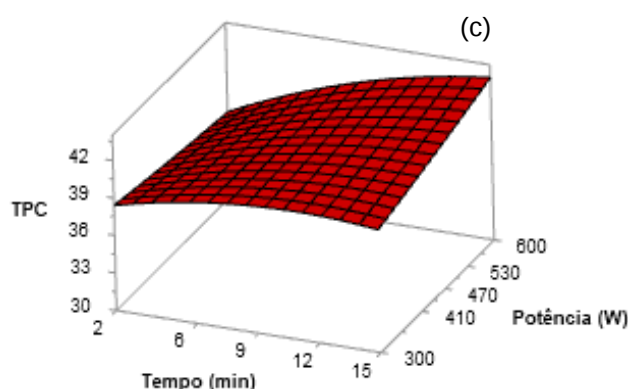
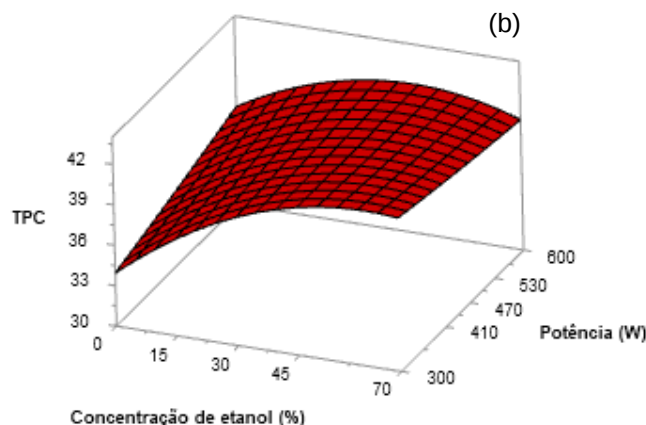
Figura 20: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3) no TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE.



Como pode ser observado por meio dos gráficos de superfície de resposta tridimensional da Figura 21 (gráficos a-c), analisando-se duas variáveis de cada vez, percebe-se que quando se varia a concentração de etanol e o tempo de extração, separadamente, de seu nível baixo para o alto, ocorre um aumento no TPC, mostrando os efeitos positivos significativos dessas variáveis.

Figura 21: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e potência de micro-ondas e (c) tempo de extração e potência de micro-ondas.





Apesar de haver uma leve curvatura nos gráficos (a e b) da Figura 21, em que é avaliada o efeito da concentração de etanol, o efeito quadrático desta variável não foi significativo, como relatado no gráfico de Pareto (Figura 20). Os resultados observados em relação ao tempo de extração estão de acordo com aquele relatado por Saifullah *et al.* [98] nos experimentos realizados com as folhas de *Backhousia citriodora* para a recuperação de ácido gálico por MAE, onde uma maior recuperação desse composto fenólico foi obtida ao se aumentar o tempo de extração.

A potência de extração não exerceu efeito significativo no TPC dos extratos de *L. alba* Figura 21 (gráficos b e c), assim como foi observado para o rendimento de extração.

A Tabela 13 mostra os valores obtidos através da análise de variância para a resposta TPC. Os termos que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por MAE considerando a espécie *L. alba*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	117,669	9	13,0743	3,69	0,082
X_1 (concentração de etanol)	48,579	1	48,5795	13,70	0,014*
X_2 (tempo)	28,359	1	28,3589	7,99	0,037*
X_3 (potência de micro-ondas)	1,263	1	1,2633	0,36	0,577
X_1X_2	3,035	1	3,0346	0,86	0,397
X_1X_3	6,375	1	6,3752	1,80	0,238
X_2X_3	5,488	1	5,4879	1,55	0,269
X_1^2	21,803	1	21,8030	6,15	0,056
X_2^2	3,561	1	3,5611	1,00	0,362
X_3^2	0,031	1	0,0306	0,01	0,930
Erro	17,736	5	3,5471		
Falta de ajuste	16,536	3	5,5120	9,19	0,100
Erro puro	1,199	2	0,5997		
SQ Total	135,405	14			
R^2	0,8690				
R^2_{ajustado}	0,6333				
C.V. (%)	4,87				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R^2 : coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

Considerando a análise de variância (Tabela 12), apesar do alto p -valor (0,082), o modelo apresentou altos valores de F-valor (3,69), coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8690$) e determinação ajustado ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,6333$), além de apresentar um baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 4,87%), o que indica grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais [23, 82, 165]. Esses valores de coeficientes de determinação estão de acordo com aqueles relatados na literatura [191, 192].

Com base na análise de regressão, a TPC pode ser descrito por uma equação polinomial quadrática (Equação 7):

$$\text{TPC } (Y_4) = 40,410 + 2,464X_1 + 1,883X_2 + 0,397X_3 - 0,871X_1X_2 - 1,262X_1X_3 + 1,171X_2X_3 - 2,430X_1^2 - 0,982X_2^2 + 0,091X_3^2 \quad (7)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e potência de micro-ondas, respectivamente.

O TPC ótimo predito pelo modelo utilizando as condições otimizadas de extração por MAE (37,48% de etanol, 15 min e 600 W) foi de 42,98 mg EAG/g ms. As análises estatísticas mostraram que as variáveis que afetaram de forma significativa o TPC dos extratos obtidos de *L. alba* por MAE foram a concentração de etanol e o tempo de extração.

5.2.2 Validação das condições otimizadas de forma simultânea por MAE

Como anteriormente mencionado, foi observado que as concentrações de etanol preditas para a otimização de cada resposta individualmente foram diferentes: 46,24% para o rendimento de extração; e 37,48% para o TPC. No entanto, as condições de extração ótimas preditas para maximizar o rendimento e o TPC, simultaneamente, foram: 43% de etanol, 15 min e 600 W. Assim, para a validação das condições ótimas de extração e respostas preditas de forma simultânea, foram realizadas três extrações utilizando essas condições otimizadas. A Tabela 14 mostra os valores experimentais e preditos de rendimento de extração e TPC dos extratos de *L. alba* obtidos por MAE nessas condições.

Tabela 14: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por MAE de *L. alba*: 43,30% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 600 W (desejabilidade de 0,9357).

Resposta	Experimental	Predito	RSD%*
Rendimento (%)	26,94 ± 0,53	28,61	4,25
TPC (mg EAG/g ms)	41,13 ± 0,27	42,91	3,00

*Desvio padrão relativo - RSD entre os valores preditos e experimentais (média de três extratos independentes obtidos nas mesmas condições de extração).

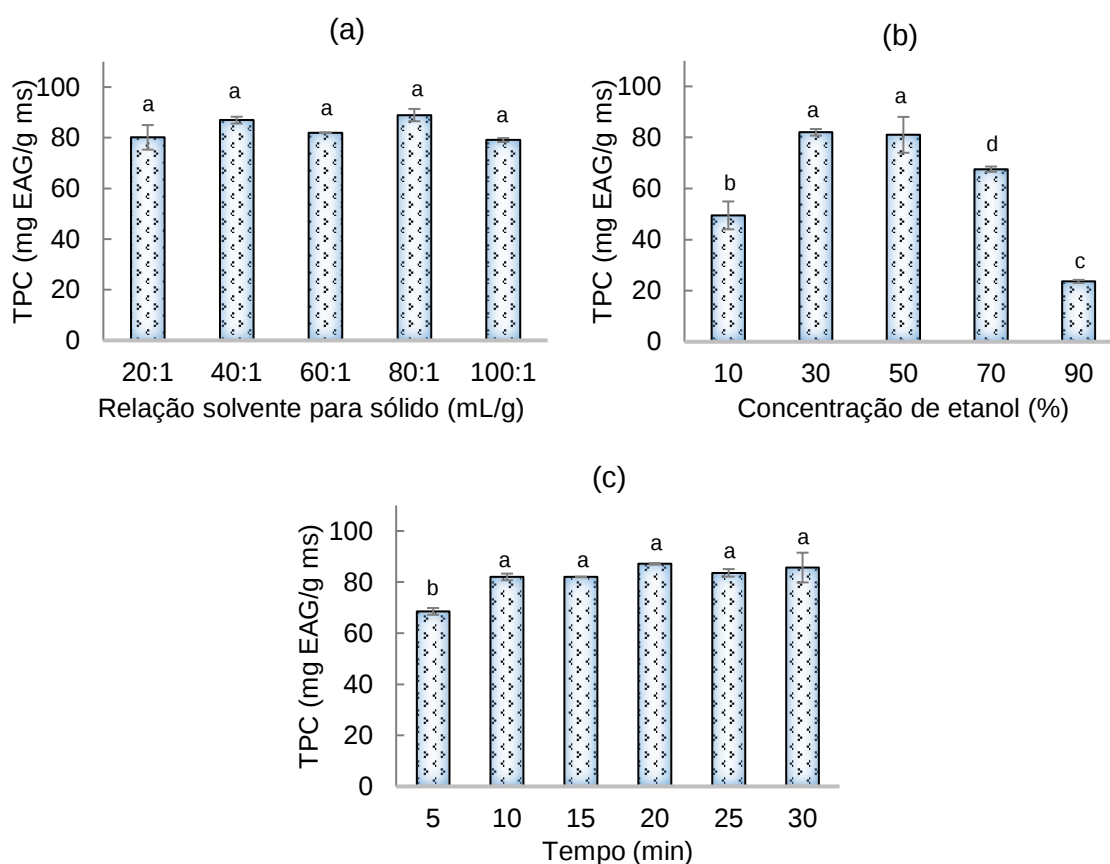
Os resultados observados na Tabela 14 indicam que o modelo explica adequadamente o processo de extração e possui alta capacidade de prever a concentração de etanol, o tempo de extração e a relação solvente para sólido mais adequados para a obtenção, simultânea, dos melhores valores de rendimento e TPC dos extratos obtidos de *L. alba* por MAE, uma vez que as diferenças entre os valores experimentais e preditos foram pouco significativas [167, 189].

5.3 Otimização por UAE a partir das folhas de *L. camara*

5.3.1 Experimento de fator único

Um planejamento de fator único também foi utilizado para avaliar o efeito das variáveis relação solvente para sólido, concentração de etanol e tempo de extração no TPC dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de *L. camara*. A Figura 22a-c mostra o efeito dessas variáveis no TPC.

Figura 22: Efeito da relação solvente para sólido (a), da concentração de etanol (b) e do tempo de extração (c) no conteúdo fenólico total (TPC) dos extratos das folhas de *L. camara* obtidos por UAE. Letras diferentes nas barras significam que há diferença significativa entre os resultados segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).



A Figura 22a mostra o efeito da relação solvente para sólido no TPC, mantendo as demais variáveis de extração avaliadas constantes: 50% de etanol e tempo de extração de 10 min. O efeito da relação solvente para sólido não se

mostrou significativo no TPC dos extratos das folhas de *L. camara* obtidos por UAE, visto que não foi observado aumento significativo do TPC com o aumento dessa relação de 20:1 até 100:1 mL/g. Esse comportamento difere do que geralmente é relatado em diversos trabalhos na literatura: aumento da recuperação dos compostos desejados com o aumento da relação solvente para sólido como consequência da melhora na transferência de massa do processo de extração [85, 174]. Entretanto, se o processo de transferência de massa dos compostos extraídos atingiu o equilíbrio, não ocorrerá aumento na extração dos compostos químicos ao se elevar ainda mais a relação solvente para sólido [51, 180]. Esse comportamento foi relatado por Zhou *et al.* [51] em estudo realizado com a espécie *Melastoma sanguineum* Sims para a recuperação de compostos antioxidantes por UAE a partir de seus frutos, avaliando-se um intervalo de relação solvente para sólido entre 10:1 e 45:1 mL/g. Xu *et al.* [180] também observaram tal comportamento ao avaliar o efeito da relação solvente para sólido (entre 15:1 e 60:1 mL/g) na atividade antioxidante de extratos preparados por UAE a partir das flores da espécie *Jatropha integerrima*.

Apesar dos resultados observados na Figura 22a não serem estatisticamente diferentes, observa-se que os maiores valores foram alcançados com as relações de 40:1 e 80:1 mL/g. Uma vez que o uso da relação 40:1 mL/g resulta em menor consumo de solvente em comparação àquela de 80:1 mL/g, 40 mL/g será utilizada nos experimentos subsequentes do planejamento de fator único.

A Figura 22b mostra o efeito da concentração de etanol no TPC, mantendo as demais variáveis de extração avaliadas constantes: relação solvente para sólido de 40:1 mL/g e tempo de extração de 10 min. Como pode ser observado, há um aumento inicial do TPC com o aumento da concentração de etanol de 10% até valores de concentração entre 30 e 50%, seguida de redução dessa resposta com o aumento dessa variável até atingir o menor valor em 90% de etanol. Esse comportamento pode estar relacionado, principalmente, à semelhança de polaridade dos compostos extraídos com o solvente de extração entre 30 e 50% de etanol [23, 177, 179]. Uma alta recuperação de compostos fenólicos por UAE, usando a mistura entre etanol e água como solvente de extração, foi relatada por Brahmi *et al.* [188] em estudo realizado

com flores de *Opuntia ficus-indica*. Em estudo realizado por Xu *et al.* [23], foi observado uma maior recuperação de compostos fenólicos das flores de *Limonium sinuatum* por UAE empregando 40% de etanol em água.

Analisando a Figura 22b, foi observado que os resultados semelhantes de TPC comparando as concentrações de 30 e 50% de etanol; os valores observados não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$). Entretanto, a concentração de 30% de etanol se mostra mais adequada para os experimentos posteriores, pois resultou em maior valor médio de TPC empregando menor volume de solvente orgânico.

O efeito do tempo de extração no TPC está mostrado na Figura 22c, mantendo as demais variáveis de extração avaliadas constantes: relação solvente para sólido de 40:1 mL/g e 30% de etanol. Foi observado um aumento do TPC com o aumento do tempo de extração até 20 min, seguido de uma pequena redução do valor médio observado com o aumento adicional dessa variável, porém não havendo diferença estatística entre os valores. Assim, pode-se supor que o aumento do tempo de extração acima de 10 min não interfere de forma significativa no TPC dos extratos obtidos de *L. camara* e que o ultrassom pode acelerar a liberação de compostos fenólicos em um curto período. Comportamento semelhante do efeito do tempo de extração foi observado por Brahmi *et al.* [188] no estudo de recuperação de compostos fenólicos das flores de *Opuntia ficus-indica* por ultrassom quando se avalia a variação da resposta com o aumento do tempo de extração até 50 min. Zhou *et al.* [51] também relataram comportamento semelhante do tempo na extração de compostos antioxidantes por UAE a partir dos frutos de *Melastoma sanguineum*, em que a recuperação média máxima de antioxidantes foi atingida a 25 min, sendo reduzido levemente (sem diferença estatisticamente significativa) com o aumento do tempo de extração.

Uma vez que pode haver interações entre as variáveis de extração por ultrassom [93, 98], o que será avaliado por meio do planejamento Box-Benhken, o efeito de interação com outra variável sobre o tempo de extração pode resultar em efeito significativo do tempo no TPC dos extratos. Nesse sentido, apesar de não haver diferença significativa das respostas acima de 10 min de extração,

observado no experimento de fator único, o efeito dessa variável será analisado através de um planejamento Box-Benhken, no qual o intervalo de tempo utilizado será de 15 a 25 min, que inclui o maior valor médio (Figura 22c).

Como observado, o planejamento de fator único permitiu avaliar o efeito das variáveis, de forma independente, no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE. De acordo com os resultados observado (Figura 22a-c) os intervalos escolhidos para serem otimizados por BBD e RSM foram: relação solvente para sólido entre 20:1 e 60:1 mL/g; concentração de etanol entre 10 e 50% e tempo de extração entre 15 e 25 min.

5.3.2 Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM

Para determinar as condições ótimas de extração por UAE a partir das folhas de *L. camara* e avaliar os efeitos das variáveis estudadas no rendimento e no TPC dos extratos, foi utilizado um planejamento Box-Benhken. Esse planejamento e as respostas obtidas nas diferentes condições de extração estão mostrados na Tabela 15, onde pode ser observado que os rendimentos de extração variaram entre 15,69 e 31,55% e os valores de TPC variaram entre 40,67 e 101,99 mg EAG/g ms, indicando a influência de alguma variável no processo de extração.

Tabela 15: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por UAE a partir das folhas de *L. camara*.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (mL/g)	Rend. (Y ₁ , %)	TPC (Y ₂ , mg EAG/g ms)
1	10 (-1)	15 (-1)	40:1 (0)	22,902	60,434
2	50 (1)	15 (-1)	40:1 (0)	25,459	87,257
3	10 (-1)	25 (1)	40:1 (0)	22,673	59,103
4	50 (1)	25 (1)	40:1 (0)	27,532	81,161
5	10 (-1)	20 (0)	20:1 (-1)	15,695	40,672
6	50 (1)	20 (0)	20:1 (-1)	24,436	81,087
7	10 (-1)	20 (0)	60:1 (1)	25,829	70,344
8	50 (1)	20 (0)	60:1 (1)	27,703	91,894

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (mL/g)	Rend. (Y ₁ , %)	TPC (Y ₂ , mg EAG/g ms)
9	30 (0)	15 (-1)	20:1 (-1)	24,035	78,956
10	30 (0)	25 (1)	20:1 (-1)	22,331	67,174
11	30 (0)	15 (-1)	60:1 (1)	28,580	87,217
12	30 (0)	25 (1)	60:1 (1)	31,555	101,999
13 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)	27,815	89,840
14 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)	29,259	93,040
15 ^c	30 (0)	20 (0)	40:1 (0)	28,215	88,164

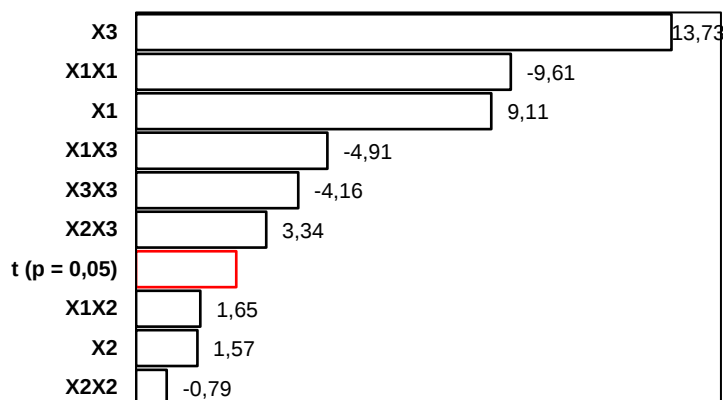
X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: relação solvente para sólido; Rend.: rendimento de extração; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; ms: material seco.

^c ponto central.

Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos

De acordo com o gráfico de Pareto apresentado na Figura 23, pode-se observar que os termos lineares referentes à concentração de etanol (X₁) e relação solvente para sólido (X₃) apresentaram efeitos significativos e positivos no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE. Além disso, os termos quadráticos X₁X₁ e X₃X₃ apresentaram efeitos significativos negativos no rendimento dos extratos, e os termos de interação X₁X₃ e X₂X₃ apresentaram efeitos significativos negativo e positivo, respectivamente, nessa resposta. Os demais termos não foram significativos.

Figura 23: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE.



A análise de variância (Tabela 16) mostra que o modelo desenvolvido foi significativo (F-valor de 46,23 e p -valor $< 0,001$), apresentando altos valores de coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9881$) e determinação ajustado ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,9668$), além de baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 2,73%), indicando uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais [23, 36].

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento de extração obtida por UAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	203,707	9	22,6341	46,23	$<0,001^*$
X_1 (concentração de etanol)	40,648	1	40,6476	83,03	$<0,001^*$
X_2 (tempo)	1,213	1	1,2129	2,48	0,176
X_3 (relação solvente para sólido)	92,276	1	92,2759	188,49	$<0,001^*$
X_1X_2	1,325	1	1,3249	2,71	0,161
X_1X_3	11,788	1	11,7881	24,08	$0,004^*$
X_2X_3	5,473	1	5,4730	11,18	$0,020^*$
X_1^2	45,201	1	45,2007	92,33	$<0,001^*$
X_2^2	0,309	1	0,3093	0,63	0,463
X_3^2	8,476	1	8,4762	17,31	$0,009^*$
Erro	2,448	5	0,4896		
Falta de ajuste	1,337	3	0,4455	0,80	0,597
Erro puro	1,111	2	0,5556		

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
SQ Total	206,155	14			
R ²	0,9881				
R ² _{ajustado}	0,9668				
C.V. (%)	2,73				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R²: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

Com base na análise de regressão, a relação entre as variáveis independentes e o rendimento de extração pode ser descrita pela seguinte equação polinomial (Equação 8):

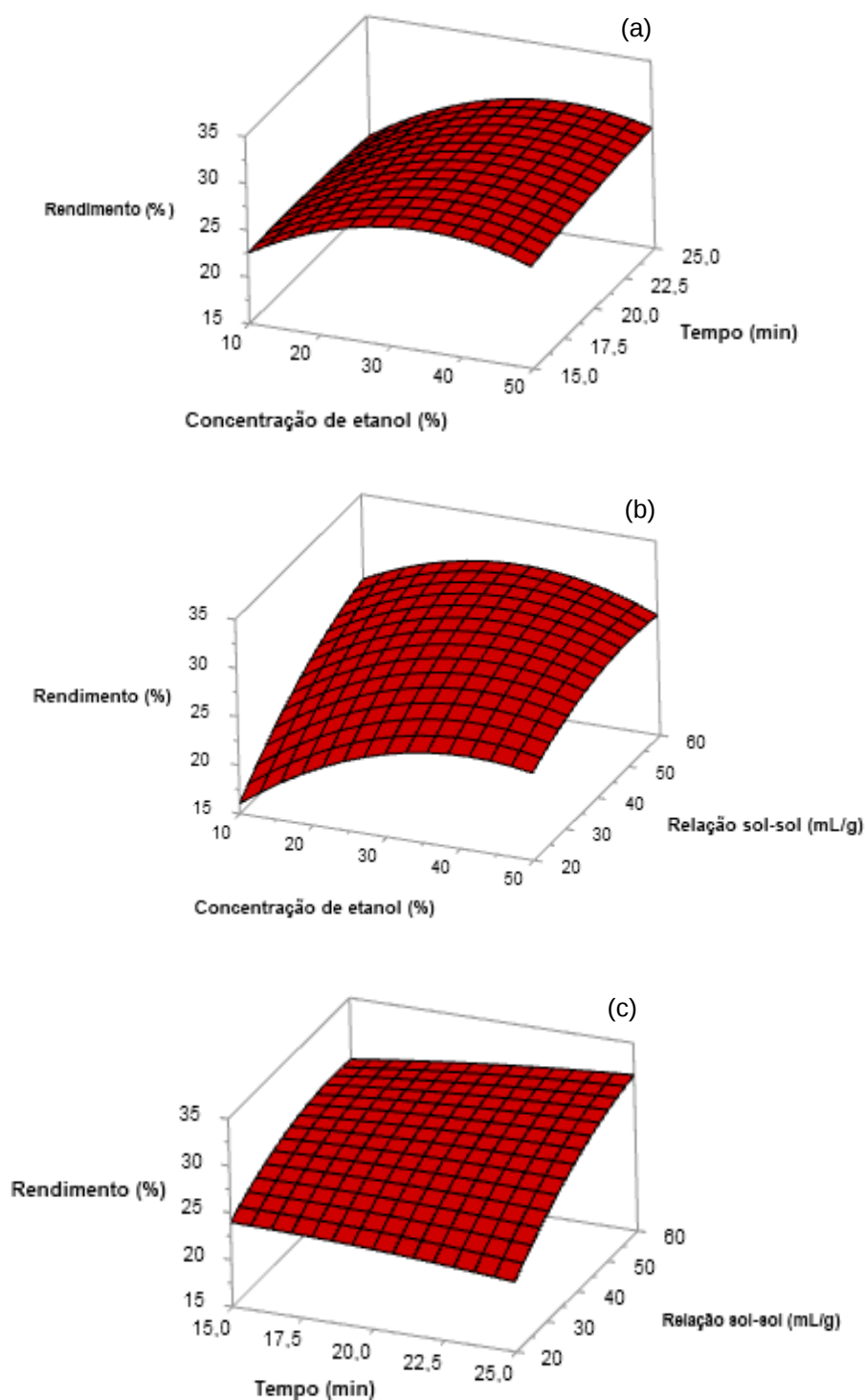
$$\text{Rendimento } (Y_1) = 28,430 + 2,254X_1 + 0,389X_2 + 3,396X_3 + 0,576X_1X_2 - 1,717X_1X_3 + 1,170X_2X_3 - 3,499X_1^2 - 0,289X_2^2 - 1,515X_3^2 \quad (8)$$

onde X₁, X₂ e X₃ são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e relação solvente para sólido, respectivamente.

As condições ótimas de extração por UAE foram determinadas como: 33,03% de etanol, 25 min e 60:1 mL/g, o que resulta em um rendimento de extração predito de 31,67%.

O efeito de cada variável no rendimento de extração pode ser observado através dos gráficos de superfície de resposta mostrados na Figura 24a-c.

Figura 24: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido.



Na Figura 24 (gráficos a e b) podemos observar o efeito quadrático da concentração de etanol no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE, uma vez que ocorreu um aumento inicial do rendimento de extração com o aumento da concentração de etanol entre 35 e 40%, seguido de redução dessa resposta com o aumento posterior da concentração do solvente orgânico.

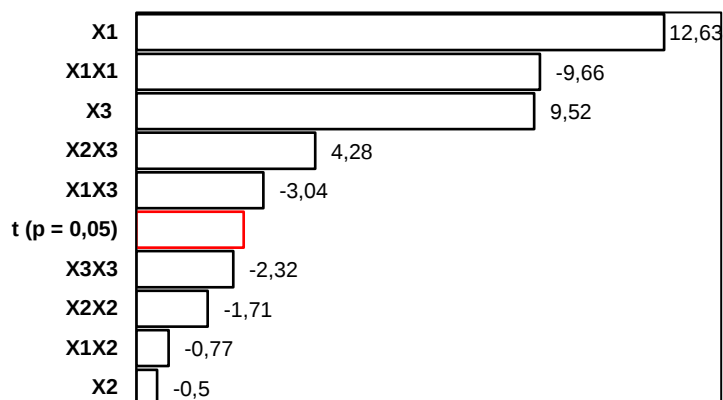
Na Figura 24 (gráficos a e b) pode ser observado o efeito linear da relação solvente para sólido no rendimento de extração: aumento da resposta com o aumento dessa variável. Esse efeito pode ser relacionado ao aumento do gradiente de concentração e dos efeitos da cavitação sobre a parede celular vegetal com o aumento dessa variável, como previamente relatado.

Os resultados estatísticos mostraram que a concentração de etanol e a relação solvente para sólido foram as variáveis que mais interferiram no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE.

Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos

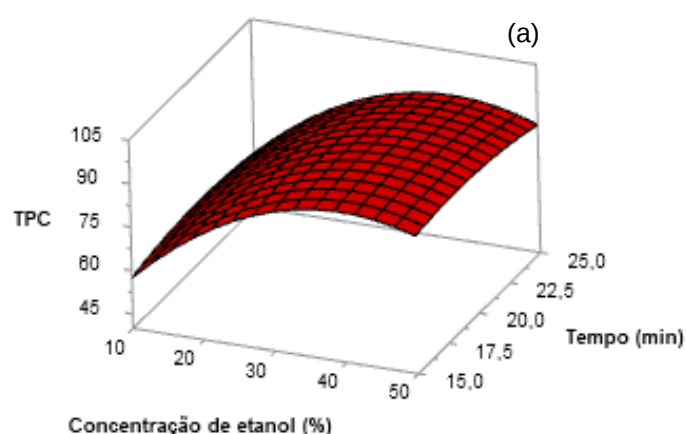
No gráfico de Pareto da Figura 25, podem ser observados os termos que interferem no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE. Os termos lineares referentes à concentração de etanol (X_1) e relação solvente para sólido (X_3) apresentaram efeitos significativos e positivos no TPC, os termos de interação X_1X_3 e X_2X_3 apresentaram efeitos significativos negativo e positivo, respectivamente. Além disso, o termo quadrático X_1X_1 apresentou efeito significativo negativo nessa resposta. Os demais termos não foram significativos.

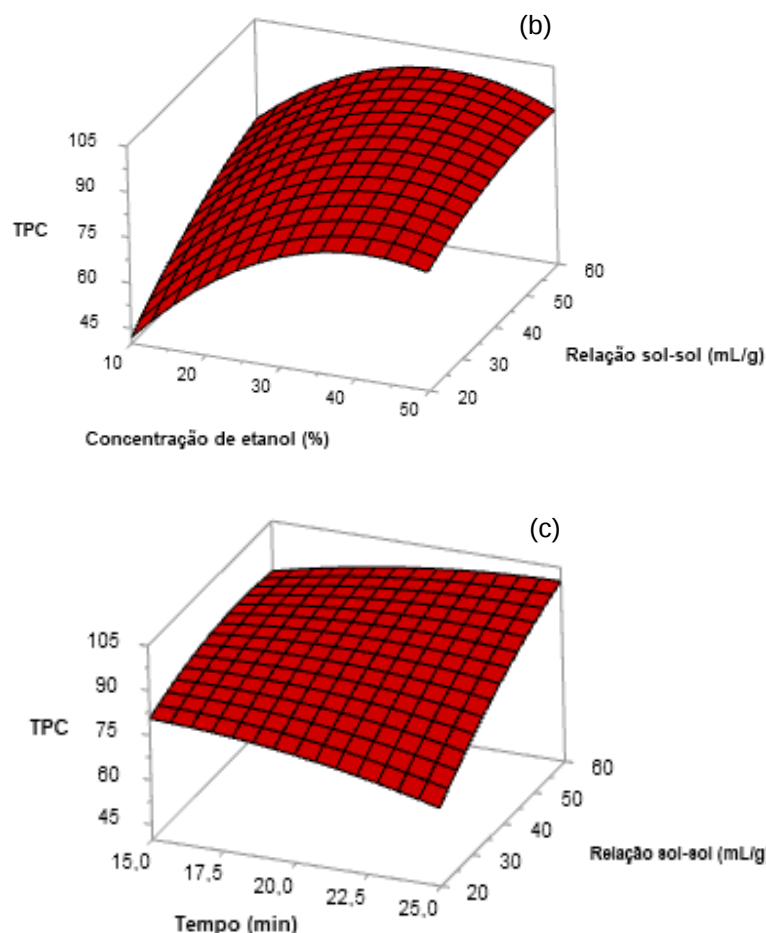
Figura 25: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e relação solvente para sólido (X_3) no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE.



Os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 26a-c mostram a interação entre as variáveis e o efeito de cada uma no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE.

Figura 26: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e relação solvente para sólido e (c) tempo de extração e relação solvente para sólido.





Como pode ser observado, o comportamento da resposta TPC foi muito semelhante ao do rendimento de extração quando se compara os gráficos em que estão mostradas as interações entre as mesmas variáveis. Assim, observa-se um aumento inicial do TPC com o aumento da concentração de etanol até cerca de 40%, seguido de redução dessa resposta com o aumento posterior da concentração do solvente orgânico (Figura 26, gráficos a e b). Na Figura 26 (gráficos b e c) pode ser observado o aumento dessa resposta com o aumento da relação solvente para sólido de 20:1 para 60:1 mL/g.

Considerando a análise de variância (Tabela 17), o modelo desenvolvido foi considerado significativo (F-valor de 41,71 e p -valor $< 0,001$), o qual se mostrou adequado para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta ($R^2 = 0,9869$) e de grande significância para prever a relação entre essas variáveis ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,9632$), além de apresentar um baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 3,95%), indicando uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais [36, 82, 165].

Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por UAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	3611,85	9	401,32	41,71	<0,001*
X_1 (concentração de etanol)	1535,81	1	1535,81	159,61	<0,001*
X_2 (tempo)	2,45	1	2,45	0,25	0,635
X_3 (relação solvente para sólido)	872,89	1	872,89	90,72	<0,001*
X_1X_2	5,68	1	5,68	0,59	0,477
X_1X_3	88,98	1	88,98	9,25	0,029*
X_2X_3	176,41	1	176,41	18,33	0,008*
X_1^2	898,36	1	898,36	93,36	<0,001*
X_2^2	28,15	1	28,15	2,93	0,148
X_3^2	51,95	1	51,95	5,40	0,068
Erro	48,11	5	9,62		
Falta de ajuste	35,84	3	11,95	1,95	0,357
Erro puro	12,27	2	6,14		
SQ Total	3659,96	14			
R^2	0,9869				
R^2_{ajustado}	0,9632				
C.V. (%)	3,95				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R^2 : coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

A análise de regressão indica que podemos utilizar uma equação polinomial quadrática (Equação 9) para descrever a relação entre as variáveis independentes e o TPC dos extratos de *L. camara*.

$$\text{TPC } (Y_2) = 90,350 + 13,860X_1 - 0,550X_2 + 10,450X_3 - 1,19X_1X_2 - 4,720X_1X_3 + 6,64X_2X_3 - 15,600X_1^2 - 2,76X_2^2 - 3,75X_3^2 \quad (9)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas concentração de etanol, tempo de extração e relação solvente para sólido, respectivamente.

As condições ótimas de extração por UAE foram determinadas como: 35,06% de etanol, 25 min e 60 mL/g. O TPC ótimo previsto nessas condições foi de 101,38 mg EAG/g ms.

De modo semelhante ao observado para a resposta rendimento de extração, as variáveis concentração de etanol e relação solvente para sólido foram as que mais influenciaram no TPC dos extratos obtidos de *L. camara* por UAE.

5.3.3 Validação das condições otimizadas de forma simultânea por UAE

Para se avaliar a precisão do modelo em determinar as condições ótimas de extração por UAE, considerando a maximização do rendimento e do TPC dos extratos de *L. camara*, foram realizadas três extrações utilizando as condições otimizadas de forma simultânea: 35% de etanol, 25 min e relação solvente para sólido de 60:1 mL/g. A Tabela 18 mostra os valores experimentais e preditos de rendimento de extração e TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por UAE nessas condições.

Tabela 18: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por UAE de *L. camara*: 35% de etanol, 25 min e relação solvente para sólido de 60:1 mL/g (desejabilidade de 0,9950).

Resposta	Experimental	Predito	RSD%*
Rendimento (%)	32,50 ± 0,84	31,64	1,90
TPC (mg EAG/g ms)	102,89 ± 3,62	101,38	1,05

*Desvio padrão relativo - RSD entre os valores preditos e experimentais (média de três extratos independentes obtidos nas mesmas condições de extração).

Os resultados observados na Tabela 18 indicam que o modelo explica adequadamente o processo de extração e possui alta capacidade de prever a concentração de etanol, o tempo de extração e a relação solvente para sólido mais adequadas para a recuperação simultânea dos melhores rendimento e TPC dos extratos obtidos das folhas de *L. camara* por UAE, uma vez que a diferença entre os valores experimentais e preditos foram muito pequenas [167, 189].

5.4 Otimização por MAE a partir das folhas de *L. camara*

5.4.1 Planejamento Box-Behnken e otimização com o auxílio de RSM

Neste trabalho, também foi verificado o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no rendimento e no TPC dos extratos obtidos de *L. camara* por MAE empregando um planejamento Box-Behnken. Na Tabela 19 estão mostrados os valores de rendimento e TPC dos extratos obtidos.

Tabela 19: Planejamento Box-Behnken contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e TPC dos extratos obtidos por MAE a partir das folhas de *L. camara*.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (W)	Rend. (Y ₃ , %)	TPC (Y ₄ , mg EAG/g ms)
1	0 (-1)	2 (-1)	450 (0)	30,44	80,92
2	70 (1)	2 (-1)	450 (0)	34,85	109,57
3	0 (-1)	15 (1)	450 (0)	31,73	95,72
4	70 (1)	15 (1)	450 (0)	38,41	125,39
5	0 (-1)	8,5 (0)	300 (-1)	31,77	91,61
6	70 (1)	8,5 (0)	300 (-1)	38,67	119,93
7	0 (-1)	8,5 (0)	600 (1)	31,39	91,53
8	70 (1)	8,5 (0)	600 (1)	38,95	129,96
9	35 (0)	2 (-1)	300 (-1)	36,33	110,07
10	35 (0)	15 (1)	300 (-1)	37,33	134,41
11	35 (0)	2 (-1)	600 (1)	36,81	126,11
12	35 (0)	15 (1)	600 (1)	37,45	125,43
13 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	37,28	120,11
14 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	37,55	125,89
15 ^c	35 (0)	8,5 (0)	450 (0)	37,53	121,02

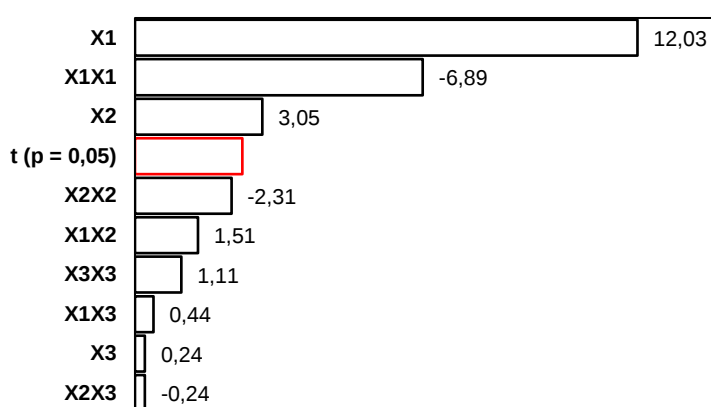
X₁: concentração de etanol em água; X₂: tempo de extração; X₃: potência de micro-ondas; Rend.: rendimento de extração; TPC: conteúdo de fenólicos totais; EAG: equivalente de ácido gálico; ms: material seco.

^c ponto central.

Influência dos parâmetros de extração no rendimento dos extratos

Através do gráfico de Pareto da Figura 27, pode-se identificar os termos que apresentam efeito significativo no rendimento dos extratos de *L. camara* obtido por MAE, os quais são responsáveis pela variação dessa resposta (30,44 a 38,95%) de acordo com a condição experimental (Tabela 19).

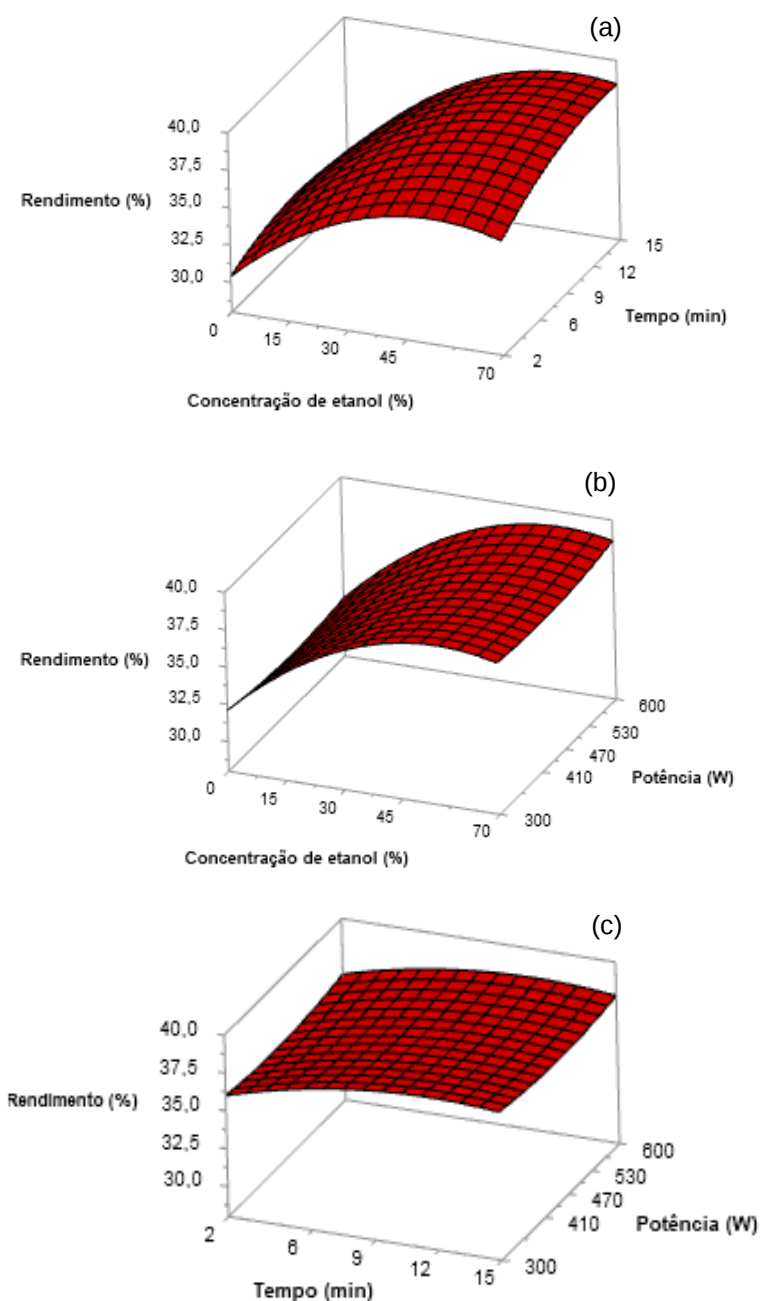
Figura 27: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3) no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.



Como pode ser observado na Figura 27, apenas os termos lineares, referentes a concentração de etanol (X_1) e ao tempo de extração (X_2), e o termo quadrático (X_1X_1) apresentaram efeitos significativas no rendimento de extração, este negativo e aqueles positivos. Os demais termos não foram significativos.

Na Figura 28a-c está ilustrado o efeito das variáveis independentes no rendimento dos extratos obtidos por UAE por meio de gráficos de superfície de resposta tridimensionais, analisando-se duas variáveis de cada vez.

Figura 28: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e potência de micro-ondas (c) tempo de extração e potência de micro-ondas.



Na Figura 28 (gráficos a e b) podem ser observado os efeitos linear e quadráticos significativos da concentração de etanol no rendimento de extração. O rendimento aumenta inicialmente com o aumento da concentração de etanol

até cerca de 45% e, então, ocorre uma redução com o aumento dessa variável até 70%. O aumento inicial do rendimento com aumento da concentração de etanol, até cerca de 45%, pode ser atribuído à semelhança entre a polaridade dos compostos presentes na matriz vegetal com a polaridade da solução de etanol nessa concentração, uma vez que o solvente de extração tende a solubilizar mais facilmente compostos com polaridades semelhantes a ele [179, 185].

Na Figura 28 (gráficos a e c) está mostrado o efeito linear do tempo de extração no rendimento. Como pode ser observado, o rendimento aumentou levemente com o aumento do tempo de extração de 2 para 15 min. Esse aumento provavelmente está relacionado ao maior tempo de contato entre a matriz e o solvente de extração e, conseqüentemente, ao maior grau de intumescimento da matriz vegetal, favorecendo assim uma maior extração dos compostos químicos [43].

Os resultados da análise de variância de cada fator e suas interações estão mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta rendimento obtida por MAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
Modelo	118,747	9	13,1941	23,38	0,001*
X_1 (concentração de etanol)	81,671	1	81,6709	144,74	<0,001*
X_2 (tempo)	5,252	1	5,2524	9,31	0,028*
X_3 (potência de micro-ondas)	0,032	1	0,0319	0,06	0,821
X_1X_2	1,286	1	1,2859	2,28	0,192
X_1X_3	0,109	1	0,1092	0,19	0,678
X_2X_3	0,032	1	0,0317	0,06	0,822
X_1^2	26,772	1	26,7722	47,45	0,001*
X_2^2	3,024	1	3,0237	5,36	0,068
X_3^2	0,697	1	0,6965	1,23	0,317
Erro	2,821	5	0,5643		
Falta de ajuste	2,776	3	0,9253	40,75	0,024*
Erro puro	0,045	2	0,0227		
SQ Total	121,568	14			

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
R ²	0,9768				
R ² _{ajustado}	0,9350				
C.V. (%)	2,10				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R²: coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

O alto valor de F do modelo (23,38) implica que o modelo matemático proposto foi apropriado e de alta significância (*p*-valor 0,001) para descrever o comportamento da resposta, além de apresentar uma alta capacidade para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta ($R^2 = 0,9768$) e de grande significância para prever a relação entre essas variáveis ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,9350$), além de apresentar um baixo valor de coeficiente de variação (C.V.: 2,10%), indicando uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais observados [23, 82].

Na Equação 10 está mostrado o modelo matemático proposto para prever o rendimento de extração de acordo com as variáveis estudadas: concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3).

$$\begin{aligned} \text{Rendimento } (Y_3) = & 37,452 + 3,195X_1 + 0,810X_2 + 0,063X_3 + 0,567X_1X_2 + \\ & 0,165X_1X_3 - 0,089X_2X_3 - 2,693X_1^2 - 0,905X_2^2 + 0,434X_3^2 \end{aligned} \quad (10)$$

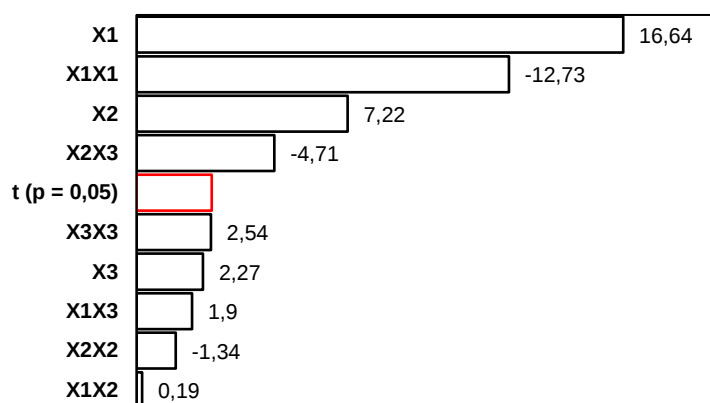
As condições ótimas de extração previstas pelo modelo para a obtenção do melhor rendimento por MAE foram 59,40% de etanol, 12,51 min e 600 W de potência. O rendimento predito empregando essas condições foi de 39,33%. Entre as variáveis estudadas, a concentração de etanol e o tempo de extração foram as que influenciaram significativamente o rendimento dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.

Influência dos parâmetros de extração no TPC dos extratos

Foi avaliado também o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE empregando um planejamento Box-Behnken.

No gráfico de Pareto da Figura 29 estão mostrados os fatores das variáveis que interferem no TPC dos extratos de *L. camara*, conforme observado pela variação dessa resposta de acordo com as condições de extração (Tabela 19).

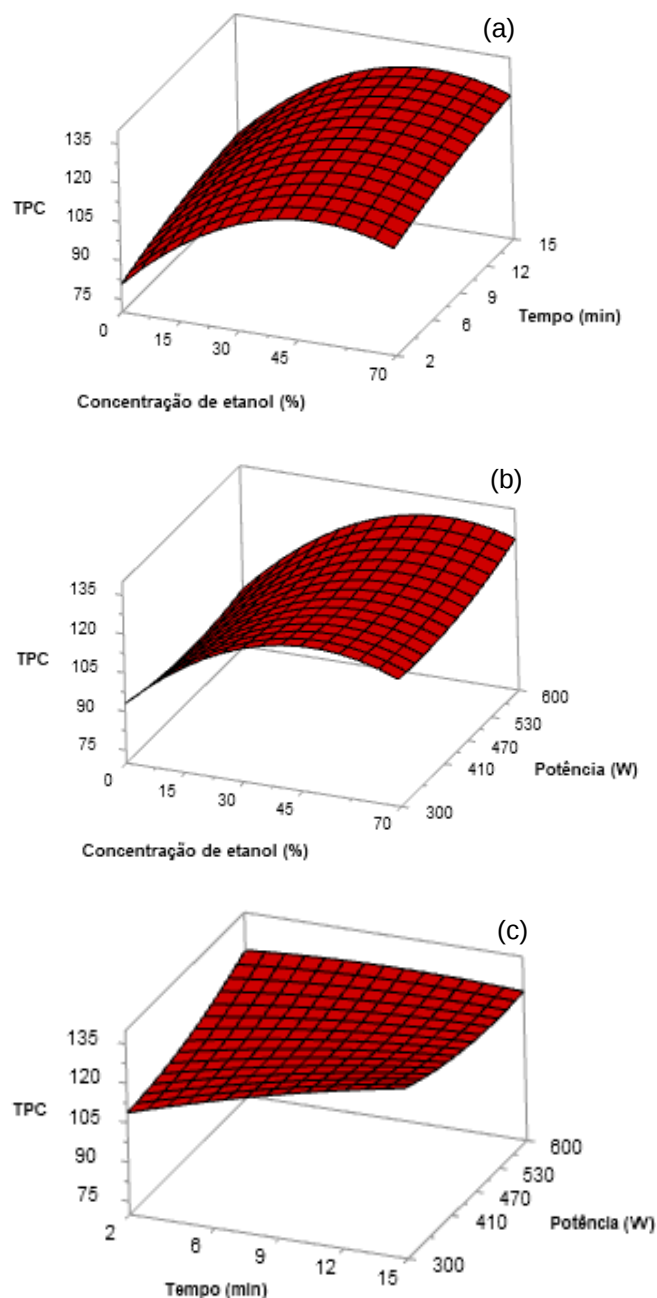
Figura 29: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis concentração de etanol (X_1), tempo de extração (X_2) e potência de micro-ondas (X_3) no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.



No gráfico de Pareto da Figura 29, pode ser observado que os termos referentes a concentração de etanol (X_1) e ao tempo de extração (X_2) apresentaram efeitos significativos e positivos, e os termos quadrático (X_1X_1) e de interação X_2X_3 apresentaram efeitos significativos e negativos no TPC. Os demais termos não foram significativos.

Na Figura 30a-c está ilustrado, por meio de gráficos de superfície de resposta tridimensionais, o efeito das variáveis independentes no TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.

Figura 30: Gráficos de superfície de resposta dos efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas no TPC (mg EAG/g ms) dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE: (a) concentração de etanol e tempo de extração, (b) concentração de etanol e potência de micro-ondas (c) tempo de extração e potência de micro-ondas.



Na Figura 30 (gráficos a e b) pode ser observado o efeito linear significativo da concentração de etanol no TPC, bem como seu efeito quadrático. O TPC aumenta inicialmente com o aumento da concentração de etanol até cerca de 45% e então ocorre uma redução da resposta com o aumento

dessa variável até 70%. Isso, pode ser atribuído, principalmente, à semelhança entre a polaridade dos compostos presentes na matriz vegetal com a polaridade da solução de etanol nessa concentração, além do efeito de desnaturação de proteínas causado pelo aumento da concentração de etanol, como já mencionado anteriormente [165, 179, 185].

Akbari *et al.* [165] observaram resultados semelhante em seus estudos relacionados à recuperação de compostos químicos polares a partir das folhas de *Aloe vera* por MAE, alcançando o maior TPC empregando uma solução de 40% de etanol, avaliando-se um intervalo de concentração entre 20 e 100% de etanol. Nabet *et al.* [167] observaram que o maior TPC dos extratos das partes aéreas de *Thymus fontanesii* foi obtido utilizando uma solução de 50% de etanol, avaliando-se o intervalo de concentração desse solvente, em mistura com água, entre 0 e 100%.

Na Figura 30 (gráficos a e c) está mostrado o efeito linear do tempo de extração. Como pode ser observado, o TPC aumenta com o aumento do tempo de extração de 2 para 15 min, o que provavelmente está relacionado ao maior tempo de contato entre a matriz e o solvente de extração, favorecendo assim a maior recuperação dos compostos químicos [43].

Considerando a análise de variância mostrada na Tabela 21, em que os termos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*), o modelo desenvolvido foi considerado significativo (alto F-valor 59,43 e baixo p -valor $< 0,001$), o qual se mostrou adequado para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta ($R^2 = 0,9907$ e $R^2_{ajustado} = 0,9741$), além de indicar uma grande precisão e confiabilidade dos dados experimentais obtidos (baixo valor de coeficiente de variação, C.V.: 2,33%) [23, 36].

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para o modelo polinomial quadrático proposto para a resposta TPC obtida por MAE considerando a espécie *L. camara*. Os efeitos significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco (*).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p -Valor
Modelo	3775,92	9	419,55	59,43	$<0,001^*$
X_1 (concentração de etanol)	1955,33	1	1955,33	276,99	$<0,001^*$
X_2 (tempo)	368,24	1	368,24	52,16	$0,001^*$

Fonte	SQ	GL	MQ	F-Valor	p-Valor
X_3 (potência de micro-ondas)	36,25	1	36,25	5,14	0,073
X_1X_2	0,26	1	0,26	0,04	0,855
X_1X_3	25,53	1	25,53	3,62	0,116
X_2X_3	156,47	1	156,47	22,16	0,005*
X_1^2	1143,25	1	1143,25	161,95	<0,001*
X_2^2	12,60	1	12,60	1,78	0,239
X_3^2	45,56	1	45,56	6,45	0,052
Erro	35,30	5	7,06		
Falta de ajuste	16,00	3	5,33	0,55	0,695
Erro puro	19,30	2	9,65		
SQ Total	3811,22	14			
R^2	0,9907				
R^2_{ajustado}	0,9741				
C.V. (%)	2,33				

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados; R^2 : coeficiente de determinação; C.V.: coeficiente de variação.

Com base na análise de regressão, o TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE pode ser descrito pela seguinte equação polinomial quadrática (Equação 11):

$$\text{TPC } (Y_4) = 122,340 + 15,634X_1 + 6,785X_2 + 2,129X_3 + 0,250X_1X_2 + 2,530X_1X_3 - 6,25X_2X_3 - 17,600X_1^2 - 1,850X_2^2 + 3,510X_3^2 \quad (11)$$

O TPC ótimo predito pelo modelo, utilizando as condições otimizadas de extração por MAE (48,08% de etanol, 15 min e 300 W), foi de 137,45 mg EAG/g ms. Entre as variáveis estudadas, a concentração de etanol e o tempo de extração foram as que mais influenciaram o TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE.

5.4.2 Validação das condições otimizadas de forma simultânea por MAE

Para se avaliar a precisão do modelo em determinar as condições ótimas de extração por MAE considerando a maximização do rendimento e do TPC dos extratos das folhas de *L. camara*, foram realizadas três extrações utilizando as condições otimizadas de forma simultânea: 53% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 300 W. A Tabela 22 mostra os valores experimentais e preditos de rendimento e TPC dos extratos de *L. camara* obtidos por MAE nessas condições.

Tabela 22: Comparação entre os resultados de rendimento de extração e TPC experimentais e preditos para as condições de extração otimizadas simultaneamente por MAE de *L. camara*: 53% de etanol, 15 min e potência de micro-ondas de 300 W (desejabilidade de 1.000).

Resposta	Experimental	Predito	RSD%*
Rendimento (%)	38,61 ± 0,56	38,96	0,64
TPC (mg EAG/g ms)	109,83 ± 4,63	137,13	15,63

*Desvio padrão relativo - RSD entre os valores preditos e experimentais (média de três extratos independentes obtidos nas mesmas condições de extração).

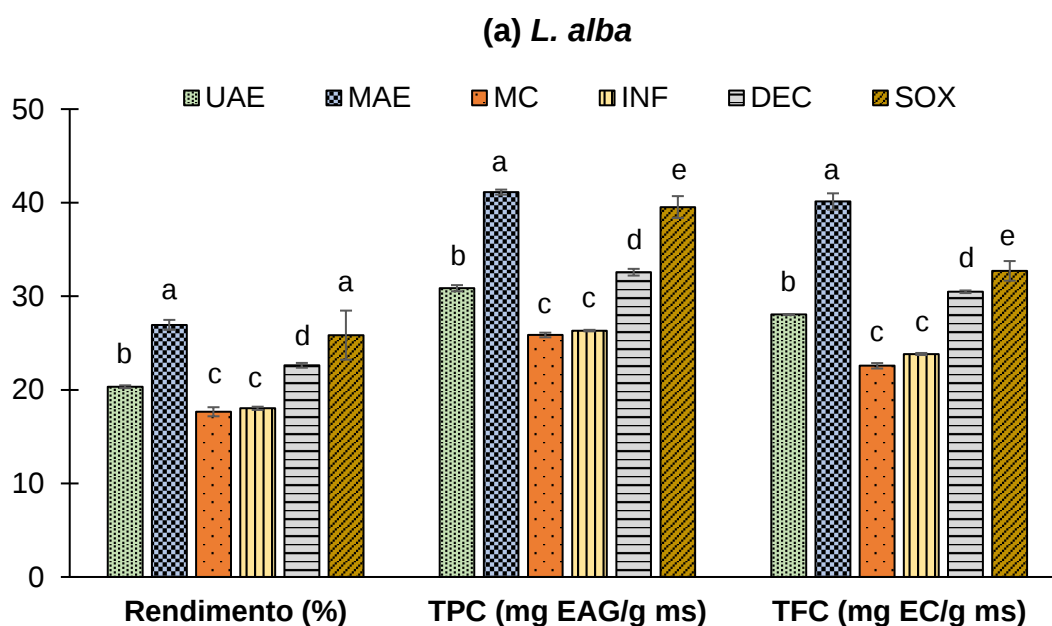
Na Tabela 22 observa-se que o modelo explica adequadamente o processo de extração e possui alta capacidade de prever as condições de extração mais adequadas para a recuperação simultânea do rendimento e TPC dos extratos das folhas de *L. camara* por MAE, uma vez que os desvios padrões relativos entre os valores experimentais e preditos não apresentaram grandes diferenças, sendo considerados adequados em comparação aqueles relatados na literatura [167, 189].

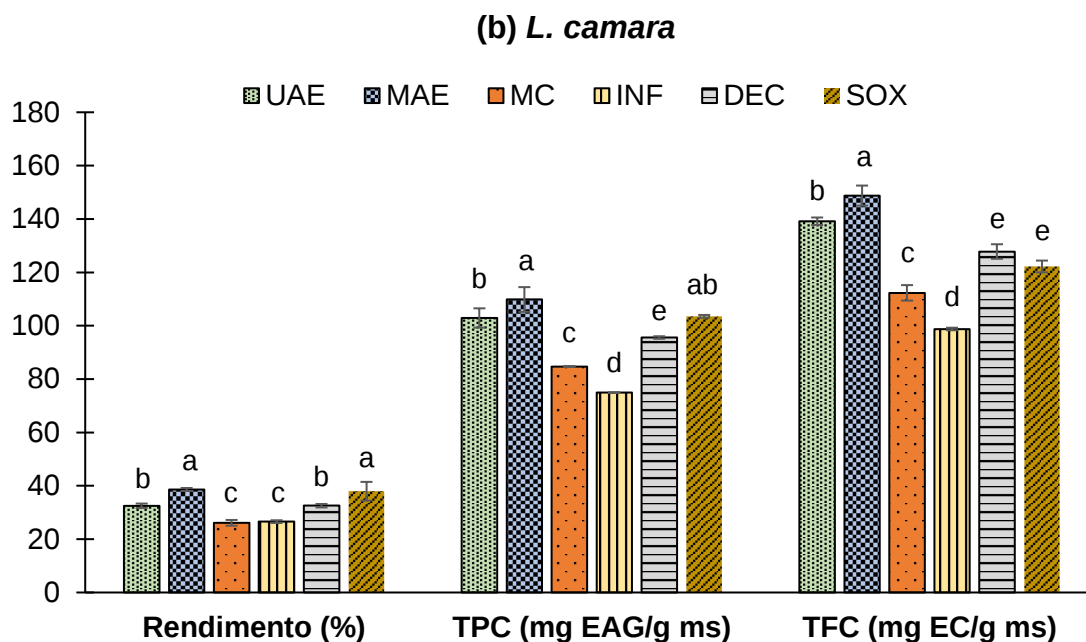
O maior desvio relativo observado para a resposta TPC pode estar relacionado à pequena diferença entre as condições de extração preditas de forma individual e aquelas preditos visando a otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC, como foi observado por Nabet *et al.* [167].

5.5 Comparação dos resultados fitoquímicos e de atividades antioxidantes dos diferentes extratos de *L. alba* e *L. camara*

Para se avaliar a eficiência das metodologias de extração por ultrassom e micro-ondas, os resultados de rendimento, TPC e TFC dos extratos de *L. alba* e *L. camara*, obtidos nas condições de extração otimizadas para cada espécie, foram comparados com aqueles dos extratos obtidos por métodos convencionais: maceração, infusão, decocção e Soxhlet. Na Figura 31a-b estão mostrados esses resultados comparativos. Cabe destacar que o objetivo principal deste trabalho foi comparar os resultados apresentados pelos extratos de cada espécie entre si, e não a comparação entre as espécies vegetais.

Figura 31: Comparação dos resultados de rendimento, conteúdo de fenólicos totais (TPC); conteúdo de flavonoides totais (TFC) dos extratos obtidos, separadamente, das folhas de *L. alba* (a) e *L. camara* (b) por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando cada resposta separadamente. EAG: equivalente de ácido gálico; EC: equivalente de catequina.





Através da Figura 31a-b pode ser observado que o rendimento, o TPC e o TFC dos extratos, tanto de *L. alba* quanto de *L. camara*, foram influenciados pelos diferentes métodos de extração de acordo com suas respectivas condições experimentais.

Na Figura 31a pode ser observado que o extrato de *L. alba* obtido por MAE apresentou os maiores valores de rendimento (26,94%), TPC (41,13 mg EAG/g ms) e TFC (40,12 mg EC/g ms) em comparação aos demais extratos obtidos a partir dessa espécie, não diferindo estatisticamente do Soxhlet com relação ao rendimento, destacando que na MAE o tempo de extração utilizado foi menor. O extrato obtido por UAE dessa espécie apresentou maiores valores de rendimento ($20,33 \pm 0,15\%$), TPC (30,86 mg EAG/g ms) e TFC (28,05 mg EC/g ms) em comparação aqueles da maceração, infusão, porém menores em relação aos extratos de decocção (rendimento de 22,62%, TPC de 32,57 mg EAG/g ms e TFC de 30,48 mg EC/g ms) e Soxhlet (rendimento de 25,85%, TPC de 39,53 mg EAG/g ms e TFC de 32,71 mg EC/g ms). Com base nas respostas avaliadas, podemos classificar os extratos de *L. alba*, do maior para o menor resultado, da seguinte forma: MAE, Soxhlet, decocção, UAE, infusão e maceração, respectivamente.

A Figura 31b mostra os resultados de rendimento, TPC e TFC dos diferentes extratos obtidos de *L. camara*. Como pode ser observado, o extrato

de MAE apresenta os maiores resultados de rendimento de extração (38,61%), TPC (109,83 mg EAG/g ms) e TFC (148,77 mg EC/g ms) em comparação aos demais extratos dessa espécie, não diferindo estatisticamente quanto ao rendimento e TPC do extrato de Soxhlet (rendimento: 37,93%; TPC: 103,50 mg EAG/g ms; TFC: 122,20 mg EC/g ms).

Os resultados apresentados pelos extratos de MAE das duas espécies estão de acordo com vários estudos relatados na literatura, os quais mostram que essa técnica apresenta maior eficiência de recuperação de compostos fenólicos de matrizes vegetais em comparação a UAE e a vários métodos de extração convencionais como maceração, infusão, decocção e Soxhlet [34, 158, 193, 194].

Castro-López *et al.* [34] relataram o maior valor de TPC do extrato de *Moringa oleífera* preparado por MAE em comparação aos extratos de UAE, maceração e decocção. Cvetanović *et al.* [194] relataram que o extrato de MAE obtido de *Aronia melanocarpa* apresentou maiores valores de TPC e TFC que o extrato obtido por UAE dessa espécie. No estudo realizado por Mašković *et al.* [193], observou-se os maiores resultados de TPC e TFC do extrato de *Satureja hortensis* obtido por MAE em relação aos extratos de UAE, maceração e Soxhlet. Em outro estudo, o extrato obtido das folhas de *Urtica dioica* por MAE apresentou maiores valores de rendimento, TPC e TFC em comparação aqueles do extrato de UAE [195]. Carbone *et al.* [160] relataram a maior eficiência da MAE na recuperação de compostos fenólicos da espécie *Humulus lupulus* em comparação ao extrato obtido por UAE. Abbas *et al.* [162], empregando acetato de etila como solvente de extração, observaram que o extrato de MAE dos frutos da espécie *Lagenaria siceraria* apresentou resultados de rendimento, TPC e TFC superiores aqueles do extrato de Soxhlet.

Em geral, os melhores resultados observados pelos extratos preparados por MAE estão relacionados a alta temperatura e a energia de micro-ondas no interior da matriz vegetal que pode causar a vaporização do solvente dentro de suas células e romper suas paredes celulares e/ou membranas plasmáticas. Isso favorece a liberação dos compostos fenólicos no solvente extrator, o que aumenta a eficiência da extração em comparação a outras técnicas. O aumento

da temperatura do sistema de extração resulta ainda na redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente extrator, favorecendo a penetração do solvente na matriz vegetal e a dissolução dos compostos químicos no solvente [34, 83, 87, 91]. Além disso, os compostos fenólicos polares podem absorver a energia de micro-ondas, o que favorece a sua liberação da parede celular vegetal [34].

Avaliando os resultados do extrato obtido por UAE a partir da espécie *L. alba* (Figura 31a), foi observado sua maior eficiência em relação à maceração e à infusão. Em geral, os melhores resultados de rendimento de extração, TPC e TFC apresentados pelos extratos obtidos por UAE em comparação a essas técnicas podem ser atribuídos, principalmente, ao efeito de cavitação acústica. Esse efeito favorece a destruição da parede celular vegetal, facilitando a entrada do solvente na matriz e a liberação dos compostos em seu interior, intensificando a transferência de massa do processo de extração [23, 36, 81].

Pode-se observar na Figura 31b que o extrato de *L. camara* obtido por UAE apresentou rendimento de extração (32,50%) maior em comparação aos extratos de maceração e infusão, semelhante ao extrato de decocção (32,53%) e menor do que o extrato de Soxhlet (37,93%). Além disso, o extrato de UAE dessa espécie apresentou resultados de TPC (102,89 mg EAG/g ms) e TFC (139,15 mg EC/g ms) superiores àqueles apresentados pelos demais extratos convencionais, porém não diferindo estatisticamente do extrato de Soxhlet com relação ao TPC (103,50 mg EAG/g ms).

Diversos estudos mostram que a UAE apresenta melhores resultados de recuperação em comparação a diferentes técnicas de extração [27, 34, 82, 188]. O extrato de UAE das folhas de *Piper betle* (empregando as condições otimizadas de extração) resultou em maiores valores de rendimento de extração (13,71%), TPC (289,05 mg EAG/g de extrato) e TFC (21,50 mg ER/g de extrato) em comparação ao da maceração: rendimento de 10,96%, TPC de 246,98 mg EAG/g de extrato e TFC de 13,48 mg ER/g de extrato [82]. O extrato obtido por UAE a partir de *Punica granatum* apresentou maior TPC em comparação aos extratos obtidos por decocção e maceração a partir dessa espécie [34]. Mašković *et al.* [27] relataram o maior TPC do extrato de UAE obtido de *Lavatera*

thuringiaca quando comparado aos extratos de maceração, Soxhlet e MAE. Maiores resultados de TPC e TFC do extrato preparado por UAE, em comparação aos de maceração e Soxhlet, também foram relatados em um estudo com as flores da espécie *Opuntia ficus-indica* [188]. Em um trabalho realizado por Iftikhar *et al.* [156], o extrato obtido a partir de *Secale cereale* por UAE apresentou maior TPC e TFC em comparação ao extrato obtido por maceração convencional, empregando as mesmas condições de extração. Abbas *et al.* [162] destacaram a semelhança dos resultados de rendimento, TPC e TFC apresentados pelos extratos de UAE e MAE obtidos de *Lagenaria siceraria*, porém muito superiores aos do extrato de Soxhlet, apesar dos menores tempos de extração empregados: MAE, 40 s; UAE, 30 min; e Soxhlet, 1 h.

Apesar dos resultados citados acima mostrarem a grande eficiência da técnica de ultrassom, o extrato preparado por UAE a partir de *L. alba* apresentou valores de rendimento de extração, TPC e TFC menor do que aqueles dos extratos de decocção e Soxhlet (Figura 31a). Nesse caso, as condições de temperatura de preparação dos extratos de decocção e Soxhlet podem ter contribuído para seus melhores resultados em relação ao UAE. Os extratos de decocção foram deixados em ebulição (89 °C) por 2 min antes de serem colocados em repouso por mais 8 min. Para a extração por Soxhlet, além da alta temperatura (80 °C), o tempo de extração utilizado foi o maior (1 h) entre todas as técnicas. A temperatura elevada empregada nessas extrações provavelmente favoreceu o processo de difusão e dissolução dos compostos no solvente de extração pela redução da sua viscosidade e tensão superficial, além do maior tempo de contato entre o solvente e a matriz vegetal na extração por Soxhlet [34]. A mesma tendência foi observada para o extrato de Soxhlet da espécie *L. camara* em relação ao extrato de UAE, onde a alta temperatura e o maior tempo de extração podem ter contribuído para os maiores valores de rendimento e TPC desse extrato convencional (Figura 31b).

Relatos da literatura corroboram o comportamento observado neste estudo com relação aos resultados dos extratos de UAE em comparação àqueles do Soxhlet e da decocção. Castro-López *et al.* [34] relataram que os extratos de *Moringa oleifera* e *Cassia fistula* obtidos por UAE apresentaram menor valor de TPC em comparação aos extratos de decocção obtidos. Santos *et al.* [28]

observaram que o extrato de Soxhlet obtido de *Acca sellowiana* apresentou resultados de rendimento de extração e TPC (rendimento de 47% e TPC de 33,6 mg EAG/g) maiores do que aqueles do extrato obtido por UAE (rendimento de 39,6% e TPC de 27,0 mg EAG/g).

A Tabela 23 mostra os valores comparativos de TPC entre os extratos obtidos neste trabalho por UAE e MAE e aqueles relatados na literatura a partir de estudos com diferentes matrizes vegetais empregando essas técnicas de extração.

Tabela 23: Comparação dos resultados de TPC apresentados pelos extratos de UAE e MAE obtidos neste trabalho com aqueles relatados na literatura.

Partes das plantas/ Espécies	TPC (mg EAG/g ms)	Referências
Folhas de <i>L. alba</i>	UAE = 30,86 MAE = 41,13	Este trabalho
Folhas de <i>L. camara</i>	UAE = 102,89 MAE = 109,83	Este trabalho
Partes aéreas de <i>Phyllanthus amarus</i>	UAE = 27,23	[35]
Casca de <i>Acca sellowiana</i>	UAE = 27,00	[28]
Folhas de <i>Ilex guayusa</i>	UAE = 34,60	[196]
Flores de <i>Opuntia ficus-indica</i>	UAE = 24,38	[188]
Farelo de <i>Secale cereale</i>	UAE = 2,46	[156]
Cones de <i>Humulus lupulus</i>	UAE = 20,30 MAE = 93,40	[160]
Folhas de <i>Moringa oleifera</i>	MAE = 15,19	[34]
Cálice de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	MAE = 29,62	[197]
Cascas de <i>Citrus X paradisi</i>	MAE = 31,10	[161]
Casca de <i>Quercus robur</i>	MAE = 21,40	[198]
Sementes de <i>Plukenetia volubilis</i>	MAE = 41,97	[199]

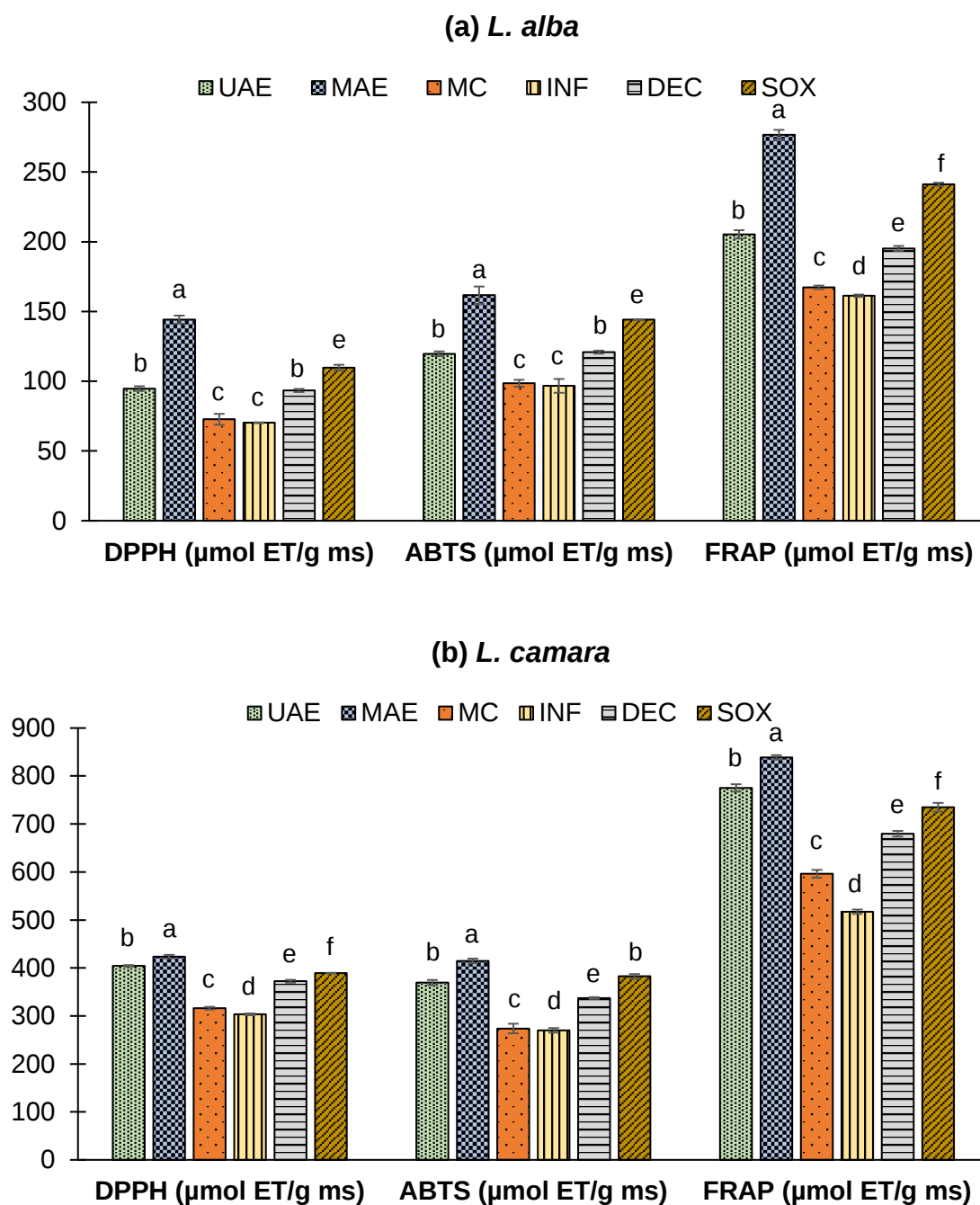
Como pode ser observado na Tabela 23, os extratos obtidos neste trabalho a partir das espécies *L. alba* e *L. camara* por UAE e MAE apresentaram maiores resultados de TPC em comparação àqueles obtidos a partir de diversas matrizes vegetais por essas técnicas, com destaque para os elevados valores

dos extratos de *L. camara*. Isso mostra que as espécies estudadas se destacam como fonte de compostos fenólicos.

Adicionalmente, os resultados apresentados na Tabela 23 mostram que o sucesso do processo de extração não depende apenas das características dos compostos que se desejam recuperar e da técnica de extração, mas também da natureza da matriz vegetal. Assim, a depender do tipo de matriz estudada, métodos diferentes como UAE e MAE podem diferir quanto a eficiência de recuperação do mesmo tipo ou classe de compostos. Isso mostra a importância da realização de estudos de otimização e/ou de comparação entre diferentes técnicas de extração para cada espécie/matriz estudada. Apesar de não terem sido avaliados neste estudo, fatores como parte da planta, sazonalidade e local de coleta devem ser considerados quando se estuda a recuperação de compostos químicos de matrizes vegetais, pois eles podem influenciar a composição química do extrato e, conseqüentemente, suas atividades biológicas [10, 15, 104, 200].

Os efeitos das técnicas de ultrassom, micro-ondas, maceração, infusão, decocção e Soxhlet nas atividades antioxidantes dos extratos de *L. alba* e *L. câmara* avaliadas, separadamente, pelos métodos de inibição dos radicais DPPH e ABTS e pelo poder antioxidante redutor férrico (FRAP), estão mostrados na Figura 32a-b.

Figura 32: Comparação dos resultados de atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) dos extratos obtidos, separadamente, das folhas de *L. alba* (a) e *L. camara* (b) por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias segundo a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$), considerando cada resposta separadamente. ET: equivalente de Trolox.



Como pode ser observado na Figura 32a, o extrato de *L. alba* obtido por MAE apresentou os maiores resultados de atividades antioxidantes (DPPH: 144,16 $\mu\text{mol ET/g ms}$, ABTS: 161,68 $\mu\text{mol ET/g ms}$ e FRAP: 276,81 $\mu\text{mol ET/g ms}$) em relação aos demais extratos. Na Figura 32b, pode ser observado que o extrato de *L. camara* obtido por MAE apresentou os maiores resultados de atividades antioxidantes (DPPH: 423,51 $\mu\text{mol ET/g ms}$, ABTS: 414,50 $\mu\text{mol ET/g ms}$ e FRAP: 838,69 $\mu\text{mol ET/g ms}$) em relação aos demais extratos dessa espécie. Esses resultados podem ser atribuídos ao maior TPC dos extratos de MAE de cada espécie em relação aos demais, uma vez que compostos fenólicos têm reconhecida atividade antioxidante [3, 28, 82].

Diferentes trabalhos na literatura observaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. Dairi *et al.* [159] observaram que o extrato fenólico obtido por MAE de *Allium cepa* apresentou maiores atividades antioxidantes através dos ensaios DPPH e ABTS em relação ao extrato de maceração com agitação, empregando tempo de extração muito menor. Em um estudo realizado com a espécie *Humulus lupulus*, foi evidenciado que o extrato preparado por MAE resultou em maior atividade antioxidante em comparação aquele da UAE [160]. O extrato de *Citrus x paradisi* obtido por MAE apresentou maiores atividades antioxidantes, em termos de concentração inibitória - CI_{50} , (DPPH: 12,81 mg/g de extrato seco e ABTS: 1,90 mg/g de extrato seco) em comparação ao da maceração (DPPH: 20,89 mg/g de extrato seco e ABTS: 2,02 mg/g de extrato seco) [161].

Na Figura 32a observa-se que o extrato de *L. alba* obtido por UAE apresentou maiores atividades antioxidantes (DPPH: 94,77 $\mu\text{mol ET/g ms}$; ABTS: 119,72 $\mu\text{mol ET/g ms}$; FRAP: 205,30 $\mu\text{mol ET/g ms}$) em comparação aos extratos de maceração e infusão. Além disso, apresentou atividades semelhantes (DPPH: 93,40 $\mu\text{mol ET/g ms}$ e ABTS: 120,89 $\mu\text{mol ET/g ms}$) e levemente maior (FRAP: 195,28 $\mu\text{mol ET/g ms}$) em comparação ao extrato de decocção. Por outro lado, as atividades foram menores em comparação àquelas apresentadas pelo extrato de Soxhlet (DPPH: 109,84 $\mu\text{mol ET/g ms}$; ABTS: 144,11 $\mu\text{mol ET/g ms}$; FRAP: 241,16 $\mu\text{mol ET/g ms}$). Esses dados corroboram os resultados de TPC e TFC (Figura 31a) desses extratos, em que se percebe uma correlação direta com os valores das atividades antioxidantes observadas.

Os maiores valores de atividades antioxidantes apresentadas pelo extrato de Soxhlet supostamente estão relacionados às condições de tempo e temperatura de extração tipicamente altos desse método, que neste estudo foi de 1 hora e 80 °C, respectivamente [28, 34].

Esse resultado antioxidante está de acordo com aquele relatado por Santos *et al.* [28], em seu estudo com a espécie *Acca sellowiana*. O extrato de Soxhlet desse estudo, preparado com uma solução etanol:água (50:50, v/v), apresentou maiores resultados antioxidantes, empregando os métodos FRAP e de inibição do radical DPPH, em relação ao extrato de ultrassom. Outro estudo mostrou que os extratos de Soxhlet, obtidos das raízes de *Silene caramanica* e das partes aéreas de *Silene otites*, apresentaram maiores atividades antioxidantes em comparação aos extratos de UAE dessas espécies [201].

Com base nos resultados observados na Figura 32a, os extratos de *L. alba* podem ser ordenados, de forma decrescente, de acordo com os valores de atividades antioxidantes, do seguinte modo: MAE > SOX > UAE > DEC > INF > MAC, sendo que os extratos de UAE e DEC não diferiram estatisticamente quando a habilidade de inibição dos radicais DPPH e ABTS.

Avaliando-se as atividades antioxidantes do extrato preparado por UAE a partir de *L. camara* mostrado na Figura 32b, observa-se os melhores resultados apresentados por essa técnica (DPPH: 404,15 µmol ET/g ms; ABTS: 369,56 µmol ET/g ms; FRAP: 775,12 µmol ET/g ms) em comparação às convencionais, com ressalva para o extrato de SOX (382,51 µmol ET/g ms), pois não diferiram estatisticamente quanto a habilidade de inibição do radical ABTS. Assim, baseado nos resultados mostrados na Figura 32b, os extratos dessa espécie podem ser ordenados, de acordo com as atividades antioxidantes, da seguinte forma: MAE > UAE > SOX > DEC > INF > MAC.

Em geral, diversos artigos têm relatado as vantagens da UAE em comparação às técnicas convencionais, que contribuem para a recuperação de compostos antioxidantes de matrizes vegetais [23, 36, 82, 156]. Brahmi *et al.* [188] relataram as maiores atividades antioxidantes (FRAP e ABTS) apresentadas pelo extrato das flores da espécie *Opuntia ficus-indica* obtido por UAE em comparação ao extrato de Soxhlet. O extrato de *Limonium sinuatum*

obtido por UAE apresentou maior atividade antioxidante (478,98 $\mu\text{mol ET/g ms}$) em comparação aos extratos de maceração (442,31 $\mu\text{mol ET/g ms}$) e Soxhlet (221,96 $\mu\text{mol ET/g ms}$) [23]. Iftikhar *et al.* [156] relataram que o extrato de UAE obtido de farelo de centeio resultou em maior atividade antioxidante em comparação ao de maceração.

Considerando os resultados apresentados, vale ressaltar que este é o primeiro relato de um estudo envolvendo a otimização de extração por meio das técnicas UAE e MAE para obtenção de compostos fenólicos a partir das duas espécies estudadas utilizando planejamento de experimento com o auxílio de metodologia de superfície de resposta. Adicionalmente, foram utilizados solventes seguros ao meio ambiente (água e etanol) para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos por meio de técnicas que fazem uso de menor tempo e/ou temperatura em comparação a diferentes técnicas convencionais.

5.5.1 Avaliação da correlação de Pearson (r)

Como foi observado nas Figuras 31 e 32, os resultados fitoquímicos (TPC e TFC) e antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) apresentados pelos extratos de cada espécie mostraram um certo grau de correlação. Assim, neste estudo, o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi empregado para avaliar a relação entre as respostas avaliadas. Esse coeficiente pode ser usado para avaliar a dependência linear entre duas variáveis. O r indica a força dessa correlação entre duas variáveis no intervalo entre -1 e 1; quanto mais próximo de 1, mais forte será a correlação; um valor negativo indica uma correlação inversa, um valor positivo indica uma correlação direta [28]. A correlação entre as respostas pode ser muito alta ($r > 0,9$), alta ($0,9 > r > 0,7$), moderada ($0,7 > r > 0,5$) ou baixa ($r < 0,5$) [27].

Na Tabela 24 estão mostrados os valores dos coeficientes de correlação de Pearson entre as respostas TPC, TFC, DPPH, ABTS e FRAP observadas para cada espécie separadamente. A significância dos dados foi expressa em quatro níveis: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$; e $p < 0,001$; todos sendo considerados significativos.

Tabela 24: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre TPC, TPF, DPPH, ABTS e FRAP dos extratos de *L. alba* e *L. camara* separadamente.

Espécies	Testes	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP
<i>L. alba</i>	TPC	1				
	TFC	0,9525 ^c	1			
	DPPH	0,9395 ^b	0,9847 ^d	1		
	ABTS	0,9865 ^d	0,9772 ^c	0,9815 ^c	1	
	FRAP	0,9698 ^c	0,9656 ^c	0,9864 ^d	0,9948 ^d	1
<i>L. camara</i>	TPC	1				
	TFC	0,9268 ^a	1			
	DPPH	0,9814 ^c	0,9464 ^c	1		
	ABTS	0,9730 ^c	0,8874 ^a	0,9807 ^c	1	
	FRAP	0,9878 ^d	0,9641 ^c	0,9860 ^d	0,9656 ^c	1

^a Estatisticamente significativa (p -valor < 0,05).

^b Estatisticamente significativa (p -valor < 0,01).

^c Estatisticamente significativa (p -valor < 0,005).

^d Estatisticamente significativa (p -valor < 0,001).

Através da Tabela 24 pode ser observado que as respostas avaliadas, para cada espécie separadamente, apresentam coeficientes de correlação direta entre elas, considerados altos ($0,7 < r < 0,9$) ou muito altos ($r > 0,9$). Isso significa que extratos com maiores valores de TPC provavelmente apresentarão maiores valores de TFC e atividades antioxidantes. Isso pode ser observado ao se comparar os extratos de MAE e UAE obtidos de *L. alba*, por exemplo, mostrados nas Figuras 31a e 32a. O extrato de MAE, por apresentar o maior valor de TPC, apresenta os maiores valores tanto de TFC quanto de atividades antioxidantes em relação ao extrato de ultrassom. Isso vale para as correlações entre

quaisquer duas respostas indicadas na Tabela 24. Além disso, as correlações muito altas ($r > 0,9$) entre as atividades de inibição de radicais (DPPH e ABTS) e o poder antioxidante redutor férrico (FRAP) observadas na Tabela 24, que são semelhantes, indicam que os mesmos compostos químicos podem ser responsáveis pelas atividades antioxidantes avaliadas pelos diferentes métodos para cada espécie, mostrando que os compostos fenólicos, tanto de *L. alba* quanto de *L. camara*, podem agir como doador de hidrogênio e agente redutor de metais [27, 28].

A semelhança dos valores de coeficiente de correlação entre TPC com as atividades antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP) e aqueles da correlação entre TFC com as atividades antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP), considerados muito altos ou altos, sugerem que flavonoides estão entre os compostos fenólicos que mais contribuem para as atividades antioxidantes dos extratos de *L. alba* e de *L. camara*. Trabalhos anteriores que estudaram extratos de *L. alba* identificaram diversos ácidos fenólicos e flavonoides que foram considerados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante dessa espécie [3, 9, 15]. Estudos anteriores também relataram a presença dessas classes de compostos nos extratos de *L. camara*, o que justifica as elevadas atividades antioxidantes observadas nos extratos estudados [12, 154].

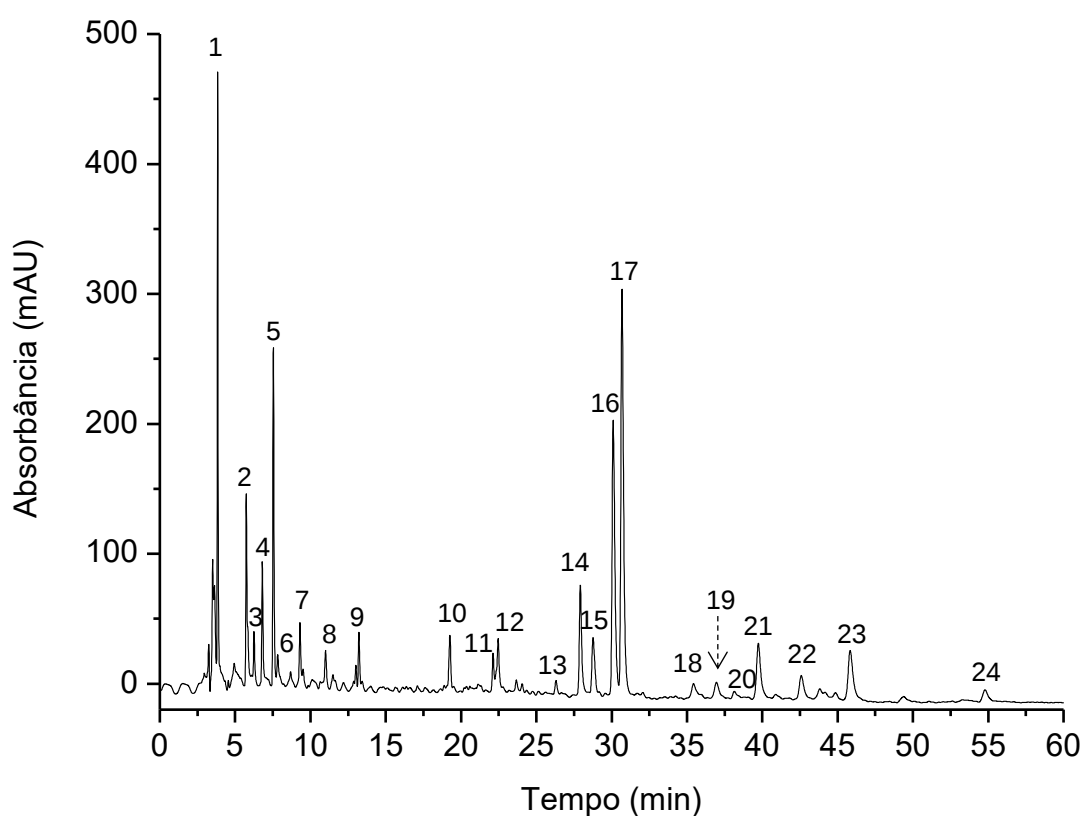
A forte correlação entre o TPC e/ou TFC e atividades antioxidantes de extratos vegetais foi relatada anteriormente por diferentes autores [28, 202, 203]. Lee *et al.* [202] observaram valores de r de 0,993 e 0,992 para TPC x DPPH e TFC x DPPH, respectivamente, dos extratos obtidos a partir das flores de *Melastoma malabathricum*. Irakli *et al.* [203] também encontraram uma forte correlação entre TPC e FRAP ($r = 0,974$) a partir dos extratos das folhas de *Olea europaea*. As altas correlações entre TPC e DPPH (CI_{50} , $r = -0,9926$) e entre TFC e DPPH (CI_{50} , $r = -0,9293$) foram observadas por Zeković *et al.* [195] nos estudos com a espécie *Urtica dioica*.

Em tese, os resultados observados mostraram que as espécies *L. alba* e *L. camara* podem ser utilizadas como fontes de compostos fenólicos antioxidantes.

5.6 Perfis cromatográficos dos extratos de *L. alba* e *L. camara*

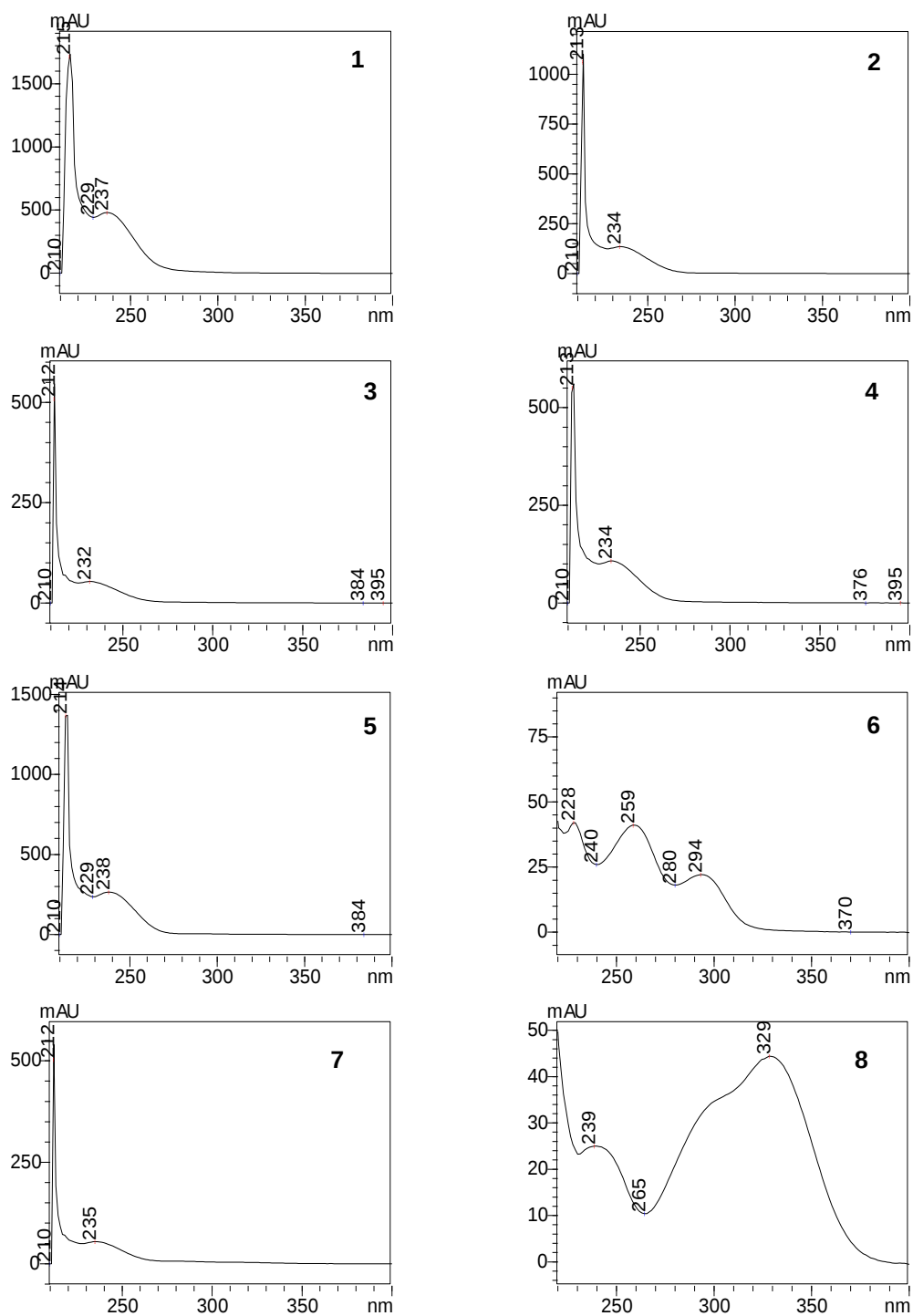
Neste trabalho, análises por cromatografia líquida com um detector de arranjo de diodos (LC-DAD) foram realizadas para tentar identificar as classes de compostos presentes nos diferentes extratos obtidos a partir das espécies *L. alba* e *L. camara*. Na Figura 33 está mostrado o perfil cromatográfico do extrato obtido por infusão a partir da espécie *L. alba*.

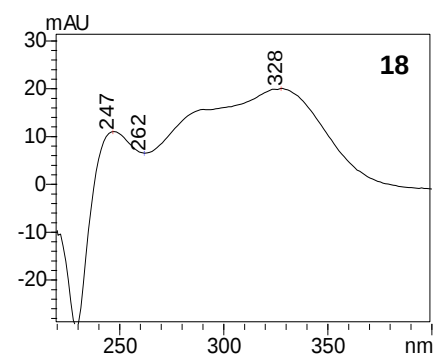
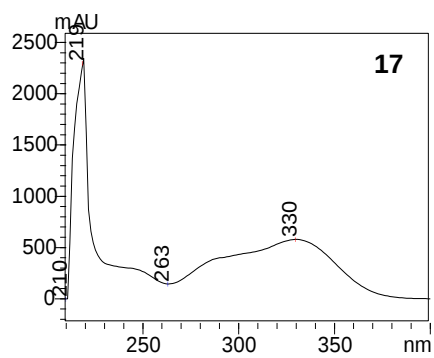
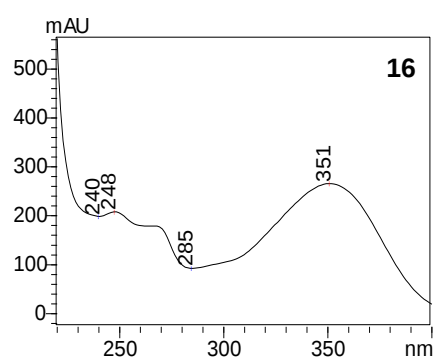
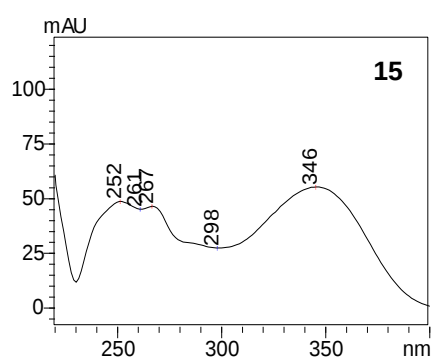
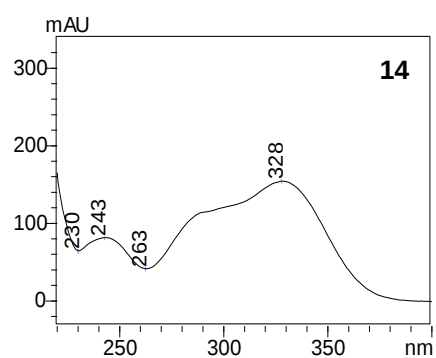
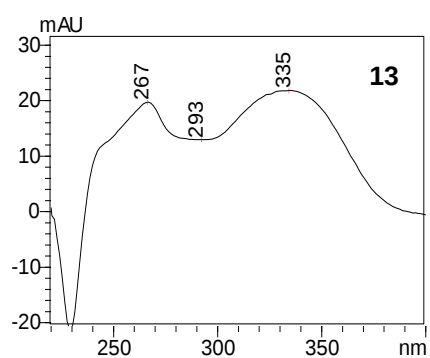
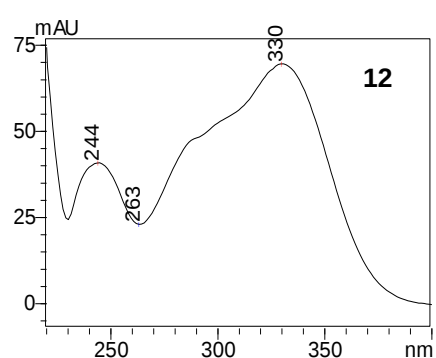
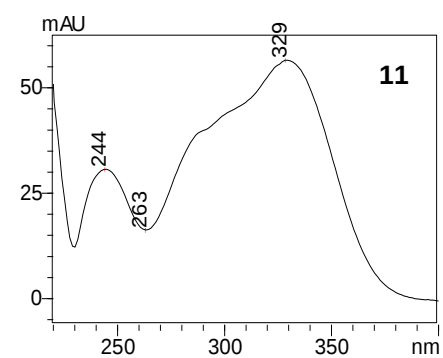
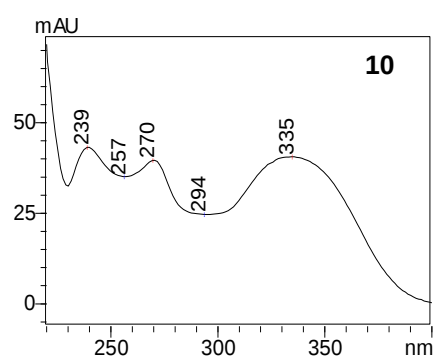
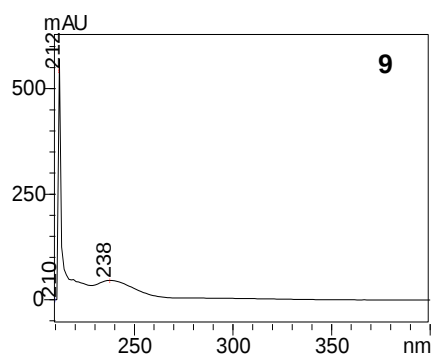
Figura 33: Perfil cromatográfico ($\lambda = 240$ nm) do extrato das folhas de *L. alba* preparado por infusão.

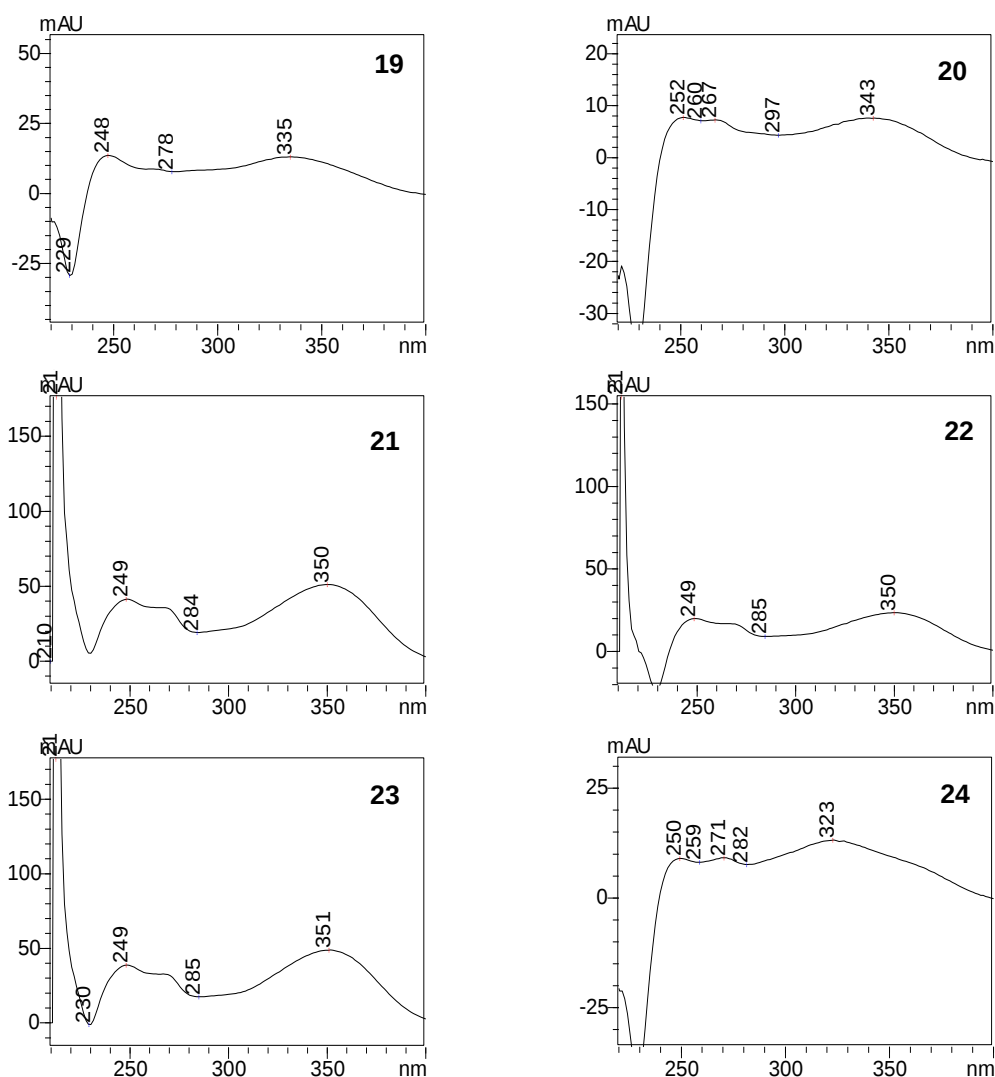


Com base na resolução dos picos cromatográficos, foram selecionadas alguns deles (numeradas de 1 a 24) para sugerir a identificação das suas classes químicas de acordo como seus respectivos espectros de ultravioleta (UV). Os espectros obtidos estão mostrados na Figura 34.

Figura 34: Espectros de absorção no UV (210 a 400 nm) dos compostos químicos presentes no extrato das folhas de *L. alba* preparado por infusão, os quais estão numerados no cromatograma da Figura 33.





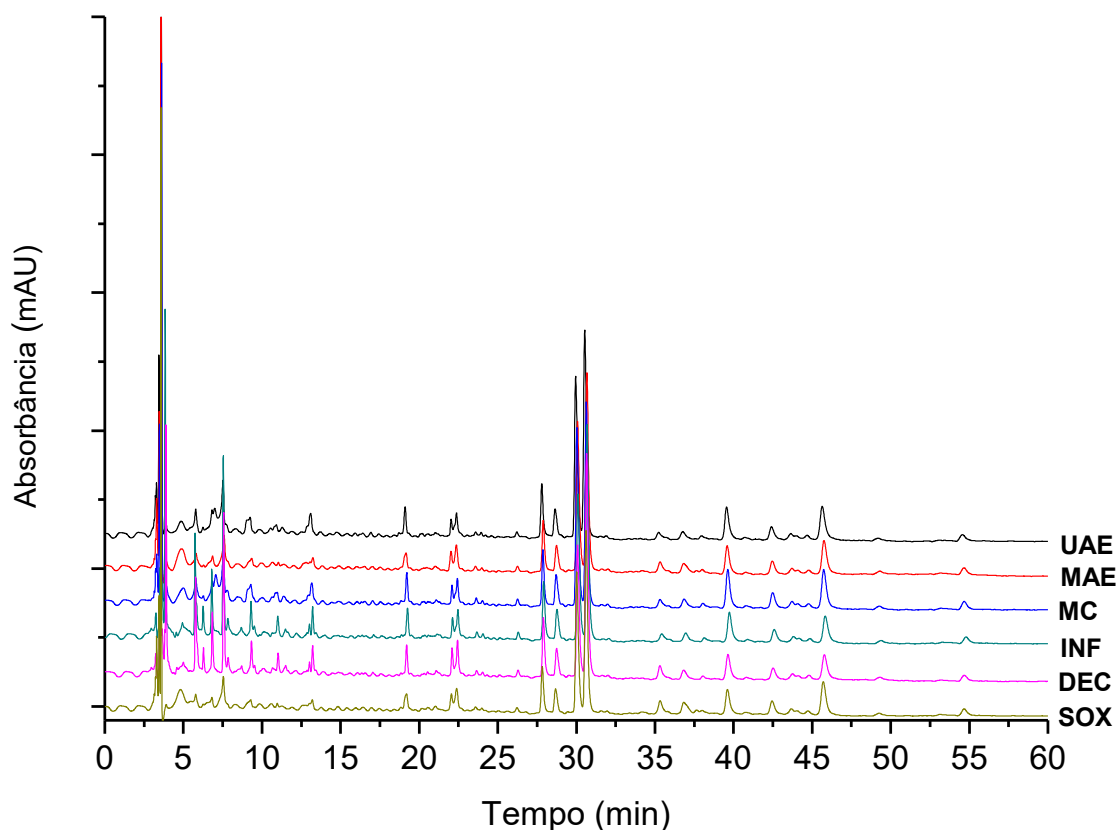


A partir desses espectros (Figura 34), pode-se sugerir a presença de diferentes classes de compostos fenólicos. Os compostos referentes aos picos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **7** e **9** apresentam espectros de UV condizentes com aqueles de derivados de iridoides, apresentando comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{max}) de 237, 234, 232, 234, 238, 235, 238 nm, respectivamente [204-206]. O espectro do pico **6** é compatível com aquele do ácido vanílico (λ_{max} = 259, 294 nm). Os picos numerados como **8** (λ_{max} = 329 nm), **11** (λ_{max} = 329 nm), **12** (λ_{max} = 330 nm), **14** (λ_{max} = 328 nm), **17** (λ_{max} = 330 nm) e **18** (λ_{max} = 328 nm) apresentam espectros semelhantes aos de ácidos fenólicos como o ácido cafeico e/ou fenilpropanoides glicosilados [207, 208]. Por sua vez, os picos numerados como **10** (λ_{max} = 239, 270, 239 nm), **13** (λ_{max} = 267, 335 nm), **15** (λ_{max} = 252, 267, 346 nm), **16** (λ_{max} = 248, 351 nm), **19** (λ_{max} = 248, 335 nm), **20** (λ_{max} = 252, 267, 343 nm), **21** (λ_{max} = 249, 350 nm), **22** (λ_{max} = 249, 350 nm), **23** (λ_{max}

= 249, 351 nm) e **24** (λ_{max} = 250, 271, 323 nm) possuem espectros compatíveis com os de flavonoides [207-209]. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados na literatura por Timóteo *et al.* [3], Trevisan *et al.* [9] e Gomes *et al.* [15], em que foram relatados a presença de diferentes iridoides, ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides nos extratos obtidos das folhas de *L. alba*.

Todos os extratos preparados neste trabalho foram analisados por LC-DAD com o objetivo de compará-los devido a grande diversidade química apresentada pela espécie *L. alba*, além do fato de que a técnica de extração pode interferir na composição química de preparações vegetais. A Figura 35 mostra os cromatogramas dos diferentes extratos de *L. alba* analisados.

Figura 35: Perfis cromatográficos ($\lambda = 240$ nm) dos extratos das folhas de *L. alba* preparados por diferentes métodos de extração: ultrassom (UAE), micro-ondas (MAE), maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX).

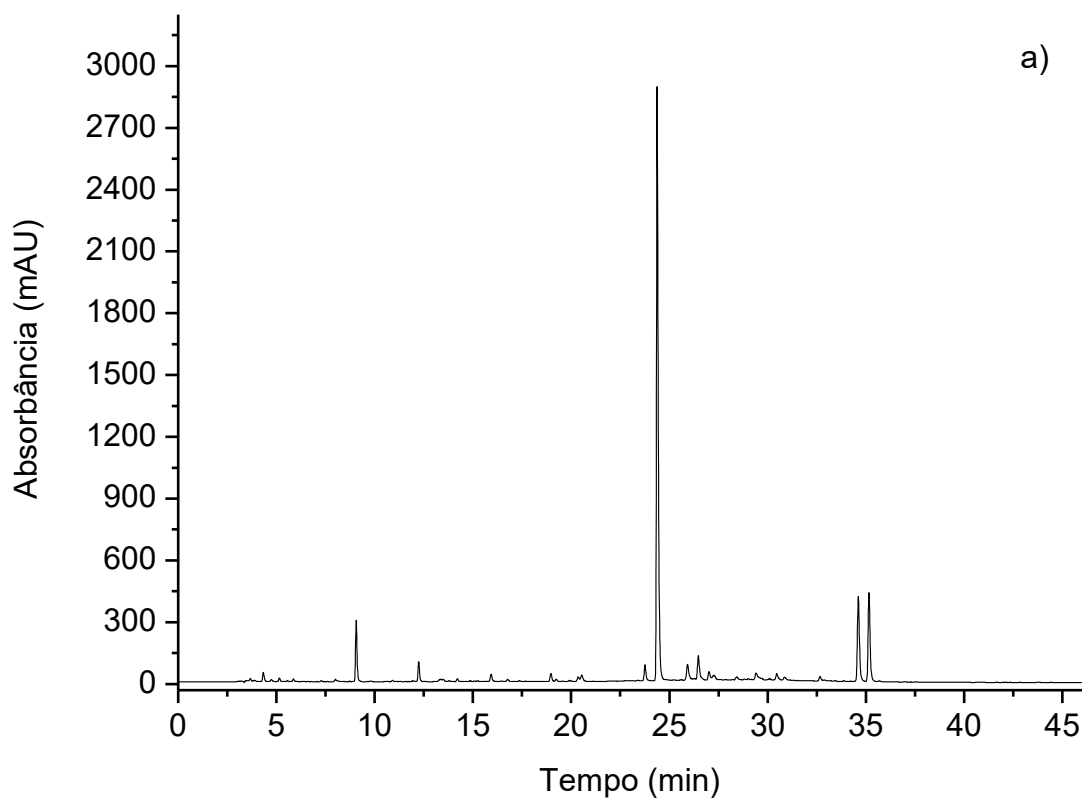


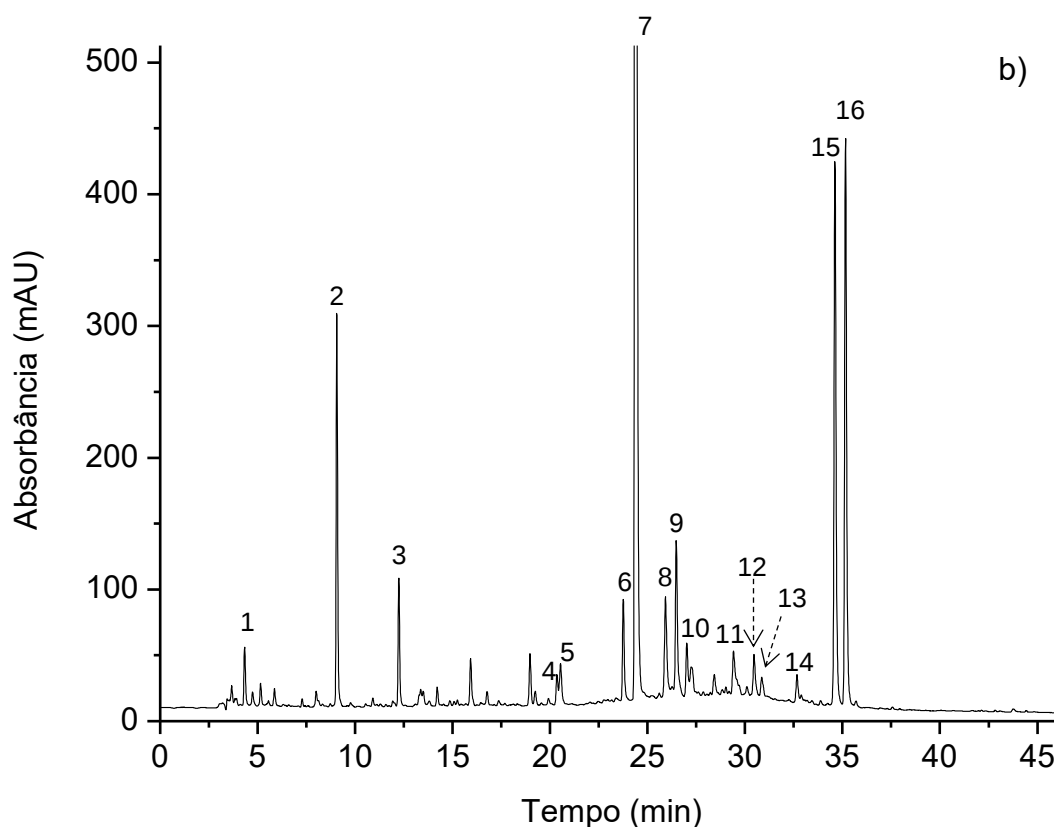
Analisando a Figura 35, apesar da semelhança entre os perfis cromatográficos dos diferentes extratos, pode-se observar algumas diferenças. Os extratos de decocção e infusão apresentam maior semelhança entre si, porém são os que mais se diferem dos demais, especificamente com relação aos compostos **2 a 8** (Figura 33) que eluem entre 5 e 10 min de análise. A maioria destes compostos possuem espectros de UV característicos de iridoides (Figuras 33 e 34). Essa diferença possivelmente está relacionada ao solvente utilizado nessas extrações, que neste caso foi água quente. Seus tempos de retenção baixos confirmam a alta polaridade dos compostos dessa região, pois a análise cromatográfica foi feita no modo reverso, sendo, portanto, mais facilmente extraídos nesse solvente em comparação às misturas hidroetanólicas utilizadas nas demais extrações. Essa diferença foi previamente relatada por Jesus *et al.* [10] em um estudo comparativo com extratos de infusão aquosa e maceração hidroetanólica obtidos de *L. alba*, utilizando as mesmas condições cromatográficas. Os autores observaram que nos extratos de infusão esses compostos aparecem em maior quantidade em relação ao de maceração.

Adicionalmente, pode ser observado que os compostos **1 a 24** (Figura 33) estão presentes em todos os extratos obtidos dessa espécie, ressaltando apenas pequenas variações quanto a quantidade, principalmente daqueles que eluem entre 5 e 10 min (compostos **2 a 8**).

O perfil cromatográfico do extrato obtido por infusão a partir da espécie *L. camara* está mostrado na Figura 36 (gráficos a e b).

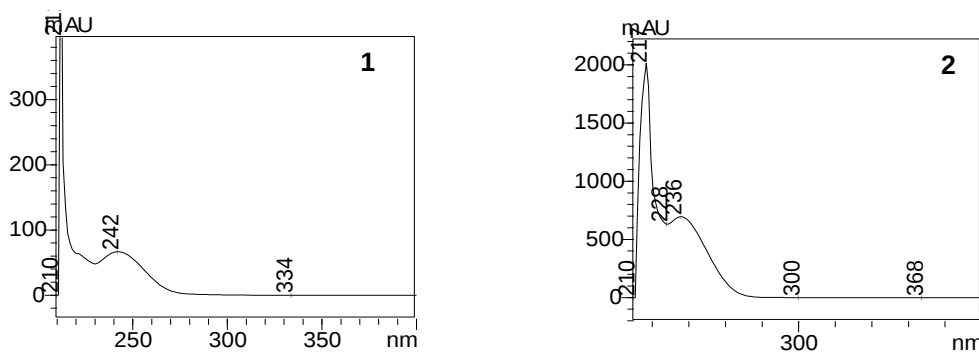
Figura 36: Perfis cromatográficos ($\lambda = 254$ nm) do extrato das folhas de *L. camara* preparado por infusão: a) cromatograma completo e b) expansão do cromatograma na região de absorvância entre 0 e 500 mAU.

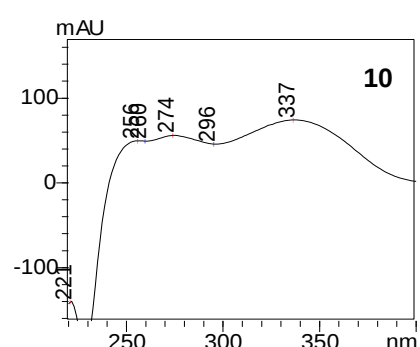
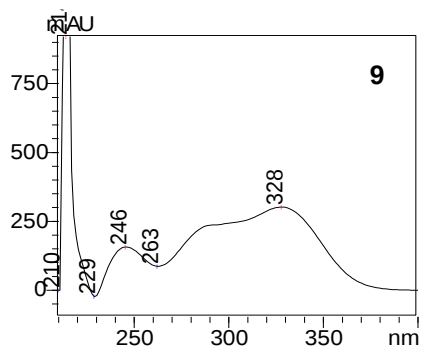
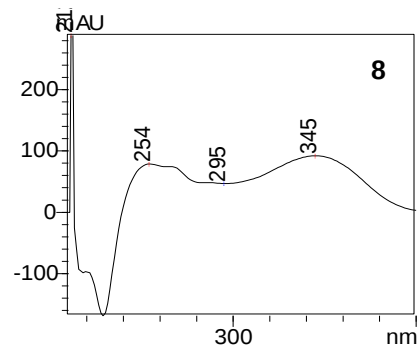
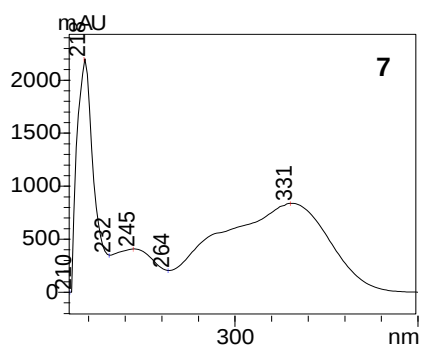
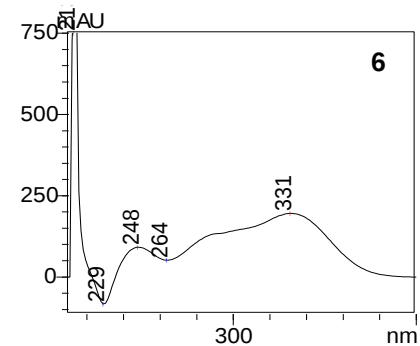
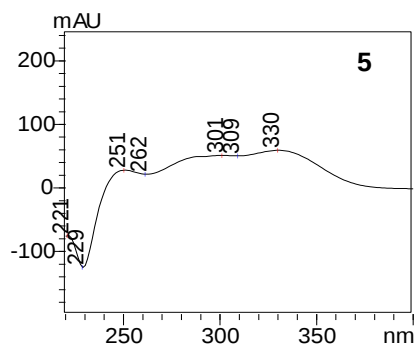
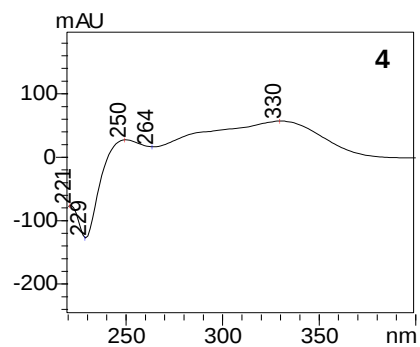
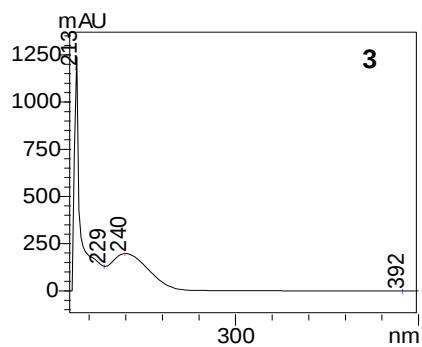


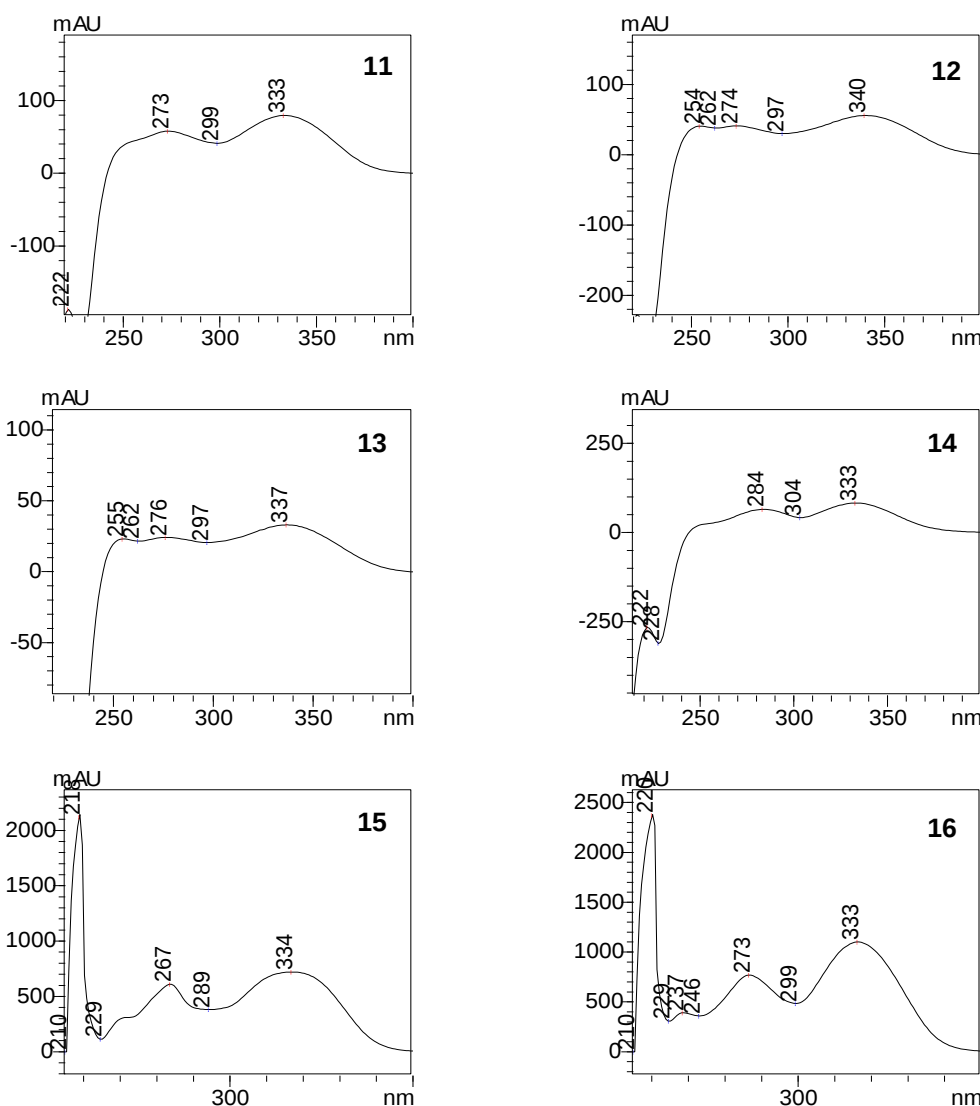


No cromatograma da Figura 36b estão numerados os compostos de **1** a **16** que permitiram a obtenção de seus espectros no UV, com base na resolução de seus picos cromatográficos. Os espectros desses compostos são mostrados na Figura 37.

Figura 37: Espectros de absorção no UV (210 a 400 nm) dos compostos químicos presentes no extrato das folhas de *L. camara* preparado por infusão, os quais estão numerados no cromatograma da Figura 36b.



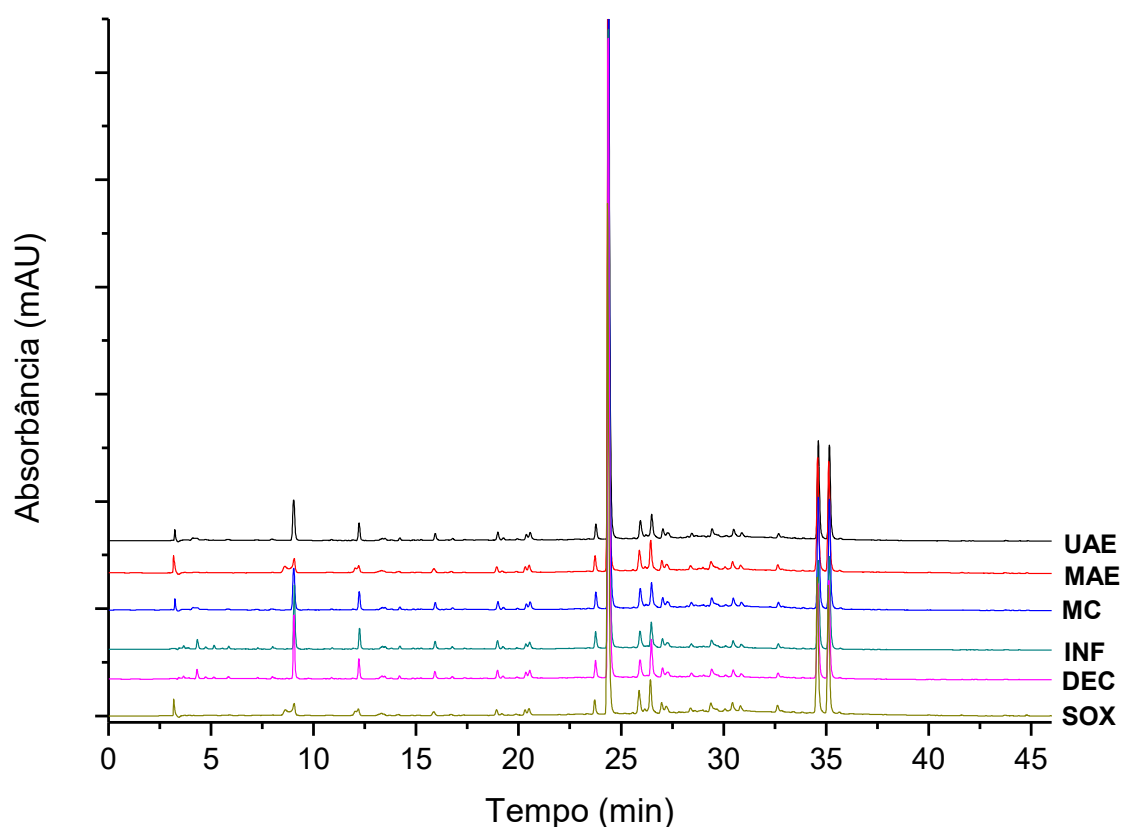




Como pode ser observado na Figura 37, os espectros no UV dos picos **1** ($\lambda_{\text{max}} = 242 \text{ nm}$), **2** ($\lambda_{\text{max}} = 236 \text{ nm}$) e **3** ($\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$) são compatíveis com aqueles de iridoides [204-206]. Os espectros do grupo de picos **4** ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$), **5** ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$), **6** ($\lambda_{\text{max}} = 331 \text{ nm}$), **7** ($\lambda_{\text{max}} = 331 \text{ nm}$) e **9** ($\lambda_{\text{max}} = 328 \text{ nm}$) e do grupo de picos **8** ($\lambda_{\text{max}} = 254, 345 \text{ nm}$), **10** ($\lambda_{\text{max}} = 256, 274, 337 \text{ nm}$), **11** ($\lambda_{\text{max}} = 273, 333 \text{ nm}$), **12** ($\lambda_{\text{max}} = 254, 274, 340 \text{ nm}$), **13** ($\lambda_{\text{max}} = 255, 276, 337 \text{ nm}$), **14** ($\lambda_{\text{max}} = 284, 333 \text{ nm}$), **15** ($\lambda_{\text{max}} = 237, 267, 334 \text{ nm}$) e **16** ($\lambda_{\text{max}} = 237, 277, 333 \text{ nm}$) apresentam espectros no UV condizentes com os de ácidos fenólicos e flavonoides, respectivamente [207-209]. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados na literatura por Sousa *et al.* [12] e Darwish *et al.* [154], que mostraram a presença dessas classes de compostos nos extratos obtidos de *L. camara*.

Na Figura 38 estão mostrados os cromatogramas (LC-DAD) dos diferentes extratos obtidos a partir de *L. camara*.

Figura 38: Perfis cromatográficos ($\lambda = 254$ nm) dos extratos das folhas de *L. camara* preparados por diferentes métodos de extração: ultrassom (UAE), microondas (MAE), maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX).



A semelhança dos perfis cromatográficos entre os extratos de *L. camara* (Figura 38) mostra que os mesmos compostos químicos estão presentes nos diferentes extratos, sendo observado algumas diferenças quantitativas entre eles. Apenas visualmente, as pequenas diferenças observadas entre os cromatogramas dificultam a avaliação, de maneira clara, do efeito do método de extração na composição química dos extratos dessa espécie. Assim, análises quimiométricas serão necessárias para realizar, de maneira racional, a discriminação entre os extratos.

Em geral, com base nas análises por LC-DAD dos extratos de *L. alba* e *L. camara* realizadas neste trabalho, foi possível avaliar quais as classes de compostos químicos estão presentes nas preparações dessas espécies. Entretanto, análises adicionais por espectrometria de massas serão realizadas para se conhecer a identidade dos compostos químicos que são responsáveis pelas atividades antioxidantes dessas espécies. Adicionalmente, como já mencionado, os dados cromatográficos obtidos para cada espécie separadamente, serão submetidos a análises quimiométricas, o que permitirá avaliar o quão similares são os extratos entre si.

5.7 Atividades citotóxicas dos extratos de *L. alba* e *L. camara*

As análises de citotoxicidade *in vitro*, realizadas neste trabalho, fazem parte de um *screening* inicial para verificar o potencial anticâncer dos diferentes extratos das espécies *L. alba* e *L. camara* frente a linhagens de células tumorais. A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade das amostras testados em concentração única (50 µg/mL).

Tabela 25: Porcentagem de inibição da proliferação celular apresentada pelos extratos de *L. alba* e *L. camara* preparados por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX) frente a linhagens de células tumorais (HCT116 e HepG2) e normal (MRC-5).

Espécies	Extratos	% Inibição ^a		
		HCT116	HepG2	MRC-5
<i>L. alba</i>	UAE	13,83 ± 1,20	18,93 ± 3,31	17,47 ± 1,14
	MAE	9,47 ± 0,80	32,96 ± 7,12	14,64 ± 1,65
	MC	18,44 ± 1,74	23,56 ± 6,58	18,61 ± 3,49
	INF	7,15 ± 0,28	29,82 ± 3,86	12,67 ± 0,98
	DEC	13,10 ± 1,28	18,65 ± 1,99	17,52 ± 2,92
	SOX	35,55 ± 1,71	37,86 ± 4,46	20,50 ± 4,63
<i>L. camara</i>	UAE	5,71 ± 0,53	42,33 ± 3,95	12,79 ± 0,20
	MAE	21,65 ± 1,26	42,66 ± 4,24	12,16 ± 1,09
	MC	16,19 ± 1,29	27,49 ± 2,89	29,32 ± 1,29
	INF	22,15 ± 1,49	10,59 ± 1,06	5,14 ± 0,45
	DEC	21,81 ± 2,55	9,05 ± 1,50	7,48 ± 0,52
	SOX	31,08 ± 6,52	36,42 ± 2,97	28,05 ± 0,95
	DOX	75,23 ± 3,06	81,95 ± 0,53	73,98 ± 1,99

^a Porcentagens de inibição celular. HCT116: células de carcinoma de colón humano; HepG2: células de carcinoma hepatocelular humano; MRC-5: células humanas normais; DOX: Doxorubicina (controle positivo).

Os ensaios de citotoxicidade seguem o método do alamar blue após 72 horas de exposição das células HCT116 (células de carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (células humanas

normais) aos extratos testados. A Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Uma vez que nenhuma das amostras das duas espécies testadas apresentou percentual de inibição acima de 75%, nenhuma foi considerada ativa, principalmente quando comparadas aos resultados alcançados pela Doxorubicina, que apresentou efeito inibidor de 75,23 e 81,95 com relação às linhagens tumorais HCT116 e HepG2, respectivamente. As amostras testadas também apresentaram baixa inibição da proliferação da linhagem de células normais (MRC-5), indicando baixa toxicidade aos seres humanos.

Apesar de não serem considerados ativos, pode-se destacar os resultados de inibição apresentados pelos extratos de Soxhlet, obtidos de *L. alba* e *L. camara*, frente as duas linhagens de células tumorais HCT116 (*L. alba*: 35,55% e *L. camara*: 31,08%) e HepG2 (*L. alba*: 37,86% e *L. camara*: 36,42%). Além desses, os extratos preparados por UAE (42,33%) e MAE (42,66%) a partir de *L. camara* e aqueles obtidos por MAE (32,96%) e Infusão (29,82 %) a partir de *L. alba* se destacaram frente à linhagem celular HepG2. As diferentes atividades apresentadas pelos extratos, considerando cada espécie separadamente, podem ser atribuídas ao efeito do método de extração, relatado na literatura como uma das variáveis que podem afetar a composição química e/ou as atividades biológicas de preparações obtidas de plantas medicinais [10, 107].

Apesar de terem apresentado atividades baixas, deve-se mencionar que a atividade biológica apresentada por um determinado extrato vegetal pode estar relacionada a um grupo de compostos ou, ainda, a uma substância em particular existente nesse extrato. Assim, frações ou compostos isolados a partir de uma determinada preparação vegetal podem proporcionar atividades farmacológicas mais intensas do que aquelas apresentadas pelo extrato bruto [117, 128]. Nesse sentido, estudos com frações e/ou compostos isolados dos extratos de *L. alba* e *L. camara* podem resultar na descoberta de compostos bioativos do ponto de vista citotóxico frente a essas células tumorais, visto que essas espécies possuem em sua composição compostos fenólicos, como fenilpropanoides glicosilados e flavonoides que podem exercer efeitos antitumorais [3, 9, 12, 210, 211].

Estudos prévios com diferentes flavonoides [211, 212] e fenilpropanoides glicosilados [213] mostraram a importante atividade antiproliferativa desses compostos frente a células tumorais de cólon. Esses estudos destacaram o potencial anticarcinogênico dessas classes de compostos.

5.8 Atividades de inibição enzimática dos extratos de *L. alba* e *L. camara*

As análises de inibição enzimática *in vitro* fazem parte de uma triagem inicial para verificar o potencial de inibição dos extratos das folhas de *L. alba* e *L. camara* frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Os resultados dos ensaios de inibição, em que cada extrato foi testado na concentração de 200 µg/mL, estão mostrados na Tabela 26.

Tabela 26: Porcentagem de inibição, frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), dos extratos de *L. alba* e *L. camara* preparados por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX).

Espécies	Extratos	% Inibição	
		AChE	BChE
<i>L. alba</i>	UAE	6,70 ± 1,10	16,80 ± 2,20
	MAE	8,40 ± 1,40	22,40 ± 0,70
	MC	5,00 ± 2,70	25,60 ± 1,80
	INF	3,90 ± 0,60	19,80 ± 1,60
	DEC	6,20 ± 1,80	1,40 ± 3,80
	SOX	5,80 ± 3,60	18,60 ± 1,80
<i>L. camara</i>	UAE	18,20 ± 1,10	24,20 ± 1,70
	MAE	11,70 ± 0,10	19,00 ± 0,80
	MC	9,50 ± 0,60	19,10 ± 2,00
	INF	6,70 ± 0,10	18,20 ± 1,50
	DEC	13,30 ± 1,80	14,40 ± 1,40
	SOX	15,30 ± 1,30	22,00 ± 0,80
	Galantamina ^a	93,90 ± 0,10	90,10 ± 0,20

^a Inibidor padrão das enzimas AChE e BChE.

Como pode ser observado na Tabela 26, todos os extratos estudados apresentaram baixo efeito inibidor das duas enzimas testadas, quando comparados à galantamina (AChE: 93,90% e BChE: 90,10%). Assim, segundo classificação proposta por Vinutha *et al.* [214], com relação a atividade inibitória da AChE *in vitro*, os extratos, tanto de *L. alba* quanto de *L. camara*, foram

considerados fracamente inibidores dessas enzimas por apresentarem inibição abaixo de 30%. Vale ressaltar que essa classificação foi estendida a atividade dos extratos frente à BChE, pois os autores não testaram essa enzima.

No estudo realizado por Jesus *et al.* [10], foram relatadas atividades moderadas de inibição da AChE apresentadas por dois extratos hidroetanólicos (50:50) de diferentes acessos de *L. alba*. Entretanto, os demais extratos avaliados (tanto hidroetanólicos quanto de infusão) apresentaram baixa atividade inibitória frente a essa enzima. Por outro lado, Moraes *et al.* [71] verificaram, através de ensaios de inibição enzimática em CCD, a atividade de inibição da AChE do extrato hidroetanólico (95:5) das partes aéreas de *L. alba*, semelhante ao controle positivo utilizado (Carbaxol). Esses estudos justificam o interesse em se continuar avaliando os extratos obtidos dessa espécie frente a essa enzima.

Na maioria das vezes, a atividade biológica apresentada por um extrato vegetal é fruto da combinação do efeito de mais de uma substância química presente nele, o qual é chamado de efeito sinérgico ou aditivo entre os constituintes químicos presentes [215, 216]. Entretanto, pode-se observar, também, o efeito oposto (efeito antagônico). Assim, a atividade apresentada por determinado extrato pode ser menor do que a atividade de uma fração ou de um único constituinte químico obtidos dessa preparação, ou seja, a fração ou o composto puro podem apresentar maiores atividades biológicas, quando testados separadamente [104, 117, 128]. Além disso, é possível determinar exatamente qual(is) composto(s) é(são) responsável(is) por determinada atividade referente a uma fração e/ou extrato e para isso será necessário isolá-los e testá-los separadamente.

Dessa forma, apesar da baixa atividade de inibição enzimática apresentada pelos diferentes extratos de *L. alba* e *L. camara*, estudos adicionais com frações e/ou compostos químicos isolados desses extratos podem resultar em atividades melhores do que aquelas obtidas por seus respectivos extratos brutos, visto que essas espécies possuem diversos fenilpropanoides glicosilados e flavonoides que podem apresentar atividade anticolinesterásica, como previamente relatado na literatura para essas classes de compostos [4, 5, 67].

Portanto, vale ressaltar a importância da realização de estudos adicionais de fracionamento e/ou isolamento de compostos a partir dos extratos destas espécies para que se possa avaliar os seus potenciais anticolinesterásicos de forma mais aprofundada.

.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi otimizado de forma simultânea o rendimento de extração e o conteúdo de fenólicos totais das folhas de *L. alba* e *L. camara*, separadamente, por UAE, avaliando-se os efeitos da concentração de etanol, do tempo de extração e da relação solvente para sólido, bem como por MAE, avaliando-se o efeito da concentração de etanol, do tempo de extração e da potência de micro-ondas, empregando um planejamento Box-Benhken com o auxílio de metodologia de superfície de resposta. A concentração de etanol e o tempo de extração foram as variáveis que mais influenciaram no rendimento e no TPC dos extratos obtidos tanto por UAE quanto por MAE.

Os extratos obtidos por MAE, nas condições ótimas de extração, a partir de cada espécie, apresentaram maiores resultados de rendimento de extração, conteúdos de fenólicos totais, conteúdo de flavonoides totais e atividades antioxidantes, avaliadas por diferentes métodos, em comparação aos extratos obtidos através da UAE e técnicas de extração convencionais (maceração, infusão, decocção e Soxhlet). Adicionalmente, os extratos obtidos por UAE apresentaram melhores resultados em comparação a diferentes métodos convencionais.

Através dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* foi observado que nenhum dos extratos obtidos foi ativo frente às linhagens de células tumorais avaliadas (HCT116 e HepG2). Os extratos de Soxhlet de *L. alba* e *L. camara* apresentaram valores de inibição moderados frente as duas linhagens. No entanto, merecem mais destaque os extratos obtidos por UAE e MAE a partir da espécie *L. camara*, os quais apresentaram-se mais ativos em relação a todos os extratos testados frente à linhagem celular HepG2. Todos os extratos de *L. alba* e *L. camara* submetidos a testes de inibição enzimática frente às enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase apresentaram valores baixos.

A partir das análises realizadas por LC-DAD foi possível verificar a presença de diversos compostos fenólicos como ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides, além de iridoides, nos diferentes extratos obtidos

de *L. alba* e *L. camara*. Essa informação corrobora as elevadas atividades antioxidantes apresentadas pelos extratos dessas espécies.

Com base nos dados obtidos através deste trabalho, pode-se sugerir com mais segurança que o uso das técnicas UAE e MAE para a extração de compostos fenólicos antioxidantes a partir das folhas das espécies *L. alba* e *L. camara* são alternativas mais eficientes em relação às técnicas de maceração, infusão, decocção e Soxhlet, tradicionalmente utilizadas. Adicionalmente, os resultados obtidos sugerem que essas espécies podem ser utilizadas como fonte importante de compostos fenólicos antioxidantes para as indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, considerando a obtenção de preparações de grande potencial biológico e econômico, especialmente quando o processo de extração for realizado através da UAE e MAE em condições adequadas.

7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Muito ainda há para ser estudado, principalmente com relação ao conhecimento das atividades antitumorais e anticolinesterásicas dessas espécies. No entanto, acredita-se que foi dado um passo bastante significativo no conhecimento químico delas e de suas potencialidades biológicas, gerando informações que podem ser utilizadas como base para futuros estudos, dessas e de outras espécies botanicamente relacionadas.

Os resultados citotóxicos e anticolinesterásicos, sugerem a necessidade de realização de ensaios citotóxicos e de inibição enzimática com frações e/ou compostos isolados dos extratos dessas espécies *L. alba* e *L. camara* a fim de se avaliar o real potencial biológico delas com relação a essas atividades.

Além disso, análises por espectrometria de massas serão realizadas para identificar os compostos presentes nos diferentes extratos obtidos a partir das espécies *L. alba* e *L. camara*, bem como das frações e/ou compostos isolados posteriormente dessas preparações.

8 REFERÊNCIAS

- [1] Letsyo, E.; Jerz, G.; Winterhalter, P.; Beuerle, T. Toxic pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines commonly used in Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 202, 154-161.
- [2] Ferreira, V. F.; Pinto, A. C. A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova* **2010**, 33, 1829.
- [3] Timóteo, P.; Karioti, A.; Leitão, S. G.; Vincieri, F. F.; Bilia, A. R. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. *Food Chemistry* **2015**, 175, 366-373.
- [4] Georgiev, M.; Alipieva, K.; Orhan, I.; Abrashev, R.; Denev, P.; Angelova, M. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry* **2011**, 128, 100-105.
- [5] Trevisan, M. T. S.; Bezerra, M. Z. B.; Santiago, G. M. P.; Feitosa, C. M.; Verpoorte, R.; Braz Filho, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. *Química Nova* **2006**, 29, 415-418.
- [6] Veličković, V.; Đurović, S.; Radojković, M.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Vujić, J.; Trifunović, S.; Mašković, P. Z. Application of conventional and non-conventional extraction approaches for extraction of *Erica carnea* L.: Chemical profile and biological activity of obtained extracts. *The Journal of Supercritical Fluids* **2017**, 128, 331-337.
- [7] García-Pérez, E.; Noratto, G. D.; García-Lara, S.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Mertens-Talcott, S. U. Micropropagation Effect on the Anti-carcinogenic Activity of Polyphenolics from Mexican Oregano (*Poliomintha glabrescens* Gray) in Human Colon Cancer Cells HT-29. *Plant Foods for Human Nutrition* **2013**, 68, 155-162.
- [8] Gutiérrez-Grijalva, E. P.; Picos-Salas, M. A.; Leyva-López, N.; Criollo-Mendoza, M. S.; Vazquez-Olivo, G.; Heredia, J. B. Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants* **2018**, 7, 2-23.

- [9] Trevisan, M. T. S.; Marques, R. A.; Silva, M. G. V.; Scherer, D.; Haubner, R.; Ulrich, C. M.; Owen, R. W. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of *Lippia* Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. *Records of Natural Products* **2016**, 10, 485-496.
- [10] Jesus, R. A.; Prado, V. M. J.; Pinto, V. S.; Silva, V. R.; Santos, L. S.; Nogueira, P. C. L.; Navickiene, S.; Pereira-Filho, E. R.; Blank, A. F.; Bezerra, D. P.; Soares, M. B. P.; Seidl, C.; Cardoso, C. L.; Moraes, V. R. S. Application of LC-DAD Metabolic Fingerprinting in Combination with PCA for Evaluation of Seasonality and Extraction Method on the Chemical Composition of Accessions from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and Biological Activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2019**, 30, 978-987.
- [11] Sousa, E. O.; Costa, J. G. M. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2012**, 22, 1155-1180.
- [12] Sousa, E. O.; Miranda, C. M. B. A.; Nobre, C. B.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Costa, J. G. M. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. *Industrial Crops & Products* **2015**, 70, 7-15.
- [13] Camêlo, L. C. A.; Blank, A. F.; Ehlert, P. A. D.; Carvalho, C. R. D.; Blank, M. F. A.; Mattos, J. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva-cidreira- brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br]. *Scientia Plena* **2011**, 7, 1-8.
- [14] Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; Villar, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 76, 201-214.
- [15] Gomes, A. F.; Almeida, M. P.; Leite, M. F.; Schwaiger, S.; Stuppner, H.; Halabalaki, M.; Amaral, J. G.; David, J. M. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. *Food Chemistry* **2019**, 273, 186-193.
- [16] Ghisalberti E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia* **2000**, 71, 467-486.

- [17] Gorai, D.; Jash, S. K.; Roy, R. Ethnopharmacological, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Lantana camara* L.: A comprehensive Review. *Advances Biomedicine and Pharmacy* **2016**, 3, 328-357.
- [18] Naz, R.; Bano, A. Phytochemical screening, antioxidants and antimicrobial potential of *Lantana camara* in different solvents. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **2013**, 3, 480-486.
- [19] Sathish, R.; Vyawahare, B.; Natarajan, K. Antiulcerogenic activity of *Lantana camara* leaves on gastric and duodenal ulcers in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 134, 95-197.
- [20] Ghosh, S.; Sarma, M.; Patra, A.; Hazra, B. Anti-inflammatory and anticancer compounds isolated from *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, 62, 1158-1166.
- [21] Badakhshan, M. P.; Sreenivasan, S.; Jegathambigai, R. N.; Surash, R. Anti-leukemia Activity of Methanolic Extracts of *Lantana camara*. *Pharmacognosy Research* **2009**, 1, 274-279.
- [22] Ganesh T.; Sen, S.; Thilagam E.; Thamotharan G.; Loganathan T.; Chakraborty, R. Pharmacognostic and anti-hyperglycemic evaluation of *Lantana camara* (L.) var. aculeate leaves in alloxan-induced hyperglycemic rats. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* **2010**, 1, 247-252.
- [23] Xu, D. P.; Zheng, J.; Zhou, Y.; Li, Y.; Li, S.; Li, H. B. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry* **2017**, 217, 552-559.
- [24] Barba, F. J.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Sant'ana, A. S.; Orlie, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, 49, 96-109.
- [25] Zhu, Z.; He, J.; Gangliu; Barba, F. J.; Koubaa, M.; Ding, L.; Bals, O.; Grimi, N.; Vorobiev, E. Recent insights for the green recovery of inulin from plant

foodmaterials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2016**, 33, 1-9.

[26] Dhami, N.; Mishra, A. D. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? *Journal of herbal medicine* **2015**, 5, 118-127.

[27] Mašković, P. Z.; Veličković, V.; Đurović, S.; Zeković, Z.; Radojković, M.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Mitić, M.; Vujić, J. Biological activity and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L. extracts obtained by different extraction approaches. *Phytomedicine* **2018**, 38, 118-124.

[28] Santos, P. H.; Ribeiro, D. H. B.; Micke, G. A.; Vitali, L.; Hense, H. Extraction of bioactive compounds from feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) peel by low and high-pressure techniques. *The Journal of Supercritical Fluids* **2019**, 145, 219-227.

[29] Martín-Domingo, M. C.; Pla, A.; Hernández, A. F.; Olmedo, P.; Navas-Acien, A.; Lozano-Paniagua, D.; Gil, F. Determination of metalloid, metallic and mineral elements in herbal teas. Risk assessment for the consumers. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, 60, 81-89.

[30] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos junto a agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf (acessado em 01 de setembro de 2019).

[31] Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **2006**, 27, 1-93.

[32] Sousa, F. C. F.; Melo, C. T. V.; Citó, M. C. O.; Félix, F. H. C.; Vasconcelos, S. M. M.; Fonteles, M. M. F.; Barbosa Filho, J. M.; Viana, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 642-654.

- [33] Melo, J. G.; Martins, J. D. G. R.; Amorim, E. L. C.; Albuquerque, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta Botanica Brasilica* **2007**, 21, 27-36.
- [34] Castro-López, C.; Ventura-Sobrevilla, J. M.; González-Hernández, M. D.; Rojas, R.; Ascacio-Valdés, J. A.; Aguilar, C. N.; Martínez-Ávila, G. C. G. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry* **2017**, 237, 1139-1148.
- [35] Sousa, A. D.; Maia, A. I. V.; Rodrigues, T. H. S.; Canuto, K. M.; Ribeiro, P. R. V.; Pereira, R. C. A.; Vieira, R. F.; Brito, E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. *Industrial Crops & Products* **2016**, 79, 91-103.
- [36] Luo, X.; Cui, J.; Zhang, H.; Duan, Y.; Zhang, D.; Cai, M.; Chen, G. Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops & Products* **2018**, 112, 296-304.
- [37] Costa, D. C.; Costa, H. S.; Albuquerque, T. G.; Ramos, F.; Castilho, M. C.; Sanches-Silva, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, 45, 336-354.
- [38] Li, A.-N.; Li, S.; Zhang, Y.-J.; Xu, X.-R.; Chen, Y.-M.; Li, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* **2014**, 6, 6020-6047.
- [39] Chandrasekara, A.; Shahidi, F. Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2018**, 8, 451-458.
- [40] Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules* **2018**, 23, 250.

- [41] Cong-Cong, X.; Bing, W.; Yi-Qiong, P.; Jian-Sheng, T.; Tong, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2017**, 15, 721-731.
- [42] Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P.; Araújo, E. L.; Amorim, E. L. C. TANINOS: UMA ABORDAGEM DA QUÍMICA À ECOLOGIA. *Química Nova* **2005**, 28, 892-896.
- [43] Kumar, M.; Dahuja, A.; Tiwari, S.; Punia, S.; Tak, Y.; Amarowicz, R.; Bhoite, A. G.; Singh, S.; Joshi, S.; Panesar, P. S.; Saini, R. P.; Pihlanto, A.; Tomar, M.; Sharifi-Rad, J.; Kaur, C. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chemistry* **2021**, 353, 129431.
- [44] Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* **2007**, 30, 1323-1338.
- [45] Zengin, G.; Uysal, A.; Aktumsek, A.; Mocan, A.; Mollica, A.; Locatelli, M.; Custodio, L.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Aumeeruddy-Elalfi, Z.; Mahomoodally, M. F.; *Euphorbia denticulata* Lam.: a promising source of phyto-pharmaceuticals for the development of novel functional formulations. *Biomedicine Pharmacotherapy* **2017**, 87, 27-36.
- [46] Nimse S. B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry* **2015**, 5, 27986-28006.
- [47] Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* **2009**, 32, 689-702.
- [48] Moon, J-K.; Shibamoto, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, 1655-1666.
- [49] Jiang, Y.; David, B.; Tu, P.; Barbin, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines - A review. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 657, 9-18.

- [50] Ribeiro, J. S.; Santos, M. J. M. C.; Silva, L. K. R.; Pereira, L. C. L.; Santos, I. A.; Lannes, S. C. S.; Silva, M. V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Science* **2019**, 148, 181-188.
- [51] Zhou, T.; Xu, D-P.; Lin, S-J.; Li, Y.; Zheng, J.; Zhou, Y.; Zhang, J-J.; Li, H-B. Ultrasound-Assisted Extraction and Identification of Natural Antioxidants from the Fruit of *Melastoma sanguineum* Sims. *Molecules* **2017**, 22, 306.
- [52] Boroski, M.; Visentainer, J. V.; Cottica, S. M.; Morais, D. R. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos, 1º ed.; Appris: Curitiba, **2015**.
- [53] Miguel, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, 25, 291-312.
- [54] Silva, E. M. F.; Nascimento, R. B. C.; Barreto, F. S.; Filho, M. O. M.; Griz, S. A. S.; Santos, A. F.; Mousinho, K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada* **2015**, 36, 277-283.
- [55] Instituto Nacional de Câncer – INCA. O que é câncer? <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> (acessado em 14 de julho de 2022).
- [56] Zia-ur-Rehman; Gurgul, A.; Youn, I.; Maldonado, A.; Wahid, F.; Che, C-T.; Khan, T. UHPLC-MS/MS-GNPS based phytochemical investigation of *Equisetum arvense* L. and evaluation of cytotoxicity against human melanoma and ovarian cancer cells. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2022**, 29, 103271.
- [57] Li, C.; Wang, H.; Dong, C.; Xie, J.; Lai, S.; Liu, J.; Chen, R.; Kang, J. New quinones, a sesquiterpene and phenol compounds with cytotoxic activity from the aerial parts of *Morinda umbellata* L. *Fitoterapia* **2022**, 156, 105089.
- [58] Demir, T; Akpınar, O; Kara, H.; Güngör, H. Phenolic profile and investigation of biological activities of *Allium scorodoprasum* L. subsp. *rotundum*. *Food Bioscience* **2022**, 46, 101548.
- [59] Hasan, A.; Zhang, M.; Shang, Z-P.; Yi, Y.; Kuang, Y.; Yu, R.; Fan, J-J.; Huang, Y-X.; Nijat, D.; Qiao, X.; Ye, M. Bioactive prenylated phenolic compounds from the aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*. *Phytochemistry* **2022**, 201, 113284.

- [60] Henriksson E.; Kjellén E.; Wahlberg P.; Wennerberg J.; Kjellstrom J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **2006**, 42, 320-323.
- [61] O'brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **2000**, 267, 5421-5426.
- [62] Rampersad, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* **2012**, 12, 12347-12360.
- [63] Munshi, S.; Twining, R. C.; Dahl, R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2014**, 70, 195-198.
- [64] Gerets, H. H. J.; Hanon, E.; Cornet, M.; Dhalluin, S.; Depelchin, O.; Canning, M.; Atienzar, F. A. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicology in Vitro* **2009**, 23, 319-332.
- [65] Adewusi, E. A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected Southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany* **2011**, 77, 638-644.
- [66] Mota, W. M.; Barros, M. L.; Cunha, P. E. L.; Santana, M. V. A.; Stevam, C. S.; Leopoldo, P. T. G. Fernandes, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2012**, 14, 624-628.
- [67] Marques, T. H. C.; Santos, P. S.; Freitas, R. M.; Carvalho, R. B. F.; Melo, C. H. S.; David, J. P.; David, J. M.; Lima, L. S. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L. (Asteraceae). *Química Nova* **2013**, 36, 549-553.
- [68] Sterner, R. M.; Takahashi, P. Y.; Ballard, A. C. Y. Active Vaccines for Alzheimer Disease Treatment. *JAMDA* **2016**, 17, 862.e11-862.e15.

- [69] Viegas Junior, C.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de alzheimer. *Química Nova*, **2004**, 27, 655-660.
- [70] Omena, C. M. B.; Valentim, I. B.; Guedes, G. S.; Rabelo, L. A.; Mano, C. M.; Bechara, E. J. H.; Sawaya, A. C. H. F.; Trevisan, M. T. S.; Costa, J. G.; Ferreira, R. C. S.; Sant'ana, A. E. G.; Goulart, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International* **2012**, 49, 334-344.
- [71] Moraes, S. M.; Lima, K. S. B.; Siqueira, S. M. C.; Cavalcanti, E. S. B.; Souza, M. S. T.; Menezes, J. E. S. A.; Trevisan, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2013**, 15, 575-582.
- [72] Vilela, A. F. L.; Silva, J. I. D.; Vieira, L. C. C.; Bernasconi, G. C. R.; Corrêa, A. G.; Cass, Q. B.; Cardoso, C. L. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. *Journal of Chromatography B* **2014**, 968, 87-93.
- [73] Aremu, A. O.; Amoo, S. O.; Ndhlala, A. R.; Finnie, J. F.; Staden, J. V. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, 49, 1122-1128.
- [74] Yamaguchi, K. K. L.; Alcantara, J. M.; Veiga-Junior, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amazonica* **2012**, 42, 541-546.
- [75] Silva, J. I.; Moraes, M. C.; Vieira, L. C. C.; Corrêa, A. G.; Cass, Q. B.; Cardoso, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 73, 44-52.
- [76] Vanzolini, K. L.; Vieira, L. C. C.; Corrêa, A. G.; Cardoso, C. L.; Cass, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry:

an on-flow tool for ligand screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 2038-2044.

[77] Araújo, C. R. M.; Santos, V. L. A.; Gonsalves, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 1818-1834.

[78] Lima, B. R.; Lima, J. M.; Maciel, J. B.; Valentim, C. Q.; Nunomura, R. C. S.; Lima, E. S.; Koolen, H. H. F.; Souza, A. D. L.; Pinheiro, M. L. B.; Cass, Q. B.; Silva, F. M. A. Synthesis and Inhibition Evaluation of New Benzyltetrahydroprotoberberine Alkaloids Designed as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Frontiers in Chemistry* **2019**, 7, 629.

[79] Panja, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* **2018**, 23, 173-182.

[80] Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **2013**, 117, 426-436.

[81] Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, 34, 540-560.

[82] Ali, A.; Lim, X. Y.; Chong, C. H.; Mah, S. H.; Chua, B. L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* **2018**, 89, 681-688.

[83] Vinatoru, M.; Mason, T. J.; Calinescu, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry* **2017**, 97, 159-178.

[84] Esclapez, M. D.; García-Pérez, J. V.; Mulet, A.; Cárcel, A. J. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews* **2011**, 3, 108-120.

- [85] Shirsath, S. R.; Sablea, S. S.; Gaikwad, S. G.; Sonawane, S. H.; Saini, D. R.; Gogate, P. R. Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, 38, 437-445.
- [86] Jiang, H-L.; Yang, J-L.; Shi, Y-P. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, 34, 325-331.
- [87] Zhang, H-F.; Yang, X-H.; Wang, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology* **2011**, 22, 672-688.
- [88] Sousa-Filho, P. C.; Serra, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. *Química Nova* **2015**, 38, 679-696.
- [89] Wang, H.; Ding, J.; Ren, N. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 75, 197-208.
- [90] Chan, C-H.; Yusoff, R.; Ngoh, G-C.; Kung, F. W-L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 6213-6225.
- [91] Llompart, M.; Garcia-Jares, C.; Celeiro, M. Dagnac, T. Microwave-Assisted Extraction. *Encyclopedia of Analytical Science* **2019**, 67-77.
- [92] Llompart, M.; Celeiro, M.; Dagnac, T. Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 116, 136-150.
- [93] 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. L. F.; Dourado, G. B.; Oliveira, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal* **2018**, 140, 176-182.
- [94] Callao, M. P. Multivariate experimental design in environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 62, 86-92.

- [95] Candiotti, L. V.; Zan, M. M.; Cámara, M. S.; Goicoechea, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* **2014**, 124, 123-138.
- [96] Barros-Neto, B.; Scarminio I.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 4a ed.; Editora Bookman: Porto Alegre, **2010**.
- [97] Pereira, F. M. V.; Pereira-Filho, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. *Química Nova* **2018**, 41, 1061-1071.
- [98] Saifullah, M.; Mccullum, R.; Mccluskey, A.; Vuong, Q. Comparison of conventional extraction technique with ultrasound assisted extraction on recovery of phenolic compounds from lemon scented tea tree (*Leptospermum petersonii*) leaves. *Heliyon* **2020**, 6, e03666.
- [99] Bezerra, M. A.; Ferreira, S. L. C.; Novaes, C. G.; Santos, A. M. P.; Valasques, G. S.; Cerqueira, U. M. F. M.; Alves, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry - A review. *Talanta* **2019**, 194, 941-959.
- [100] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, **2010**.
- [101] Lanças, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora Átomo: Campinas, **2009**.
- [102] Cass, Q. B.; Cassiano, N. M. Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações, 1º ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, **2015**.
- [103] Zhao, J.; Deng, J. W.; Chen, Y. W.; Li, S. P. Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1313, 2-23.
- [104] Prado, V. M. J.; Jesus, R. A.; Oliveira, J. M. A.; Blank, A. F.; Bezerra, D. P.; Soares, M. B. P.; Silva, V. R.; Santos, L. S.; Cardoso, C. L.; Vilela, A. F. L.; Nogueira, P. C. L.; Moraes, V. R. S. Biological studies and chromatograms aided by chemometric analysis in evaluation of seasonality and extraction method of *Croton grewoides* extracts. *Brazilian Journal of Botany* **2022**, 45, 607-618.

- [105] Esteki, M.; Shahsavari, Z.; Simal-Gandara, J. Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. *Food Research International* **2019**, 122, 303-317.
- [106] Rosa, G. S.; Vanga, S. K.; Gariepy, Y.; Raghavan, V. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2019**, 58, 102234.
- [107] Prado, V. M. J.; Jesus, R. A.; Oliveira, J. M. A.; Pereira, C. S. A.; Blank, A. F.; Pereira-Filho, E. R.; Cass, Q. B.; Lima, J. M.; Ferreira, A. G.; Nogueira, P. C. L.; Moraes, V. R. S. Evaluation of the Seasonality and Extraction Method on the Polar Extracts of *Croton grewoides* Baill. by Chromatogram Fingerprinting and Isolation of a New Triglycosylated Flavonoid. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2021**, 32, 385-394.
- [108] Bansal, A.; Chhabra, V.; Rawal, R. K.; Sharma, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2014**, 4, 223-233.
- [109] Liu, X.; Wu, Z.; Yang, F.; Ding, H.; Wu, Y. Quantitative analysis combined with chromatographic fingerprint for comprehensive evaluation of Danhong injection using HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 76, 70-74.
- [110] Leme, G. M.; Coutinho, I. D.; Creste, S.; Hojo, O.; Carneiro, R. L.; Bolzani, V. S.; Cavaleiro, A. J. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. *Analytical Methods* **2014**, 6, 7781-7788.
- [111] Blank, A. F.; Camêlo, L. C. A.; Blank, M. F. A.; Pinheiro, J. B.; Andrade, T. M.; Niculau, E. S.; Alves, P. B. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. *The Scientific World Journal* **2015**, 1-11.
- [112] Gomes, S. V. F.; Nogueira, P. C. L.; Moraes, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química* **2011**, 36, 64-77.
- [113] Siqueira-Lima, P. S.; Passos, F. R. S.; Lucchese, A. M.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; Lima, A. A. N.; Zengin, G.; Quintans, J. S. S.; Quintans-Júnior,

L. J. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2019**, 29, 125-135.

[114] Melo, J. O.; Bitencourt, T. A.; Fachin, A. L.; Cruz, E. M. O.; De Jesus, H. C. R.; Alves, P. B.; Blank, M. F. A.; Franca, S. C.; Beleboni, R. O.; Fernandes, R. P. M.; Blank, A. F.; Scher, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. *Acta Tropica* **2013**, 128, 110-115.

[115] Santos, C. P.; Rocha, D.S.; Bajay, M. M.; Santos, F. R. C.; Campos, J. B.; Pinheiro, J. B.; Zucchi, M. I.; Mann, R. S.; Blank, M. F. A.; Blank, A. F. Cross-species transferability of microsatellite markers in the genus *Lippia*. *Genetics and Molecular Research* **2014**, 13, 9846-9850.

[116] Santos, C. P.; Pinto, J. A. O.; Santos, C. A.; Cruz, E. M. O.; Blank, M. F. A.; Andrade, T. M.; Santos, D. A.; Alves, P. B.; Blank, A. F. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Industrial Crops & Products* **2016**, 79, 205-210.

[117] Funari, C. S.; Passalacqua, T. G.; Rinaldo, D.; Napolitano, A.; Festa, M.; Capasso, A.; Piacente, S.; Pizza, C.; Young, M. C. M.; Durigan, G.; Silva, D. H. S. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. *Phytochemistry* **2011**, 72, 2052-2061.

[118] Funari, C. S.; Eugster, P. J.; Martel, S.; Carrupt, P. A.; Wolfender, J. L.; Silva, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *Journal of Chromatography A* **2012**, 1259, 167-178.

[119] Funari, C. S.; Almeida, L.; Passalacqua, T. G.; Martinez, I.; Ambrósio, D. L.; Cicarelli, R. M. B.; Silva, D. H. S.; Graminha, M. A. S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity. *Acta Amazonica* **2016**, 46, 411-416.

[120] Piné, R. Q.; López, M. H.; Funes, L.; Linaresa, I. B.; Micol, V.; Carretero, S. A.; Gutiérrez, A. F. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress

after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine* **2013**, 20, 1112-1118.

[121] Moraes, V. R. S.; Thomas, S. S.; Sprenger, R. F.; Prado, V. M. J.; Cruz, E. M. O.; Cass, Q. B.; Ferreira, A. G.; Blank, A. F. Secondary Metabolites from an Infusion of *Lippia gracilis* Schauer Using the LC-DAD-SPE/NMR Hyphenation Technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2017**, 28, 1335-1340.

[122] Bores, A. M. G.; González, A. M. E.; Campos, A. R.; Toscano, S. C.; Flores, J. C. B.; Delgado, C. T. H.; Maya, F. S.; Meza, M. U.; Castro, I. P.; Acuña, C. L. C.; Acevedo, J. G. A. *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* **2017**, 167, 72-81.

[123] Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de alzheimer. *Química Nova* **2003**, 26, 301-304.

[124] Fernandes, L. C. B.; Albuquerque, C. C.; Sales-Júnior, R.; Oliveira, F. F. M.; Gurgel, E. P.; Mesquita, M. V.; Silva, M. D. S. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. *Summa Phytopathologica* **2015**, 41, 153-155.

[125] Almeida, M. C. S.; Alves, L. A.; Souza, L. G. S.; Machado, L. L.; Matos, M. C.; Oliveira, M. C. F.; Lemos, T. L. G.; Filho, R. B. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Química Nova* **2010**, 33, 1877-1881.

[126] Ludere, M. T.; Ree, T. V.; Vleggaar, R. Isolation and relative stereochemistry of lippialactone, a new antimalarial compound from *Lippia javanica*. *Fitoterapia* **2013**, 86, 188-192.

[127] Olivier, D. K.; Shikanga, E. A.; Combrinck, S.; Krause, R. W. M.; Regnier, T.; Dlamini, T. P. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. *South African Journal of Botany* **2010**, 76, 58-63.

[128] Cheng, L. C.; Murugaiyah, V.; Chan, K. L. Flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Lippia nodiflora* as promising antihyperuricemic agents and

elucidation of their mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology* **2015**, 176, 485-493.

[129] Cádiz-Gurrea, M. L.; Olivares-Vicente, M.; Herranz-López, M.; Arraez-Roman, D.; Fernández-Arroyo, S.; Micol, V.; Segura-Carretero, A. Bioassay-guided purification of *Lippia citriodora* polyphenols with AMPK modulatory activity. *Journal of Functional Foods* **2018**, 46, 514-520.

[130] Barros, F. M. C.; Zambarda, E. O.; Heinzmann, B. M.; Mallmann, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova* **2009**, 32, 861-867.

[131] Camillo, F. C. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Fitos* **2016**, Supl. 1-62.

[132] Peixoto, M. G.; Costa-Júnior, L. M.; Blank, A. F.; Lima, A. S.; Menezes, T. S. A.; Santos, D. A.; Alves, P. B.; Cavalcanti, S. C. H.; Bacci, L.; Blank, M. F. A. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* **2015**, 210, 118-122.

[133] Souza, R. C.; Costa, M. M.; Baldisserotto, B.; Heinzmann, B. M.; Schmidt, D.; Caron, B. O.; Copatti, E. C. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis* **2017**, 113, 29-33.

[134] Silva-Júnior, A. Q.; Silva, D. S.; Figueiredo, P. L. B.; Sarrazin, S. L. F.; Bouillet, L. E. M.; Oliveira, R. B.; Maia, J. G. S.; Mourão, R. H. V. Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. *Biochemical Systematics and Ecology* **2019**, 85, 35-42.

[135] Jannuzzi, H.; Mattos, J. K. A.; Vieira, R. F.; Silva, D. B.; Bizzo, H. R.; Gracindo, L. A. M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. *Horticultura Brasileira* **2010**, 28: 412-417.

- [136] Costa, M. C. C. D.; Aguiar, J. S.; Nascimento, S. C. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Acta Farmacêutica Bonaerense* **2004**, 23, 349-352.
- [137] Gomes, A. F.; Almeida, M. P.; Ruela, A. L. M.; Amaral, J. G.; David, J. M.; Leite, M. F. Development and evaluation of physical and release properties of a tablet formulation containing dry hydroethanolic extract from *Lippia alba* leaves. *Journal of Herbal Medicine*, **2021**, 29, 100459.
- [138] Zamora, C. M. P.; Michaluk, A. G.; Chiappetta, D. A.; Nuñez, M. B. Herbal buccal films with *in vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects. *Journal of Herbal Medicine*, **2022**, 31, 100527.
- [139] Sena-Filho, J. G.; Xavier, H. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Duringer, J. M. A chemical marker proposal for the *Lantana* genus: composition of the essential oils from the leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications* **2010**, 5, 635-640.
- [140] Sena-Filho, J. G.; Rabbani, A. R. C.; Silva, T. R. S.; Silva, A. V. C.; Souza, I. A.; Santos, M. J. B. A.; Jesus, J. R.; Nogueira, P. C. L.; Duringer, J. M. Chemical and molecular characterization of fifteen species from the *Lantana* (Verbenaceae) genus. *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**, 45, 130-137.
- [141] Julião, L. S.; Leitão, S. G.; Lotti, C.; Picinelli, A. L.; Rastrelli, L.; Fernandes, P. D.; Noël, F.; Thibaut, J. B.; Leitão, G. G. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. *Phytochemistry* **2010**, 71, 294-300.
- [142] Maldonado, E. M.; Salamanca, E.; Giménez, A.; Sterner, O. Antileishmanial metabolites from *Lantana balansae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2016**, 26, 180-183.
- [143] Sena-Filho, J. G.; Nimmo, S. L.; Xavier, H. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Cichewicz, R. H. Phenylethanoid and Lignan Glycosides from Polar Extracts of *Lantana*, a Genus of Verbenaceous Plants Widely Used in Traditional Herbal Therapies. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 1344-1347.

- [144] Julião, L. S.; Piccinelli, A. L.; Marzocco, S.; Leitão, S. G.; Lotti, C.; Autore, G.; Rastrelli, L. Phenylethanoid Glycosides from *Lantana fucata* with *in Vitro* Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 1424-1428.
- [145] Imbenzi, P. S.; He, Y.; Yan, Z.; Osoro, E. K.; Cheplogoi, P. K. Chemical Constituents in Extracts from Leaves of *Lantana trifolia* and Their *In Vitro* Anti-oxidative Activity. *Chinese Herbal Medicines* **2014**, 6, 242-246.
- [146] Mohamed, N. M.; Makboul, M. A.; Farag, S. F.; Jain, S.; Jacob, M. R.; Tekwani, B. L.; Ross, S. A. Triterpenes from the roots of *Lantana montevidensis* with antiprotozoal Activity. *Phytochemistry Letters* **2016**, 15, 30-36.
- [147] Kalita, S.; Kumar, G.; Karthik, L.; Rao, K. V. B. A. Review on Medicinal Properties of *Lantana camara* Linn. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **2012**, 5, 711-715.
- [148] Santos, R. C; Filho, A. A. M.; Chagas, E. A.; Takahashi, J. A.; Ferraz, V. P.; Fernández, I. M.; Ribeiro, P. R. E.; Melo, A. C. G. R.; Holanda, L. C. Chemical composition, antimicrobial and antiacetylcholinesterase activities of essential oil from *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers. *Journal of Medicinal Plants Research* **2015**, 9, 922-928.
- [149] Mahdi-Pour, B.; Jothy, S. L.; Latha, L. Y.; Chen, Y.; Sasidharan, S. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine* **2012**, 2, 960-965.
- [150] Kalita, S.; Kumar, G.; Karthik, L.; Rao, K. V. B. *In vitro* antioxidant and DNA damage inhibition activity of aqueous extract of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2012**, 2, S1675-S1679.
- [151] Nirmal, C. R.; Ebenezer, R. S.; Kannan, P.; Balasubramanian, M.; Thirunavukkarasu, I.; Mondal, R.; Dusthacker, A. Anti-tuberculosis activity of bio-active compounds from *Lantana camara* L., *Euphorbia hirta* L., *Mukia maderaspatana* (L.) M. Roem, and *Abutilon indicum* (L.). *European Journal of Integrative Medicine* **2020**, 35, 101105.

- [152] Hiremath, K. Y.; Jagadeesh, N.; Belur, S.; Kulkarni, S. S.; Inamdar, S. R. A lectin with anti-microbial and anti proliferative activities from *Lantana camara*, a medicinal plant. *Protein Expression and Purification* **2020**, 170, 105574.
- [153] Delgado-Altamirano, R.; García-Aguilera, M. E.; Delgado-Domínguez, J.; Becker, I.; San Miguel, E. R.; Rojas-Molina, A.; Esturau-Escofet, N.. ¹H NMR profiling and chemometric analysis as an approach to predict the leishmanicidal activity of dichloromethane extracts from *Lantana camara* (L.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2021**, 199, 114060.
- [154] Darwish, R. S.; El-Banna, A. A.; Ghareeb, D. A.; El-Hosseney, M. F.; Seadawy, M. G.; Dawood, H. M. Chemical profiling and unraveling of anti-COVID-19 biomarkers of red sage (*Lantana camara* L.) cultivars using UPLC-MS/MS coupled to chemometric analysis, *in vitro* study and molecular docking. *Journal of Ethnopharmacology* **2022**, 291, 115038.
- [155] Goltz, C.; Ávila, S.; Barbieri, J. B.; Igarashi-Mafra, L.; Mafra, M. R. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. *Industrial Crops & Products* **2018**, 115, 227-234.
- [156] Iftikhar, M.; Zhang, H.; Iftikhar, A.; Raza, A.; Begum, N.; Tahamina, A.; Syed, H.; Khan, M.; Wang, J. Study on optimization of ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from rye bran. *LWT - Food Science and Technology* **2020**, 134, 110243.
- [157] Silva Júnior, M. E.; Araújo, M. V. R. L.; Santana, A. A.; Silva, F. L. H.; Maciel, M. I. S. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. *Arabian Journal of Chemistry* **2021**, 14, 103260.
- [158] Moreira, M. M.; Barroso, M. F.; Boeykens, A.; Withouck, H.; Morais, S.; Delerue-Matos, C. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops & Products* **2017**, 104, 210-220.
- [159] Dairi, S.; Dahmoune, F.; Belbahi, A.; Remini, H.; Kadri, N.; Aoun, O.; Bouaoudia, N.; Madani, K.; Optimization of microwave extraction method of

phenolic compounds from red onion using response surface methodology and inhibition of lipoprotein low-density oxidation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2021**, 22, 100301.

[160] Carbone, K.; Macchioni, V.; Petrella, G.; Cicero, D. O. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Industrial Crops & Products* **2020**, 156, 112888.

[161] Kaanin-Boudraa, G.; Brahmi, F.; Wrona, M.; Nerín, C.; Moudache, M.; Mouhoubi, K.; Madani, K.; Boulekbache-Makhlouf, L. Response surface methodology and UPLC-QTOF-MS^E analysis of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus X paradisi*) by-products as novel ingredients for new antioxidant packaging. *LWT - Food Science and Technology* **2021**, 151, 112158.

[162] Abbas, M.; Ahmed, D.; Qamar, M. T.; Ihsan, S.; Noor, Z. I. Optimization of ultrasound-assisted, microwave-assisted and Soxhlet extraction of bioactive compounds from *Lagenaria siceraria*: A comparative analysis. *Bioresource Technology Reports* **2021**, 15, 100746.

[163] Aziz, N. A. A.; Hasham, R.; Sarmidi, M. R.; Suhaimi, S. H.; Idris, M. H. H. A review on extraction techniques and therapeutic value of polar bioactives from Asian medicinal herbs: Case study on *Orthosiphon aristatus*, *Eurycoma longifolia* and *Andrographis paniculate*. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2021**, 29, 143-165.

[164] Marco, B. A.; Rechelo, B. S.; Tótolí, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2019**, 27, 1-8.

[165] Akbari, S.; Abdurahman, N. H.; Yunus, R. M.; Alsaggaf, A. H. A.; Ahmed, N. LC-QTOF-MS analysis of phenolics and saponins extracted from *Aloe vera* leaves via microwave technology in optimal condition. *South African Journal of Botany* **2021**, 139, 362-373.

[166] Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Mudalip, S. K. A.; Olalere O. A. Microwave-assisted extraction of *Vernonia amygdalina* leaf for optimal recovery of total phenolic content. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2018**, 10, 16-24.

- [167] Nabet, N.; Gilbert-López, B.; Madani, K.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Mendiola, J. A. Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops & Products* **2019**, 129, 395-404.
- [168] Lenucci, M. S.; Tornese, R.; Mita, G.; Durante, M. Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Different Fractions of Mango Fruits (*Mangifera indica* L., Cultivar Tommy Atkins and Keitt). *Antioxidants* **2022**, 11, 484.
- [169] Ahmed, S. A.; Gogal, R. M.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods* **1994**, 170, 211-224.
- [170] Seidl, C.; Vilela, A. F. L.; Lima, J. M.; Leme, G. M.; Cardoso, C. L. A novel on-flow mass spectrometry-based dual enzyme assay. *Analytica Chimica Acta* **2019**, 1072, 81–86.
- [171] Vilela, A. F. L.; Seidl, C.; Lima, J. M.; Cardoso, C. L. An improved immobilized enzyme reactor mass spectrometry-based label free assay for butyrylcholinesterase ligand screening. *Analytical Biochemistry* **2018**, 549, 53–57.
- [172] Pradal, D.; Vauchel, P.; Decossin, S.; Dhulster, P.; Dimitrov, K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry* **2016**, 32, 137-146.
- [173] Dzah, C. S.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wen, C.; Zhang, J.; Chen, G.; Ma, H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience* **2020**, 35, 100547.
- [174] Rao, M. V.; Sengar, A. S.; Sunil, C. K.; Rawson, A. Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, 116, 975-991.

- [175] Bouafia, M.; Nesrin Colak, N.; Ayaz, F. A.; Benarfa, A.; Harrat, M.; Gourine, N.; Yousfi, M. The optimization of ultrasonic-assisted extraction of *Centaurea* sp. antioxidative phenolic compounds using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2021**, 25, 100330.
- [176] Zhong, L.; Liu, Y.; Xiong, B.; Chen, L.; Zhang, Y.; Li, C. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* by Response Surface Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2019**, 10.
- [177] Lin, X.; Wu, L.; Wang, X.; Yao, L.; Wang, L. Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2021**, 20, 100284.
- [178] Martins, C. R.; Lopes, W. A.; Andrade, J. B. Organic Compound Solubility. *Química Nova* **2013**, 36, 1248-1255.
- [179] Dahmoune, F.; Nayak, B.; Moussi, K.; Remini, H.; Madani, K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* **2015**, 166, 585-595.
- [180] Xu, D-P.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Li, S.; Li, A-N.; Li, H-B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules* **2016**, 21, 18.
- [181] Kumar, K.; Srivastav, S.; Sharanagat, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **2021**, 70, 105325.
- [182] Sanchez-Camargo, A. P.; Bueno, M.; Parada-Alfonso, F.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Hansen solubility parameters for selection of green extraction solvents. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 118, 227-237.
- [183] Liu, Y.; Wei, S.; Lia, M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Industrial Crops & Products* **2013**, 49, 837-843.

- [184] Sharayei, P.; Azarpazhooh, E.; Zomorodi, S.; Ramaswamy, H. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT - Food Science and Technology* **2019**, 101, 342-350.
- [185] Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Ali, H. A.; Zain, N. M.; Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Carica papaya* leaves: An optimization study and LC-QTOF-MS analysis. *Future Foods* **2021**, 3, 100035.
- [186] Hani, N. M.; Torkamani, A. E.; Abidin, S. Z.; Mahmood, W. A. K.; Juliano, P. The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach. *Food Bioscience* **2017**, 17, 7-16.
- [187] Contreras, M. M.; Lama-Muñoz, A.; Espínola, F.; Moya, M.; Romero, I.; Castro, E. Valorization of olive mill leaves through ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry* **2020**, 314, 126218.
- [188] Brahmi, F.; Blando, F.; Sellami, R.; Mehdi, S.; De Bellis, L.; Negro, C.; Haddadi-Guemghar, H.; Madani, K.; Makhoul-Boulekbatche, L. Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. flowers and comparison with conventional procedures. *Industrial Crops & Products* **2022**, 184, 114977.
- [189] Ez zoubi, Y.; Fadil, M.; Boustia, D.; Lalami, A. E.; Lachkar, M.; Farah, A. Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: Optimization Using Response Surface Methodology. *Journal of Chemistry* **2021**.
- [190] Alara, O. R.; Mudalip, S. K. A.; Abdurahman, N. H.; Mahmoud, M. S.; Obanijesu, E. O. Data on parametric influence of microwave-assisted extraction on the recovery yield, total phenolic content and antioxidant activity of *Phaleria macrocarpa* fruit peel extract. *Chemical Data Collections* **2019**, 24, 100277.
- [191] Chen, S.; Zeng, Z.; Hu, N.; Bai, B.; Wang, H.; Suo, Y. Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chemistry* **2018**, 242, 1-8.

- [192] Garrido, T.; Gizdavic-Nikolaidis, M.; Leceta, I.; Urdanpilleta, M.; Guerrero, P.; Caba, K.; Kilmartin, P. A. Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc using microwave-assisted extraction. *Waste Management* **2019**, 88, 110-117.
- [193] Mašković, P.; Veličković, V.; Mitić, M.; Đurović, S.; Zeković, Z.; Radojković, M.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Vujić, J. Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity. *Industrial Crops & Products* **2017**, 109, 875-881.
- [194] Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Zeković, Z.; Mašković, P.; Đurović, S.; Zengin, G.; Delerue-Matos, C.; Lozano-Sánchez, J.; Jakšić, A. Chemical and biological insights on aronia stems extracts obtained by different extraction techniques: From wastes to functional products. *The Journal of Supercritical Fluids* **2017**, 128, 173-181.
- [195] Zeković, Z.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Gorjanović, S.; Sužnjević, D.; Mašković, P.; Savić, S.; Radojković, M.; Đurović, S. Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Industrial Crops & Products* **2017**, 108, 423-430.
- [196] Arteaga-Crespo, Y.; Radice, M.; Bravo-Sanchez, L. R.; García-Quintana, Y.; Scalvenzi, L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon* **2020**, 6, e03043.
- [197] Cassol, L.; Rodrigues, E.; Noreña, C. P. Z. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. *Industrial Crops & Products* **2019**, 133, 168-177.
- [198] Bouras, M.; Chadni, M.; Barba, F. J.; Grimi, N.; Bals, O. Vorobiev, E. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Industrial Crops & Products* **2015**, 77, 590-601.
- [199] Sanchez-Reinoso, Z.; Mora-Adames, W. I.; Fuenmayor, C. A.; Darghan-Contreras, A. E.; Gardana, C.; Gutiérrez, L-F. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from Sacha Inchi shell: Optimization, physicochemical

properties and evaluation of their antioxidant activity. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* **2020**, 153, 107922.

[200] Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, 30, 374-381.

[201] Aygun, R. B.; Zengin, G.; Yildiztugay, E.; Jugreet, S.; Yilmaz, M. A.; Mahomoodally, F. M. Chemical characterization, anti-oxidant and anti-enzymatic properties of extracts from two *Silene* species: A focus on different plant parts and extraction methods. *Process Biochemistry* **2022**, 116, 206–213.

[202] Lee, T. H.; Lee, C. H.; Ong, P. Y.; Wong, S. L.; Hamdan, N.; Ya'akob, H.; Azmi, N. A.; Khoo, S. C.; Zakaria, Z. A.; Cheng, K-K;. Comparison of extraction methods of phytochemical compounds from white flower variety of *Melastoma malabathricum*. *South African Journal of Botany* **2022**, 148, 170-179.

[203] Irakli, M.; Chatzopoulou, P.; Ekateriniadou, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops & Products* **2018**, 124, 382-388.

[204] Wang, Y.; Chen, Y.; Deng, L.; Cai, S.; Liu, J.; Li, W.; Du, L.; Cui, G.; Xu, X.; Lu, T.; Chen, P.; Zhang, H. Systematic Separation and Purification of Iridoid Glycosides and Crocetin Derivatives from *Gardenia jasminoides* Ellis by High-speed Counter-current Chromatography. *Phytochemical Analysis* **2015**.

[205] Akihisa, T.; Watanabe, H.; Yamamoto, A.; Zhang, J.; Matsumoto, M.; Fukatsu, M. Melanogenesis Inhibitory Activity of Monoterpene Glycosides from *Gardeniae Fructus*. *Chemistry & Biodiversity* **2012**, 9, 1490-1499.

[206] Yu, Y.; Xie, Z-L.; Gao, H.; Ma, W-W.; Dai, Y.; Wang, Y.; Zhong, Y.; Yao, X-S. Bioactive Iridoid Glucosides from the Fruit of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, 1459–1464.

[207] Campos, M. G.; Markham, K. R. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. Editora Coimbra: Palheira, **2007**.

- [208] Moussi, K.; Nayak, B.; Perkins, L. B.; Dahmoune, F.; Madani, K.; Chibane, M. HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial Crops & Products* **2015**, 74, 858–866.
- [209] Kachmar, M. R.; Oliveira, A. P.; Valentão, P.; Gil-Izquierdo, A.; Domínguez-Perles, R.; Ouahbi, A.; El Badaoui, K.; Andrade, P. B.; Ferreres, F. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ phenolic profile and *in vitro* biological potential of *Centaureum erythraea* Rafn aqueous extract. *Food Chemistry* **2019**, 278, 424–433.
- [210] Papoutsis, Z.; Kassi, E.; Mitakou, S.; Aligiannis, N.; Tsiapara, A.; Chrousos G. P.; Moutsatsou, P. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **2006**, 98, 63-71.
- [211] Murthy, K. N. C.; Kim, J.; Vikram, A.; Patil, B. S. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry* **2012**, 132, 27-34.
- [212] Ibrahim, A.; Sobeh, M.; Ismail, A.; Alaa, A.; Sheashaa, H.; Sobh, M.; Badria, F. Free-B-Ring flavonoids as potential lead compounds for colon cancer therapy. *Molecular and Clinical Oncology* **2014**, 2, 581-585.
- [213] Encalada, M. A.; Rehecho, S.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Caverio, R. Y.; Calvo, M. I. Antiproliferative effect of phenylethanoid glycosides from *Verbena officinalis* L. on Colon Cancer Cell Lines. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, 63, 1016-1022.
- [214] Vinutha, B. Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S. L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 109, 359-363.
- [215] Eid, S. Y.; El-Readi, M. Z.; Wink, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* **2012**, 19, 1307-1314.
- [216] Yang, Y.; Zhang, Z.; Li, S.; Ye, X.; Li, X.; He, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* **2014**, 92, 133-147.

APÊNDICE

Figura 1A: Curva de calibração de: (a) ácido gálico (0-200 mg L⁻¹) para determinação do conteúdo de fenólicos totais, (b) catequina (0-300 mg L⁻¹) para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, (c) Trolox (0-700 µmol L⁻¹) para a determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH; (d) Trolox (0-2000 µmol L⁻¹) para a determinação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP); (e) Trolox (0-700 µmol L⁻¹) para a determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS.

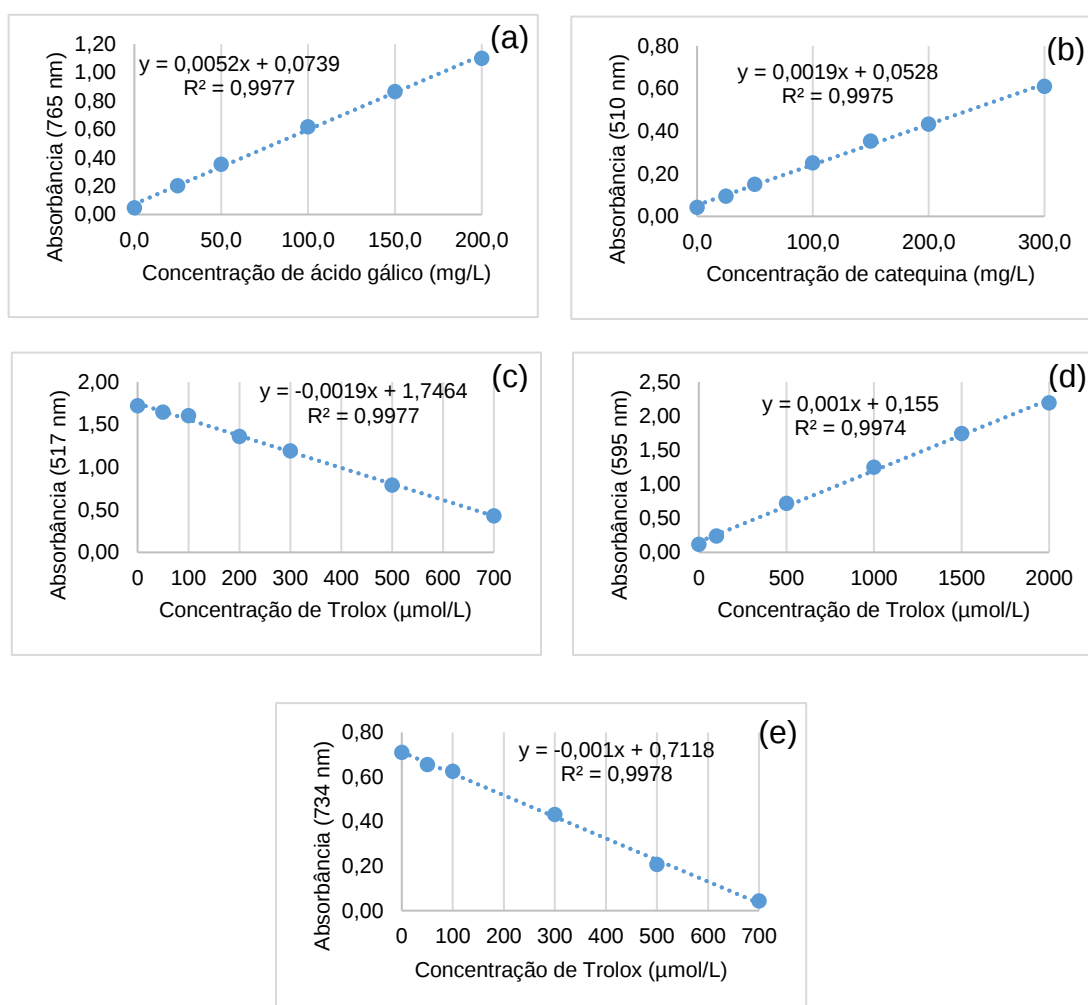


Figura 2A: Gráfico de desejabilidade mostrando as condições de operação por UAE que resulta na otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC a partir das folhas de *L. alba*.

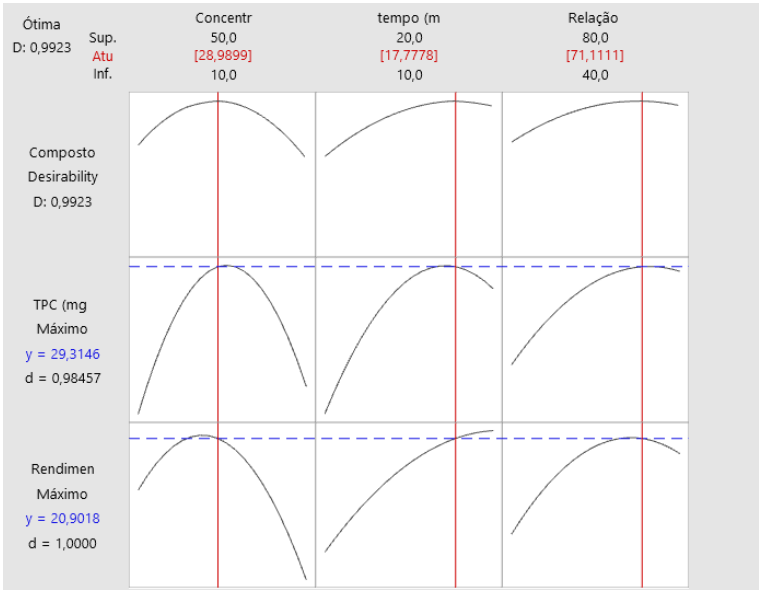


Figura 3A: Gráfico de desejabilidade mostrando as condições de operação por MAE que resulta na otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC a partir das folhas de *L. alba*.

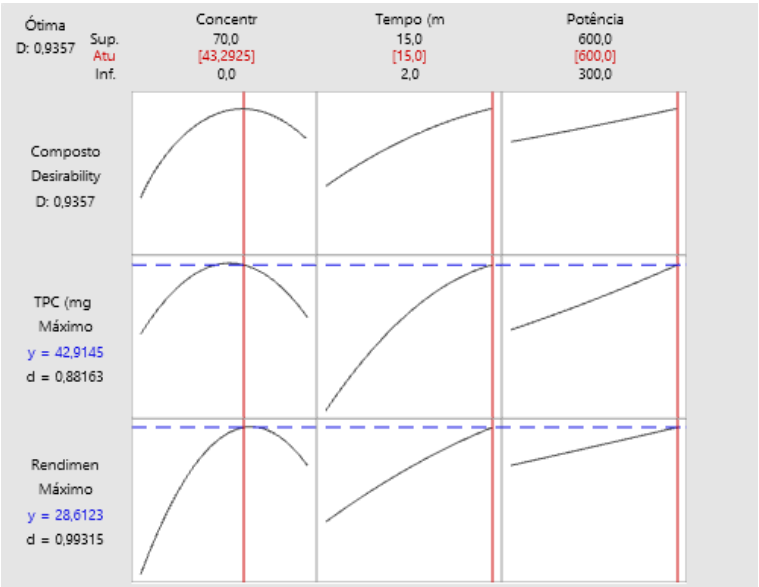


Figura 4A: Gráfico de desejabilidade mostrando as condições de operação por UAE que resulta na otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC a partir das folhas de *L. camara*.

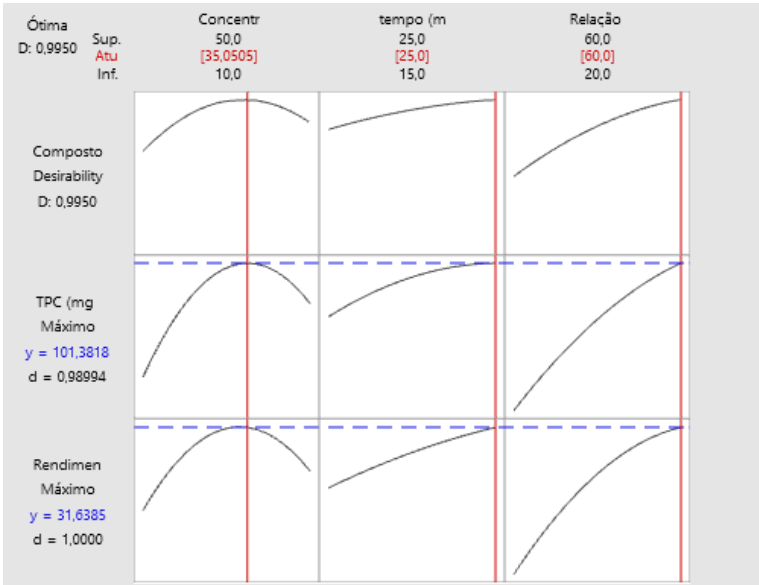


Figura 5A: Gráfico de desejabilidade mostrando as condições de operação por MAE que resulta na otimização simultânea do rendimento de extração e do TPC a partir das folhas de *L. camara*.

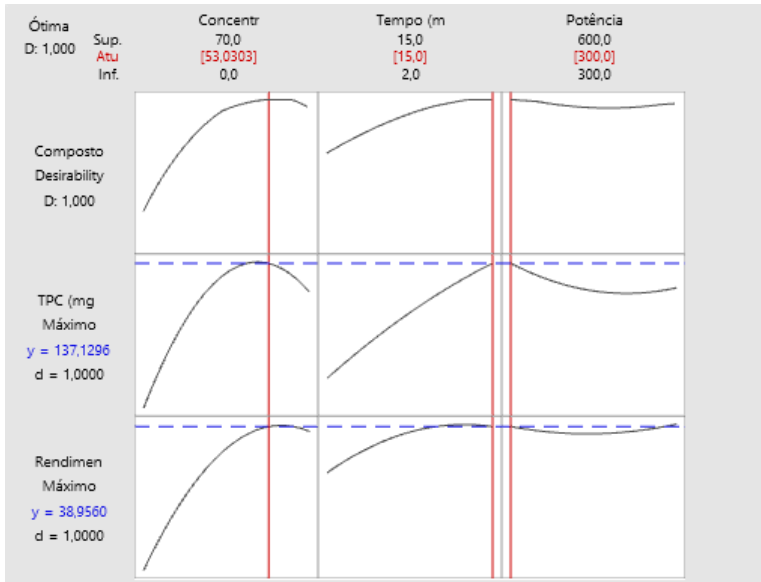


Tabela 1A: Comparação dos resultados de rendimento de extração, TPC, TFC e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) dos extratos obtidos das folhas de *L. alba* por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias em cada coluna segundo a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).

Método	Rendimento (%)	TPC (mg EAG/g ms)	TFC (mg EC/g ms)	DPPH ($\mu\text{mol ET/g ms}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g ms}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g ms}$)
UAE	20,33 $\pm$ 0,15 ^b	30,86 $\pm$ 0,33 ^a	28,05 $\pm$ 0,49 ^a	94,77 $\pm$ 1,67 ^{ad}	119,72 $\pm$ 1,69 ^{ad}	205,30 $\pm$ 2,99 ^a
MAE	26,94 $\pm$ 0,53 ^a	41,13 $\pm$ 0,27 ^b	40,12 $\pm$ 0,88 ^b	144,16 $\pm$ 2,92 ^b	161,68 $\pm$ 6,25 ^b	276,81 $\pm$ 3,44 ^b
MC	17,66 $\pm$ 0,49 ^c	25,86 $\pm$ 0,25 ^c	22,57 $\pm$ 0,29 ^c	72,71 $\pm$ 3,90 ^c	98,56 $\pm$ 2,48 ^c	167,34 $\pm$ 1,25 ^c
INF	18,02 $\pm$ 0,17 ^c	26,33 $\pm$ 0,08 ^c	23,83 $\pm$ 0,11 ^c	70,26 $\pm$ 0,29 ^c	96,71 $\pm$ 4,95 ^c	161,30 $\pm$ 0,83 ^d
DEC	22,62 $\pm$ 0,26 ^b	32,57 $\pm$ 0,36 ^d	30,48 $\pm$ 0,14 ^d	93,40 $\pm$ 1,09 ^d	120,89 $\pm$ 1,06 ^d	195,28 $\pm$ 1,73 ^e
SOX	25,85 $\pm$ 2,62 ^a	39,53 $\pm$ 1,17 ^e	32,71 $\pm$ 1,05 ^e	109,84 $\pm$ 1,98 ^e	144,11 $\pm$ 0,32 ^e	241,16 $\pm$ 1,15 ^f

TPC: conteúdo de fenólicos totais; TFC: conteúdo de flavonoides totais; DPPH: captura do radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: captura do cátion radicalar 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico); FRAP: poder antioxidante redutor férrico; EAG: equivalente de ácido gálico; EC: equivalente de catequina; ET: equivalente de Trolox.

Tabela 2A: Comparação dos resultados de rendimento de extração, TPC, TFC e atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) dos extratos obtidos das folhas de *L. camara* por UAE, MAE, maceração (MC), infusão (INF), decocção (DEC) e Soxhlet (SOX). As letras sobrescritas diferentes indicam que há diferença estatística entre as médias em cada coluna segundo a ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$).

Método	Rendimento (%)	TPC (mg EAG/g ms)	TFC (mg EC/g ms)	DPPH ($\mu\text{mol ET/g ms}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g ms}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g ms}$)
UAE	32,50 $\pm$ 0,84 ^b	102,89 $\pm$ 3,62 ^b	139,15 $\pm$ 1,41 ^b	404,15 $\pm$ 1,84 ^b	369,56 $\pm$ 5,39 ^b	775,12 $\pm$ 7,75 ^b
MAE	38,61 $\pm$ 0,56 ^a	109,83 $\pm$ 4,63 ^a	148,77 $\pm$ 3,76 ^a	423,51 $\pm$ 3,68 ^a	414,50 $\pm$ 4,96 ^a	838,69 $\pm$ 4,70 ^a
MC	26,11 $\pm$ 1,08 ^c	84,70 $\pm$ 0,16 ^c	112,31 $\pm$ 2,90 ^c	316,05 $\pm$ 2,76 ^c	273,77 $\pm$ 9,97 ^c	596,14 $\pm$ 8,15 ^c
INF	26,56 $\pm$ 0,51 ^c	74,92 $\pm$ 0,11 ^d	98,76 $\pm$ 0,48 ^d	303,32 $\pm$ 1,88 ^d	269,91 $\pm$ 4,81 ^d	517,26 $\pm$ 4,53 ^d
DEC	32,53 $\pm$ 0,65 ^b	95,56 $\pm$ 0,48 ^e	127,80 $\pm$ 2,73 ^e	372,28 $\pm$ 2,86 ^e	337,30 $\pm$ 1,84 ^e	679,74 $\pm$ 5,83 ^e
SOX	37,93 $\pm$ 3,53 ^a	103,50 $\pm$ 0,53 ^{ab}	122,20 $\pm$ 2,21 ^e	389,22 $\pm$ 0,65 ^f	382,51 $\pm$ 4,74 ^b	734,88 $\pm$ 9,11 ^f

TPC: conteúdo de fenólicos totais; TFC: conteúdo de flavonoides totais; DPPH: captura do radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: captura do cátion radicalar 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico); FRAP: poder antioxidante redutor férrico; EAG: equivalente de ácido gálico; EC: equivalente de catequina; ET: equivalente de Trolox.

