

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**CAROLINY FERNANDA BATISTA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO IN VITRO DE EXTRATOS DE PEIXINHO DA HORTA (*Stachys  
byzantina*) OBTIDOS POR MEIO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS  
NATURAIS**

**CAMPO MOURÃO**

**2021**

**CAROLINY FERNANDA BATISTA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO IN VITRO DE EXTRATOS DE PEIXINHO DA HORTA (*Stachys byzantina*) OBTIDOS POR MEIO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS**

**In vitro evaluation of Peixinho da horta (*Stachys byzantina*) extracts obtained using natural deep eutetic solvents**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Leila Larisa Medeiros Marques.

**CAMPO MOURÃO**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**CAROLINY FERNANDA BATISTA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO IN VITRO DE EXTRATOS DE PEIXINHO DA HORTA (*Stachys byzantina*) OBTIDOS POR MEIO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 30/Novembro/2021

---

Aline Takaoka Alves Baptista  
Doutorado em Ciência de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Leila Larisa Medeiros Marques  
Doutorado em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Stéphani Caroline Benetl  
Doutorado em Engenharia de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**CAMPO MOURÃO**

**2021**

Dedico este trabalho à minha família, em especial a  
minha mamãe, por tudo!

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço aos meus professores, por todos os ensinamentos transmitidos, conselhos, correções e questionamentos, pois foram essas ações me agregam como profissional e me permitiram realizar este trabalho. Em especial, a minha orientadora Profa. Dra. Leila Larisa Medeiros Marques, pela amizade, oportunidade e confiança depositadas em mim durante esse projeto, e por toda sabedoria e paciência com que me guiou nesta trajetória.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, mãe, pai e meu irmão, que me incentivaram nos altos e baixos da graduação, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio. Incluo aqui, um agradecimento especial para a pessoa que se fez família nesses últimos anos, Izabela Rosa Marchezoni.

Aos meus amigos da graduação, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado, Rafaela Galassi, Maria Victoria Biason, Jacqueline de Carvalho, Julia Gomes, Stefanie Calisto e todos que me agregaram afeto e conhecimento, de forma direta ou até mesmo sem perceber, levarei todos comigo.

Agradeço pela minha vida e por cada obstáculo imposto a ela, pois estes me fizeram forte e resiliente, desta forma, gostaria de me parabenizar pelo crescimento pessoal, científico e profissional alcançados nesses anos de IC e TCC.

Por fim, ressalto que esses parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, peço desculpas a aquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

## RESUMO

As doenças crônicas representaram sete das dez principais causas de morte no mundo na última década. Deste modo a busca por compostos com ação antioxidantes capazes de prevenir o aparecimento dessas doenças, torna-se indispensável. Esses compostos podem ser obtidos pela operação unitária de extração, a qual requer o uso de solventes, porém, solventes convencionais empregados atualmente na pesquisa e na indústria podem apresentar risco químico ao produto final e ao manipulador. Estudos buscam tecnologias verdes eficazes para a substituição dos solventes convencionais. O peixinho da horta (*Stachys byzantina*) é uma Planta alimentícia não convencional (PANC) rica em vitamina A e uma gama de minerais como ferro e cálcio, além de apresentar elevado poder antioxidante e alta quantidade de fenólicos totais, o que a torna objeto de interesse nesse estudo. Deste modo, foi proposta a extração de compostos com potencial antioxidante das folhas da *Stachys byzantina* com o uso de diferentes combinações de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) em comparação aos convencionais, além de investigar a melhor combinação para a espécie com as variáveis de resposta em teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante. Os extratos obtidos foram avaliados quanto a fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Os teores de compostos bioativos variaram de 0,308 a 0,811 mg EAG.g<sup>-1</sup> para fenólicos totais e de 0,030 a 1,162 mg EQ.g<sup>-1</sup> para flavonoides totais. A capacidade antioxidante dos extratos avaliados pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP variou de 1,867 e 6,706 μmol ET.g<sup>-1</sup>, 0,420 e 2,159 μmol ET.g<sup>-1</sup> e 100,376 e 299,156 μmol ET.g<sup>-1</sup>, respectivamente. A função desejabilidade e análise dos componentes principais (PCA), definiram o solvente LP-Ale-50% como a melhor combinação para a recuperação de compostos bioativos da espécie. Os resultados evidenciam a superioridade dos NADES em comparação aos solventes convencionais e o teor de compostos encontrados indicam que os extratos poderão ser utilizados em trabalho futuro com intuito em aplicação na indústria alimentícia e farmacológica.

**Palavras-chave:** antioxidante; PANC; extração verde; solvente eutético.

## ABSTRACT

Chronic diseases accounted for seven of the ten leading causes of death in the world in the last decade. Thus, the search for compounds with antioxidant action capable of preventing the onset of these diseases becomes essential. These compounds can be obtained by the unitary extraction operation, which requires the use of solvents, however, the conventional solvents currently used in research and industry can present a chemical hazard to the final product and to the handler. Studies are looking for effective green technologies to replace conventional solvents. The “peixinho da horta” (*Stachys byzantina*) is a PANC rich in vitamin A and a range of minerals such as iron and calcium, in addition to having a high antioxidant power and a high amount of total phenolics, which makes it an object of interest in this study. Thus, it was proposed to extract compounds with antioxidant potential from *Stachys byzantina* leaves using different combinations of natural deep eutectic solvents compared to conventional ones, in addition to investigating the best combination for the species with the response variables in content of bioactive compounds and antioxidant capacity. The extracts obtained were evaluated for phenolics, flavonoids and antioxidant capacity by the DPPH, ABTS and FRAP methods. The contents of bioactive compounds ranged from 0.308 to 0.811 mg EAG.g<sup>-1</sup> for total phenolics and from 0.030 to 1.162 mg EQ/g for total flavonoids. The antioxidant capacity of the extracts evaluated by the DPPH, ABTS and FRAP methods ranged from 1.867 and 6.706 μmol ET.g<sup>-1</sup>, 0.420 and 2.159 μmol ET.g<sup>-1</sup> and 100.376 and 299.156 μmol ET.g<sup>-1</sup>, respectively. The desirability function and principal component analysis (PCA) defined the LP-Ale-50% solvent as the best combination for the recovery of bioactive compounds of the species. The results show the superiority of NADES compared to conventional solvents and the content of compounds found indicate that the extracts can be used in future work with the aim of applying them in the food and pharmacological industry.

**Keywords:** antioxidant; PANC; green extraction; eutectic solvent.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da molécula de antioxidante doando elétron para a molécula de radical livre.....	15
Figura 2 - Estrutura química das principais classes de flavonoides encontradas em diferentes fontes naturais de origem vegetal.....	16
Figura 3 - Canteiro de cultivo da <i>Stachys byzantina</i> K. Koch no centro paranaense de referência em agroecologia (CPRA).....	19
Figura 4 - Sistema de extração banho ultrassônico.....	21
Figura 5 - Processo de cavitação do banho ultrassônico. (A) Formação de bolhas de cavitação; (B) Efeito de cavitação observado no banho ultrassônico; (C) Sistema de extração por banho ultrassônico.....	22
Figura 6 - Formação do complexo estável Quercetina-Al <sup>3+</sup> .....	33
Figura 7 - Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	34
Figura 8 - Estabilização do radical DPPH.....	34
Figura 9 - Redução do complexo TPTZ com Fe <sup>3+</sup> .....	35
Figura 10 - Função desejabilidade para definição do melhor solvente.....	45
Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) para a avaliação dos solventes empregados.....	46
Gráfico 1 - Recuperação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.....	42
Gráfico 2 - Atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP.....	43
Fotografia 1 - Canteiro de <i>Stachys byzantina</i> K. Koch, UTFPR - Campo Mourão – PR.....	26
Fotografia 2 - Folhas de <i>Stachys byzantina</i> dispostas em bandejas antes (A) e durante (B) a secagem em estufa, respectivamente.....	27
Fotografia 3 - Extração contínua de extrato etéreo em aparato soxhlet de amostras de <i>Stachys byzantina</i> seca e in natura, respectivamente.....	29
Fotografia 4 - Produto líquido das extrações das folhas de <i>Stachys byzantina</i> com solventes convencionais e eutéticos.....	32



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinações, razão molar e mássica para o preparo dos solventes eutéticos.....	31
Tabela 2 - Resumo do preparo das curvas de calibração e análises da amostra.....	36
Tabela 3 - Composição centesimal das folhas de <i>Stachys byzantina</i> in natura e seca.....	37
Tabela 4 - Médias e desvios-padrões para a extração de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de <i>Stachys byzantina</i> .....	38
Tabela 5 - Médias e desvios-padrões para a extração de compostos fenólicos, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP em solventes.....	40
Tabela 6 - Correlações (coeficientes de correlação de Pearson) entre os parâmetros físico-químicos e os dois primeiros componentes principais.....	46

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Compostos bioativos</b> .....	<b>14</b>
3.1.1	Antioxidantes .....	14
3.1.2	Compostos fenólicos e flavonoides .....	15
<b>3.2</b>	<b>Plantas alimentícias não convencionais (PANCs)</b> .....	<b>17</b>
3.2.1	Peixinho da horta ( <i>Stachys byzantina</i> K. Koch).....	18
<b>3.3</b>	<b>Métodos de extração</b> .....	<b>20</b>
3.3.1	Extração por banho ultrassônico .....	21
<b>3.4</b>	<b>Solventes convencionais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Solventes eutéticos profundos naturais (NADES)</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Do cultivo à colheita</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Tratamento da amostra</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise centesimal</b> .....	<b>27</b>
4.3.1	Umidade .....	28
4.3.2	Cinzas .....	28
4.3.3	Proteínas .....	28
4.3.4	Lipídeos.....	29
4.3.5	Carboidratos.....	30
<b>4.4</b>	<b>Preparo dos solventes eutéticos</b> .....	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>Método de extração</b> .....	<b>31</b>
<b>4.6</b>	<b>Atividade in vitro</b> .....	<b>32</b>
4.6.1	Determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	32
4.6.2	Determinação de Flavonoides .....	33
4.6.3	Determinação da capacidade antioxidante pelo método de ABTS <sup>+</sup> .....	33
4.6.4	Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH .....	34
4.6.5	Determinação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP <sup>+</sup> .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Composição centesimal</b> .....	<b>36</b>

5.2	Avaliação in vitro da recuperação de compostos bioativos .....	37
6	CONCLUSÃO .....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020), as doenças crônicas não transmissíveis constituem sete das dez principais causas de morte no mundo na última década, ressaltando assim, a necessidade de um foco global e intensificado na prevenção e no tratamento destas doenças.

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, sendo uma das formas de prevenção para as doenças crônicas. O primeiro mecanismo de defesa contra esses radicais é impedir sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Assim, estimulam o sistema endógeno de defesa do organismo evitando o estresse oxidativo e a perda da integridade celular, associado ao desenvolvimento de tais doenças ou ainda, podem agir em espécies já reativas removendo os danos causados a molécula de DNA e reconstituindo as membranas celulares danificadas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes podem ser aplicados em várias vertentes da indústria alimentícia, como incremento nutricional, auxiliando na ingestão de compostos promotores de saúde e bem-estar, como coadjuvantes que retardam a degradação e aumentam a estabilidade oxidativa, e ainda como inibidores para o crescimento de microrganismos indesejáveis (CASTRO *et al.*, 2019; GUPTA; JAIN, 2014; KOZŁOWSKA *et al.*, 2012).

Esses podem ser encontrados em fontes vegetais que são ricas em vitaminas, minerais, fitoquímicos e metabólitos, destacando-se os compostos fenólicos, compostos nitrogenados, carotenoides, ácido ascórbico e os tocoferóis, que conferem capacidade antioxidante e decorrente eficácia na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares e câncer (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Extratos de plantas de espécies da família *Lamiaceae* vêm sendo pesquisados e relatam expressivo poder antioxidante, em especial, a espécie *Stachys byzantina*. Ela é rica em compostos nutracêuticos, possui alta concentração de minerais, apresenta altos níveis de vitamina C e K, destaca-se ainda, em teores de fibras, proteínas e carboidratos. O conjunto de todos esses nutrientes podem contribuir para a ingestão diária necessária dos consumidores, em especial com relação aos aminoácidos essenciais e por fim, possui uma ampla gama de

compostos bioativos (ALBAYRAK *et al.*, 2013; AZEVEDO, 2018; GÓMEZ-RIVERA *et al.*, 2018).

Para quantificação desses compostos, um dos procedimentos mais comuns é a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos ativos, por meio de metodologias de extração. Estas se baseiam em operação unitária que envolve transferência de massa, e objetiva a separação desses compostos de interesse de sua matriz, seja ela sólida ou líquida por meio de processos químicos, físicos e ou mecânicos com uso de diferentes solventes, tudo a depender da aplicação (MIGLIATO *et al.*, 2011; VIEIRA, 2015).

O uso de extratos vegetais com fins alimentícios e ou farmacológicos deve considerar como fator determinante para sua aplicação a sua toxicidade, seja está relacionada às características da matriz vegetal ou ao solvente empregado na extração, sendo desejado a baixa ou nenhuma toxicidade no produto final (PRADO, 2003). Dessa forma, solventes ecologicamente corretos e atóxicos vêm sendo estudados, e uma alternativa citada pela literatura são os solventes eutéticos profundos naturais formados a partir de doadores e aceitadores de ligação de hidrogênio, destacando-se pela adaptabilidade quanto à polaridade e seletividade para diferentes aplicações (DAI *et al.*, 2013; VISSER; SWATLOSKI; ROGERS, 2000).

Considerando tais informações, neste trabalho foi proposto produzir extratos a partir das folhas de *Stachys byzantina* utilizando diferentes combinações de solventes eutéticos e convencionais (água e etanol), e ainda, investigar a melhor combinação de NADES para a espécie com as variáveis de resposta em teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir extratos a partir das folhas de *Stachys byzantina* utilizando diferentes solventes (eutéticos e convencionais) e investigar a melhor combinação para a espécie com as variáveis de resposta em teor de compostos bioativos e capacidade antioxidante.

### 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar mudas de *Stachys byzantina*;
- Realizar secagem das folhas de *Stachys byzantina* em estufa de circulação forçada;
- Determinar a composição centesimal das folhas in natura e secas de *Stachys byzantina*;
- Preparar diferentes formulações de solventes eutéticos profundos naturais (NADES);
- Extrair compostos bioativos presentes nas folhas por meio de banho ultrassom com o uso dos diferentes tipos de NADES e solventes convencionais (água e etanol);
- Caracterizar o extrato por meio de análises de compostos fenólicos totais e flavonoides totais para definição da melhor combinação de NADES;
- Avaliar o desempenho de extração dos NADES entre si e em comparação com os solventes convencionais por meio das análises do item anterior;
- Determinar a capacidade antioxidante das combinações otimizadas do item anterior por via de três metodologias: DPPH, ABTS e FRAP;
- Eleger a melhor combinação com base nos resultados das análises in vitro, delineadas por meio dos testes Tukey, função desejabilidade e análise dos componentes principais (PCA).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Compostos bioativos

O crescimento da demanda global pela busca de produtos derivados de plantas naturais saudáveis, se deve à presença de vários compostos bioativos como os antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos. Este fato tem atraído a atenção de cientistas e pesquisadores no que se refere a encontrar novas plantas com bioatividade dominante, já que o mecanismo de ação por trás de tais ativos biológicos tem se mostrado benéfico para a saúde humana (BAHADORI *et al.*, 2020).

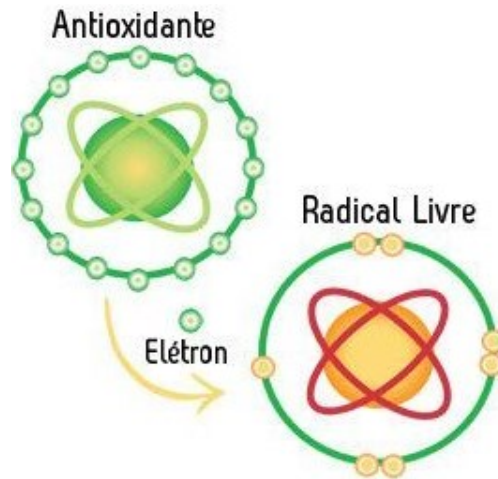
Segundo pesquisadores, o consumo quase que diário de frutas e vegetais tem contribuído para a redução de riscos a doenças (ABDENNACER *et al.*, 2015; VEBERIC; COLARIC; STAMPAR, 2008). Esses alimentos são conhecidos por apresentar em sua composição rica fonte de moléculas antioxidantes, compostos que têm a capacidade de prevenir uma ampla gama de condições patológicas. Já os compostos fenólicos presentes nas frutas e vegetais, atuam como protetores contra o câncer e doenças cardíacas (ABDENNACER *et al.*, 2015; BURSAL *et al.*, 2013). Os flavonoides e ácidos fenólicos são os polifenóis alvo de estudo frequente, incluindo as propriedades biológicas desses fitoquímicos em sistemas de teste *in vitro* e *in vivo* (ABDENNACER *et al.*, 2015; TOHMA; GULCIN, 2010).

##### 3.1.1 Antioxidantes

Há tempos sabe-se da importância e dos benefícios dos antioxidantes encontrados em plantas e alimentos naturais (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Estes antioxidantes, são compostos envolvidos no mecanismo de defesa do organismo contra patologias associadas ao ataque de radicais livres (Figura 1) (DIMITROVA *et al.*, 2017). Portanto sua função é proteger as células sadias do organismo contra a ação oxidante dos radicais livres, assim, essas substâncias doam elétrons devido a sua propriedade química, o que os tornam capazes de estabilizar as moléculas de radicais livres e impedir os efeitos prejudiciais, tornando-

se eficazes na proteção contra doenças crônicas (VIRGOLIN; SEIXAS; JANZANTTI, 2017).

**Figura 1 - Ilustração da molécula de antioxidante doando elétron para a molécula de radical livre**



Fonte: Torres (2007)

Apesar do oxigênio desempenhar importante papel nos sistemas biológicos das formas aeróbicas de vida, os derivados produzidos durante a síntese são altamente tóxicos (DIMITROVA *et al.*, 2017). Tais derivados como, os radicais livres são produzidos como subprodutos ou produtos finais de algumas reações bioquímicas e contribuem para o desenvolvimento e manutenção das células no organismo. Porém, altos níveis de radicais livres presentes em sistemas normais causam um desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres, ocasionando o surgimento de várias doenças (MASOKO, 2017).

### 3.1.2 Compostos fenólicos e flavonoides

De acordo com a literatura, o metabolismo primário das plantas tem como objetivo produzir componentes essenciais para o bom funcionamento e sobrevivência do organismo (WINK, 2015). Já os metabólitos secundários das plantas são utilizados na defesa contra patógenos e são potenciais antimicrobianos, aplicados em diversas áreas da sociedade gerando um impacto econômico significativo (SILVA, 2013). Dentre as formas de uso estão os aditivos alimentares,

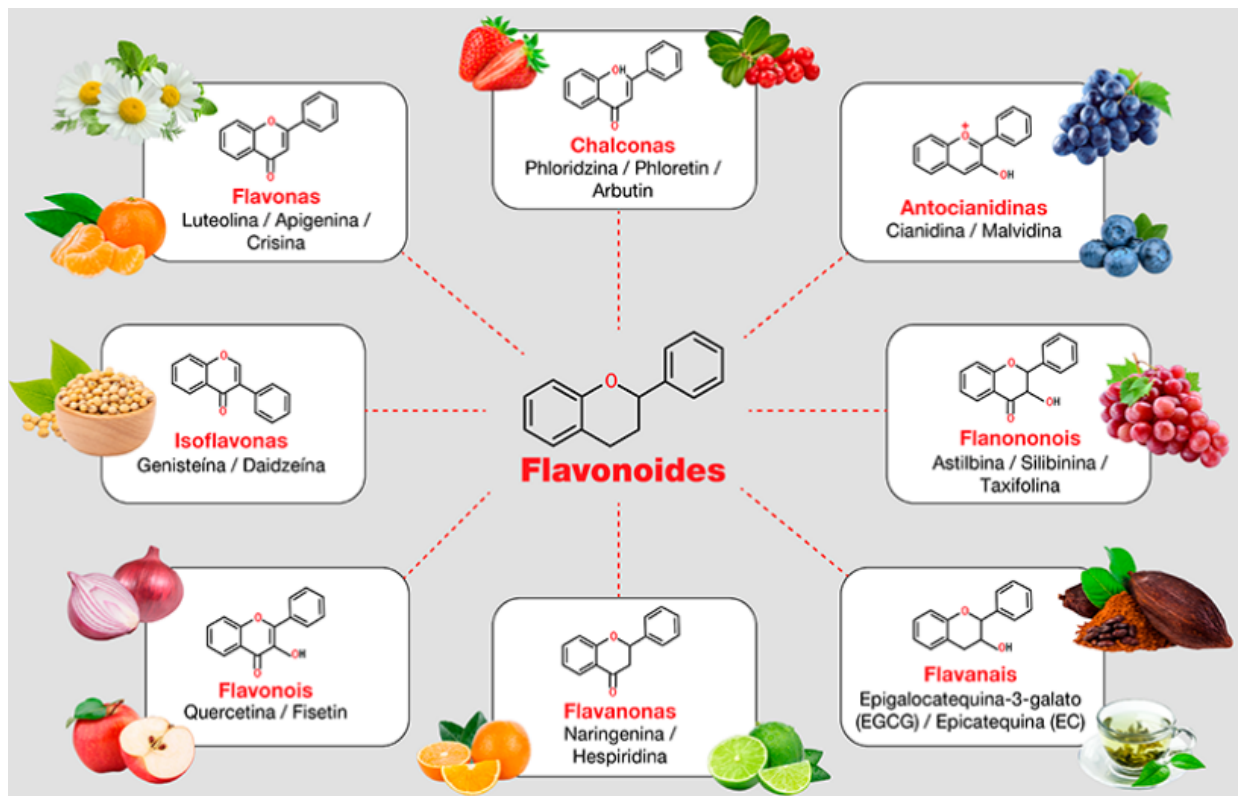


aromatizantes e compostos bioquímicos de importância industrial ou fármacos (AKULA; RAVISHANKAR, 2011).

Neste contexto, encontram-se os compostos fenólicos que estão entre os mais abundantes e importantes grupos de metabólitos secundários das plantas. Sua função é inibir ou ativar uma diversidade de sistemas enzimáticos (SCHAFRANSKI, 2019). Ainda relacionado aos compostos fenólicos, duas subclasses se destacam, os flavonoides e os ácidos fenólicos (LUTHRIA; MUKHOPADHYA; KWANSA, 2006). Estes por sua vez, apresentam características específicas dos vegetais, como o sabor, odor e cor (SOUSA *et al.*, 2007).

Conhecidos como polifenóis naturais, os flavonoides estão presentes na maioria das plantas e em alimentos como frutas, legumes e chás (Figura 2), contribuindo com efeitos benéficos a saúde (GEORGE; DELLAIRE; RUPASINGHE, 2017). Atualmente, são considerados um componente indispensável quando se trata de aplicações nutricionais, farmacêuticas, medicinais e cosméticas, devido sua ampla gama de propriedades funcionais (COIMBRA, 2019).

**Figura 2 – Estrutura química das principais classes de flavonoides encontradas em diferentes fontes naturais de origem vegetal**



Fonte: Active Pharmaceutica (2021)

Na Figura 2, nota-se que a estrutura básica destes compostos consiste em 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos. De acordo com os radicais presentes nesta estrutura química, os flavonoides são classificados em subclasses, são elas: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanois (flavan-3-ols), flavononois, antocianidinas, chalconas e flavanonas (ACTIVE PHARMACEUTICA, 2021).

### **3.2 Plantas alimentícias não convencionais (PANCs)**

Plantas alimentícias por definição são aquelas que possuem uma ou mais partes que podem ser utilizadas na alimentação humana, desde raízes e sementes, frutas e flores, ou ainda látex, resina e goma. E ainda podem ser empregadas na obtenção de óleos e gorduras alimentares. No passado, muitas dessas plantas faziam parte da base alimentar de muitos brasileiros, mas com o passar do tempo tornaram-se desconhecidas e negligenciadas por grande parte da população, devido a uma alimentação básica muito homogênea, monótona e globalizada (KINUPP; LORENZI, 2015), assim como por influência de grandes monoculturas de alto rendimento instauradas no país (LANDIS, 2017).

Como consequência das atividades humanas, diversas espécies da fauna e flora estão em risco de extinção e isso tem contribuído para o declínio da biodiversidade (HOOPER *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que, conforme destaca a Organização das Nações Unidas da Alimentação e Agricultura (FAO, 2019), a biodiversidade do planeta é fundamental para salvaguardar a segurança alimentar global, sustentar dietas saudáveis e nutritivas, melhorar os meios de vida rurais e a resiliência das pessoas e das comunidades. Portanto, a difusão de informações sobre as plantas não convencionais pode ter papel importante na diversificação dos cultivos e na renda dos pequenos ou até mesmo dos grandes produtores.

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs), denominação criada pelo biólogo Valdely Kinupp, podem ser descritas como o conjunto de todas as plantas que possuem uma ou mais categorias de uso alimentício, sendo elas exóticas, nativas, silvestres, espontâneas ou cultivadas. Apesar de serem comuns, não são utilizadas corriqueiramente no dia a dia da maior parte da população (KINUPP; LORENZI, 2015). Em alguns casos, espécies que são consideradas

convencionais em determinada região, podem ser consideradas PANCs em outra, isto ocorre devido a fatores como por exemplo, herança cultural (TERRA; VIERA, 2019).

As PANCs tornaram-se uma alternativa para aumentar a diversidade da dieta e são alvo de interesse de muitos pesquisadores (PASCHOAL; GOUVEIA; SOUZA, 2016; LIBERATO *et al.*, 2019; SANTOS, 2021). De acordo com estudo, quando comparadas a alguns alimentos convencionais, as PANCs são nutricionalmente superiores, contribuindo para uma ingestão diária adequada de vitaminas e minerais essenciais, além de possuírem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e ação terapêutica (LIBERATO; LIMA; SILVA, 2019).

O Brasil é considerado o país com a flora mais rica do mundo (BEECH *et al.*, 2017), com estimativa de que existem aproximadamente 5.000 espécies de PANCs (KINUPP; LORENZI, 2015). Além disso, a flora nativa brasileira detém importantes plantas que em sua composição apresentam compostos bioativos, ativos para medicamentos entre outras moléculas utilizáveis (BIONDO *et al.*, 2018). Contudo, muitas PANCs ainda são desconhecidas por grande parte da população, tanto pela falta de informação quanto pelo sistema agrícola convencional, que está focado em monoculturas (PASCHOAL; GOUVEIA; SOUZA, 2016).

Segundo a literatura, o uso de PANCs no país ocorre nas comunidades tradicionais e por pequenos agricultores que cultivam ampla diversidade de espécies para subsistência (TULER; PEIXOTO; SILVA, 2019). Na maioria das vezes, as PANCs são consumidas in natura, refogadas, em forma de doces, omeletes, dentre outros (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; CREPALDI *et al.*, 2001; KINUPP; BARROS, 2008; MIRANDA; HANAZAKI, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013; PILLA; AMOROZO, 2009). Já nas áreas urbanas, o consumo de PANCs é baixo, principalmente, por falta de acesso, conhecimento e de costume (KINUPP; LORENZI, 2015), ficando condicionado aos produtos comuns encontrados em supermercados (REIS; CLARET; MONTEIRO, 2021).

### 3.2.1 Peixinho da horta (*Stachys byzantina* K. Koch)

Conhecida popularmente como “peixinho da horta, orelha de lebre, lambari de folha ou pulmonária”, a planta *Stachys byzantina* K. Koch (Figura 3), pertence à

família *Lamiaceae* (AZEVEDO, 2018; KINUPP; LORENZI, 2015; BRASIL, 2010). Tem origem na Turquia, Ásia e Cáucaso, no entanto, também pode ser encontrada em regiões de clima ameno, onde as temperaturas variam entre 5 e 30 °C. É uma herbácea perene, que chega a atingir aproximadamente 30 cm de altura e forma touceiras com dezenas de propágulos. É uma planta rústica, com baixas exigências e bastante tolerante ao ataque de pragas e doenças. A colheita das folhas é realizada a partir dos 60-70 dias, conforme elas atingem tamanho superior a 8 cm, podendo alcançar facilmente a 15 cm (KINUPP; LORENZI, 2015; BRASIL, 2010).

**Figura 3 – Canteiro de cultivo da *Stachys byzantina* K. Koch no centro paranaense de referência em agroecologia (CPRA)**



**Fonte: Azevedo (2018, p. 28)**

Considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC) de crescente aplicação na alimentação humana (AZEVEDO, 2018), suas folhas apresentam características como alto teor de proteínas (SILVA *et al.*, 2018), com potencial de aplicação como elemento proteico em dietas livres de produtos animal, como é o caso de dieta vegetariana estrita. Os compostos bioativos encontrados nessa planta são significativos e referem-se ao elevado poder antioxidante e alta quantidade de fenólicos totais (HAJIMEHDIPOOR *et al.*, 2014). É rica em vitamina A e fonte de cálcio, fósforo, ferro, vitamina C, tiamina, riboflavina e niacina (SILVA *et al.*, 2018).

Outro fator importante relacionado a esta espécie é sua atuação na medicina tradicional, onde partes aéreas da planta *Stachys byzantina* são usadas no tratamento de infecções, feridas, asma, disenteria, epilepsia, distúrbios digestivos, resfriado, distúrbios reumáticos e neuropatia (ASNAASHARI *et al.*, 2010; LASHGARGAHI; SHAFAGHAT, 2017). Além disso, estudos mostram atividades biológicas potentes presentes nesta espécie, como por exemplo, anticâncer, anti-inflamatório, antimalária, anti-alzheimer, antiespasmódico e antirreumatóide (TUNDIS; PERUZZI; MENICHINI, 2014).

### 3.3 Métodos de extração

Considerada uma operação unitária, a extração se baseia na transferência de um ou mais componentes de uma matriz, seja ela sólida ou líquida, para uma outra fase fluida por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Em seguida, ocorre a separação da fase fluida e a recuperação dos componentes (DANIELSKI, 2002). Entre os métodos convencionais de extração estão a hidrodestilação, maceração, percolação e Soxhlet (AZMIR *et al.*, 2013; VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2015; WANG; WELLER, 2006).

É importante salientar que a eficiência da extração de qualquer método convencional depende do solvente que será utilizado, sendo que a polaridade do composto alvo é o fator que prevalece na escolha do solvente. Outros fatores como, afinidade molecular entre solvente e soluto, a transferência de massa, o uso de cossolventes, a toxicidade e competitividade econômica, também devem ser levados em consideração (AZMIR *et al.*, 2013).

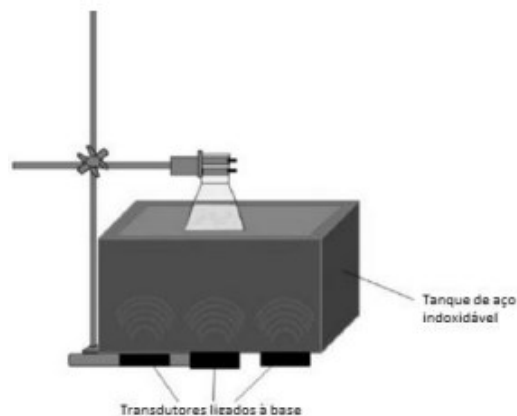
Apesar dos métodos convencionais ainda serem muito empregados em pesquisas, estes apresentam limitações durante o processo de extração. Como por exemplo, baixo rendimento, maior tempo de extração, elevado consumo de solventes que posteriormente serão removidos, gerando maiores gastos de energia, além da presença de resíduos do solvente, ou ainda, ocasionando problemas ambientais com o descarte inadequado desses resíduos (AZMIR *et al.*, 2013; JOVANOVIC *et al.*, 2017; MAZZUTTI, 2012; VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2015).

Sendo assim, métodos não convencionais de extração são introduzidos para suprir tais limitações, dentre eles, o método de extração assistida por banho ultrassônico (AZMIR *et al.*, 2013; VAZQUEZ-ROIG; PICÓ, 2015).

### 3.3.1 Extração por banho ultrassônico

Os processos de extração por ultrassom podem ser empregados em diferentes tipos de equipamentos, um deles é o banho de ultrassom (Figura 4) (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Esta técnica envolve um dispositivo relativamente simples, são mais baratos, e operam em uma frequência de aproximadamente 40 kHz, podendo ser equipados com controles de temperatura (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; CHEMAT *et al.*, 2017).

**Figura 4 – Sistema de extração banho ultrassônico**

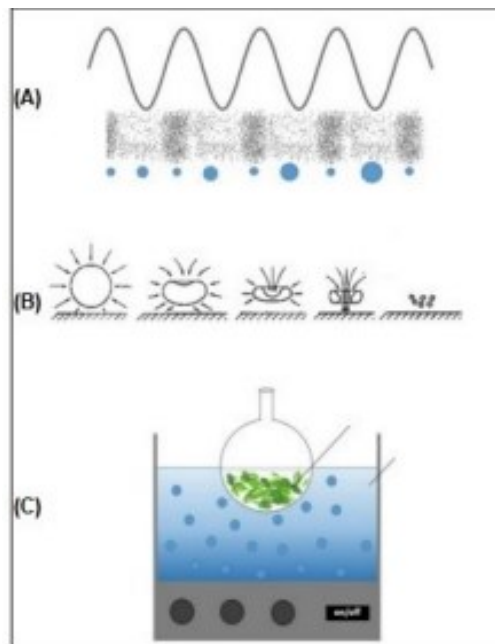


**Fonte: Adaptado de Chemat *et al.* (2017, p. 818)**

De acordo com a literatura, o banho ultrassônico possui um transdutor preso no fundo da cuba do aparelho, que durante o processo emite energia ultrassônica, que se transmite através de um líquido, geralmente água, fazendo com que ocorra um processo de cavitação (SCHNEIDER, 2005). Este fenômeno, denominado de cavitação (Figura 5), que é o ciclo de compressão e expansão, em processo contínuo, formando um ciclo de diferentes pressões e gerando microbolhas que implodem, ocasionando pontos de alta temperatura e pressão, o que facilita o processo. A cavitação das bolhas é maior quando a frequência do equipamento também é maior (MATOS *et al.*, 2009).

A eficiência do banho está relacionada com o meio em que se está inserido. Quando a cavitação de bolhas implode em uma superfície sólida, ocorre a distorção de uma zona de pressão formada a altas velocidades, permitindo que as membranas celulares se rompam, aumentam sua porosidade, e facilitando a transferência de massa no interior da célula (NORA; BORGES, 2017).

**Figura 5 – Processo de cavitação do banho ultrassônico. (A) Formação de bolhas de cavitação; (B) Efeito de cavitação observado no banho ultrassônico; (C) Sistema de extração por banho ultrassônico**



Fonte: Nora; Borges (2017)

O banho ultrassônico oferece algumas vantagens como melhorias no rendimento, extração de compostos bioativos sem prejudicar os efeitos antioxidantes e atividade antimicrobianas, reduz a degradação térmica dos compostos, além, de diminuir o tempo de extração e a quantidade de solvente (NORA; BORGES, 2017). Assim, contribuindo de forma positiva com o meio ambiente por se tratar de uma técnica não convencional ou “tecnologia verde”, considerando-se quase que livre da geração de efluentes, já que muitas vezes, são utilizados solventes verdes (naturais).

### 3.4 Solventes convencionais

Alguns fatores podem influenciar na obtenção dos compostos bioativos, como: o tamanho das partículas, solvente, tempo e temperatura (ALMEIDA *et al.*, 2019; HUANG; YANG; WANG, 2013; SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016). O método convencional consiste na extração sólido-líquido ou líquido-líquido (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016; DUARTE, 2016), utilizando solventes orgânicos tóxicos, como clorofórmio (DEMIR; SERDAR; SÖKMEN, 2015; IAL, 2008; MILEK; MLODECKI; DZUGAN, 2021; NEVES; CALDAS, 2017) e diclorometano (DEMISSIE; WOYESSA; ABEBE, 2016; GEBEYEHU; BIKILA, 2015; SCHNEIDER; HOEHNE, 2014; TORRES *et al.*, 2015). Apesar da facilidade e eficiência deste método utilizando estes solventes, inúmeras são as desvantagens, como por exemplo: geração de resíduos tóxicos, transformação química dos extratos, utilização de solventes que possam prejudicar, a longo prazo, o meio ambiente, necessidade de longo tempo para concluir a extração, grande consumo de solventes e energia (SERDAR *et al.*, 2016; SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016; DUARTE, 2016).

A etapa de extração, é considerada a mais poluente, devido ao uso frequente de solventes orgânicos (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009), que apresentam riscos tanto para quem está manuseando (analista), quanto para o meio ambiente, sendo que estes solventes são prejudiciais para ambos (ARMENTA *et al.*, 2019). Quando descartados inadequadamente, os solventes orgânicos podem gerar danos para a flora e fauna, com liberação de gases poluentes, contaminação de águas, redução da fertilidade do solo e contaminação de alimentos (AMBSCIENCE, 2021).

Visando a minimização dos impactos ambientais relacionados a etapa de extração, surge como alternativa a redução do consumo de solventes, por meio da substituição de solventes orgânicos pelos chamados solventes verdes ou solventes eutéticos profundos, de baixa toxicidade (BUBALO *et al.*, 2016; PACHECO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

### 3.5 Solventes eutéticos profundos naturais (NADES)

Diante do impacto que muitos solventes vêm gerando ao meio ambiente, a “extração verde” tem sido centro das atenções de pesquisadores e indústrias,



devido a descoberta e geração de processos de extração que favorecem a redução do consumo de energia utilizando solventes alternativos ou produtos naturais renováveis. Além de contribuir com o meio ambiente, a tecnologia verde facilita o uso de meios não perigosos, sendo possível controlar propriedades físicas como temperatura e pressão (BUBALO *et al.*, 2016). Sendo assim, os solventes eutéticos profundos naturais têm sido uma alternativa estratégica para substituir os solventes atuais, visando o uso de solventes orgânicos tradicionais (DAI *et al.*, 2013).

Os *Deep Eutectic Solvents* (DES) ou solventes eutéticos profundos naturais (NADES) são considerados uma classe emergente de solventes verdes ou solventes ecológicos, compreendem as misturas de sais de haletos orgânicos como um composto orgânico doador e um aceitador de hidrogênio, tais como: amidas, aminas, álcoois e ácidos carboxílicos, onde ocorre a formação de uma mistura eutética. Essa combinação de compostos tem ponto de fusão inferior aos seus componentes individuais, principalmente devido à geração de ligações de hidrogênio (ABBOTT *et al.*, 2003; ABO-HAMAD *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Os NADES apresentam uma alta viscosidade e na presença de água a viscosidade tende a diminuir. Estes solventes têm influência sobre outras variáveis, tais como temperatura, razão molar e o tipo de composto empregado. A variação na formulação e síntese dos NADES possui grande influência sobre a viscosidade dos NADES devido às ligações de hidrogênio que ocorrem, pois, a estrutura espacial destes possui grande influência sobre a formação e estabilidade das ligações de hidrogênio presentes no NADES (DAI, 2013).

Os NADES ainda possuem alta estabilidade térmica, capacidade de solubilização, volatilidade e pressões de vapor reduzidas e polaridade ajustável, atributos relacionados à sua estrutura supramolecular. Tais características tornam os NADES excelentes solventes para extração de ampla gama de fitoquímicos e candidatos promissores para a substituição dos atuais solventes a base de compostos orgânicos, amplamente difundidos na pesquisa e na indústria (DAI *et al.*, 2013; HANSEN *et al.*, 2020).

Os NADES são de fácil preparo, sendo que o método de preparação mais aplicado se baseia na mistura e aquecimento constante dos constituintes até que um líquido límpido e homogêneo seja formado. Outros métodos de preparação baseiam-se na evaporação a vácuo ou liofilização. Na evaporação, os componentes são misturados e dissolvidos em água, e posteriormente evaporados sob vácuo até

atingir peso constante. No método de liofilização, os componentes também são diluídos em água, e a mistura posteriormente é submetida ao congelamento e, subsequentemente, liofilizadas para formar um líquido límpido e homogêneo (HANSEN *et al.*, 2020, BUBALO *et al.*, 2016).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Do cultivo à colheita

Os canteiros destinados ao plantio das mudas de *Stachys byzantina*, pertencem a horta da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no município de Campo Mourão, Paraná (-24.061773644682166, -52.385236560389735).

O solo dos cinco canteiros foi previamente preparado com adubação a base de húmus de minhoca, composto orgânico oriundo de resíduos de cevada e mistura NPK (nitrogênio, fósforo e potássio). Desta forma seguindo as boas práticas de adubação orgânica, que utiliza elementos obtidos de compostagem, adubação verde e em solos muito degradados sugere o uso de complementação química em baixíssima concentração (PRIMAVESI, 1999).

Posteriormente sessenta mudas de *Stachys byzantina* adquiridas do viveiro Geração, localizado em Maringá/PR, foram divididas e plantadas nos canteiros, com distanciamento de 50 cm x 40 cm entre si (Fotografia 1). A espécie não tolera sol em excesso nem ambientes secos, as mudas então foram protegidas do sol intenso com uso de sombrite 50% e irrigadas diariamente para melhor adaptação climática. O cultivo estendeu-se por oito meses, e posteriormente, realizou-se a colheita das folhas saudáveis da planta.

**Fotografia 1 - Canteiro de *Stachys byzantina* K. Koch, UTFPR - Campo Mourão – PR**



**Fonte: Autoria própria (2020)**

## 4.2 Tratamento da amostra

As folhas de *Stachys byzantina* foram higienizadas em água corrente, dispostas em grelhas e submetidas a secagem em estufa de circulação forçada (Cienlab) (Fotografia 2), em condições de operação de 45°C por um período de oito horas, até que atingir umidade em torno de 11 a 12%, aferida em estufa (Solab). A amostra então, foi homogeneizada e triturada em processador (Philips Walita), e por fim, armazenadas em freezer (Electrolux) a temperatura de -18°C.

**Fotografia 2 - Folhas de *Stachys byzantina* dispostas em bandejas antes (A) e durante (B) a secagem em estufa, respectivamente**



Fonte: Autoria própria (2021)

Uma parte da amostra in natura foi separada, higienizada, secas em temperatura ambiente e cortadas, exclusivamente para a análise centesimal.

## 4.3 Análise centesimal

Todas as análises de composição centesimal seguiram metodologias propostas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) com adaptações.

Amostras secas e in natura foram submetidas as análises em triplicata. As vidrarias necessárias foram previamente higienizadas e secas em estufa (Solab) a 105°C durante o período de 1 h. Na sequência pesou-se a massa especificada pela

metodologia para cada item, e anotou-se para o posterior cálculo de resultados. Todas as pesagens foram realizadas em balança semi-analítica (Bioscale).

#### 4.3.1 Umidade

Para determinação de umidade ou da perda por dessecação, pesou-se em média 2g das folhas triruradas de Stc em cada cadinho de 8,5cm de diâmetro e levou-se diretamente em estufa (Solab) a temperatura de 105°C por períodos de 3h, até a massa de resíduo seco tornar-se constante. Desta forma, a umidade foi calculada pela diferença da massa do cadinho com a amostra antes e depois da secagem.

#### 4.3.2 Cinzas

Para o cálculo de cinzas ou resíduo por incineração, pesou-se em média 2 g de cada amostra em cadinho de 50 mL e levou-se a queima direta em mufla (Omicron) inicialmente na temperatura de 100°C sendo ajustada a cada 1 h até atingir 550°C. As amostras permaneceram na mufla por um período de 4 h até atingir coloração branca, que representa o ponto final da queima. Desta forma, o teor de cinzas foi estimado pela diferença de massa entre o cadinho com a amostra antes e depois da queima.

#### 4.3.3 Proteínas

O método de Kjeldahl para quantificação do teor de proteínas é baseado na decomposição ácida da matéria orgânica presente na amostra e na transformação do nitrogênio residual em amônia, sendo executado em três etapas: digestão, destilação e titulação. Assim, para a primeira etapa, adicionou-se ao tubo digestor 0,1g de cada amostra, 1g de mistura catalítica, além de 5 mL de ácido sulfúrico (Alphatec). As misturas previamente identificadas foram levadas ao bloco digestor (Tecnal) em temperatura inicial de 150°C sendo ajustada a cada 30 min até atingir 400°C, na qual permaneceram por um período de 4 h até atingir coloração azul-esverdeada. Após resfriamento e adição de 10 mL de água destilada, as amostras

seguiram para a etapa de destilação, em destilador de nitrogênio (Solab) com adição de 25 mL de solução NaOH 40% as gotas resultantes da destilação foram recolhidas em erlenmeyer previamente preparado com 15 mL de solução de ácido bórico 4% e 4 gotas de indicador misto (verde bromocresol e vermelho de metila) até o volume de 75 mL e coloração verde. Por fim, as amostras foram tituladas com ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até o ponto de viragem marcado pela mudança de coloração da amostra de verde para rosa claro e o volume gasto anotado.

#### 4.3.4 Lipídeos

Para determinação do teor de lipídeos ou extrato etéreo, utilizou-se aparelho extrator de Soxhlet (Vidrolabor) acoplado de chapa de aquecimento (Fotografia 3).

**Fotografia 3 - Extração contínua de extrato etéreo em aparato soxhlet de amostras de *Stachys byzantina* seca e in natura, respectivamente**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

Desta forma, pesou-se em cartucho soxhlet em média 2 g de cada amostra (in natura e seca), e a extração contínua foi realizada com o uso do solvente apolar éter de petróleo (Vetec), em volume necessário ao refluxo do equipamento e na temperatura de 90°C com vazão constante de 4 gotas por segundo, durante o período de 8 h, ao fim se reservou-se o solvente do processo nos respectivos balões.

Os balões com os produtos da extração seguiram para secagem em evaporador rotativa a vácuo (Solab) em temperatura de 60°C e 3 rpm, e ao fim, os balões foram submetidos a estufa (Solab) a 105°C e pesados a cada 30 min até a

massa permanecer constante. O teor de lipídeos, foi determinado pela diferença de massa entre o balão seco vazio e o balão com o resíduo de extração seco.

#### 4.3.5 Carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens dos teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas. Os valores de carboidratos incluem a fibra alimentar total da amostra.

#### 4.4 Preparo dos solventes eutéticos

As combinações e proporções de doadores e aceitadores de ligação de hidrogênio empregados no preparo dos solventes eutéticos foram otimizadas a partir do trabalho de Zhu *et al.* (2020). Assim, as proporções molares, foram corrigidas de acordo com a relação da razão mássica para uma mistura binária ( $\omega$ ), onde  $\omega_1 + \omega_2 = 1$  Equações 1 e 2.

$$\omega_1 = \frac{(x_1.M_1)}{(x_1.M_1 + x_2.M_2)} \quad (1)$$

$$\omega_2 = \frac{(x_2.M_2)}{(x_2.M_2 + x_1.M_1)} \quad (2)$$

Onde:

$x_1$  e  $x_2$ = porcentagem elemento 1 e 2, respectivamente.

$M_1$  e  $M_2$ = massa molar elemento 1 e 2, respectivamente.

As denominações de cada combinação, a razão molar e mássica, assim como o somatório estão dispostos na Tabela 1.

Os solventes foram preparados seguindo metodologia proposta por Bubalo *et al.* (2016). Em balança analítica (Bioscale), os reagentes de cada uma das cinco combinações foram pesados em frascos reagentes de 50 mL na proporção mássica definida. Na sequência a mistura foi acondicionada em incubadora (Solar) na temperatura de 80°C, com agitação a 100 rpm até que se transforme em uma mistura de única fase, caracterizada pela coloração transparente livre de sólidos visíveis.

**Tabela 1 - Combinações, razão molar e mássica para o preparo dos solventes eutéticos**

Combinação	Aceitador	Doador	Razão molar	$\omega$ aceitador	$\omega$ doador	Soma
CIC – Ala	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:3	0,3407	0,6593	1
CIC – Ale	Cloreto de colina	Ácido levulínico	1:2	0,3755	0,6245	1
CIC – Gli	Cloreto de colina	Glicerol	1:3	0,3357	0,6643	1
LP – Ale	L-Prolina	Ácido levulínico	1:2	0,3315	0,6685	1
CIC – Xil	Cloreto de colina	Xilitol	1:1	0,4785	0,5215	1

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Após preparo, as misturas eutéticas foram resfriadas em temperatura ambiente e devido sua alta viscosidade receberam adição de água destilada, nas proporções de 10, 25 e 50%, totalizando 15 combinações, sendo que adições maiores que 50% podem quebrar o complexo supramolecular de haleto-doador de hidrogênio (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Por fim, foram acondicionados em frascos âmbar, identificados e armazenados em dessecador.

#### 4.5 Método de extração

Em balança analítica (Bioscale), aproximadamente 0,3 g das amostras (folhas de *S. byzantina* secas e trituradas) foram pesadas dentro de tubos de Falcon em triplicata, na sequência receberam adição de 2,5 mL dos solventes (cinco combinações de NADES acrescidos de água nas proporções de 10, 25 e 50% (totalizando 15 combinações) e água destilada e etanol), e foram homogeneizados. Na sequência as amostras foram submetidas a banho ultrassônico (Elma) para obtenção do extrato bruto, na temperatura de 50°C, frequência de 37 Hz, potência de 30 %, durante o período de 5 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada (Hoffmann) por 5 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado do precipitado e reservado.

Novamente adicionou-se 2,5 mL de solvente ao precipitado dentro do mesmo tubo Falcon, e o procedimento de mistura, extração, centrifugação e separação entre o sobrenadante e o precipitado foi repetido. A amostra foi submetida ao processo de extração por duas vezes e os sobrenadantes foram combinados em um único frasco (Fotografia 4), e por fim acondicionados em freezer (Electrolux) a -18°C e protegidos da luz.



**Fotografia 4 - Produto líquido das extrações das folhas de *Stachys byzantina* com solventes convencionais e eutéticos**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

#### **4.6 Atividade in vitro**

Para quantificação da atividade in vitro, cada análise seguiu metodologia com fundamento específico para o composto investigado, conforme descrito a seguir.

##### **4.6.1 Determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

O ensaio colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu descrito inicialmente por Singleton e Rossi (1965), é um dos métodos tradicionais mais empregado na quantificação de fenólicos totais e baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu por compostos redutores presentes na amostra pesquisada (KARAKAYA, 2004).

O reagente Folin-Ciocalteu é constituído pelos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico e apresenta coloração amarela. Desta forma, na presença de compostos fenólicos e em pH alcalino tais ácidos são reduzidos, levando à formação do ânion fenolato. Este por sua vez é capaz de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, ocasionando mudança na coloração do meio reacional da cor amarela para a cor verde. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 760 nm (IKAWA *et al.*, 2003; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

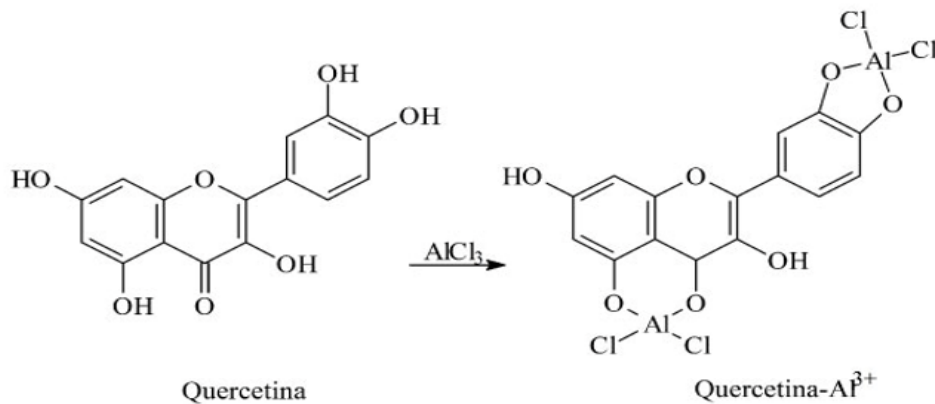
No entanto, a quantificação por esta metodologia não abrange apenas o grupo dos fenólicos, podendo sofrer interferências de outras substâncias tais como

proteínas e açúcares redutores. Sendo necessário análises complementares mais específicas para sua identificação (IKAWA *et al.*, 2003).

#### 4.6.2 Determinação de Flavonoides

O ensaio colorimétrico para quantificação de flavonoides baseia-se na complexação com cloreto de alumínio conforme descrito inicialmente por Markham (1982). É um dos métodos tradicionais mais acessível, prático e de baixo custo. Na reação, o íon alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) complexa-se com as moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonoide- $\text{Al}^{3+}$  (Figura 6) de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides presente na amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda de 510 nm, para que não ocorra interferência de outros compostos fenólicos (PEIXOTO *et al.*, 2012; ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999).

Figura 6 – Formação do complexo estável Quercetina- $\text{Al}^{3+}$



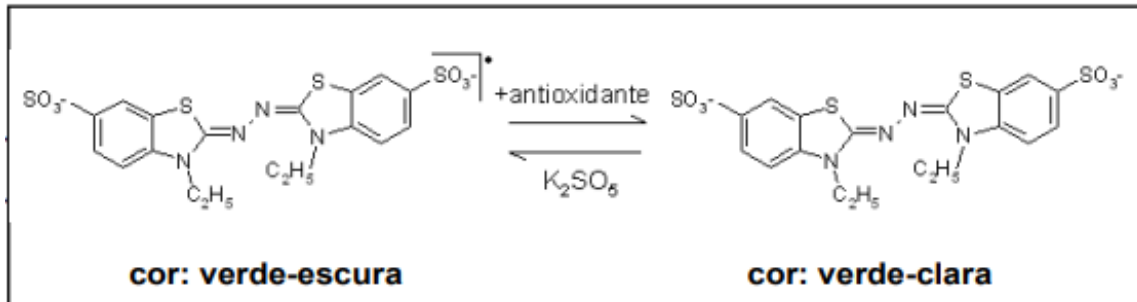
Fonte: Peixoto *et al.* (2012)

#### 4.6.3 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de ABTS<sup>+</sup>

O método de captura do radical orgânico 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), desenvolvido por Miller *et al.* (1993) e modificado por Wang *et al.* (2016), baseia-se na geração do radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  por meio de uma reação química (dióxido de manganês, persulfato de potássio), eletroquímica ou enzimática (peroxidase, mioglobulina). Desta forma pode-se medir a atividade antioxidantes de

compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. Na presença de um antioxidante, ocorre a redução do radical  $ABTS^{+\bullet}$  a  $ABTS$ , ocasionando perda de coloração do meio reacional, permitindo assim leitura por espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda de 645, 734 e 815 nm (Figura 7) (RE *et al.*, 1999; RUFINO *et al.*, 2007).

Figura 7 - Estabilização do radical  $ABTS^{+\bullet}$

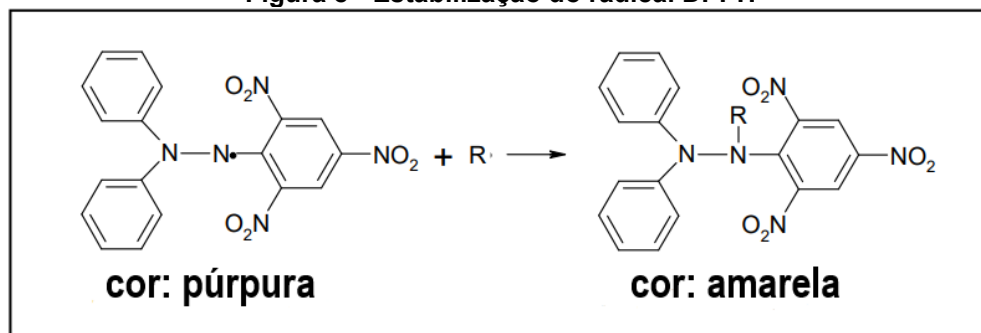


Fonte: Rufino *et al.* (2007a)

#### 4.6.4 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito primeiramente por Blois (1958) e modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), baseia-se na captura do radical orgânico livre do DPPH por ação de antioxidantes, ocasionando mudança de coloração no meio reacional da cor púrpura para cor amarela, o que caracteriza a redução do radical e formação do composto difenil-picril-hidrazina. Desta forma podendo ser quantificado por espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm (Figura 8).

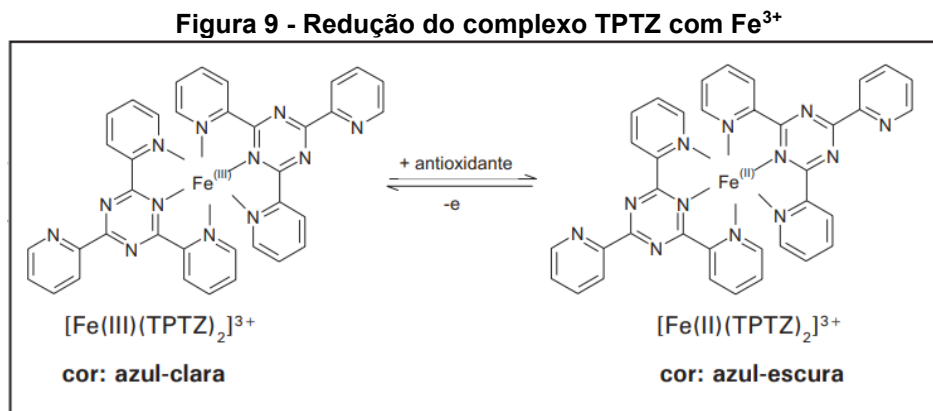
Figura 8 - Estabilização do radical DPPH



Fonte: Adaptado de Rufino *et al.* (2007b)

#### 4.6.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP<sup>+</sup>

O método FRAP do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power* com tradução para Poder Antioxidante de Redução do Ferro, descrito inicialmente por Benzie e Strain (1996) e modificado por Wong *et al.* (2006), baseia-se na produção do íon  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do íon  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Assim, na presença de um antioxidante e em condições ácidas, ocorre aumento da tonalidade da mistura reacional, de azul claro para um tom azul escuro intenso (Figura 9), permitindo leitura por espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 595 nm.



Fonte: Rufino *et al.* (2006)

Deste modo, foram realizadas curvas de calibrações com padrões analíticos para quantificação de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante. As análises empregadas neste estudo foram realizadas em ambiente escuro (dentro de tubos de 10 mL protegidos com papel alumínio e tampa), em triplicata e com precisão de pipetas automáticas. Entre todas as adições, as misturas foram agitadas em vortex (Biomixer). Assim as curvas de calibração e a análise de cada extrato, seguiram técnicas descritas por metodologias adaptadas, conforme demonstrado na Tabela 2. As leituras de absorbâncias ocorreram em espectrofotômetro Uv-Vis (Global Analyzer).

Tabela 2 – Resumo do preparo das curvas de calibração e análises da amostra

Análise	Padrão e marca	Concentração da curva	Técnica aplicada
<b>Fenólicos totais</b> <sup>(1)</sup>	Ácido gálico (Sigma)	1500 mg.l <sup>-1</sup>	30 µL de cada amostra + 2370 µL de água destilada + 150 µL de folin-ciocalteu (5 min) + 450 µL de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 15%. Leitura após 2 horas em 765 nm.
<b>Flavonoides</b> <sup>(2)</sup>	Quercetina (Sigma)	1000 mg.l <sup>-1</sup>	250 µL de cada amostra + 1000 µL de água destilada + 75 µL de NaNO <sub>2</sub> (5 minutos) + 75 µL de AlCl <sub>3</sub> 10% (5 minutos) + 500 µL de NaOH 1 mol/L. Leitura imediata em 510 nm.
<b>ABTS</b> <sup>+</sup> <sup>(3)</sup>	ABTS <sup>+</sup> (Sigma)	1500 µmol.l <sup>-1</sup>	30 µL de de cada amostra + 3,0 mL de solução do radical ABTS <sup>+</sup> . Leitura após 6 minutos em 734 nm.
<b>DPPH</b> <sup>(4)</sup>	DPPH (Sigma)	1500 µmol.l <sup>-1</sup>	2,5 mL de cada amostra + 1,0 mL de solução de DPPH. Leitura após 2 horas em 515 nm.
<b>FRAP</b> <sup>(5)</sup>	TPTZ (Sigma)	1500 µmol.l <sup>-1</sup>	90 µL de cada amostra + 270 µL de água destilada + 2,7 mL de reagente FRAP. Leitura após 30 minutos de incubação à 37°C, em 595 nm.

Fonte: Brand-Williams<sup>(4)</sup>; Cuvelier; Berset (1995); Singleton; Orthofer; Lamuela-raventós (1999) <sup>(1)</sup>; Wang *et al.* (2016) <sup>(3)</sup>; Wong *et al.* (2006) <sup>(5)</sup>; Zhishen; Mengcheng; Jianming (1999) <sup>(2)</sup>

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição centesimal

Os resultados obtidos nas análises de composição centesimal estão expostos em porcentagem na Tabela 3.

As folhas in natura apresentam alto teor de umidade (79,81%), característica que contribui positivamente para as suas propriedades sensoriais. Azevedo (2018) relatou em seu estudo valores semelhantes (78,22%) ao encontrado nesse estudo para a espécie.

Em teor de cinzas, o presente estudo encontrou 1,51 e 6,83% para as folhas in natura e seca, respectivamente, semelhante ao encontrado por Azevedo (2018) para a espécie. Esse teor supera o da alface 0,07%, que é uma hortaliça tradicional muito consumida no país (COSTA; SOUZA, 2017).

O teor de proteínas para as folhas in natura 4,69% foi semelhante ao encontrado por Azevedo (2018) para espécie que foi de 4,75%. Já a amostra seca

obteve 11,86% valor inferior ao obtido pelo autor para amostra liofilizada 19,22%, essa diferença pode ser diferente devido a maior eficiência do método de secagem por liofilização em relação a secagem em estufa. Esse teor é superior ao valor observado nas folhas de outras plantas da mesma família *Lamiaceae* (TUNÇTÜRK; ERYIĞIT; KAYA, 2017). Outra PANC, a *Moringa Oleífera* apresenta teor superior a peixinho (20,66%) (FINK *et al.*, 2018).

**Tabela 3 – Composição centesimal das folhas de *Stachys byzantina* in natura e seca.**

<b>Componentes</b>	<b>In natura</b>	<b>Seca</b>
Umidade (%)	79,81	12,58
Cinzas (%)	1,51	6,83
Proteínas (%)	4,69	11,86
Lipídeos (%)	0,71	2,13
Carboidratos (%)	13,28	66,60

**Fonte: Autoria própria (2021)**

O percentual de lipídeos foi de 0,71 e 2,13% para as amostras in natura e seca, respectivamente, valores similares aos encontrados por Azevedo (2018), 0,75 e 3,14 para amostra in natura e liofilizada, respectivamente.

Os carboidratos na amostra seca representam 66,6% sendo o componente majoritário da planta, que já é conhecida por ser fibrosa. Fink *et al.*, (2018) relataram em seu estudo que a também PANC *Moringa Oleífera*, possui 46,78% de fibras, sendo este bem próximo do valor encontrado nesse estudo para a PANC *Stachys byzantina*.

## **5.2 Avaliação in vitro da recuperação de compostos bioativos**

Os resultados das análises de quantificação de fenólicos totais e flavonoides foram obtidos por meio das curvas de calibração descritas, pelas seguintes equações da reta  $y = 0,0525x + 0,0314$  com  $R^2 = 0,992$  para o padrão ácido gálico (AG) e  $y = 0,137x + 0,0516$  com  $R^2 = 0,998$  para o padrão quercetina (Q). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca ( $\text{mg EAG.g}^{-1}$ ) e miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra seca ( $\text{mg EQ.g}^{-1}$ ), respectivamente. Os resultados foram apresentados

como média  $\pm$  desvio padrão, submetidos à análise de variância entre a água, etanol e os NADES, e segundo o teste de Tukey testou-se a hipótese de que todas as médias das variáveis das amostras sejam iguais ou pelo menos uma das médias seja diferente das demais. As concentrações obtidas tais como as médias e seus respectivos desvios podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Médias e desvios-padrões para a extração de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de *Stachys byzantina***

<b>Solventes</b>	<b>Fenólicos totais (mg EAG.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Flavonoides totais (mg EQ.g<sup>-1</sup>)</b>
Água	0,380 <sup>efg</sup> $\pm$ 0,005	0,030 <sup>d</sup> $\pm$ 0,016
Etanol	0,530 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,030	0,759 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,504
CIC-ALa-10%	0,609 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,022	0,676 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,071
CIC-ALa-25%	0,486 <sup>cdef</sup> $\pm$ 0,029	0,498 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,036
CIC-ALa-50%	0,657 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,023	0,736 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,029
CIC-ALe-10%	0,493 <sup>cdef</sup> $\pm$ 0,044	0,534 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,080
CIC-ALe-25%	0,435 <sup>def</sup> $\pm$ 0,003	0,604 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,031
<b>CIC-ALe-50%</b>	<b>0,766<sup>a</sup><math>\pm</math>0,057</b>	<b>1,162<sup>a</sup><math>\pm</math>0,159</b>
CIC-Gli-10%	0,293 <sup>fg</sup> $\pm$ 0,037	0,229 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,028
CIC-Gli-25%	0,355 <sup>efg</sup> $\pm$ 0,027	0,101 <sup>cd</sup> $\pm$ 0,034
CIC-Gli-50%	0,446 <sup>def</sup> $\pm$ 0,005	0,445 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,097
LP-ALe-10%	0,660 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,005	0,456 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,072
LP-ALe-25%	0,740 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,011	0,762 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,024
<b>LP-ALe-50%</b>	<b>0,811<sup>a</sup><math>\pm</math>0,032</b>	<b>0,898<sup>ab</sup><math>\pm</math>0,086</b>
CIC-Xil-10%	0,618 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,122	0,126 <sup>cd</sup> $\pm$ 0,014
CIC-Xil-25%	0,199 <sup>g</sup> $\pm$ 0,025	0,147 <sup>cd</sup> $\pm$ 0,022
CIC-Xil- 50%	0,308 <sup>fg</sup> $\pm$ 0,022	0,380 <sup>b</sup> $\pm$ 0,002

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Analisando-se na Tabela 4 para as médias de recuperação de fenólicos totais, é possível observar que o maior teor é obtido pelas combinações LP-Ale-50% (0,811 $\pm$ 0,032 mg EAG.g<sup>-1</sup> peso) e CIC-Ale-50% (0,766 $\pm$ 0,057 mg EAG.g<sup>-1</sup> peso), e o menor teor de recuperação foi dado pela combinação CIC-Xil-25% (0,199 $\pm$ 0,025 mg EAG.g<sup>-1</sup> peso). Ao comparar-se os dois melhores extratos obtidos por via de NADES

com os solventes convencionais (água e etanol) obteve-se diferença significativa, o que evidência melhor ou igual capacidade de recuperação de compostos fenólicos.

As combinações CIC-ALa-10%, CIC-ALa-50%, CIC-ALe-50%, LP-ALe-10%, LP-ALe-25%, LP-ALe-50% e CIC-Xil-10% igualaram-se ou superaram o poder de extração de fenóis dos solventes convencionais água e etanol.

Os resultados descritos anteriormente indicam que para ambas as análises, as combinações CIC-Ala, CIC-Ale e LP-Ale destacaram-se na recuperação destes fitoquímicos, e assim sendo, essas três combinações adicionadas de 10, 25 e 50% de água foram selecionadas para realizar os experimentos subsequentes.

Deste modo, as análises de fenólicos e flavonoides foram repetidas e uma série de ensaios antioxidantes foram realizados nas combinações CIC-Ala, CIC-Ale e LP-Ale e, os resultados destas (DPPH, ABTS e FRAP), foram obtidos por meio das curvas de calibração descritas, e pelas seguintes equações da reta (todas com padrão Trolox),  $y = -0,104x + 0,808$  com  $R^2=0,999$ ,  $y = -0,166x + 0,87$  com  $R^2= 0,992$  e  $y = 0,000797x + 0,00885$  com  $R^2= 1$ , respectivamente. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de trolox por grama de amostra seca (mg ET.g<sup>-1</sup>), e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância entre os solventes água, etanol, CIC - Ala, CIC - Ale e LP - AL e segundo o teste de Tukey considerando testar novamente a hipótese de que todas as médias das variáveis das amostras sejam iguais ou pelo menos uma das médias seja diferente das demais. Todos os efeitos do modelo foram assumidos como fixos (compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, ABTS e FRAP) e um termo foi adicionado em função da triplicata realizada nas medidas, conforme Equação 3. O teste de Tukey foi utilizado quando foram encontrados efeitos significativos entre os solventes com nível de significância  $p < 0,05$ . Os termos não significativos foram eliminados do modelo. As análises foram realizadas empregando-se o *software Statistica 12.0*.

$$Y_i = \mu + F_i + e_{ijk}, \quad (3)$$

Onde:

$\mu$  = média da população;



$F$  = efeito fixo das variáveis resposta sendo  $i$  = baixo; intermediário ou alto

$e_{ijk}$  = erro do modelo.

As concentrações obtidas tais como as médias e seus respectivos desvios podem ser observados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Médias e desvios-padrões para a extração de compostos fenólicos, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP em solventes**

Solventes	Fenólicos totais (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	Flavonoides totais (mg EQ.g <sup>-1</sup> )	DPPH (μmol ET.g <sup>-1</sup> )	ABTS (μmol ET.g <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol ET.g <sup>-1</sup> )
Água	0,380 <sup>g</sup> ±0,005	0,030 <sup>b</sup> ±0,016	2,638 <sup>bcd</sup> ±0,042	0,451 <sup>e</sup> ±0,069	164,015 <sup>bcd</sup> ±3,845
Etanol	0,530 <sup>def</sup> ±0,030	0,759 <sup>ab</sup> ±0,504	2,818 <sup>b</sup> ±0,015	0,420 <sup>e</sup> ±0,115	139,319 <sup>cd</sup> ±34,221
CIC - ALa - 10%	0,609 <sup>cde</sup> ±0,022	0,676 <sup>ab</sup> ±0,071	2,715 <sup>bc</sup> ±0,033	0,456 <sup>e</sup> ±0,029	123,403 <sup>cd</sup> ±10,806
CIC - ALa - 25%	0,486 <sup>efg</sup> ±0,029	0,498 <sup>ab</sup> ±0,036	2,632 <sup>bcd</sup> ±0,029	0,762 <sup>e</sup> ±0,074	227,752 <sup>abc</sup> ±19,725
CIC - ALa - 50%	0,657 <sup>bcd</sup> ±0,023	0,736 <sup>ab</sup> ±0,029	2,556 <sup>cd</sup> ±0,018	0,942 <sup>de</sup> ±0,039	<b>299,156<sup>a</sup>±7,268</b>
CIC - ALe - 10%	0,493 <sup>efg</sup> ±0,044	0,534 <sup>ab</sup> ±0,080	2,793 <sup>bc</sup> ±0,040	0,854 <sup>e</sup> ±0,061	124,786 <sup>cd</sup> ±10,829
CIC - ALe - 25%	0,435 <sup>fg</sup> ±0,003	0,604 <sup>ab</sup> ±0,031	2,675 <sup>bc</sup> ±0,005	1,098 <sup>bcd</sup> ±0,060	168,451 <sup>bcd</sup> ±16,463
CIC - ALe - 50%	0,766 <sup>ab</sup> ±0,057	<b>1,162<sup>a</sup>±0,159</b>	2,391 <sup>de</sup> ±0,087	1,755 <sup>abc</sup> ±0,169	<b>285,274<sup>a</sup>±40,161</b>
LP - ALe - 10%	0,660 <sup>bcd</sup> ±0,005	0,456 <sup>ab</sup> ±0,072	2,273 <sup>e</sup> ±0,083	1,923 <sup>ab</sup> ±0,042	100,376 <sup>d</sup> ±16,162
LP - ALe - 25%	0,740 <sup>abc</sup> ±0,011	0,762 <sup>ab</sup> ±0,024	1,867 <sup>f</sup> ±0,050	1,848 <sup>ab</sup> ±0,263	115,653 <sup>d</sup> ±22,270
LP - ALe - 50%	<b>0,811<sup>a</sup>±0,032</b>	<b>0,898<sup>a</sup>±0,086</b>	<b>6,706<sup>a</sup>±0,076</b>	<b>2,159<sup>a</sup>±0,465</b>	254,698 <sup>ab</sup> ±29,658

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

**Fonte: Autoria própria (2021)**

A Tabela 5 apresenta as médias resultantes das análises dos extratos, empregando-se cinco tipos de solventes dentre estas três combinações de solventes eutéticos otimizados nas proporções de adição de água de 10, 25 e 50%, assim, é possível observar que no global, três combinações (CIC - ALa - 50%, CIC - ALe - 50% e LP - ALe - 50%) destacaram-se e obtiveram diferença significativa sobre as demais, porém quantitativamente a combinação LP - ALe - 50% obteve êxito em maior número de análises.

Analisando os testes de forma individual, nota-se que as médias para a recuperação de compostos fenólicos, relatam que a maior quantidade do composto foi obtida com a extração de solvente LP-Ale-50% (0,811±0,032 mg EAG.g<sup>-1</sup>) e a

menor quantidade também com a extração à base de água ( $0,380 \pm 0,005$  mg EAG.g<sup>-1</sup>). Ainda, em comparação ao etanol o solvente LP-Ale-50% recuperou 65% mais fenólicos.

Azevedo (2018) em seu estudo utilizando solventes convencionais (metanol, água e acetona) e igualmente extraído por ultrassom, relataram teores de fenólicos  $0,439$  mg EAG.g<sup>-1</sup> peso seco. No presente estudo, apenas a extração a base de água ficou abaixo do obtido pelo autor, as demais alcançaram teores iguais ou superiores, comprovando a superioridade dos NADES. Roman *et al.* (2015) em seu estudo sobre a *Salvia officinalis* L. que também pertence a família *Lamiaceae*, obtiveram  $309,0 \pm 3,0$  mg EAG.g<sup>-1</sup> utilizando água como solvente, valor semelhante ao desse estudo para o mesmo solvente ( $0,380 \pm 0,005$  mg EAG.g<sup>-1</sup>).

Já para flavonoides totais é possível observar na Tabela 5, que a maior concentração de compostos foi obtida com o solvente CIC-ALe-50% ( $1,162 \pm 0,159$  mg EQ.g<sup>-1</sup>) que apesar dos valores, não diferiu significativamente da extração com a combinação LP-ALe-50% ( $0,898 \pm 0,086$  mg EQ.g<sup>-1</sup>). Ainda se observa que o menor valor também foi encontrado na extração à base de água ( $0,030 \pm 0,016$  mg EQ.g<sup>-1</sup>). Nesta análise, nenhum dos extratos obteve diferença significativa quando comparado ao etanol, que alcançou o valor de  $0,759 \pm 0,054$  mg EQ.g<sup>-1</sup>.

Silva *et al.* (2017) investigaram o teor de flavonoides da *Melissa officinalis* também pertencente à família *Laminaceae* e encontraram valores de  $0,228$  mg EQ.g<sup>-1</sup> de folhas secas, dentre as combinações otimizadas nesse estudo, somente a extração a base de água teve menor rendimento, ressaltando novamente o poder de extração dos NADES.

Com as parcelas DPPH, ABTS e FRAP, que tratam da atividade antioxidante, as análises de DPPH e ABTS alcançaram maiores teores de inibição de seus radicais com as extrações realizadas com o solvente LP-ALe-50% ( $6,706 \pm 0,076$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup> e  $2,159 \pm 0,465$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup>, respectivamente). Para a parcela FRAP, as médias entre os solventes CIC-Ala-50% ( $299,156 \pm 7,268$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup>) e CIC-ALe-50% ( $285,274 \pm 40,161$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup>) destacaram-se e não diferiram significativamente entre si.

Os valores para inibição dos radicais de DPPH neste estudo variaram entre  $1,867$  e  $6,706$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup>, sendo a maior inibição obtida com a combinação LP-Ale-50% e a menor com LP-Ale-25%.

Os valores para inibição dos radicais de ABTS neste estudo, variaram entre  $0,420$  e  $2,159$   $\mu$ mol ET.g<sup>-1</sup>, sendo a maior inibição obtida com a combinação LP-Ale-50% e a menor com o etanol. A literatura apresenta valores de eliminação dos

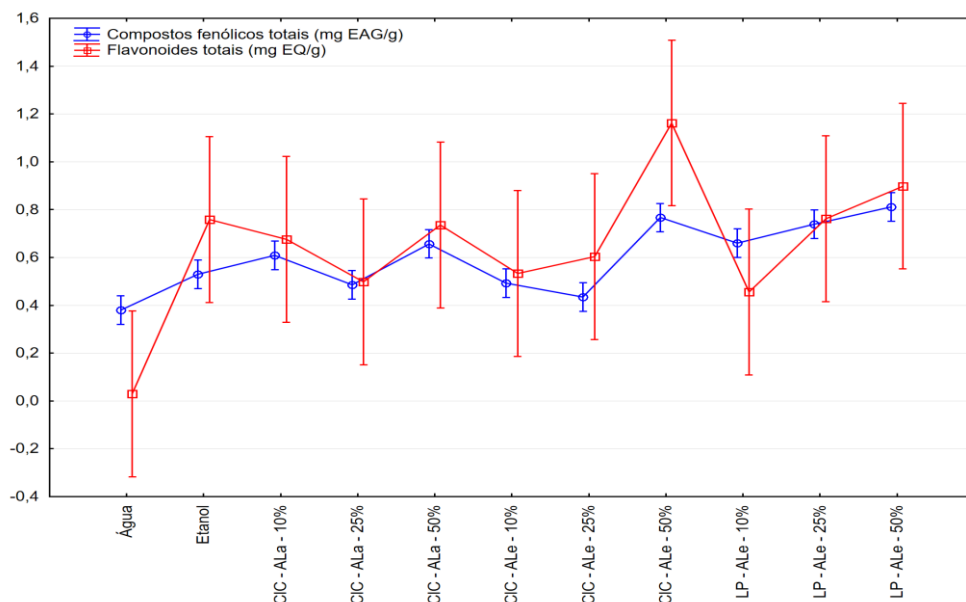
radicais de ABTS superiores aos obtidos nesse estudo para a mesma espécie ( $214,05 \pm 10,34 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$ ) (AZEVEDO, 2018).

O poder de redução férrica nesse estudo variou entre 100,376 e 299,156  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$ , sendo esses valores associados as combinações CIC-Ala-50% e LP-Ale-10%, respectivamente. Hajimehdipoor *et al.* (2014) ao estudar a *Stachys byzantina*, utilizando metanol como solvente, obtiveram 186,8  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  fato que ressalta novamente a superioridade dos NADES. E ainda, Hmidani *et al.* (2021) pesquisaram três espécies da família *Lamiaceae* quanto a atividade antioxidante pelo método FRAP, utilizando água destilada em incubadora de agitação orbital como solvente e encontrou valores de 477,82  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para a *Origanum majorana*, 226,82  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para a *Lavandula officinalis* e 172,84  $\mu\text{mol ET.g}^{-1}$  para *Ocimum basilicum*, as diferenças podem estar relacionadas ao tratamento da amostra, método de extração e tipo de solvente.

No presente estudo, somente as melhores combinações se aproximaram para os dados relatados pela literatura sobre a mesma família.

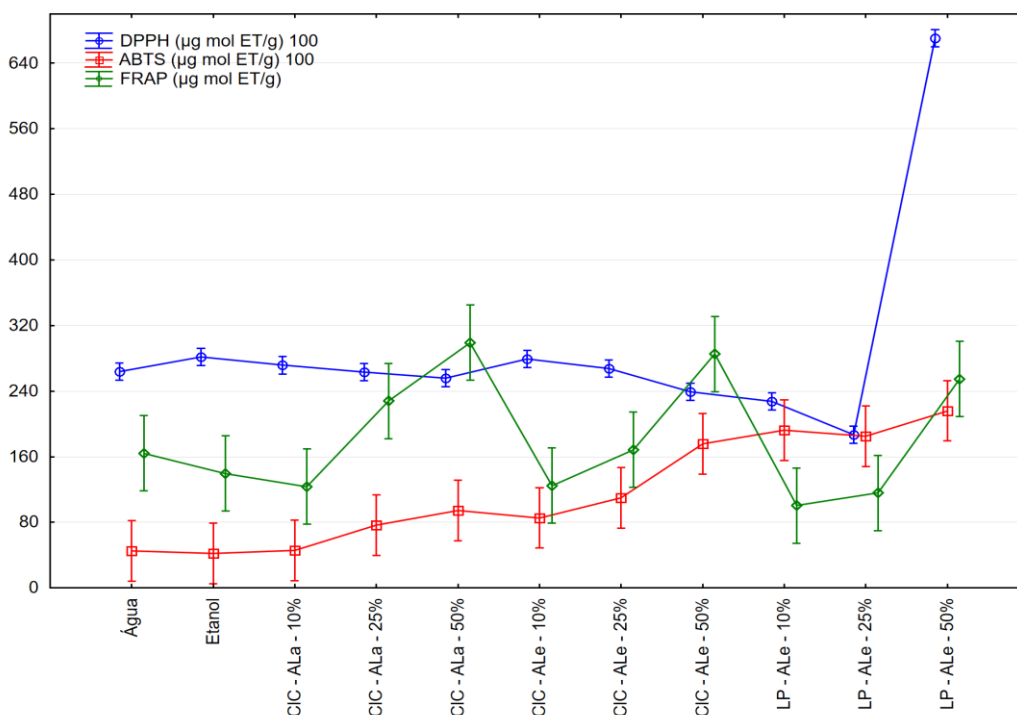
As médias e os respectivos desvios das análises *in vitro* apresentados na Tabela 5, podem ser mais bem observados nos gráficos 1 e 2.

**Gráfico 1 – Recuperação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais**



Fonte: Autoria própria (2021)

Gráfico 2 – Atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP



Fonte: Autoria própria (2021)

Tendo que as extrações foram realizadas com NADES contendo diferentes teores de adição de água (10, 25 e 50%) com intuito de reduzir a viscosidade, que é uma das características mais problemáticas na aplicação dos NADES como solvente (DAI *et al.*, 2013), nota-se nos gráficos 1 e 2, que a adição de água impactou de forma positiva as análises de fenólicos, flavonoides, ABTS e FRAP, pois as combinações acrescidas de 50% de água obtiveram teores maiores, quando comparados com a mesma combinação com 10 ou 25% de água para a maioria das amostras.

Bubalo *et al.* (2016) em seu estudo, relataram que a estrutura dos NADES determina suas propriedades físico-químicas e que a adição de água influencia na eficiência de extração de compostos bioativos, também concluíram que os maiores teores de recuperação de compostos fenólicos são obtidos com adição de água na proporção de 50%.

Nesse estudo, ao comparar os solventes convencionais utilizados para a recuperação de fenólicos e flavonoides, com as combinações de NADES acrescidas de 50% igualaram-se ou superaram os mesmos. Dentre as análises de antioxidantes a mesma tendência se manteve.

Os resultados obtidos até aqui seguiram para avaliação para identificar o solvente ideal, considerando que os modelos foram significativos e tiveram um bom ajuste, foi realizada a análise da função desejabilidade (Equação 4). O processo de otimização simultânea é reduzido à simples tarefa de se calcular os níveis das variáveis que maximizem a desejabilidade global.

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{se } y_i(x) < L_i \\ \left[ \frac{U_i - y_i(x)}{U_i - L_i} \right]^t & \\ 0 & \text{se } y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (4)$$

Onde:

$y_i$  é a resposta obtida para a variável estudada;

$d_i(y_i)$  é a desejabilidade individual da resposta  $y_i$ ;

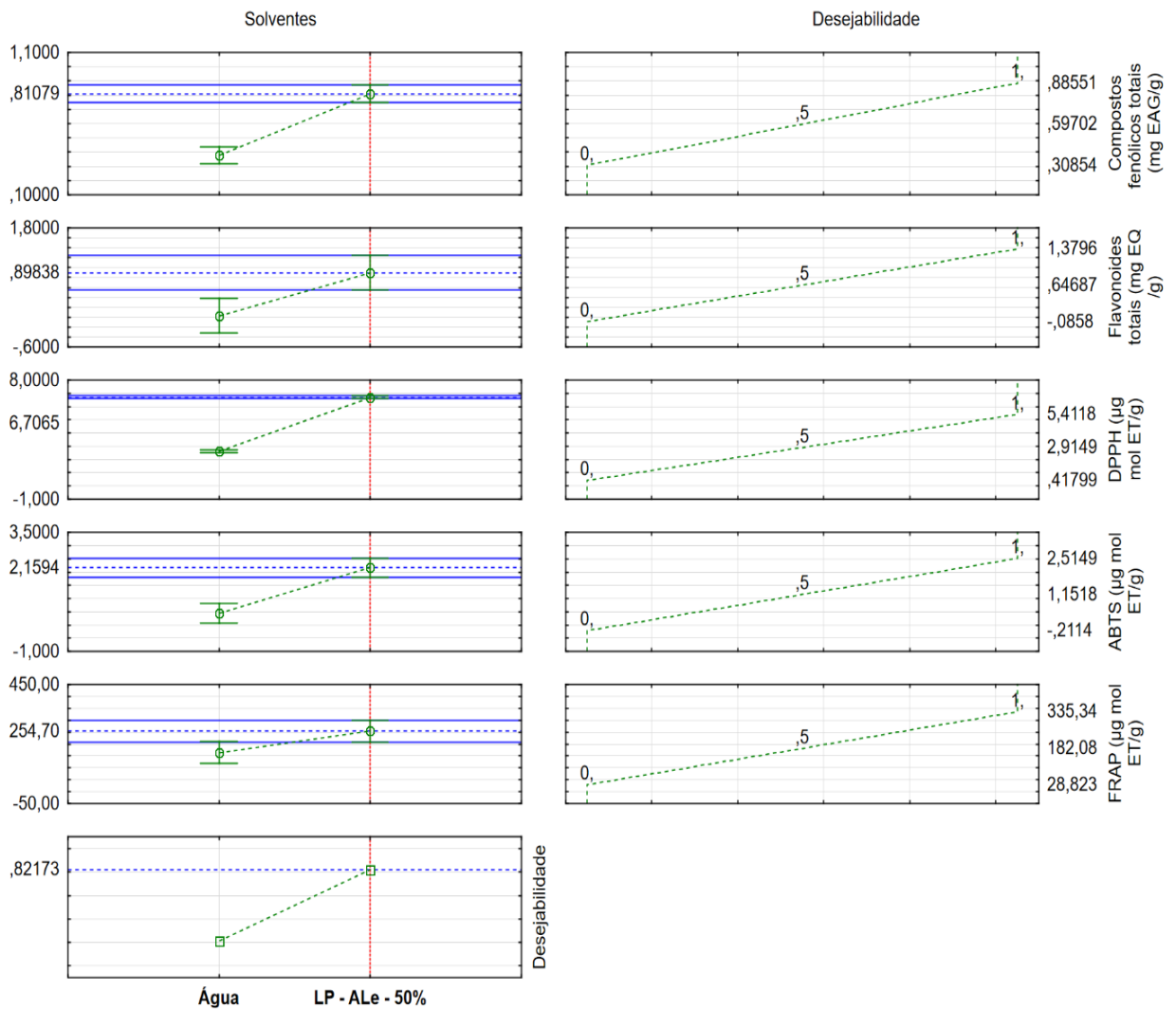
$U_i$  é o maior valor aceitável adotado para a resposta;

$L_i$  é o menor valor aceitável adotado para a resposta;

$t$  é fator que determina o quão é desejável  $y_i$  ser próximo do mínimo, variando de 0 a 1.

Deste modo, a Figura 10 apresenta o solvente LP - ALe - 50% com sendo o solvente ideal (82,17%) para valores desejáveis correspondentes a uma extração de 0,811 mg EAG.g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos totais, 0,898 mg EQ.g<sup>-1</sup> de flavonoides totais e, na atividade antioxidante, 6,707 µmol ET.g<sup>-1</sup> para DPPH, 2,159 µmol ET.g<sup>-1</sup> para ABTS e 254,70 µmol ET.g<sup>-1</sup> para FRAP.

**Figura 10 - Função desejabilidade para definição do melhor solvente**



Fonte: Autoria própria (2021)

Por fim, no intuito de avaliar os resultados apresentados pela Anova, e corroborar a função desejabilidade, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), considerando as análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, ABTS e FRAP. Na Figura 11, em que foram feitas observações para as amostras a primeira (PC1) e a segunda (PC2) componentes explicaram 74,55% do total de variação. A componente principal 1 (PC1) capturou 55,84% da variância, enquanto o componente principal 2 (PC2) 18,71%. Na Análise de Componentes Principais (PCA), as variáveis são representadas como vetores, que caracterizam as amostras relativas a eles. Quanto mais longo o vetor, maior a explicação da variabilidade entre amostras e os valores obtidos pela correlação de Pearson confirmam a relação entre os parâmetros observados na análise de componentes

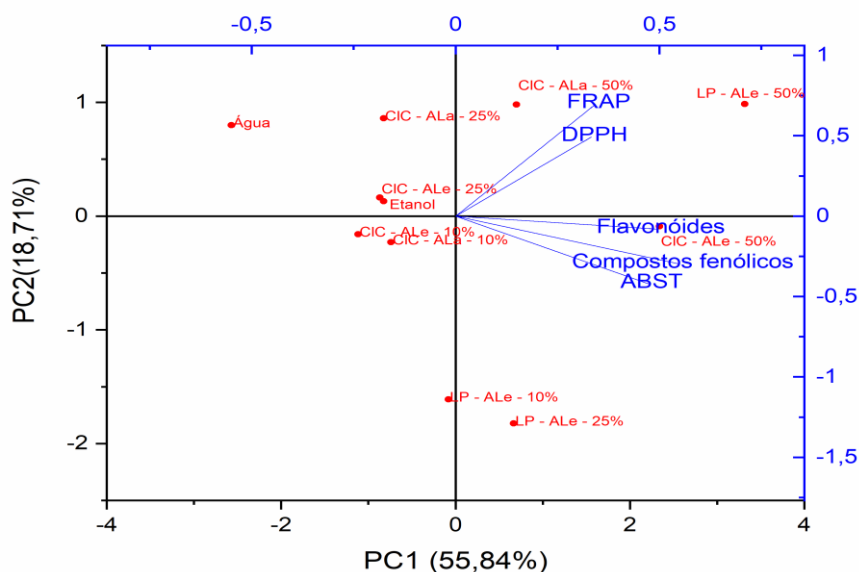
principais (Tabela 6), demonstrando relações entre algumas das variáveis estudadas. Os compostos fenólicos (0,54953), e flavonoides (0,49522) e o ABST se relacionaram positivamente na primeira componente principal (PC1). O DPPH (0,49204) e o FRAP (0,69669) se relacionaram positivamente na segunda componente principal. Na Figura 11 também é possível verificar que o solvente que contribuiu para uma melhor extração foi o LP - ALe - 50%, seguido pelo CIC - Ale - 50% e CIC Ala - 50%, corroborando as informações apresentadas pela Tabela 5 e pela Figura 10.

**Tabela 6 - Correlações (coeficientes de correlação de Pearson) entre os parâmetros físico-químicos e os dois primeiros componentes principais**

Parâmetros	Componente Principal	
	PC1 (r)	PC2 (r)
DPPH	0,33307	0,49204
ABST	0,47350	-0,42125
FRAP	0,34299	0,69669
Flavonoides	0,49522	-0,0804
Compostos fenólicos	0,54953	-0,29766

Fonte: Autoria própria (2021)

**Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) para a avaliação dos solventes empregados**



Fonte: Autoria própria (2021)

Deste modo ao fim das avaliações, a combinação LP-Ale-50% foi eleita como a melhor na recuperação de uma gama de compostos fitoquímicos, seguida pelas combinações CIC-Ale-50% e CIC-Ala-50%. Tais combinações corroboram a eficácia da redução de custo, adicionando água aos solventes.

Os resultados alcançados neste estudo confirmam que os NADES são uma excelente opção para substituição dos solventes convencionais, pois estes, são capazes de alcançarem teores maiores do que os citados pela literatura, com a vantagem de serem solventes verdes, e assim, podem ser utilizados para fins alimentícios e farmacológicos.



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados evidenciam a espécie como uma ótima fonte de antioxidantes pois os extratos de modo geral demonstraram possuir uma ampla gama de fitoquímicos, o que evidencia potencial para novos estudos, em especial a aplicação desses em matrizes alimentícias.

Os solventes eutéticos profundos naturais demonstram potencial superior a solventes convencionais empregados neste estudo e relatados na literatura, para a espécie *Stachys byzantina*, em teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Ainda, os NADES são solventes verdes e possuem características atóxicas, possibilitando assim seu uso para obtenção de extratos com segurança, essa relacionada ao manipulador e a aplicação em produtos na indústria de alimentos e farmacológica.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, n. 1, p. 70-71, 2003. Disponível em: [https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2003/cc/b210714g?casa\\_token=EkIZefCNrdQAAAAA:M7J-H3FQwEMiGe4e7t4mYM-9gduUc6zYj0sc4Szsg6GZvqJu6t1iJ-oGtCj1LcNNleM1m-et8nHUj\\_w](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2003/cc/b210714g?casa_token=EkIZefCNrdQAAAAA:M7J-H3FQwEMiGe4e7t4mYM-9gduUc6zYj0sc4Szsg6GZvqJu6t1iJ-oGtCj1LcNNleM1m-et8nHUj_w). Acesso em: 11 nov. 2021.
- ABDENNACER, B.; KARIM, M.; YASSINE, M.; NESRINE, R.; MOUNA, D.; MOHAMED, B. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of metanol extracts obtained from the fruit and leaves of *Tunisian Lycium intricatum* Boiss. **Food Chemistry**, v. 174, p. 577-584, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614018433>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- ABO-HAMAD, A.; HAYYAN, A. M.; ALSAADI, M. A.; HASHIM, M. A. Potenciais aplicações de solventes eutéticos profundos em nanotecnologia. **Chemical Engineering Journal**, v. 273, p. 551-567, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894715004076>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- ACTIVE PHARMACEUTICA. **Flavonoides e seus efeitos benéficos sobre a imunidade**. 2021. Disponível em: <https://www.activepharmaceutica.com.br/blog/flavonoides-e-seus-efeitos-beneficos-sobre-a-imunidade>. Acesso em: 25 de out. 2021.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signal Behav**, v. 6 p. 1720-1731, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.6.11.17613>. Acesso em: 25 de out. 2021.
- ALBAYRAK, S.; AKSOY, A.; ALBAYRAK, S.; SAGDIC, O. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some *Lamiaceae* species. **Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2013. Disponível em: [https://ijsts.shirazu.ac.ir/article\\_1529\\_a25cd2f632d65a8d4ad1771673b16d92.pdf](https://ijsts.shirazu.ac.ir/article_1529_a25cd2f632d65a8d4ad1771673b16d92.pdf). Acesso em: 25 de out. 2021.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. D. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abb/a/XV7B6sK4TM7VHWGm7cSprWr/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 25 de out. 2021.
- ALMEIDA, M. S.; FARIA, A. P. C.; SILVA, L. D.; TEIXEIRA, H. S.; PEREIRA, C. S. S. Processo de extração de compostos antioxidantes: experimental e simulação. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 5, n. 2, p. 212-218, 2019. Disponível em: [https://periodicos.ufes.br/bjpe/article/view/V05N02\\_19](https://periodicos.ufes.br/bjpe/article/view/V05N02_19). Acesso em: 12 nov. 2021.

AMBSCIENCE ENGENHARIA. **Saiba como os solventes podem ser uma fonte de contaminação**. 2021. Disponível em: <https://ambscience.com/solventes-contaminacao/>. Acesso em: 25 de out. 2021.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; ESTEVES-TURRILAS, F. A.; GUARDIA, M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248-253, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993619300822>. Acesso em: 12 nov. 2021.

ASNAASHARI, S.; DELAZAR, A; ALIPOUR, S. S.; NAHAR, L.; WILLIAMS, A. S.; PASDARAN, A.; MOJARAB, M.; AZAD, F. F.; SARKER S. D. Chemical composition, free-radical-scavenging and insecticidal activities of the aerial parts of *Stachys byzantina*. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 653-662, 2010. Disponível em: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641003653A#.YY8M5WDMLIU>. Acesso em: 12 nov. 2021.

AZEVEDO, T. D. **Propriedades nutricionais, antioxidantes, antimicrobianas e toxicidade preliminar do peixinho da horta (*Stachys byzantina* K. Koch)**. 2018. Dissertação (Programa de pós-graduação em Alimentação e Nutrição), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/58899>. Acesso em: 12 nov. 2021.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. K. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877413000277>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BAHADORI, M. B.; ZENGİN, G.; DINPARAST, L.; ESKANDANI, M. The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*) – profiling phenolic and antioxidant activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 36, p. 101134, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876382020300342>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P. P. GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. **International Journal of Sustainable Future for Human Security**, v. 36, p. 454-489, 2017. Disponível em: [https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10549811.2017.1310049?casa\\_token=g1q8w1pPUjcAAAAA%3AKoRYrlvGg10xEn4N\\_ZN4J1gh8X78CgYkXYCRuCGQ4-WslRQt7FqdnQhPJI3TaaX6NI4VjDCcUe3e6aP4](https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10549811.2017.1310049?casa_token=g1q8w1pPUjcAAAAA%3AKoRYrlvGg10xEn4N_ZN4J1gh8X78CgYkXYCRuCGQ4-WslRQt7FqdnQhPJI3TaaX6NI4VjDCcUe3e6aP4). Acesso em: 12 nov. 2021.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269796902924>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/bzHBTqBfJr8jmJn3ZXx9nMs/?lang=pt>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BIONDO, E.; FLECK, M.; KOLCHINSK, E. M.; SANT'ANNA, V.; POLES, R. G. Diversidade e potencial de utilização de plantas alimentícias não convencionais ocorrentes no Vale do Taquari, RS. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v.4, n.1, p.61-90, 2018. Disponível em: <http://revista.uergs.edu.br/index.php/revuergs/article/view/1005>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1811199a0>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643895800085>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: Mapa/ACS, 2010. Disponível em: [http://www.abcsem.com.br/docs/manual\\_hortaliças\\_web.pdf](http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortaliças_web.pdf). Acesso em: 12 nov. 2021.

BUBALO, M. C.; CURKO, N.; TOMASEVIC, M.; GANIC, K. K.; REDOVNIKOVIC, I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p.159–166, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616300449>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BURSAL, E.; KOKSAL, E.; GULÇIN, I.; BILSEL, G.; GOREN, A. C. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 66-74, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996912004917>. Acesso em: 12 nov. 2021.

CASTRO, D. S.; MOREIRA, I. S.; DE MELO, L. M. S.; LIMA, J. P.; DA SILVA, W. P.; GOMES, J. P.; FIGUEIRÊDO, A. M. F. Isolamento e caracterização do amido do endocarpo de pitomba. **Food Research International**, v. 124, p. 181-187, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918304782>. Acesso em: 12 nov. 2021.

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**, v. 34, p. 540–560, 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716302358>. Acesso em: 12 nov. 2021.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813–835, 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417710002385>. Acesso em: 12 nov. 2021.

COIMBRA, E. Q. **Compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de extratos metanólicos de *Senna rugosa***. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019. Disponível em:

<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27576>. Acesso em: 12 nov. 2021.

COSTA, T. P.; SOUZA, P. M. **Qualidade Nutricional e determinação de compostos tóxicos em alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – (Bacharel em Química) - Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017. Disponível em:

<http://site.ufvjm.edu.br/dequi/files/2017/07/Tatiana.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2021.

CREPALDI, I. C.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; RIOS, M. D. G.; PENTEADO, M. V. C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbb/a/hd45Fhjwy3wYkyB3gMLHGv/?lang=pt>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DAI, Y.; VAN, S. J.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green Technology, **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61-68, 2013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267012018260>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DAI, Y. **Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development**. 1 edição. Shanxi Province, China. Leiden University. 2013. Disponível em

<https://scholarlypublications.universiteitleiden.nl/handle/1887/21787>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DANIELSKI, L. **Solubilidade das oleoresinas de calêndula (*Calendula officinalis* L.) e cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO<sub>2</sub> supercrítico**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/82941>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DEMIR, E.; SERDAR, G.; SÖKMEN, M. Comparison of some extraction methods for isolation of catechins and caffeine from Turkish green tea. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 2, n. 2, p. 16-25, 2015. Disponível em:

<https://dergipark.org.tr/en/pub/ijsm/issue/22524/240702>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DEMISSIE, E. G.; WOYESSA, G. W.; ABEBE, A. UV/VIS spectrometer determination of Caffeine in green coffee beans from Hararghe, Ethiopia, using beer-lambert's law

and integrated absorption coefficient techniques. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering*, v. 17, n. 2, p. 109-123, 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Semu-Abebe/publication/304792608\\_UVVIS\\_spectrometer\\_determination\\_of\\_caffeine\\_in\\_green\\_coffee\\_beans\\_from\\_Hararghe\\_Ethiopia\\_using\\_Beer-Lambert's\\_law\\_and\\_integrated\\_absorption\\_coefficient\\_techniques/links/577b8cce08aec3b743365634/UV-VIS-spectrometer-determination-of-caffeine-in-green-coffee-beans-from-Hararghe-Ethiopia-using-Beer-Lamberts-law-and-integrated-absorption-coefficient-techniques.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Semu-Abebe/publication/304792608_UVVIS_spectrometer_determination_of_caffeine_in_green_coffee_beans_from_Hararghe_Ethiopia_using_Beer-Lambert's_law_and_integrated_absorption_coefficient_techniques/links/577b8cce08aec3b743365634/UV-VIS-spectrometer-determination-of-caffeine-in-green-coffee-beans-from-Hararghe-Ethiopia-using-Beer-Lamberts-law-and-integrated-absorption-coefficient-techniques.pdf). Acesso em: 12 nov. 2021.

DIMITROVA, L.; ZAHARIEVA, M. M.; POPOVA, M.; KOSTADINOVA, N.; TSVETKOVA, I.; BANKOVA, V.; NAJDENSKI, H. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. *Chemistry Central Journal*, v. 11, n. 1, p. 113, 2017. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-017-0343-8>. Acesso em: 12 nov. 2021.

DUARTE, A. M. F. C. **Extração com fluidos pressurizados de compostos bioativos: polifenóis e tiosulfatos**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/12313>. Acesso em: 12 nov. 2021.

FAO. Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura. **Relatório global: a biodiversidade que sustenta os sistemas alimentares**. Roma: FAO, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1181587/>. Acesso em: 12 nov. 2021.

FINK, S. R.; KONZEN, R. E.; VIEIRA, S. E.; ORDONEZ, A. M.; NASCIMENTO, C. R. B. Benefícios das plantas alimentícias não convencionais PANCs: Caruru (*Amaranthus Viridis*), Moringa Oleifera Lam. e Ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Mill). *Revista Pleiade*, v. 12, n. 24, p. 39-44, 2018. Disponível em: <https://pleiade.uni america.br/index.php/pleiade/article/view/409>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GEBEYEHU, B.T.; BIKILA, S.L. Determination of caffeine content and antioxidant activity of coffee. *American Journal of Applied Chemistry*, v. 3, n. 2, p. 69-76, 2015. Disponível em: <http://article.ajapplchem.org/pdf/10.11648.j.ajac.20150302.16.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 45, n. 1, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316302236>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GÓMEZ-RIVERA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; HERRERA-RUÍZ, M.; ZAMILPA, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V. Sesseína e isosesseína com atividade antiinflamatória, antibacteriana e antioxidante isoladas da *Salvia sessei* Benth. *Journal of ethnopharmacology*, v. 217, p. 212-219, 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874117340102>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GUPTA, N.; JAIN, S. K. Storage behavior of mango as affected by post harvest application of plant extracts and storage conditions. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2499-2507, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-012-0774-0>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GUTIERREZ, M. C.; FERRER, M. L.; MATEO, C. R.; MONTE, F. D. Secagem por congelamento de soluções aquosas de solventes eutéticos profundos: uma abordagem adequada para suspensões eutéticas profundas de estruturas automontadas. **Langmuir**, v. 25, n. 10, pág. 5509-5515, 2009. Disponível em: [https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900552b?casa\\_token=aqN-hBCx-vsAAAA:byfhBUi2PKzTRxwV4rjywkCuWJri83QRUrKWjRWdB\\_8PpvlhjCiUUb8iDtzS6vo4\\_rGRKIsLP4WC8w0](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la900552b?casa_token=aqN-hBCx-vsAAAA:byfhBUi2PKzTRxwV4rjywkCuWJri83QRUrKWjRWdB_8PpvlhjCiUUb8iDtzS6vo4_rGRKIsLP4WC8w0). Acesso em: 12 nov. 2021.

HAJIMEHDIPOOR, H.; GOHARI, A. R.; AJANI, Y.; SAEIDNIA, S. Comparative study of the total phenol content and antioxidant activity of some medicinal herbal extracts. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 1, n. 3, p. 21-25, 2014. Disponível em: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=380070>. Acesso em: 12 nov. 2021.

HANSEN, B. B.; SPITTLE, S. S.; CHEN, B.; POE, D.; ZHANG, Y.; KLEIN, J. M.; HORTON, A.; ADHIKARI, L.; ZELOVICH, T.; DOHERTY, B. W.; GURKAN, B.; MAGINN, E. J.; RAGAUSKAS, A.; DADMUN, M.; ZAWODZINSKI, T. A.; BAKER, G. A.; TUCKERMAN, M. E.; SAVINELL, R. F.; SANGORO, J. R. Solventes eutéticos profundos: uma revisão dos fundamentos e aplicações. **Revisões químicas**, v. 121, n. 3, pág. 1232-1285, 2020. Disponível em: [https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.0c00385?casa\\_token=rF5E5pwxSsAAAA:mN1Mm6BSn11Vu1pCGDg80YD\\_0tqg\\_gtcjdFHR1zrKyJ0fVONHXzngjC8V47ZgG2S3BXP2sUM82S1W0PU](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.0c00385?casa_token=rF5E5pwxSsAAAA:mN1Mm6BSn11Vu1pCGDg80YD_0tqg_gtcjdFHR1zrKyJ0fVONHXzngjC8V47ZgG2S3BXP2sUM82S1W0PU). Acesso em: 12 nov. 2021.

HMIDANI, A.; BOUHLALI, E. D. T.; AJEBLI, M.; KHOUYA, T.; BENLYAS, M.; ALEM, C. Investigação in vitro das atividades antioxidantes e anti-hemolíticas de três espécies de *Lamiaceae* do Marrocos. **Jornal de Ciências Básicas e Aplicadas da Universidade Beni-Suef**, v. 10, n. 1, pág. 1-8, 2021. Disponível em: <https://bjbas.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s43088-021-00116-9.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2021.

HOOPER, D. U.; CHAPIN III, F. S.; EWEL, J. J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON, J. H.; LODGE, D. M.; LOREAU, M.; NAEEM, S.; SCHMID, B.; SETALA, H.; SYMSTAD, A. J.; VANDERMEER, J.; WARDLE, D. A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. **Ecological monographs**, v. 75, n. 1, p. 3-35, 2005. Disponível em: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/04-0922>. Acesso em: 12 nov. 2021.

HUANG, H.; YANG, B. B.; WANG, C. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 1, p. 54-62, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224413001386>. Acesso em: 12 nov. 2021.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed., p. 1020. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf). Acesso em: 12 nov. 2021.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, 2003. Disponível em: [https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021099r?casa\\_token=N0cEEgHcnw0AAAAA:diU417KX5EEO2CM61TTPSvSD5-2r6PF8WDWtFvPLp-KaV6pUrAnMMg5xy\\_ZCH7yeSyS8Dml0IkS8Vsl](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021099r?casa_token=N0cEEgHcnw0AAAAA:diU417KX5EEO2CM61TTPSvSD5-2r6PF8WDWtFvPLp-KaV6pUrAnMMg5xy_ZCH7yeSyS8Dml0IkS8Vsl). Acesso em: 12 nov. 2021.

JOVANOVIĆ, A. A.; DORĐEVIĆ, V. B.; ZDUNIĆ, G. M.; PLJEVLJAKUSIĆ, D. S.; SAVIKIN, K. P.; GODEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369–380, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616318421>. Acesso em: 12 nov. 2021.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004. Disponível em: [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490886683?casa\\_token=nCtvZWdKqGsAAAAA:m\\_MTF-mWykn7M8b2u5HiglnQ4QilltWv32SpneZG1kBI97l8OSspuqGkcHFfxsds-6-UH-yxCcOr7Gt5](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490886683?casa_token=nCtvZWdKqGsAAAAA:m_MTF-mWykn7M8b2u5HiglnQ4QilltWv32SpneZG1kBI97l8OSspuqGkcHFfxsds-6-UH-yxCcOr7Gt5). Acesso em: 12 nov. 2021.

KINUPP, F. V.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**: um guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustrativas. 1 edição. Santa Odessa, São Paulo, Brasil. Editora Plantarum. 2015.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. D. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/YVFJFF7hsmZKq9BQFcQ5Yyy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 nov. 2021.

KOZŁOWSKA, M.; SZTERK, A.; ZAWADA, K.; ZABKOWSKI, T. New opportunities of the application of natural herb and spice extracts in plant oils: application of electron paramagnetic resonance in examining the oxidative stability. **Journal of food science**, v. 77, n. 9, p. C994-C999, 2012. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2012.02856.x?casa\\_token=HS3O-29I1wkAAAAA:B\\_iRwOokRk4HnlnzUjWiBQ1m0WgvUTPmlz6F6aPclSFZdAAXF7KUyT9Gji2Vx0aUFHmFc-zQzuvQZ2k](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2012.02856.x?casa_token=HS3O-29I1wkAAAAA:B_iRwOokRk4HnlnzUjWiBQ1m0WgvUTPmlz6F6aPclSFZdAAXF7KUyT9Gji2Vx0aUFHmFc-zQzuvQZ2k). Acesso em: 12 nov. 2021..

LANDIS, D. A. Designing agricultural landscapes for biodiversity-based ecosystem services. **Basic and Applied Ecology**, v. 18, p. 1-12, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1439179116300950>. Acesso em: 12 nov. 2021.



LASHGARGAHI, Z.; SHAFAGHAT, A. Volatile constituents of essential oils isolated from fresh and dried *Stachys lavandulifolia* Vahl. and *Stachys byzantina* C. Koch. two *Lamiaceae* from North-West Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 5, p. 1302-1309, 2017. Disponível em:

[https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2017.1405744?casa\\_token=beV4D4Mc7SwAAAAA:04HCye3LJLuJ2mF1owC\\_J0SkG\\_ljI7OTUACU-S8Cd3HC\\_ZHP3r9Wo5UHfmJ9S53Hr2rhegX7YTCEiH\\_g](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2017.1405744?casa_token=beV4D4Mc7SwAAAAA:04HCye3LJLuJ2mF1owC_J0SkG_ljI7OTUACU-S8Cd3HC_ZHP3r9Wo5UHfmJ9S53Hr2rhegX7YTCEiH_g). Acesso em: 12 nov. 2021.

LIBERATO, P. S.; LIMA, D. V. T.; SILVA, G. M. B. PANCs - Plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. **Environmental Smoke**, v. 2, n.2, p. 102-111, 2019. Disponível em:

<http://www.environmentalsmoke.com.br/index.php/EnvSmoke/article/view/64>. Acesso em: 12 nov. 2021.

LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KWANSA, A. L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 9, p. 1350–1358, 2006. Disponível em:

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2521?casa\\_token=YC3NVUMarjUAAAAA:wS2Emr53wbZLiNvIH8AGBZS5aEo2VuLPMa1UQ\\_ajEXeKPZELKGP0omZ6FAn2g-gkU4PacrDMmrbeJsQ](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2521?casa_token=YC3NVUMarjUAAAAA:wS2Emr53wbZLiNvIH8AGBZS5aEo2VuLPMa1UQ_ajEXeKPZELKGP0omZ6FAn2g-gkU4PacrDMmrbeJsQ). Acesso em: 12 nov. 2021.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic press, p. 113, 1982. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19850773265>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MASOKO, P. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Spilanthes mauritiana* Used Traditionally in Limpopo Province, South Africa. **Journal of EvidenceBased Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 4, p. 936-943, 2017. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/2515690X17746774>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MATOS, L. J. B. L.; COSTA, E.; LIMA, L. P.; FERNANDES, F. A. N. Estudo comparativo da extração do óleo da borra de café. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2009, Ceará, Anaiseletrônicos. Ceará: UFCE, 2009. Disponível em: <http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1470/583>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MAZZUTTI, S. **Obtenção de extrato de cogumelo do sol (*Agaricus Brasiliensis*): atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99313>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. G.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M.; ALMEIDA, A. M. F.; PIZZOLITTO, A. C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422011000400024&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422011000400024&script=sci_arttext). Acesso em: 12 nov. 2021.

MILEK, M.; MLODECKI, L.; DZUGAN, M. Caffeine content and antioxidant activity of various brews of specialty grade coffee. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 20, n. 2, p. 179-188, 2021. Disponível em: <https://www.food.actapol.net/volume20/issue2/abstract-5.html>. Acesso em: 12 nov. 2021.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993. Disponível em: [https://portlandpress.com/clinsci/article-pdf/84/4/407/464148/cs0840407.pdf?casa\\_token=-eVB1xvsPhUAAAAA:MvExsBGuddVJySFzIzGALwsYPFWNxYOhfWBQyyLt7tuE82w7FsZBwJViyBKrDg9aAxTgOj4B2w](https://portlandpress.com/clinsci/article-pdf/84/4/407/464148/cs0840407.pdf?casa_token=-eVB1xvsPhUAAAAA:MvExsBGuddVJySFzIzGALwsYPFWNxYOhfWBQyyLt7tuE82w7FsZBwJViyBKrDg9aAxTgOj4B2w). Acesso em: 12 nov. 2021.

MIRANDA, T. M.; HANAZAKI, N. Conhecimento e uso de recursos vegetais de restinga por comunidades das ilhas do Cardoso (SP) e de Santa Catarina (SC), Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 203-215, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abb/a/DQ6F7MPY8NhYNzRqWZmWNgF/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 nov. 2021.

NASCIMENTO, V. T.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Famine foods of Brazil's seasonal dry forests: ethnobotanical and nutritional aspects. **Economic Botany**, v. 66, n. 1, p. 22-34, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-012-9187-2>. Acesso em: 12 nov. 2021.

NASCIMENTO, V. T.; LUCENA, R. F. P.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge and use of wild food plants in áreas of dry seasonal forests in Brazil. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 317-343, 2013. Disponível em: [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03670244.2012.707434?casa\\_token=Z6qnS2KSSv4AAAAA:3AQ7GJ\\_Cg-3aS-p4WukFSqSrW6R9uTu0ZhZRDMq89qEfhjGqo3jzaeUdKARjFYKm3Dhql6zPYLWHVUiU](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03670244.2012.707434?casa_token=Z6qnS2KSSv4AAAAA:3AQ7GJ_Cg-3aS-p4WukFSqSrW6R9uTu0ZhZRDMq89qEfhjGqo3jzaeUdKARjFYKm3Dhql6zPYLWHVUiU). Acesso em: 12 nov. 2021.

NEVES, D. B. J.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194-202, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517301655>. Acesso em: 12 nov. 2021.

NORA, F. M. D.; BORGES, C. D. Ultrasound pretreatment as an alternative to improve essential oils extraction. **Ciência Rural**, n. 9, v. 47, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/SPtrDHC3YjrsPSyWg8vWQ7s/?lang=en&format=html>. Acesso em: 12 nov. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). **OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019**. Genebra, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>. Acesso em: 11 set. 2021.

PACHECO-FERNANDEZ, I.; PINO, V.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M. Guanidinium ionic liquid-based surfactants as low cytotoxic extractants: analytical performance in an in-situ dispersive liquid-liquid microextraction method for determining personal care products. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 102-111, 2018.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731730657X>. Acesso em: 12 nov. 2021.

PASCHOAL, V.; GOUVEIA, I.; SOUZA, N. S. Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): o potencial da biodiversidade brasileira. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 33, n. 68, p. 8-14, 2016. Disponível em:

<https://www.vponline.com.br/portal/noticia/pdf/69c8eaa376fded1bf13a053e868facf0.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2021.

PEIXOTO S. T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 586-591, 2012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/8pbRQVkJGgcWMh5b463PRDcv/abstract/?lang=pt>.

Acesso em: 12 nov. 2021.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012. Disponível em:

<https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf>.

Acesso em: 12 nov. 2021.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. O conhecimento sobre os recursos vegetais alimentares em bairros rurais no Vale do Paraíba, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 4, p. 1190-1201, 2009. Disponível em:

<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/93479>. Acesso em: 12 nov. 2021.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003. Disponível em:

[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000500018&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000500018&script=sci_arttext).

Acesso em: 12 nov. 2021.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. A atividade antioxidante da aplicação de um ensaio de descoloração melhorou o cátion radical ABTS. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584998003153>. Acesso em: 11 jan. 2021.

REIS, J. D.; CLARET, K. C. P.; MONTEIRO, V. F. C. Plantas alimentícias não convencionais nas escolas: proposta de uma sequência didática para o ensino da diversidade vegetal, alimentar e cultura. **Journal of Education, Science and Health**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2021. Disponível em:

<http://jeshjournal.com.br/jesh/article/view/31>. Acesso em: 11 nov. 2021.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138597010182>. Acesso em: 11 nov. 2021.

ROMAN, W. A.; PICOLLI, A.; MORAIS, B.; LOEBLEIN, M.; SCHÖNELL, A. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso de *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 774-781, 2015. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/RKVNSk9QwPkgNNmWskTTDMM/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 11 nov. 2021.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, p. 1679-6535, 2007a. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/426954/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pela-captura-do-radical-livre-abts>. Acesso em: 11 nov. 2021.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, p. 1679-6535, 2007b. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2021.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo Método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico EMBRAPA**, p. 1679-6535, 2006. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/664098/1/cot125.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2021.

SANTOS, G. A. **Avaliação dos frutos de *Dillenia indica* (maçã de elefante) com Planta Alimentícia Não Convencional**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Nutrição) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

Disponível em: <https://monografias.ufop.br/handle/35400000/3224>. Acesso em: 11 nov. 2021.

SCHAFRANSKI, K. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**.

2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019. Disponível em:

<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3945>. Acesso em: 11 nov. 2021.

SCHNEIDER, C. C.; **Utilização de Ultrassom em Química Orgânica**. 2005.

Monografia (Bacharelado e Licenciatura em Química) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005. Disponível em:

<https://wp.ufpel.edu.br/wwverde/files/2014/12/Utiliza%C3%A7%C3%A3o-de-Ultrassom-em-Qu%C3%ADmica-Org%C3%A2nica.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SCHNEIDER, F. A.; HOEHNE, L. Otimização de metodologia para determinação de cafeína por extração líquido-líquido em bebida energética. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 6, n. 4, p. 85-90, 2014. Disponível em: <http://www.univates.br/revistas/index.php/destaques/article/view/439>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SERDAR, G.; DEMIR, E.; BAYRAK, S.; SÖKMEN, M. New approaches for effective microwave assisted extraction of caffeine and catechins from green tea. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 3, n. 1, p. 3-13, 2016. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/ijsm/issue/22523/240697>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <https://attena.ufpe.br/handle/123456789/12962>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO, L. M. S. S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 81-96, 2016. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/230456164.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2021.

SILVA, L. F. L.; SOUZA, D. C.; RESENDE, L. V.; NASSUR, R. D. C. M.; SAMARTINI, C. Q.; GONÇALVES, W. M. Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1775-1785, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/9rHHLZqLYGDBnHWtymBvcVk/abstract/?lang=en>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SILVA, N. L.; ARAÚJO, Í. P. C.; FERREIRA, M. R.; BATISTA, T. B. A. S.; FERNANDO, W. L.; RODRIGUES, F. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (dc) stapf e *Melissa officinalis* lam obtidos por decocção. **Conexão Ciência**, Formiga-MG, v. 12, n. 1, p. 46-53, 2017. Disponível em: <https://scholar.archive.org/work/y3nazjra5fauvpuitm6y5j2mpi/access/wayback/https://periodicos.uniformg.edu.br:21011/periodicos/index.php/conexaociencia/article/download/499/556>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687999990171>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.short>. Acesso em: 01 nov. 2021.

SOUSA, C. M. M. S.; SILVA, R. H.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L. C. D.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante

de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/4d6yvCyDmhHyfP9ZJqV6nDy/?format=html&lang=pt>.

Acesso em: 01 nov. 2021.

TERRA, S. B.; VIERA, C. T. R. Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): levantamento em zonas urbanas de Santana do Livramento, RS. **Ambiência**, v. 15, n. 1, p. 112-130, 2019. Disponível em:

<https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/5765>. Acesso em: 01

nov. 2021.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIEŚNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, 943-951, 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993609001265>. Acesso

em: 11 nov. 2021.

TOHMA, H. S.; GULCIN, I. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 657-671, 2010. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942911003773916>. Acesso em: 11

nov. 2021.

TORRES, A. **O que são antioxidantes?** 2007. Disponível em:

<https://andreiatorres.com/blog/2007/05/25/o-que-sao-antioxidantes?rq=antioxidante>.

Acesso em: 22 out. 2021.

TORRES, J. L. T.; HILEY, S. L.; LORIMOR, S. P.; RHOAD, J. S.; CALDWELL, B. D.; ZWEERINK, G. L.; DUCEY, M. Separation of caffeine from beverages and analysis using thin-layer chromatography and gas chromatography–mass spectrometry.

**Journal of Chemical Education**, v. 92, n. 5, p. 900-902, 2015. Disponível em:

[https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed500977r?casa\\_token=ao0FQCp2WtoAAAAA:7ed0R-5vNi4AtrOTUKIGbTWdrmpCUp\\_H5QJMPQy-12A7tRW2CVWXVwEJ\\_SWK\\_ZEvfPt6QKai6e9Y1C8X](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed500977r?casa_token=ao0FQCp2WtoAAAAA:7ed0R-5vNi4AtrOTUKIGbTWdrmpCUp_H5QJMPQy-12A7tRW2CVWXVwEJ_SWK_ZEvfPt6QKai6e9Y1C8X).

Acesso em: 22 out. 2021.

TULER, A. C.; PEIXOTO, A. L.; SILVA, N. C. B. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) na comunidade rural de São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, p. 1-12, 2019. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rod/a/t6QpNtZ8dcwsLzZsSPCXhSg/?lang=pt&format=html>.

Acesso em: 11 nov. 2021.

TUNDIS, R.; PERUZZI, F.; MENICHINI, F. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: a review. **Phytochemistry**, v. 102, p. 7-39, 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942214000673>. Acesso

em: 11 nov. 2021.

TUNÇTÜRK, M.; ERYIĞIT, T.; KAYA, A. R. Nutritional properties, minerals, and selected heavy metal contents in herby cheese plants of *Lamiaceae*. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 41–47, 2017. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13765-016-0245-9>. Acesso em: 11 nov. 2021.

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 55-64, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993615001600>. Acesso em: 11 nov. 2021.

VEBERIC, R.; COLARIC, M.; STAMPAR, F. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northn Mediterranean region. **Food Chemistry**, v. 106, p. 153-157, 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814607005201>. Acesso em: 22 out. 2021.

VIEIRA, G.S. **Estudo dos processos de extração de antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) e da concentração do extrato por nanofiltração.** 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas, 2015. Disponível em:

<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1328969>. Acesso em: 22 out. 2021.

VIRGOLIN, L. B.; SEIXAS, F. R. F.; JANZANTTI N. S. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidant activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.10, p. 933–941, 2017. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pab/a/vP4vzvwrDb5yfcvVqs78SXv/?format=html&lang=en>. Acesso em: 22 out. 2021.

VISSER, A. E.; SWATLOSKI, R. P.; ROGERS, R. D. pH-dependent partitioning in room temperature ionic liquids provides a link to traditional solvent extraction behavior. **Green Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2000. Disponível em:

[https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2000/gc/a908888a?casa\\_token=NKlshvSz1EQAAAAA:ZBwadkCoPXWOHwvDAPNmYbSF6yciW1qvrpKYMYqUVYqRUt2KHvSOcY4OJXRbqC\\_V8LbT9vvjM62ZffM](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2000/gc/a908888a?casa_token=NKlshvSz1EQAAAAA:ZBwadkCoPXWOHwvDAPNmYbSF6yciW1qvrpKYMYqUVYqRUt2KHvSOcY4OJXRbqC_V8LbT9vvjM62ZffM). Acesso em: 22 out. 2021.

WANG, L.; WEI, W.; TIAN, X.; SHI, K.; WU, Z. Improving bioactivities of polyphenol extracts from *Psidium guajava* L. leaves through co-fermentation of *Monascus anka* GIM 3.592 and *Saccharomyces cerevisiae* GIM 2.139. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 206-215, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016305568>. Acesso em: 22 out. 2021.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224405003559>. Acesso em: 29 out. 2021.

WANG, S.; PENG, X.; ZHONG, L.; JING, S.; CAO, X.; LU, F.; SUN, R. Choline chloride/urea as an effective plasticizer for production of cellulose films.

**Carbohydrate polymers**, v. 117, p. 133-139, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861714009023>. Acesso em: 29 out. 2021.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2305-6320/2/3/251>. Acesso em: 29 out. 2021.

WONG, C.; LI, H. B.; CHENG, K. W.; CHEN, F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food chemistry**, v. 97, n. 4, p. 705-711, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814605004437>. Acesso em: 29 out. 2021.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814698001022>. Acesso em: 29 out. 2021.

ZHU, H.; ZHANG, J.; LI, C.; LIU, S.; WANG, L. *Morinda citrifolia* L. leaves extracts obtained by traditional and eco-friendly extraction solvents: Relation between phenolic compositions and biological properties by multivariate analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 153, p. 112586, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020305021>. Acesso em: 29 out. 2021.