

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**Ane Patrícia Cacique**

**Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus*  
(L.) G. Don**

**Montes Claros  
2020**

**Ane Patrícia Cacique**

**Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus*  
(L.) G. Don**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

**Orientador:** Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

**Coorientadora:** Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros – MG  
Setembro de 2020

Cacique, Ane Patrícia

C118e  
2020

Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don / Ane Patrícia Cacique. Montes Claros, 2020.  
101 f.:il

Tese (doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Prof. Dr. Lázaro Chaves Sicupira, Profa. Dra. Sônia Ribeiro Arrudas, Profa. Dra. Anna Christina de Almeida, Profa. Dra. Elka Fabiana Aparecida Almeida, Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério.

Inclui referências.

1. *Catharanthus*. 2. Cultivares. 3. Ácido fenólico. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 635

Ane Patrícia Cacique

**Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus*  
(L.) G. Don**

Aprovada pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Lázaro Chaves Sicupira

UFVJM

Profa. Dra. Sônia Ribeiro Arrudas

Unimontes

Profa. Dra. Anna Christina de Almeida

ICA/UFMG

Profa. Dra. Elka Fabiana Aparecida Almeida

ICA/UFMG



---

Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Orientador – ICA/UFMG

Montes Claros, 18 de setembro de 2020.



### ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 18 dias do mês de setembro de 2020, às 13:00 horas, sob a Presidência do Professor Flaviano Oliveira Silvério, D. Sc. (Orientador - ICA/UFMG) e com a participação dos Professores Anna Christina de Almeida, D. Sc. (ICA/UFMG), Elka Fabiana Aparecida Almeida, D. Sc. (ICA/UFMG), Sônia Ribeiro Arrudas, D. Sc. (Unimontes) e Lázaro Chaves Sicupira, D. SC. (UFVJM), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de tese de **Ane Patrícia Cacique**, aluna do Curso de Doutorado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de tese intitulada: "Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don",

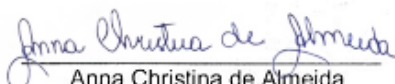
sendo a aluna considerada (aprovada/reprovada) Aprovada. E, para constar, eu, Professor Flaviano Oliveira Silvério, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do **ARTIGO 68** do regulamento do Curso de Doutorado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

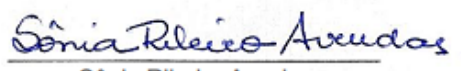
**Art. 68** Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, 4 (quatro) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 18 de setembro de 2020.

  
Flaviano Oliveira Silvério  
Orientador

  
Anna Christina de Almeida  
Membro

  
Elka Fabiana Aparecida Almeida  
Membro

  
Sônia Ribeiro Arrudas  
Membro

  
Lázaro Chaves Sicupira  
Membro

*Dedico a mim que, mesmo em meio às  
adversidades, não desisti de sonhar.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de concluir mais esta etapa.

À Universidade Federal de Minas Gerais pelo custeio e pela infraestrutura disponibilizada para desenvolvimento deste projeto de pesquisa e, também, pela oportunidade de cursar o doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor Flaviano, meu orientador, pela confiança depositada ao longo deste projeto, pela compreensão, amparo e direcionamento no momento de maior adversidade. Além de total apoio na etapa de correção dos tópicos da tese.

À professora Gevany Paulino de Pinho pelos pontos de clareza em meio à quantidade de dados e pelas reflexões sociais.

À minha família, meu eterno respeito e gratidão pelo apoio e amor incondicional durante toda a jornada decorrida. À mamãe (Luíza), eterno exemplo de força e dedicação; ao papai (Alencar), que agora como um anjo roga por mim, guiando e iluminando meus caminhos. Aos meus irmãos Henrique e Maurício que, mesmo à distância, se fazem presentes.

Aos companheiros de laboratório e/ou vida Érica e Luís, meu agradecimento pela amizade, companheirismo e suporte dispensados em todos os momentos.

Obrigada!

## ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

1. CACIQUE, A. P.; BARBOSA, É. S.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Miniaturized Methodology for Determining the Concentration of Total Phenols, Flavonoids and Antioxidant Activity. Enviado a **Food Analytical Methods**.

2. CACIQUE, A. P.; BARBOSA, É. S.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Maceration Extraction Conditions for Determining the Constituent Phenolic Compounds and the Antioxidant Activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Enviado à **Revista de Ciência e Agrotecnologia**.



## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi estruturada em uma introdução geral, três capítulos e um tópico com as considerações finais.

No **capítulo 1** buscamos preparar uma revisão de literatura que apresente o estado da arte de forma detalhada, concisa e atual. Neste texto, tivemos como objetivo principal preparar o leitor para compreender, claramente, os temas abordados nos capítulos 2 e 3.

No **capítulo 2** é apresentado o estudo relacionado à miniaturização dos reagentes empregados nas metodologias convencionais de determinação de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP.

No **capítulo 3** é apresentado o estudo detalhado relacionado à otimização da maceração como método de extração de compostos fenólicos a partir da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Neste capítulo, as metodologias miniaturizadas, no capítulo 2, foram aplicadas, com sucesso, para determinar a concentração de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante.

Os capítulos 2 e 3 foram apresentados no formato de artigos científicos, por isso, estruturados com uma introdução, parte experimental, resultados e discussões, conclusões e referências. A formatação das referências em cada capítulo pode apresentar diferenças, pois foram adotadas as regras de formatação da revista em que o estudo foi submetido.

## Extração e análise de polifenóis e atividade antioxidante em cultivares de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

### RESUMO

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don pertence à família Apocynaceae e, a partir deste, foram isolados alcaloides com função antineoplásica, denominados de vincristina e vimblastina. Entretanto, ainda não há na literatura método de extração e análise padrão para caracterizar a atividade antioxidante e a composição química dos compostos fenólicos em *C. roseus*. As mudas dessa espécie apresentam massa seca reduzida e, por isso, as principais metodologias de preparo de extratos e de avaliação da atividade antioxidante não são aplicáveis. Dessa forma, a primeira parte deste estudo teve como objetivo reduzir a quantidade de reagentes utilizados nas metodologias convencionais de determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e dos testes de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP. Para isso, os métodos miniaturizado e convencional foram comparados e, em seguida, aplicados na análise de 38 amostras diferentes incluindo chás, especiarias, bebidas alcoólicas, energético, geleias, produtos do mel e derivados da uva. As metodologias miniaturizada e convencional apresentaram linearidade nas mesmas faixas de concentração, com coeficiente de determinação e correlação superiores a 0,99. A metodologia miniaturizada proporcionou a redução no custo das análises de 96% para a determinação de fenóis totais, 80% para flavonoides, 72% para DPPH, 67% para ABTS e de 70% para FRAP, além de ter reduzido os volumes de resíduos gerados. Este estudo revelou que as metodologias miniaturizadas apresentam a mesma eficiência e segurança que os métodos convencionais, porém com a vantagem de ser significativamente mais econômica. A segunda parte do trabalho teve como objetivo otimizar a extração dos compostos fenólicos da *C. roseus*. Os parâmetros de massa de amostra vegetal, composição da fase extratora, modo de homogeneização, tempo e temperatura de extração foram avaliados. Os resultados da concentração de fenóis totais foram submetidos à análise de variância pelo teste F e teste de Duncan, a 5% de significância. Posteriormente, as condições ideais de extração foram empregadas no preparo de extratos de 12 cultivares de *C. roseus*. As metodologias miniaturizadas de determinação do teor de fenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante foram usadas para analisar os 12 extratos obtidos, em triplicada. A concentração dos ácidos fenólicos e o agrupamento das cultivares foram determinados por análises cromatográficas. O método de extração otimizado utilizou 30 mg de folhas secas de *C. roseus*, 0,72 mL de fase extratora constituída por etanol e água a 50% (v/v), empregando aquecimento a 50 °C por 1 h. A concentração média de fenóis totais foi de 30,3 mg g<sup>-1</sup> CEAG, flavonoides 20,0 mg g<sup>-1</sup> CEQ e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP foi de 19,4; 11,8 e 23,3 mg g<sup>-1</sup> CET, respectivamente. Os ácidos salicílico, vanílico, siríngico, gálico, ferúlico e cafeico foram quantificados em todos os extratos. A metodologia de extração miniaturizada apresentou menor consumo de solvente, amostra e tempo, sem reduzir a eficiência da extração. Em termos de composição de ácidos fenólicos, os extratos das folhas de *C. roseus* se mostraram constituídos, predominantemente, pelos ácidos ferúlico e cafeico. Esses ácidos foram determinantes para a separação das 12 cultivares em dois grupos principais.

**Palavras-chave:** Triagem fitoquímica. Vinca. Ácidos fenólicos. Análise foliar. Cromatografia (CG-EM).

## Extraction and analysis of polyphenols and antioxidant activity in cultivars of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

### ABSTRACT

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don belongs to the *Apocynaceae* family and, from this, alkaloids with antineoplastic function were isolated, called vincristine and vinblastine. However, there is still no in the literature standard method of extraction and analysis to characterize the antioxidant activity and chemical composition of the phenolic compounds in *C. roseus*. The seedlings of this species present reduced dry mass and, therefore, the main methodologies for preparing extracts and assessing antioxidant activity are not applicable. Thus, the first part of this study aimed to reduce the amount of reagents used in conventional methodologies to determination of the concentration of total phenols, flavonoids and antioxidant activity tests by DPPH, ABTS and FRAP. For this, the miniaturized and conventional methods were compared and then applied in the analysis of 38 different samples including teas, spices, alcoholic drinks, energy drinks, jellies, products of the honey and grape derivatives. The miniaturized and conventional methodologies showed linearity in the same concentration ranges, with determination and correlation coefficients greater than 0.99. The miniaturized methodology provided a reduction in the cost of analysis of 96% for the determination of total phenols, 80% for flavonoids, 72% for DPPH, 67% for ABTS and 70% for FRAP, in addition to have reduced the volumes of waste generated. This study revealed that miniaturized methodologies present the same efficiency and security than conventional methods, but with the advantage of being significantly more economical. The second part of the work aimed to optimize the extraction of the *C. roseus* phenolic compounds. The parameters of the mass of vegetable sample, composition of the extraction phase, homogenization mode, time and extraction temperature were evaluated. The results of the concentration of total phenols were subjected to analysis of variance by the F test and the Duncan test, at 5% significance level. Later, the ideal conditions of extraction were used in the preparation of extracts from 12 cultivars of *C. roseus*. The miniaturized methodologies of determining the content of total phenols, flavonoids and antioxidant activity were used to analyze the 12 extracts obtained, in triplicate. The concentration of phenolic acids and the cultivar grouping were determined by chromatographic analyzes. The optimized extraction method used 30 mg of dry leaves of *C. roseus*, 0.72 mL of extracting phase consisting of ethanol and water at 50% (v/v), using heating at 50 °C for 1 h. The average concentration of total phenols was 30.3 mg g<sup>-1</sup> GAE, flavonoids 20.0 mg g<sup>-1</sup> QE and the antioxidant activity by the DPPH, ABTS and FRAP methods was 19.4; 11.8 and 23.3 mg g<sup>-1</sup> TEAC, respectively. Salicylic, vanillic, syringic, gallic, ferulic and caffeic acids were quantified in all extracts. The miniaturized extraction methodology showed lower consumption of solvent, sample and time, without reducing extraction efficiency. In terms of the composition of phenolic acids, the extracts of the leaves of *C. roseus* proved to be constituted, predominantly, by ferulic and caffeic acids. These acids were determinants for the separation of the 12 cultivars into two main groups.

**Keywords:** Phytochemical screening. Vinca. Phenolic acids. Leaf analysis. Chromatography (GC-MS).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
Figura 1 - Morfologia externa de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. (A) desenho esquemático do ápice floral e folha; (B) fotografia do ápice floral e folha; (C) flor em antese evidenciando a estrutura reprodutiva; (D) folhas e flores totalmente expandidas.....	20
Figura 2 – Estruturas químicas de alcaloides isolados de <i>C. roseus</i> para o tratamento antineoplásico.....	21
Figura 3 – Classes de substâncias com atividade antioxidante extraídas de amostras vegetais.....	23
Figura 4 – Estruturas químicas de compostos fenólicos A) <i>orto</i> : quando os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 2; B) <i>meta</i> : os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 3; C) <i>para</i> : quando os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 4.....	24
Figura 5 – Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos.....	25
Figura 6 - Metodologias de extração utilizadas em amostras vegetais.....	26
Figura 7 – Esquema representando o princípio dos métodos de extração convencionais: maceração e Soxhlet.....	28
Figura 8 – Equação química da reação entre o composto fenólico e o reagente de Folin-Ciocalteu.....	30
Figura 9 – Esquema representativo do meio reacional da análise de fenóis totais indicando o teste negativo e positivo.....	31
Figura 10 – Equação química da reação de complexação entre flavonoide e o reagente complexante, cloreto de alumínio (AlCl <sub>3</sub> ).....	32
Figura 11 – Esquema representativo do meio reacional da análise de flavonoides com cloreto de alumínio indicando o teste negativo e positivo.....	33
Figura 12 - Estrutura química do radical DPPH• indicando o elétron desemparelhado.....	34
Figura 13 – Equação química da reação entre um radical DPPH• e o padrão de referência Trolox.....	35
Figura 14 – Esquema representativo do meio reacional do método DPPH• indicando o teste negativo e positivo.....	35
Figura 15 – Equação química da reação entre o cátion-radical ABTS <sup>•+</sup> e o Trolox.....	37
Figura 16 – Esquema representativo do meio reacional durante a estabilização do cátion-radical ABTS <sup>•+</sup> pelo padrão Trolox, indicando um teste negativo e um teste positivo.....	38
Figura 17 – Equação química da reação de redução do [Fe <sup>3+</sup> (TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup> para [Fe <sup>2+</sup> (TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> na presença de substância antioxidante.....	39
Figura 18 – Esquema representativo do meio reacional do método FRAP, indicando um teste negativo e	

positivo.....	40
<b>4.1 Artigo 1 - Metodologia miniaturizada para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante.....</b>	<b>51</b>
Figura 1 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de ácido gálico a 8 mg L <sup>-1</sup> , (A) antes e (B) após a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.....	57
Figura 2 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de quercetina a 10 mg L <sup>-1</sup> (A) antes e (B) após a reação de complexação com cloreto de alumínio.....	58
Figura 3 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução de DPPH (A) antes e (B) após a reação com o padrão de Trolox.....	59
Figura 4 - Espectro de absorção na região do UV-Vis da solução contendo o cátion-radical ABTS <sup>+</sup> (A) antes e (B) após a reação com padrão de Trolox.....	60
Figura 5 - Espectro de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de Trolox a 10 mg L <sup>-1</sup> (A) antes e (B) após a reação com o complexo [Fe <sup>3+</sup> (TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup> .....	61
Figura 6 - Curvas analíticas de calibração obtidas utilizando a metodologia miniaturizada e a convencional para determinação de: A) fenóis totais, B) flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos C) DPPH, D) ABTS e E) FRAP.....	62
Figura 7 - Comparação entre as quantidades de reagentes utilizados nas metodologias miniaturizada e convencional de determinação da concentração de fenóis totais (A), flavonoides (B) e atividade antioxidante por DPPH (C), ABTS (D) e FRAP (E).....	64
Figura 1S - Material suplementar. Esquema de reação e fotografia de cada método indicando resultado positivo. A) Fenóis totais. B) Flavonoides. Atividade antioxidante pelos métodos: C) DPPH. D) ABTS. E) FRAP.....	78
<b>4.2 Artigo 2 – Condições de extração por maceração para determinação de compostos fenólicos constituintes e atividade antioxidante de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....</b>	<b>79</b>
Figura 1 - Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas para seis diferentes de massas de folhas de <i>C. roseus</i> . Os valores de concentração são expressos em equivalentes de ácido gálico (CEAG). As condições representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5% de significância.....	86
Figura 2 - Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas para sete tipos de fases extratoras. 1: acetona, 2: etanol, 3: metanol, 4: água, 5: etanol:acetona (70:30, v/v), 6: etanol-água (50%, v/v), 7: metanol:água (50%, v/v). Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.....	87
Figura 3 - Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas por maceração com e sem homogeneização. 1: vórtex (5 min), 2: maceração com agitação (3 h), 3: maceração sem agitação (24 h). Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG).	

Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.....	88
Figura 4 - Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas para cinco tempos de extração. Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.....	89
Figura 5 - Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas para quatro temperaturas de extração. Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.....	90
Figura 6 - Cromatograma obtido para os padrões de ácidos fenólicos na concentração de 12,5 mg L <sup>-1</sup> : 1) ácido salicílico; 2) ácido vanílico; 3) ácido siríngico; 4) ácido gálico; 5) ácido ferúlico e 6) ácido cafeico.....	92
Figura 7 - Espectro de massas de ácidos fenólicos e ascórbicos – comparação entre padrão e biblioteca Nist 2.0.....	93
Figura 8 - Cromatograma do extrato da cultivar 11 (Híbrida Doméstica) obtido nas condições extração otimizadas: 1) ácido salicílico; 2) ácido vanílico; 3) ácido siríngico; 4) ácido gálico; 5) ácido ferúlico e 6) ácido cafeico.....	94
Figura 9 - Dendograma de agrupamento pelo método UPGMA de 12 cultivares de <i>C. roseus</i> : 1) Vinca Cora Red (não avaliado), 2) Vinca Sustorm White Eye, 3) Vinca Sustorm Pure White, 4) Vinca Sustorm Blush, 5) Vinca Sustorm Rose Eye, 6) Vinca Cora Strawberry, 7) Vinca Sustorm Deep Orchid, 8) Vinca Cora Deep Lavender, 9) Vinca Sustorm Purple, 10) Vinca Sustorm Apricot, 11) Híbrida Doméstica e 12) Híbrido Selvagem. Ponte de corte de Mojena (linha tracejada).....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
Tabela 1 – Comparação entre os mecanismos, princípios, vantagens e limitações dos principais métodos para determinação da atividade antioxidante.....	41
<b>4.1 Artigo 1 - Metodologia miniaturizada para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante.....</b>	<b>51</b>
Tabela 1 - Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).....	65
<b>4.2 Artigo 2 – Condições de extração por maceração para determinação de compostos fenólicos constituintes e atividade antioxidante de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....</b>	<b>79</b>
Tabela 1 - Parâmetros e níveis avaliados para extração de compostos fenólicos em <i>C. roseus</i> .....	83
Tabela 2 - Concentrações de fenóis totais (CEAG: concentração equivalente de ácido gálico), flavonoides (CEQ: concentração equivalente de quercetina) e atividade antioxidante expressa pela concentração equivalente de Trolox (CET) nos métodos DPPH, ABTS e FRAP em extratos de 12 cultivares de <i>C. roseus</i> .....	91
Tabela 3 - Concentrações de ácidos fenólicos em extratos de <i>C. roseus</i> oriundos de 12 cultivares....	95

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1	Metabolismo secundário.....	18
3.2	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don .....	18
3.3	Atividade antioxidante e compostos fenólicos.....	22
3.4	Métodos de extração de metabólitos secundários em plantas .....	25
3.5	Análises fitoquímicas de fenóis totais e flavonoides .....	29
3.5.1	Determinação do teor de fenóis totais.....	28
3.5.2	Determinação do teor de flavonoides.....	32
3.6	Métodos para determinar a atividade antioxidante .....	34
3.6.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....	34
3.6.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	36
3.6.3	Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.....	39
3.7	Análises cromatográficas de compostos fenólicos .....	43
3.8	Referências.....	45
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	<b>51</b>
4.1	Artigo 1 - Metodologia miniaturizada para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante .....	51
4.2	Artigo 2 – Condições de extração por maceração para determinação de compostos fenólicos constituintes e atividade antioxidante de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don .....	79
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>101</b>
	APÊNDICE A – Esquema representativo para análise quantitativa de fenóis totais por espectrofotometria .....	102
	APÊNDICE B – Esquema representativo para cálculo da concentração de fenóis totais em amostra líquida e sólida. Continuação apêndice A .....	103



## 1 INTRODUÇÃO

O metabolismo secundário compõe uma importante estratégia química para defesa das plantas frente às adversidades do meio ambiente em que estão inseridas (ROCKENBACH *et al.*, 2018). Várias classes químicas atuam como protetores vegetais, por exemplo, os compostos fenólicos, estilbenos, terpenos, cumarinas, carotenoides, taninos e alcaloides (BOROSKI *et al.*, 2015).

Os compostos presentes nessas classes não participam diretamente do crescimento ou reprodução das plantas (BRAZ-FILHO, 2010), mas atuam na proteção (ROCKENBACH *et al.*, 2018). Por isso, esses metabólitos secundários têm despertado interesse como princípios ativos de remédios (FARJADMAND *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, a *Catharanthus roseus* (L.) G. Don tem um papel de destaque na formulação de medicamentos contra diversos tipos de cânceres (CHUNG *et al.*, 2007). A partir dessa espécie foram isolados alcaloides de grande importância para a medicina, como a vimblastina e vincristina, que possuem atividade antitumoral (YAMAMOTO *et al.*, 2016).

A *C. roseus* apresenta o metabolismo secundário bem desenvolvido, sendo composto por uma diversidade de classes químicas como os compostos fenólicos (MUSTAFA; VERPOORTE, 2007), que ainda têm recebido pouca atenção do meio científico.

Os compostos fenólicos apresentam em suas estruturas químicas uma hidroxila ligada ao anel aromático, característica que torna o uso desses compostos como agentes antioxidantes (AGBO *et al.*, 2015). Estes compostos apresentam capacidade de reduzir ou eliminar a formação de radicais livres. Os radicais são espécies químicas que apresentam em sua estrutura elétrons desemparelhados e, conseqüentemente, podem danificar células devido à alta reatividade (ZHANG *et al.*, 2015).

Por isso, o primeiro desafio em estudos envolvendo os compostos fenólicos é a extração seletiva a partir dos tecidos vegetais (ALTEMIMI *et al.*, 2017). Nesse sentido, métodos mais instrumentalizados como ultrassom, micro-ondas e extrator por fluido supercrítico têm apresentado elevada eficiência, precisão e agilidade (ALARA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2015). Entretanto, com maior custo de aquisição e manutenção, restringindo o acesso (AZMIR *et al.*, 2013).

Em contrapartida, os métodos menos instrumentalizados como a maceração e extração por Soxhlet têm sido considerados mais econômicos e com menor número de etapas, porém com elevado consumo de solvente e tempo de extração (ALARA *et al.*, 2018; FARJADMAND *et al.*, 2018). Esses métodos precisam ser otimizados para que os analitos alvos, ou seja, os compostos fenólicos sejam extraídos de forma seletiva e efetiva. Por isso, os parâmetros que podem ser otimizados têm sido a massa de amostra, o tipo de solvente, o volume de solvente, o tempo, a temperatura, dentre outros parâmetros (ALARA *et al.*, 2018).

Para confirmação da eficiência da extração desses compostos, podem-se utilizar análises fitoquímicas, como o teor de fenóis totais e flavonoides e a avaliação do potencial antioxidante dos constituintes desses extratos através de métodos como DPPH, ABTS e FRAP. Esses métodos consistem em medir a capacidade de transferir elétrons dos compostos fenólicos para os reagentes de cada método, utilizando métodos espectrofotométricos (BOROSKI *et al.*, 2015; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Apesar de muito difundido na literatura, esses métodos apresentam protocolos

que empregam quantidades elevadas de reagentes, tornando não aplicável para plantas com massa vegetal reduzida, como é o caso da *C. roseus*.

Posteriormente, a caracterização dos compostos responsáveis por essa atividade antioxidante é realizada por análises cromatográficas, que são capazes de separar, identificar e quantificar os compostos presentes nos extratos (XIANG *et al.*, 2019).

Por isso, este estudo teve como objetivo miniaturizar as metodologias convencionais de determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e dos testes de DPPH, ABTS e FRAP. Em seguida, otimizar as condições de extração de compostos fenólicos em *C. roseus* e aplicar a metodologia otimizada para obter extratos de diferentes cultivares. E nesses extratos determinar a atividade antioxidante e a composição química dos ácidos fenólicos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Miniaturizar a quantidade de reagentes utilizada nas metodologias convencionais de determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e dos testes de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP e otimizar a maceração como método de extração de compostos fenólicos em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Miniaturizar a quantidade de reagentes utilizada nos métodos de determinação do teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante por ABTS, FRAP e DPPH;
- Otimizar a maceração como método de extração de compostos fenólicos em *C. roseus*;
- Preparar extratos de 12 cultivares de *C. roseus*, utilizando o método de extração otimizado;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos de 12 cultivares de *C. roseus*, utilizando as metodologias miniaturizadas;
- Determinar a composição química de ácidos fenólicos dos extratos de 12 cultivares de *C. roseus*, usando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Estudar a dissimilaridade dos 12 cultivares de *C. roseus*, usando o método de agrupamento de pares de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Metabolismo secundário

Para consolidar a conquista do ambiente terrestre, as plantas desenvolveram dois tipos de metabolismos químicos, denominados de primário e secundário. O metabolismo primário tem como objetivo a síntese de moléculas orgânicas essenciais para a manutenção e desenvolvimento das plantas como carboidratos, proteínas, lipídios, aminoácidos e bases nitrogenadas (AZMIR *et al.*, 2013).

O metabolismo secundário abrange a síntese de compostos orgânicos como ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, alcaloides, terpenos e outros, que não são essenciais ao desenvolvimento das plantas (DREW; DEMAIN, 1977; BRAZ-FILHO, 2010; BOROSKI *et al.*, 2015). Entretanto, são importantes na defesa frente às pressões ambientais (ROCKENBACH *et al.*, 2018), como a alteração na radiação solar, estresse hídrico, fertilidade do solo, contaminação atmosférica, sazonalidade e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os compostos do metabolismo secundário podem apresentar propriedades antioxidantes e atuar como protetores solares da planta contra danos no aparelho fotossintético pelo alto índice de radiação atmosférica (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Atuam também na defesa contra o ataque de patógenos e pragas deixando as estruturas vegetais menos palatáveis (SPEED *et al.*, 2015). Se por um lado esse metabolismo representa uma importante ferramenta na consolidação das plantas no ambiente terrestre, por outro é fonte dos princípios ativos de formulações farmacêuticas para casos de agravo da saúde humana e animal (FARJADMAND *et al.*, 2018). Por isso, os estudos envolvendo produtos de origem vegetal apresentam grande relevância, para áreas como a química e a medicina (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

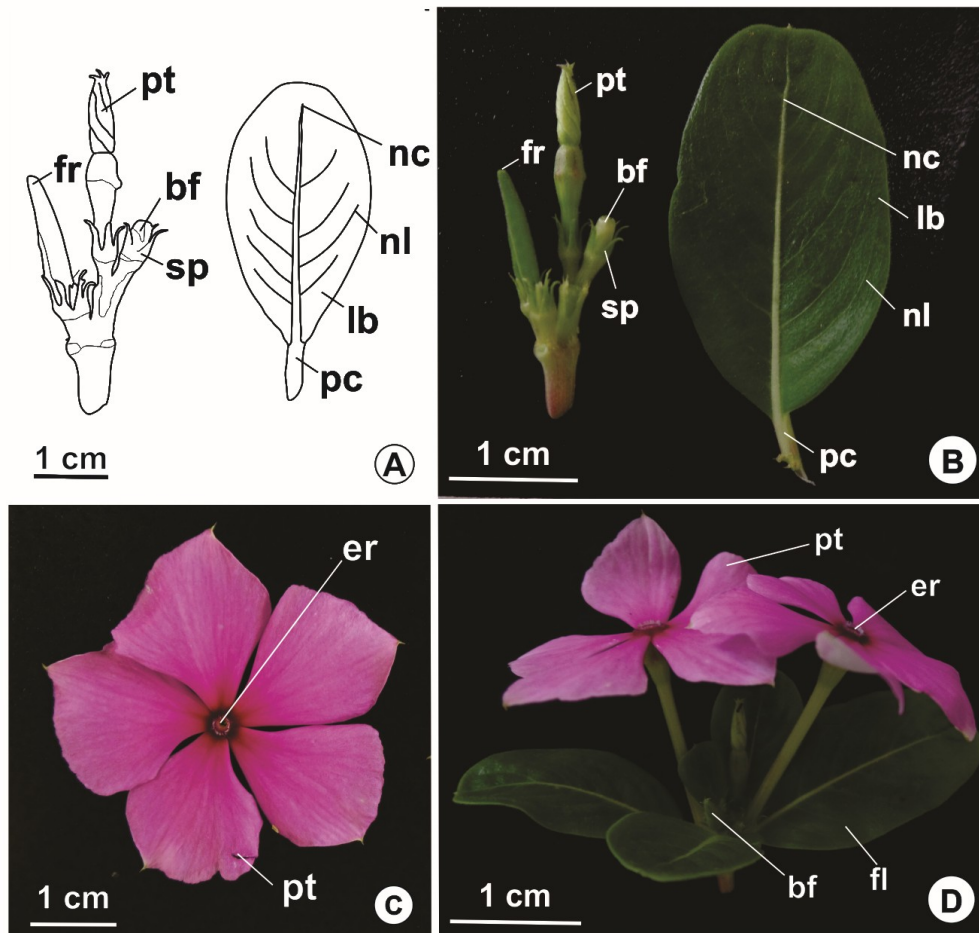
Neste estudo, a *Catharanthus roseus* foi selecionada por ser uma planta que tem se destacado por apresentar o seu metabolismo secundário bem desenvolvido e ser tolerante a diversas condições ambientais (JALEEL *et al.*, 2008; NEJAT *et al.*, 2015). Isso constitui fortes evidências de que *C. roseus* pode reunir em sua composição espécies químicas com elevado potencial antioxidante.

#### 3.2 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma planta que pertence à família das apocináceas, grupo especializado na produção de importantes alcaloides (GAJALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI; DEVI, 2013). O gênero *Catharanthus* engloba oito espécies, sendo sete originárias de Madagascar, no continente africano, e uma endêmica da Índia. O primeiro registro do gênero foi realizado por Linnaeus e, em 1837, a espécie foi renomeada por George Don e passou a ter o nome científico de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, com origem em Madagascar (NEJAT *et al.*, 2015).

É uma planta herbácea e perene (TIONG *et al.*, 2013) que apresenta folhas elípticas de forma oblonga e se distribuem de modo alternado no caule, como pode ser observado na Figura 1. A *C. roseus* apresenta ainda flores pentâmeras com pétalas de coloração variando de branca a rosa-escuro (GAJALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI; DEVI, 2013). A estrutura reprodutiva também conhecida como “olho” da flor pode apresentar coloração diferente das pétalas.

Figura 1 – Morfologia externa de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (A) desenho esquemático do ápice floral e folha; (B) fotografia do ápice floral e folha; (C) flor em antese evidenciando a estrutura reprodutiva; (D) folhas e flores totalmente expandidas. pc: pecíolo, lb: limbo foliar, nl: nervura lateral, nc: nervura central, fr: fruto, pt: pétala, sp: sépala, bf: botão floral, er: estrutura reprodutiva



Fonte: Da autora, 2020.

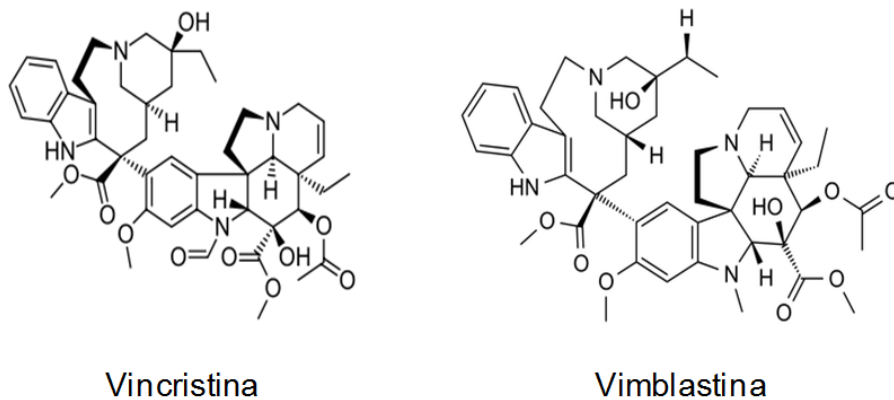
A *C. roseus* foi introduzida como uma planta ornamental popular em muitas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (GAJALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI; DEVI, 2013; NEJAT *et al.*, 2015). No Brasil, é popularmente conhecida como vinca-de-gato, vinca, boa-noite, beijo da mulata e maria-sem-vergonha. A dispersão da espécie pode ser por semente ou estaca. A germinação ocorre em ambiente escuro e com facilidade. Além disso, é pouco exigente em água, sobrevive bem em solos arenosos e sob pleno sol. A coloração e simplicidade das flores atraem os cultivadores (NEJAT *et al.*, 2015).

A *C. roseus* passou por diversos usos na horticultura, dentre eles: cobertura do solo, decoração em vasos, cerca viva e, em alguns cenários, foi considerada espécie daninha. Os diferentes usos proporcionaram mudanças na distribuição e genética da espécie (CURRY, 2012). Os cruzamentos de *C. roseus* resultaram em cultivares com variação da altura da planta, formato das pétalas, maior tolerância a doenças e ambientes frios. Essas cultivares são separadas em séries, sendo as mais conhecidas: Carpet, Cooler, Cora, Heat Wave, First Kiss, Jaio, Little, Mediterranean, Nirvana, Pacifica, Pretty, Solar,

Stardust, Sunstorm, Titan, Tropicana, Victory, Viper e Vitesse. As flores dessas séries apresentam uma variedade de cores: rosa claro ou escuro, vermelho, escarlata, branco, branco com olhos vermelhos, azul lavanda, pêssego, damasco, vinho e outras tonalidades (NEJAT *et al.*, 2015).

A *C. roseus* ganhou destaque pela sua importância medicinal. Isso ocorreu em 1950-1970 com o isolamento de dois alcaloides indólicos chamados de vincristina e vimblastina, conforme estrutura química apresentada na Figura 2 (TIONG *et al.*, 2013, YAMAMOTO *et al.*, 2016).

Figura 2 – Estruturas químicas de alcaloides isolados de *C. roseus* para o tratamento antineoplásico



Fonte: Da autora, 2020.

Essas duas substâncias apresentam potente ação no controle do crescimento de células tumorais e, por isso, são utilizadas no tratamento de diversos cânceres (CHUNG *et al.*, 2007, BRAZ-FILHO, 2010). Atualmente, são os princípios ativos de maior eficiência no tratamento da leucemia e linfoma (KARIMI; RAOFIE, 2019; QU; SAFONOVA; DE-LUCA, 2019).

Os estudos do metabolismo secundário dessa espécie se intensificaram e, desde a sua descoberta, foram isolados aproximadamente 130 alcaloides com potencial para controle de outras doenças (VERMA *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2016; ALAM *et al.*, 2017). Além da função antitumoral, *C. roseus* apresenta muitas outras ações farmacológicas, tais como antimicrobiano, antioxidante, anti-helmíntico, antifúngico, antiesterilidade e antidiarreico (GAJALAKSHMI; VIJAYALAKSHMI; DEVI, 2013).

Em virtude da alta eficiência e do custo de obtenção desses alcaloides, os estudos das últimas décadas foram voltados para modificações genéticas e cultivo *in vitro* da *C. roseus* para maximizar a produção dessas substâncias (VERMA *et al.*, 2012; ABOUZEID *et al.*, 2019). Os estudos agrônômicos e de outras substâncias do metabolismo secundário foram pouco realizados (MELO; ALVARENGA, 2009). Os fenólicos como ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogênico, entre outros, são compostos com importante atividade antioxidante, que estão presentes nos tecidos da *C. roseus* (MUSTAFA; VERPOORTE, 2007) e não foram completamente avaliados.

### 3.3 Atividade antioxidante e compostos fenólicos

Antioxidantes são substâncias capazes de impedir o início ou seguimento da cadeia de reações oxidativas envolvendo radicais livres (OLIVEIRA, 2015). Os radicais livres são espécies químicas que apresentam elétrons desemparelhados e, por isso, são altamente reativas. Essas espécies podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, como câncer e outros tipos degenerativos. Dessa forma, os antioxidantes atuam neutralizando os radicais no organismo (AGBO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Portanto, um desequilíbrio entre radicais livres e antioxidantes resulta no chamado estresse oxidativo. Nessa condição, os radicais atacam macromoléculas importantes como os lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico - DNA), causando danos às células e perturbações homeostáticas<sup>1</sup> - doenças (BARBOSA *et al.*, 2010; ABDEL-LATEIF; ELDEAB; MAGHRABI, 2016).

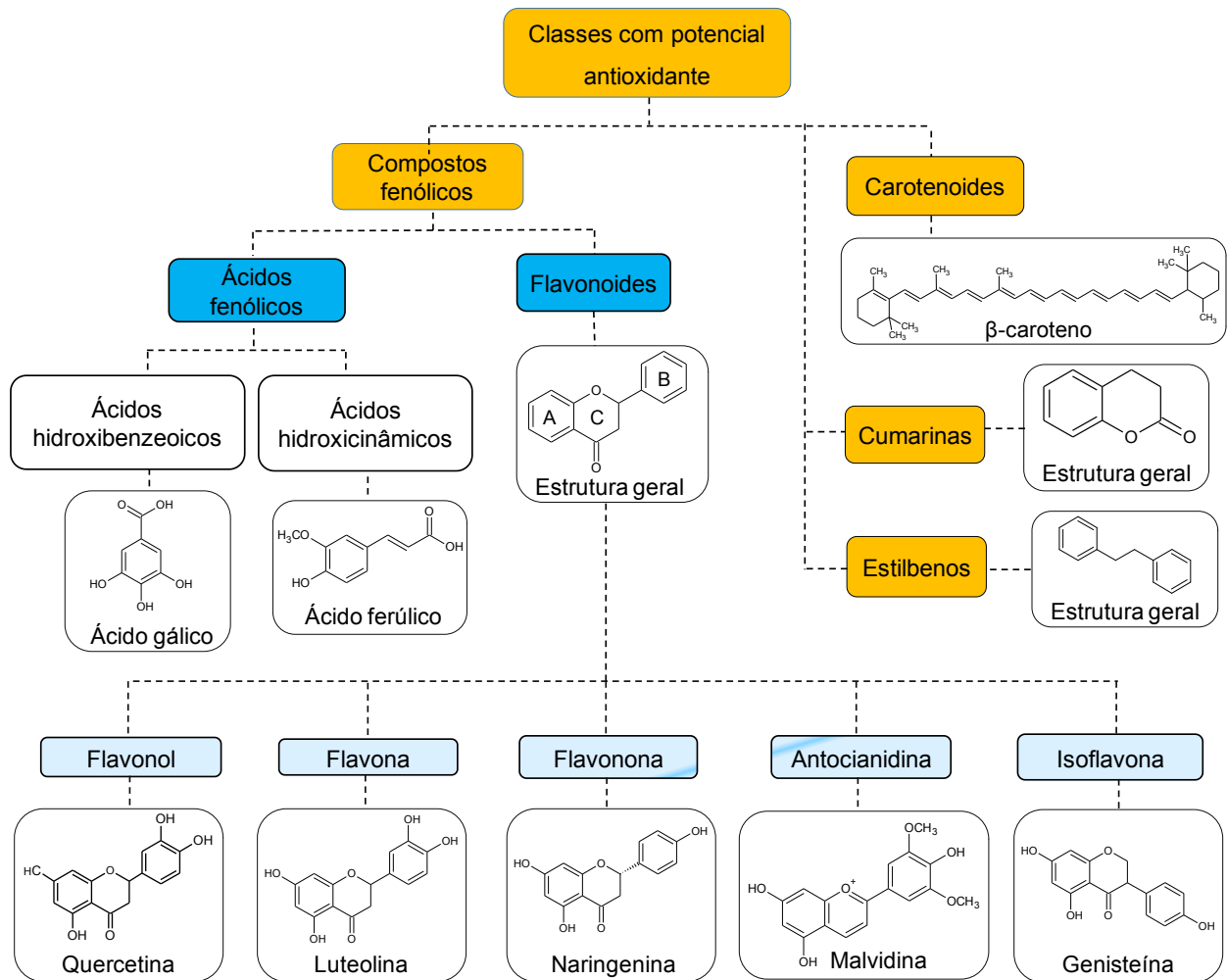
Os antioxidantes naturais de fonte exógenas constituem uma forma promissora de inibir a iniciação ou o seguimento do processo de carcinogênese. O mecanismo de ação tem como base a transferência de elétrons ou átomo de hidrogênio do antioxidante para o radical livre, assumindo a forma de espécie química inativa e interrompendo a reação em cadeia (ARNAO, 2000; APAK *et al.*, 2016).

As classes de substâncias com potencial antioxidante mais comumente discutidas na literatura científica têm sido os carotenoides, estilbenos, cumarinas e taninos, como podem ser observadas na Figura 3.

---

<sup>1</sup> Homeostática: vem de homeostasia, termo grego no qual *homeo* “significa similar/igual” e *stasis* significa “estático”. Trata-se de processos de regulação do meio interno, principalmente de seres vivos, de maneira a estabelecer um equilíbrio e realizar as funções do organismo de modo adequado. As perturbações na homeostasia do organismo são caracterizadas pela extinção ou funcionamento inadequado das células e configuram o quadro de doença.

Figura 3 – Classes de substâncias com atividade antioxidante extraídas de amostras vegetais

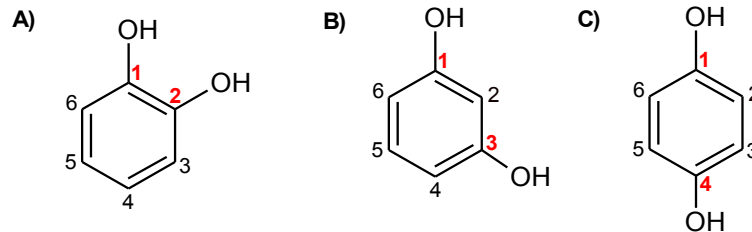


Fonte: Adaptado de BOROSKI *et al.*, 2015.

Os compostos fenólicos apresentam na estrutura química pelo menos um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (-OH) e podem ser classificados como antioxidantes primários e secundários. Nos primários, os grupos doadores de elétrons encontram-se nas posições *orto* (C1 e C2) e *para* (C1 e C4) do anel aromático, como pode ser observado na Figura 4. Esses compostos são considerados moléculas de maior potencial para reagir com os radicais livres e quelar metais *in vitro* e *in vivo* (SOARES, 2002; AGBO *et al.*, 2015).



Figura 4 – Estruturas químicas de compostos fenólicos A) *orto*: quando os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 2; B) *meta*: os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 3; C) *para*: quando os grupos substituintes estão ligados aos carbonos 1 e 4



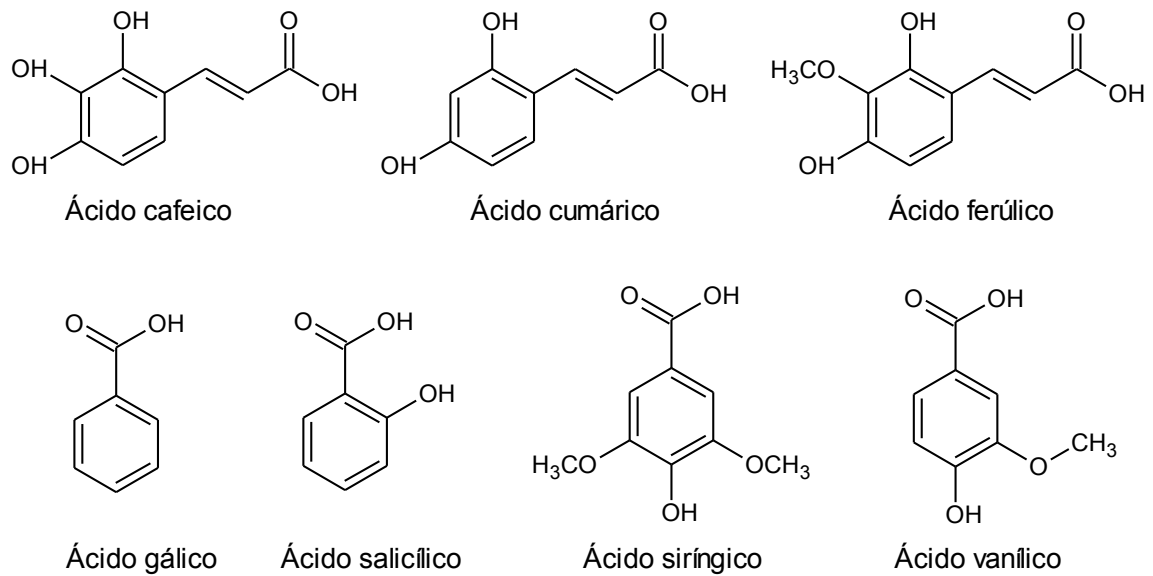
Fonte: Da autora, 2020.

Os antioxidantes secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais. Nesse processo, o composto com ação antioxidante liga-se a metais por meio de ligações covalentes e formam os complexos chamados quelatos. Isso impede que o metal participe como catalisador na produção de radicais livres no interior das células (DEL RÉ; JORGE, 2012; APAK *et al.*, 2016).

Os ácidos fenólicos são moléculas biologicamente ativas, que podem estar presentes em várias plantas comestíveis e não comestíveis. Por isso, são alvos das indústrias de beleza, saúde e medicina, apresentando propriedades antienvhecimento, antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória (AL-JITAN; ALKHOORI; YOUSEF, 2018).

Estudo anterior mostrou que os ácidos ferúlico, cafeico, sinápico, *p*-cumárico, vanílico e gálico foram os principais responsáveis por essas atividades, pois apresentam grupos hidroxilas ligados nas posições *orto* e *para* de seus anéis aromáticos, o que configura alta reatividade desses grupos em doar elétron ou o átomo de hidrogênio (MATHEW; ABRAHAM; ZAKARIA, 2015). As estruturas químicas desses compostos podem ser observadas na Figura 5.

Figura 5 – Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos



Fonte: Da autora, 2020.

Esses ácidos têm participado da formulação de protetores solares e cosméticos que previnem dos danos da radiação ultravioleta (UV) proveniente do sol e, por consequência, do câncer de pele (GALANAKIS; TSATALAS; GALANAKIS, 2018).

Vale ressaltar que as indústrias de alimentos também têm apresentado interesse nesses compostos, visando substituir os antioxidantes sintéticos por naturais, utilizados na conservação de alimentos durante o armazenamento. Para isso, o objetivo principal dessas indústrias é reduzir a lipoperoxidação<sup>2</sup> e a oxidação de pigmentos e proteínas que reduzem a qualidade e o valor nutricional dos alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2019). Na indústria de óleos comestíveis estão sendo realizados estudos da eficácia de antioxidantes naturais encapsulados à base de nanoemulsão na estabilidade oxidativa (SHARMA *et al.*, 2019).


### 3.4 Métodos de extração de metabólitos secundários em plantas

A extração é a primeira etapa nos estudos de compostos do metabolismo secundário das plantas (AZMIR *et al.*, 2013; ALTEMIMI *et al.*, 2017). Nessa etapa, o material vegetal é colocado em contato com a fase extratora que pode ser constituída por um único solvente, mistura de solventes ou uso de solventes de forma sequenciada. A escolha de qual metodologia depende do objetivo da pesquisa. A escolha do solvente da fase extratora é realizada com base na polaridade do analito de interesse (ALTEMIMI *et al.*, 2017; FARJADMAND *et al.*, 2018).

<sup>2</sup> Lipoperoxidação: é o processo em que os radicais livres, especialmente as espécies reativas do oxigênio, atacam os ácidos graxos da membrana celular (animal ou vegetal) proporcionando o rompimento da estrutura, perdas metabólicas e, em último nível, causa a morte celular.

Até o momento, não existe um método padrão que possa ser realizado como referência para extração de compostos em plantas, em virtude da complexidade e especificidade de cada matriz (AZMIR *et al.*, 2013). Por isso, várias metodologias têm sido empregadas para extração de compostos orgânicos e inorgânicos das plantas, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Metodologias de extração utilizadas em amostras vegetais

	<p>Analitos inorgânicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Digestão ácida em bloco</li> <li>❖ Micro-ondas</li> </ul>
	<p>Analitos orgânicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Maceração</li> <li>❖ Soxhlet</li> <li>❖ Ultrassom</li> <li>❖ Fluido supercrítico</li> <li>❖ Líquido pressurizado</li> </ul>

Fonte: Da autora, 2020.

Como pode ser observado, o número de métodos de extração é amplo e esses podem se apresentar mais ou menos instrumentalizados (ALTEMIMI *et al.*, 2017; FARJADMAND *et al.*, 2018). Dentre os métodos instrumentalizados, podem-se destacar a extração assistida por micro-ondas (ALARA *et al.*, 2018), a extração assistida por ultrassom (ZHANG *et al.*, 2015), a extração por líquido pressurizado e a extração por fluido supercrítico (ALTEMIMI *et al.*, 2017; ALARA *et al.*, 2018). Esses métodos necessitam de equipamentos sofisticados, que reduzem o tempo de extração e visam elevar a precisão dos resultados (AZMIR *et al.*, 2013).

A extração por micro-ondas utiliza rotação dipolar e condução iônica como mecanismos de aquecimento da amostra para promover a migração dos compostos para fase extratora (TSUKUI; REZENDE, 2014). A extração por ultrassom baseia-se em ondas de baixa frequência e resulta no processo de cavitação<sup>3</sup> com bolhas de alta energia, combinado com pressão e temperatura (FREITAS *et al.*, 2015). A extração por líquido pressurizado utiliza altas pressões e temperaturas para manter o solvente no estado líquido e elevar o poder de penetração na matriz, favorecendo a extração dos compostos de interesse (CASTRO-PUYANA *et al.*, 2013). A extração por fluido supercrítico baseia-se no

<sup>3</sup> Cavitação: processo de formação de cavidades caracterizadas por bolhas de vapor com alta energia interna por efeito da redução da pressão total durante o movimento.

uso de substâncias que são mantidas com pressão e temperatura acima do ponto crítico<sup>4</sup>, sendo o dióxido de carbono o fluido supercrítico mais utilizado na extração de compostos (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996; CHAVES *et al.*, 2020).

Todos esses métodos instrumentalizados têm resultado em extrações rápidas e eficientes. Entretanto, os custos de obtenção dos equipamentos têm sido mais elevados e podem apresentar desvantagens como, por exemplo, na extração assistida por micro-ondas, a energia aplicada pode ocasionar a oxidação de lipídios presentes na matriz e interferir no resultado final de quantificação (PHARM; PHARM; PHARM, 2015). Na extração por ultrassom também podem ocorrer efeitos deletérios<sup>5</sup> nos compostos alvo, de acordo com a energia e o tempo de extração. As demais técnicas modernas apresentam complexidade de operação com vários parâmetros a serem otimizados (DANLAMI *et al.*, 2014).

Como alternativa a esses métodos podem-se destacar os métodos de maceração e extração por refluxo que estão entre os mais utilizados na literatura e são tidos como métodos convencionais (AZMIR *et al.*, 2013; ALARA *et al.*, 2018; FARJADMAND *et al.*, 2018).

A maceração consiste em colocar o material vegetal em contato com o solvente e deixar o sistema em repouso ou sob agitação, processos conhecidos como estático e dinâmico, respectivamente (PIANA *et al.*, 2018). Essa metodologia é considerada mais econômica, pois não emprega equipamentos sofisticados, demanda menor consumo de energia, apresenta número reduzido de etapas de extração e não degrada os compostos alvos.

Na extração em refluxo (Soxhlet), o processo é dinâmico e ocorre por arraste das substâncias pela percolação do solvente em sistema de fluxo (AZMIR *et al.*, 2013). A necessidade de aquecimento na extração por Soxhlet pode ocasionar a perda de compostos por volatilização ou até mesmo degradação desses.

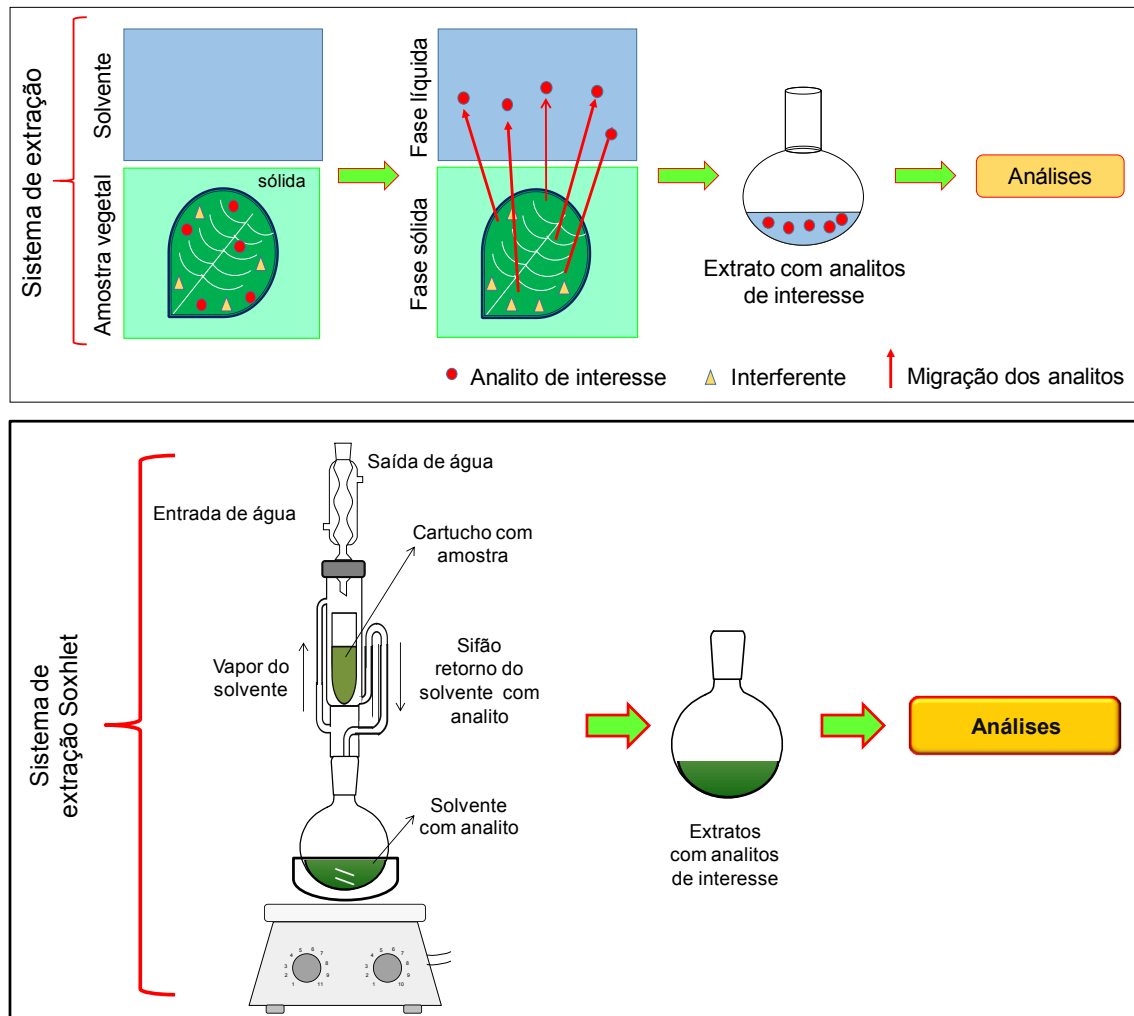
Esses dois métodos têm como princípio a extração sólido-líquido, em que a fase líquida é um solvente orgânico ou a água, e a fase sólida é o material vegetal (FIGURA 7). Para a extração de compostos fenólicos em plantas, os principais solventes utilizados têm sido o metanol, etanol, a água ou misturas desses solventes (VAJIĆ *et al.*, 2015; ČUJIĆ *et al.*, 2016).

---

<sup>4</sup> Ponto crítico: ponto do diagrama de fases (sólido, líquido e gás) que marca a maior temperatura e pressão para que ocorra equilíbrio das fases líquido e gás. Nesse estágio, as propriedades densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade, entre outras, tendem a ser idênticas. Toda substância com temperatura e pressão acima do ponto crítico é denominada de fluido supercrítico.

<sup>5</sup> Deletério: termo derivado do grego que representa um adjetivo para algo ou ação com efeito destrutivo, danoso, degradante sobre o alvo.

Figura 7 – Esquema representando o princípio dos métodos de extração convencionais: maceração e Soxhlet



Fonte: Da autora, 2019.

A extração por maceração ou Soxhlet são processos tradicionais, amplamente empregados em diferentes amostras, e, por isso, algumas vezes utilizados como metodologias de referências. Entretanto, esses dois métodos apresentam como desvantagens o longo período de extração e o uso de quantidades elevadas de solventes (ALARA *et al.*, 2018). A extração por Soxhlet também pode utilizar temperaturas elevadas.

A eficiência de métodos convencionais e não convencionais de extração depende de vários parâmetros como histórico da amostra, acondicionamento e processamento. Logo, é importante compreender a natureza da matriz vegetal e as afinidades químicas de possíveis compostos bioativos (AZMIR *et al.*, 2013). Em seguida, os principais fatores que interferem no sucesso de um método de extração são: o solvente escolhido, a área superficial do material vegetal, o tipo de homogeneização, a temperatura, o tempo de extração e o valor de pH<sup>6</sup> (ALARA *et al.*, 2018).

<sup>6</sup> pH: sigla utilizada para potencial hidrogeniônico, que tem como base uma escala numérica (0 a 14) para determinar a atividade de íons H<sup>+</sup> em meio aquoso, preferencialmente. Essa escala permite medir o grau de acidez, neutralidade e alcalinidade de uma solução.

### 3.5 Análises fitoquímicas de fenóis totais e flavonoides

Após a etapa de extração, o monitoramento dos compostos do metabolismo secundário vegetal é realizado por análises químicas das principais classes de compostos orgânicos, denominadas análises fitoquímicas (BRAZ-FILHO, 2010; FARJADMAND *et al.*, 2018).

Em geral, essas análises são realizadas por meio de reações de complexação<sup>7</sup> que podem ser verificadas qualitativamente por inspeção visual (MIR; SAWHNEY; JASSAL, 2013). Nesse caso, a mudança de coloração ou formação de precipitado indica a presença ou ausência de determinada classe de substâncias.

As análises quantitativas são realizadas empregando curvas analíticas de calibração e padrão externo<sup>8</sup> específico para cada classe química. Geralmente, as análises dos extratos vegetais e das soluções padrão são realizadas em espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) (YADAV; AGARWALA, 2011). O resultado dessas análises pode informar o teor de fenóis totais, flavonoides e taninos. Além disso, pode ser determinado o potencial antioxidante desses extratos (AGBO *et al.*, 2015; ALTEMIMI *et al.*, 2017).

Apesar dessas metodologias serem bastante difundidas na literatura científica, nos estudos envolvendo amostras vegetais diferentes, a quantidade de compostos fenólicos extraídos pode apresentar variações significativas. Por isso, tornou-se fundamental estudar o tempo necessário para a reação, que ocorre em cada método, atingir o platô de maior estabilidade e absorbância.

#### 3.5.1 Determinação do teor de fenóis totais

Essas análises fitoquímicas baseiam-se em ensaios colorimétricos<sup>9</sup>, sendo que o método de Folin-Ciocalteu tem sido amplamente utilizado para determinar o teor de fenóis totais. Esse método foi proposto por Singleton e Rossi, em 1965, preconizando originalmente o uso do Folin-Ciocalteu em vez de Folin-Denis, do ácido gálico como padrão de referência e a necessidade do estudo do tempo de reação (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Em 1999, Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós revisaram o procedimento e confirmaram que o uso do Folin-Denis é dificultado, pois durante a reação ocorre a formação de um precipitado branco que interfere na análise espectrométrica. Dessa forma, propuseram o aumento da proporção de molibdato e

---

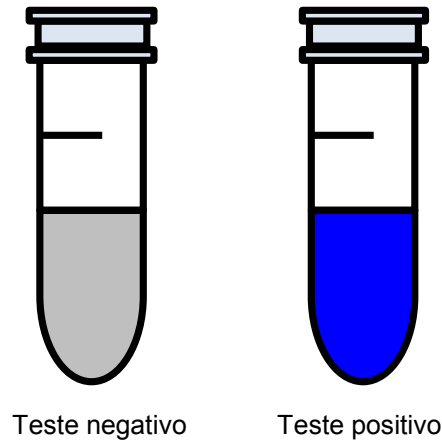
<sup>7</sup> Reação de complexação: ocorre pela interação de agentes quelantes, normalmente orgânico, com íons metálicos através de dois ou mais átomos doadores de elétrons.

<sup>8</sup> Padrão externo: substância conhecida, com teor de pureza elevado ( $\geq 99\%$ ), que é utilizada no preparo de soluções em diferentes concentrações. Essa série de soluções é analisada previamente para obter uma curva analítica, tida como referência para análise de amostras com concentração desconhecida dessa substância.

<sup>9</sup> Ensaio colorimétrico: termo do latim *color* (cor) e *metria* (medida). É uma técnica utilizada para determinar a concentração de compostos coloridos em solução, a partir da variação de absorbância em comprimento de onda selecionado.



Figura 9 – Esquema representativo do meio reacional da análise de fenóis totais indicando o teste negativo e positivo



Fonte: Da autora, 2020.

A determinação quantitativa é realizada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis. As etapas envolvidas na análise quantitativa de fenóis totais podem ser observadas nos Apêndices A e B (páginas 100 e 101).

Para a realização de estudos quantitativos é necessário primeiro preparar soluções padrão utilizando o ácido gálico em diferentes concentrações. Em seguida, essas soluções são colocadas em contato com o reagente de Folin-Ciocalteu. Após a reação, cada uma das misturas obtidas pode apresentar coloração azul com diferentes intensidades. Posteriormente, essas misturas são analisadas em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, ajustando o equipamento para o comprimento de onda entre 725 e 750 nm (LIU *et al.*, 2009). Cada mistura apresentará uma absorvância e essa deve estar, necessariamente, entre 0 e 1 e, preferencialmente, entre 0,2 e 0,8. A lei de Lambert-Beer<sup>10</sup> deve ser utilizada para converter o valor de cada absorvância em concentração de fenóis totais.

As primeiras análises são referentes à curva analítica de calibração. Os extratos a serem analisados passam pela reação com o reagente Folin-Ciocalteu. A leitura da absorvância, assim como nas soluções padrão, deve estar na faixa proposta por Lambert-Beer.

A determinação do teor de fenóis totais é apresentada como mg EAG L<sup>-1</sup> de amostra, para amostras líquidas, e expressa em mg EAG g<sup>-1</sup> de amostra ou mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de amostra, para amostras sólidas. O termo EAG é referente à concentração equivalente de ácido gálico, pois esse composto tem sido o principal padrão de referência utilizado para preparação da curva de calibração e, conseqüentemente, quantificação.

<sup>10</sup> Lei de Lambert-Beer: estabelece uma relação diretamente proporcional entre a absorvância e a concentração da solução, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada (raios luminosos paralelos). Propõe uma faixa de absorvância entre 0,2 e 0,8, pois nesse intervalo a maioria das substâncias apresenta uma relação linear entre a absorvância e a concentração, sendo possível a aplicação a Lei.

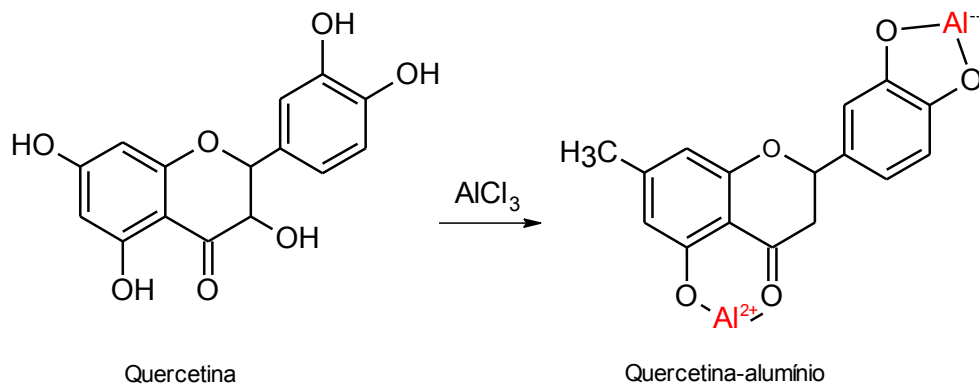


### 3.5.2 Determinação do teor de flavonoides

A determinação de flavonoides totais pode ser realizada pela reação de complexação das substâncias presentes no extrato com cloreto de alumínio (GRANATO *et al.*, 2018). Esse método foi proposto em 1959, em que uma solução de quercetina e uma do agente complexante (cloreto de alumínio -  $\text{AlCl}_3$ ), em meio aquoso e em  $\text{pH} = 4$ , foram misturadas na proporção 1:1 (v/v), obtendo um complexo de coloração amarela (DOWD, 1959).

Durante o processo de evolução do método, o meio aquoso foi substituído por solventes orgânicos e sem acidificação do meio. Essa mudança de solvente favoreceu a solubilidade do padrão de quercetina e a estabilidade do complexo formado (BOROSKI *et al.*, 2015). Apesar dessas alterações, o princípio do método manteve-se baseado na formação do complexo quercetina-alumínio, que apresenta coloração amarela intensa. A equação química da reação de complexação entre um flavonoide e o reagente cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) pode ser observada na Figura 10.

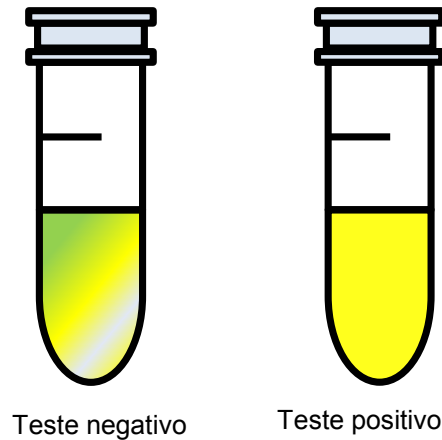
Figura 10 – Equação química da reação de complexação entre flavonoide e o reagente complexante, cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ )



Fonte: BOROSKI *et al.*, 2015.

A análise qualitativa de flavonoides é realizada por meio da verificação da cor amarela do meio reacional, como pode ser observado na Figura 11 nos testes negativo e positivo.

Figura 11 – Esquema representativo do meio reacional da análise de flavonoides com cloreto de alumínio indicando o teste negativo e positivo



Fonte: Da autora, 2020.

A determinação quantitativa é realizada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis. As análises podem ser realizadas entre 400 e 500 nm, sendo que 425 e 430 nm têm sido os comprimentos de onda mais utilizados na determinação da concentração de flavonoides (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014; KUPPUSAMY *et al.*, 2018). As etapas envolvidas na análise quantitativa de flavonoides são similares às empregadas na determinação do teor de fenóis totais e também podem ser observadas nos Apêndices A e B (páginas 100 e 101).

Para a realização de estudos quantitativos é necessário primeiramente preparar soluções padrão utilizando quercetina em metanol, em diferentes concentrações. A quantificação de flavonoides também pode ser realizada utilizando a rutina e catequina como padrão de referência (MA *et al.*, 2011; PHAM *et al.*, 2017; NARDINI; GARAGUSO, 2020).

As soluções padrão preparadas com rutina, quercetina ou catequina e os extratos a serem analisados devem ser misturados com a solução do agente complexante ( $AlCl_3$ ). Nesse momento, cada uma das misturas obtidas pode apresentar coloração amarela com diferentes intensidades. Após análise em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, cada uma dessas misturas irá apresentar uma absorbância. O valor de cada absorbância deverá ser convertido em concentração de flavonoides, por meio da equação da lei de Lambert-Beer.

A determinação da concentração de flavonoides é apresentada em mg EQ  $L^{-1}$  e mg EQ  $g^{-1}$ , sendo que o termo EQ significa equivalente de quercetina. A quercetina é o principal padrão utilizado na preparação da curva de calibração e, conseqüentemente, quantificação.

No método de complexação dos flavonoides, a análise espectrofotométrica pode sofrer interferência de compostos coextraídos da matriz. Esses compostos não complexam com o cloreto de alumínio, mas podem apresentar bandas de absorção no mesmo comprimento de onda dos flavonoides. Nessas situações, pode ocorrer sobreposição de bandas de absorção dos flavonoides complexados e dos demais compostos coextraídos, indicando interferência na análise em 425 nm. A clorofila é o

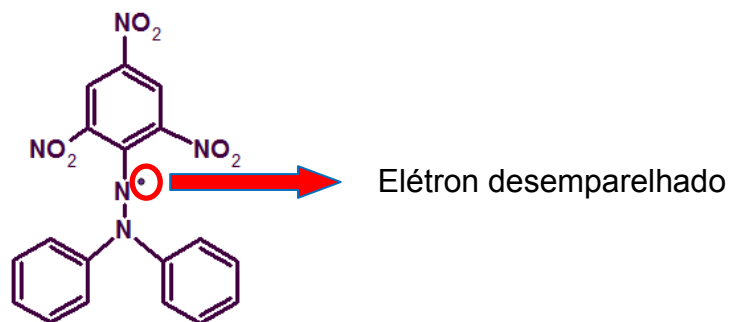
pigmento mais comum de promover interferências na determinação de flavonoides, pois ela apresenta bandas de absorção entre 400-480 e 630-690 nm (ENGEL; POGGIANI, 1991).

### 3.6 Métodos para determinar a atividade antioxidante

#### 3.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O método original de DPPH•, do termo em inglês *1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl*, foi descrito por Blois, em 1958 e, posteriormente, modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Bersert em 1995. O reagente DPPH é caracterizado, principalmente, pelo radical em que o elétron desemparelhado se localiza no átomo de nitrogênio da molécula, como pode ser observado na Figura 12 (BOROSKI *et al.*, 2015).

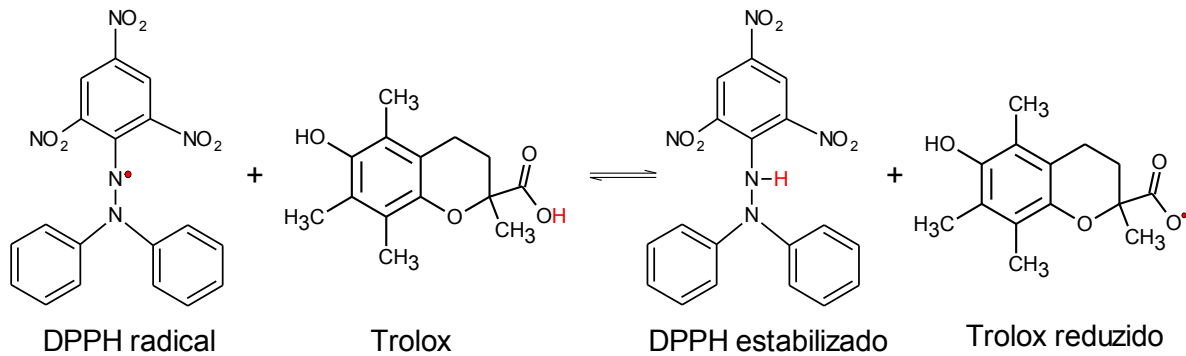
Figura 12 - Estrutura química do radical DPPH indicando o elétron desemparelhado



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Esse método é um dos mais utilizados na literatura e baseia-se na eliminação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), após reação com uma substância com atividade antioxidante (SHAHIDI; ZHONG, 2015). O processo ocorre por meio de reações que envolvem a transferência de átomo de hidrogênio e de elétrons do antioxidante para o radical DPPH• (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), como pode ser observado na Figura 13.

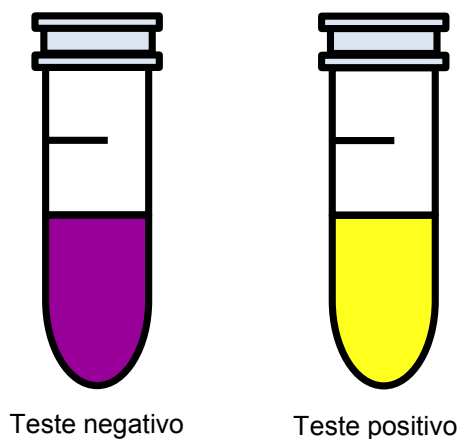
Figura 13 – Equação química da reação entre um radical DPPH• e o padrão de referência Trolox



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2009.

O DPPH, na forma de radical, apresenta coloração púrpura intensa com absorvância máxima entre 515 e 528 nm (BOROSKI *et al.*, 2015). A espécie química formada após reação com a substância antioxidante apresenta coloração amarela e, conseqüentemente, ocorre redução da banda de absorção antes observada em 515 nm (SHAHIDI; ZHONG, 2015). O potencial da atividade antioxidante da amostra é proporcional à mudança de cor da solução contendo o radical DPPH•. Dessa forma, esse parâmetro atua como análise qualitativa da eficiência antioxidante, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 – Esquema representativo do meio reacional do método DPPH indicando o teste negativo e positivo



Fonte: Da autora, 2020.

O método DPPH é considerado fácil, preciso, rápido, simples e econômico, sendo adequado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e misturas complexas, como os extratos vegetais (BONDET *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 2015).

A determinação quantitativa da atividade antioxidante é realizada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis. As análises podem ser realizadas em 515 nm. As etapas envolvidas na análise quantitativa deste método são similares às empregadas na determinação do teor de fenóis totais e flavonoides e também podem ser observadas nos Apêndices A e B (páginas 100 e 101).

Para a realização de estudos quantitativos é necessário, primeiramente, preparar soluções padrão utilizando Trolox, em diferentes concentrações. As soluções padrão preparadas devem ser misturadas com a solução contendo o radical DPPH•. Nesse momento, cada uma das misturas obtidas pode apresentar coloração púrpura descolorida com diferentes intensidades ou amarela. Após análise em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, cada uma dessas misturas irá apresentar uma absorbância.

O valor de cada absorbância deverá ser convertido em atividade antioxidante, por meio da equação da lei de Lambert-Beer. O mesmo procedimento deve ser realizado com os extratos. A determinação da atividade antioxidante é apresentada em mg CET L<sup>-1</sup> e mg CET g<sup>-1</sup>, sendo que o termo CET significa concentração equivalente de Trolox. Alguns estudos também apresentam os resultados em termos de mmol Fe(II) g<sup>-1</sup> ou L<sup>-1</sup>, para amostras sólidas ou líquidas, respectivamente (PIANA *et al.*, 2018; XIANG *et al.*, 2019).

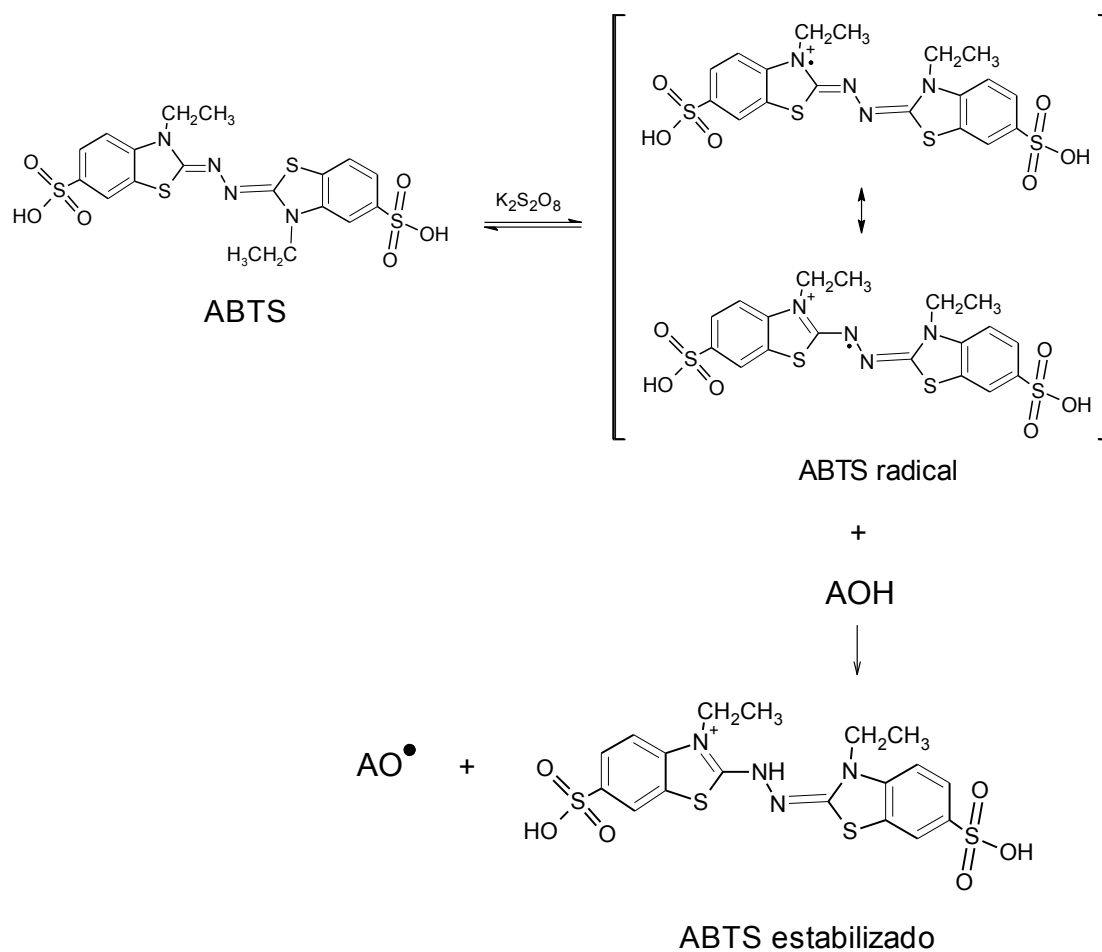
### 3.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O método ABTS, da abreviatura do inglês *2,2'-AzinoBis-3-ethylbenzoThiazoline-6- Sulfonic acid*, foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller, em 1994, e recebeu esse nome devido à capacidade dos compostos antioxidantes de eliminar o radical oriundo do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). O método original foi automatizado como *kits* enzimáticos em soro ou plasma sanguíneo e a formação do radical ABTS simultaneamente à reação (RICE-EVANS; MILLER, 1994).

Os avanços referentes ao método ABTS focaram-se na obtenção do radical, em processo prévio, para depois ser utilizado na reação com os compostos antioxidantes (BOROSKI *et al.*, 2015). A formação do cátion-radical ABTS<sup>+</sup> ocorre a partir da mistura de uma solução contendo o reagente ABTS com uma solução de persulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), na proporção 1:1 (v/v). Essa mistura é deixada em repouso, por 16 horas, no escuro. Ao final desse tempo é obtida uma solução contendo o cátion-radical ABTS<sup>+</sup> de coloração verde-azulada intensa (RE *et al.*, 1999; BOROSKI *et al.*, 2015).

Em geral, antes da reação, é necessário realizar diluições da solução concentrada contendo o cátion-radical ABTS<sup>+</sup>, usando metanol 80% (v/v), até obter uma solução diluída com absorbância de 0,7. O cátion-radical ABTS<sup>+</sup> presente na solução pode ser estabilizado após reação com substâncias com atividades antioxidantes (Figura 15). O processo ocorre por meio de reações que envolvem a transferência de átomo de hidrogênio e de elétrons do antioxidante para o cátion-radical ABTS<sup>+</sup> (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), como pode ser observado na Figura 15.

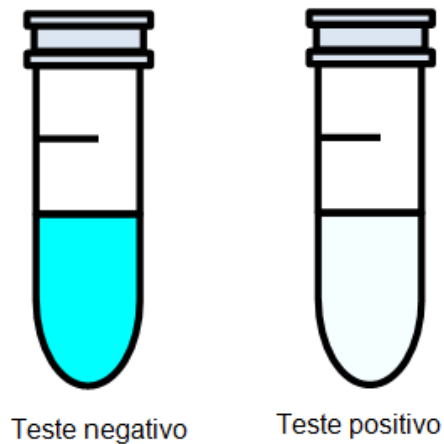
Figura 15 – Equação química da reação entre o cátion-radical ABTS<sup>•+</sup> e o antioxidante (AOH)



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2014.

Após a reação se completar, ocorre mudança de cor do meio reacional de verde para incolor. Essa mudança de coloração evidencia a eliminação do cátion-radical por compostos presentes na amostra (FIGURA 16).

Figura 16 – Esquema representativo do meio reacional durante a estabilização do cátion-radical  $ABTS^{\cdot+}$  pelo padrão Trolox, indicando um teste negativo e um teste positivo



Fonte: Da autora, 2019.

A determinação quantitativa da atividade antioxidante pode ser realizada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis. As análises podem ser realizadas em 734 nm (SHAHIDI; ZHONG, 2015). Esse comprimento de onda está na região do espectro em que não é comum observar bandas atribuídas à interferência dos reagentes e compostos coextraídos da matriz (SIDDIQ; SOGI; DOLAN, 2013).

As etapas envolvidas na análise quantitativa deste método são similares às empregadas na determinação do teor de fenóis totais e flavonoides e também podem ser observadas nos Apêndices A e B (páginas 100 e 101).

Para a realização de estudos quantitativos é necessário, primeiramente, preparar soluções padrão utilizando Trolox, em diferentes concentrações (MAREČEK *et al.*, 2017). As soluções padrão preparadas e os extratos a serem analisados devem ser misturados com a solução contendo o cátion-radical  $ABTS^{\cdot+}$ , em tubos individuais. Nesse momento, cada uma das misturas obtidas pode apresentar coloração esverdeada com diferentes intensidades. Após análise em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, cada uma dessas misturas irá apresentar uma absorbância. O valor de cada absorbância deverá ser convertido em atividade antioxidante, por meio da equação da lei de Lambert-Beer.

A determinação da atividade antioxidante é apresentada em  $mg\ CET\ L^{-1}$  de amostra e  $mg\ CET\ g^{-1}$ , sendo que o termo CET é atribuído à concentração equivalente de Trolox. Alguns estudos também apresentam os resultados em termos de  $\mu mol$  de Trolox ou na forma de  $mmol\ CET\ g^{-1}$  (XIANG *et al.*, 2019; NARDINI; GARAGUSO, 2020).

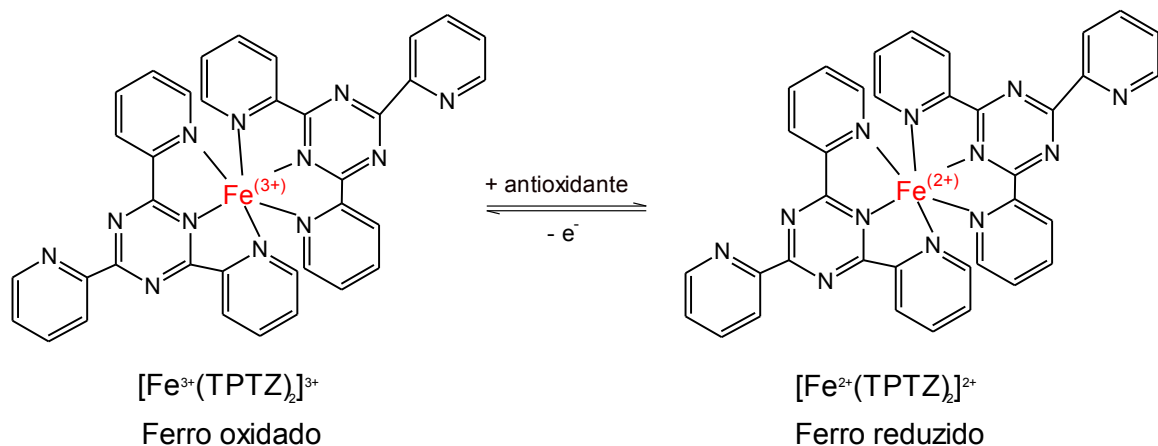
O método ABTS pode ser empregado para determinar a capacidade antioxidante em matrizes de caráter hidrofílicas ou lipofílicas (RE *et al.*, 1999). Além disso, é considerado rápido, sensível e os resultados apresentam elevada repetibilidade (BOROSKI, *et al.*, 2015). Entretanto, esse método pode ser influenciado pelo tipo de solvente utilizado no preparo da amostra e pelo pH do meio, pois a fase

extratora em meio básico promove descoloração do cátion-radical, mesmo na ausência dos extrativos da matriz (resultados não publicados).

### 3.6.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP

A atividade antioxidante também pode ser determinada pelo poder de redução do íon ferro. O termo FRAP é atribuído à abreviatura do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*. Esse método foi desenvolvido, em 1996, considerando as espécies reativas do oxigênio que são geradas a partir do funcionamento das células. Dessa forma, foi proposto um sistema automatizado para a “produção” de  $\text{Fe}^{2+}$  a partir da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Nesse método, o  $\text{Fe}^{3+}$ , presente no complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ , é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$ , presente no  $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ , após reação em meio ácido (pH = 3,6) com os compostos antioxidantes da amostra (BENZIE; STRAIN, 1996). A equação química pode ser observada na Figura 17.

Figura 17 – Equação química da reação de redução do  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  para  $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  na presença de substância antioxidante



Fonte: BOROSKI *et al.*, 2015.

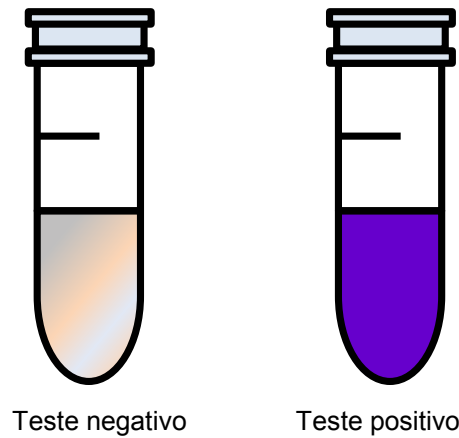
O método FRAP foi desenvolvido, inicialmente, para aplicação em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos isolados, mantidos a temperatura corporal de 37 °C (BENZIE; STRAIN, 1996; URREA-VICTORIA *et al.*, 2016). Por isso, esse método é aplicado, com frequência, em sistemas aquosos (BOROSKI *et al.*, 2015).

A reação apresentada na Figura 17 se caracteriza, principalmente, por envolver o mecanismo com transferência direta de elétrons (TE), diferentemente dos métodos DPPH e ABTS que envolvem a transferência indireta de elétrons e por meio da migração de átomos de hidrogênio (TAH) (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Quando a reação é negativa, o meio reacional apresenta coloração castanho-claro e, quando a reação é positiva, a coloração muda para roxa e pode ser facilmente confundida com azul, como pode ser observado na Figura 18.



Figura 18 – Esquema representativo do meio reacional do método FRAP, indicando um teste negativo e positivo



Fonte: Da autora, 2020.

Essa mudança de coloração é monitorada em 593 nm, usando espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis (PHAM *et al.*, 2017). Quando o método FRAP original foi proposto, a quantificação foi realizada usando solução padrão de sulfato de ferro(II) ( $\text{FeSO}_4$ ) (BENZIE; STRAIN, 1996). Após evolução do método, a solução de Trolox tem sido utilizada, com maior frequência, na literatura científica (BOROSKI *et al.*, 2015; PHAM *et al.*, 2017).

A determinação quantitativa da atividade antioxidante também é realizada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis. As análises podem ser realizadas em 593 nm (PHAM *et al.*, 2017). As etapas envolvidas na análise quantitativa desse método têm sido similares às empregadas na determinação do teor de fenóis totais e flavonoides e também podem ser observadas nos Apêndices A e B (páginas 100 e 101).

Para a realização de estudos quantitativos é necessário, primeiramente, preparar soluções padrão utilizando Trolox, em diferentes concentrações. As soluções padrão preparadas e os extratos a serem analisados devem ser misturados com a solução contendo o  $\text{Fe}^{3+}$  na forma do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), ou seja,  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ . Nesse momento, cada uma das misturas obtidas pode apresentar coloração variando de castanho-claro a púrpuro-escuro, com diferentes intensidades. Após análise em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, cada uma dessas misturas apresentará uma absorbância. O valor de cada absorbância deverá ser convertido em atividade antioxidante, por meio da equação da lei de Lambert-Beer (BOROSKI *et al.*, 2015).

A determinação da atividade antioxidante é apresentada em mg CET  $\text{L}^{-1}$  de amostra e mg CET  $\text{g}^{-1}$ , sendo que o termo CET é atribuído à concentração equivalente de Trolox. Alguns estudos também apresentam os resultados em termos de  $\mu\text{mol}$  de Trolox ou na forma de mg CET  $\text{g}^{-1}$  (PHAM *et al.*, 2017; ONIGA *et al.*, 2018).

Estudos prévios têm criticado esse método por realizar as análises em pH não fisiológico e na região do espectro eletromagnético em que outros compostos, incluindo pigmentos, apresentam bandas de absorção e podem ser possíveis interferentes. (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000;

GRANATO; NUNES, 2016). Apesar dessas críticas, o método é considerado uma importante ferramenta de determinação do potencial antioxidante de amostras, pois indica o mecanismo de transferência de elétrons envolvido durante a reação da amostra com o reagente TPTZ (BOROSKI *et al.*, 2015).

Nesse sentido, e para facilitar a comparação entre cada um dos métodos apresentados, foi preparada uma tabela que reúne os mecanismos envolvidos, as vantagens e limitações de cada método (Tabela 1).

A avaliação detalhada de cada uma dessas informações pode ser decisiva no processo de escolha do método mais adequado para definir a atividade antioxidante de uma determinada amostra (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Tabela 1 – Comparação entre os mecanismos, princípios, vantagens e limitações dos principais métodos para determinação da atividade antioxidante.

Método	Mecanismo	Padrões	Princípios	Vantagens	Limitações
DPPH•	- TAH - TE	Ácido gálico Catequina Quercetina Ácido cafeico Trolox	Avalia a capacidade do antioxidante em transferir hidrogênio/elétrons para estabilizar o radical livre DPPH•, monitorando a mudança de cor do meio (roxo > amarelo).	Aplicação em diversas matrizes (vegetal e animal); alta sensibilidade e facilidade de aplicação.	Interferência de antocianinas e carotenoides na análise ( $\lambda = 515$ nm).
ABTS	- TAH - TE	Trolox	Avalia a capacidade do antioxidante em transferir hidrogênio/elétrons para estabilizar o radical livre ABTS, monitorando a descoloração da solução do radical (verde > incolor).	Pode ser aplicado em amostras de natureza lipofílica e hidrofílica e a leitura em 734 nm reduz interferências.	Estequiometria complexa e dependência do pH do meio.
FRAP (poder de redução)	- TE	Fe <sup>2+</sup> Trolox FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Avalia a capacidade dos compostos antioxidantes presentes na amostra em reduzir o complexo 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) e obter um complexo com Fe <sup>2+</sup> de coloração roxa.	Distingue entre TAH e TE qual mecanismo dominante, simples, robusto, alta reprodutibilidade e repetibilidade.	pH de 3,6 (não fisiológico), interferência de pigmentos no $\lambda = 593$ nm e do ácido ascórbico na reação.
Habilidade quelante	- TE - Quelante	Trolox, EDTA	Determina a habilidade dos compostos antioxidantes da amostra em quelar íons ferro (II), através do uso de ferrozina como competidor pela formação de um complexo rosa.	Aplicável em diversas matrizes, rápido, requer pouca amostra e reagentes. Baixa geração de resíduos.	Exige controle rigoroso do pH do meio. Interferências de pigmentos no comprimento de onda da análise.
TRAP	TAH	Trolox	Determina a capacidade dos compostos antioxidantes em capturar radicais livres, empregando a proteína R-ficoeritrina como substância fluorescente.	Uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, pois, assim, ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras.	Instrumento caro, execução complexa e demorada. Requer intensa experiência e especialização.
ORAC	TAH	Trolox	Determina a capacidade dos compostos antioxidantes em capturar radicais livres empregando a proteína e a fluoresceína como substâncias fluorescentes.	Uso da fluorescência como medida do dano oxidativo. Isso elimina interferências dos compostos coloridos presentes nas amostras.	Instrumento caro, sensível à temperatura e longo tempo de análise.

Fonte: Adaptado de PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; BOROSKI *et al.*, 2015; SHAHIDI; ZHONG, 2015.

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (Parâmetro Antioxidante Total de Captura Radicalar). ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio). TAH: Transferência de Átomos de Hidrogênio. TE: Transferência de Elétrons. EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético.

Apesar desses métodos estarem muito bem sedimentados na literatura científica, foi observado que os volumes e as quantidades dos reagentes usados em cada um dos respectivos protocolos representam um entrave na realização de alguns trabalhos científicos. Por isso, foi verificado que um estudo minucioso, empregando volumes reduzidos de cada reagente e, conseqüentemente, dos extratos vegetais pode ser de grande importância para trabalhos que não disponham de grande quantidade de amostras vegetais, além de representar uma significativa economia no custo da análise.

Nesse sentido, uma das propostas deste estudo foi reduzir as quantidades de reagentes descritos em cada protocolo e aplicá-los na determinação da atividade antioxidante de extratos da *C. roseus*.

### 3.7 Análises cromatográficas de compostos fenólicos

As substâncias associadas às atividades antioxidantes dos extratos vegetais têm sido alvo de diversas pesquisas, visando à completa caracterização qualitativa e quantitativa (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; ČUJIC *et al.*, 2016; GULCIN *et al.*, 2019). Nesse sentido, a principal ferramenta analítica empregada são os métodos cromatográficos. Esses métodos possibilitam a separação, identificação e quantificação simultânea de cada substância presente no extrato vegetal (BAGHDADY; SCHUG, 2016; XIANG *et al.*, 2019).

Os dois principais métodos cromatográficos empregados, nestes estudos, são cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) e a cromatografia em fase gasosa (CG) (BAJ *et al.*, 2017; ONIGA *et al.*, 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência é empregada quando as substâncias de interesse apresentam massa molecular considerada alta, com tendência a ser pouco volátil ou termicamente instável (THAMMANA, 2016).

A cromatografia em fase gasosa caracteriza-se por analisar amostras que apresentam compostos termicamente estáveis e voláteis. Além dessas moléculas, essa técnica também permite a determinação de espécies químicas volatilizáveis (BAGHDADY; SCHUG, 2016). Para ser volatilizável, a molécula precisa passar por uma reação química, denominada derivatização (PAGLIANO *et al.*, 2018). Na derivatização, a espécie química se torna volátil e termicamente estável e, assim, pode ser analisada por cromatografia em fase gasosa (PAGLIANO *et al.*, 2018; SAJID, 2018).

Em geral, a CG e a HPLC apresentam-se acopladas a ferramentas de identificação, que são chamadas de detectores cromatográficos. Na HPLC, os principais tipos de detectores empregados é o de detecção por ultravioleta (UV) ou a detecção por arranjo de diodos (DAD) (GIUSTI *et al.*, 2017; ONIGA *et al.*, 2018). Esses detectores só podem ser utilizados quando as espécies químicas absorvem na região do ultravioleta ou do visível (LANÇAS, 2009), o que é característico das moléculas com propriedades antioxidantes. Como discutido em tópicos anteriores, as moléculas que estão associadas à atividade antioxidante apresentam em suas estruturas químicas anéis aromáticos ou duplas ligações,

como pode ser observado na Figura 5 (página 24) (AGBO *et al.*, 2015). Essas características estruturais são conhecidas como grupos cromóforos<sup>11</sup>.

Os principais detectores associados à cromatografia em fase gasosa têm sido o detector por ionização em chama (FID - do inglês *flame ionization detector*) e o detector por espectrometria de massas (EM) (AL-RUBAYE; HAMEED; KADHIM, 2017; YAHYA; HADI, 2017). Este último detector é o mais utilizado, pois permite a identificação de cada espécie química presente no extrato. Essa identificação ocorre por meio da análise do espectro de massas gerado por cada substância, do extrato, ao chegar ao detector (GULCIN *et al.*, 2019).

Os equipamentos que acoplam a cromatografia em fase gasosa com o detector por espectrometria de massas são denominados por CG-EM ou GC-MS, do inglês *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. Esses equipamentos possuem banco de dados contendo espectros de massas com mais de 500.000 compostos e isso tem auxiliado, decisivamente, na caracterização química das substâncias com atividade antioxidante.

Vale ressaltar que apenas a comparação com os espectros de massas presentes no banco de dados não tem sido suficiente para a completa elucidação das substâncias com atividade antioxidante (HIGASHI; OGAWA, 2016). Nessa direção, os melhores periódicos científicos têm exigido, também, a comparação com espectros de massas de compostos padrão de referência ou a análise em equipamentos ainda mais sofisticados como o GC-MS/MS<sup>12</sup> ou HPLC-MS/MS<sup>13</sup> (PIANA *et al.*, 2018; BALLESTEROS-VIVAS *et al.*, 2019; GULCIN *et al.*, 2019).

Neste estudo, foi realizada a caracterização química dos compostos fenólicos utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e, posteriormente, a identificação foi confirmada com os espectros de massas de substâncias padrão de cada composto.

---

<sup>11</sup> Grupos cromóforos: de acordo com a IUPAC, são utilizados para descrever um sistema (átomos ou grupo de átomos) responsável pela absorção de radiação na região UV-Vis. Geralmente, esse grupo de átomos se caracteriza por apresentar duplas ligações conjugadas e elétrons livres.

<sup>12</sup> GC-MS/MS: termo do inglês “**G**as **C**hromatography tandem **M**ass **S**pectrometry”, cromatografia a gás acoplada a espectrômetros em sequência. Consiste em dois detectores de massa separados por uma célula de colisão.

<sup>13</sup> HPLC-MS/MS: termo do inglês **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography tandem **M**ass-**M**ass, referente à cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de quadrupolo triplo.

### 3.8 Referências

- ABDEL-LATEIF, K. S.; ELDEAB, H. A.; MAGHRABI, I. A. The plant natural products: their antioxidants, free radical scavengers, DNA protection and antimicrobial activities. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 6, n. 293, p.104-172, 2016.
- ABOUZEID, S.; HIJAZIN, T.; LEWERENZ, L.; HÄNSCH, R.; SELMAR, D. The genuine localization of indole alkaloids in *Vinca minor* and *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 168, s. n., p. 112110, 2019.
- AGBO, M. O.; UZOR, P. F.; AKAZIE-NNEJI, U. N.; ODURUKWE, C. U. E.; OGBATUE, U. B.; MBAOJI, E. C. Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of selected Nigerian medicinal plants. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 35-41, 2015.
- ALAM, M. M.; NAEEM, M.; KHAN, M. M.; UDDIN, M. Vincristine and vimbastine anticancer Catharanthus Alkaloids: pharmacological applications and stratiefies for yield improvement. In: *Catharanthus roseus*, p. 277-307, 2017.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I.; AZHARI, N. H. *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. **Industrial Crops and Products**, v. 122, s. n., p. 533-544, 2018.
- AL-JITAN; S.; ALKHOORI, S. A.; YOUSEF, L. F. Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. In **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, s. n., p. 389-417, 2018.
- AL-RUBAYE, A. F.; HAMEED, I. H.; KADHIM, M. J. A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research**, v. 9, n. 1, p. 81-85, 2017.
- ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.; LIGHTFOOT, D. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 42, p. 1-23, 2017.
- APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997-1027, 2016.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.
- AZMIR, J.; Z Aidul, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.
- BAGHDADY, Y. Z.; SCHUG, K. A. Review of in situ derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 1, p. 102-114, 2016.
- BAJ, T.; SIENIAWSKA, E.; LUDWICZUK, A.; WIDELSKI, J.; KIEŁTYKA-DADASIEWICZ, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GŁOWNIAK, K. Thin-layer chromatography—fingerprint, antioxidant activity, and gas chromatography—mass spectrometry profiling of several *Origanum L.* species. **JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC**, v. 30, n. 5, p. 386-391, 2017.
- BALLESTEROS-VIVAS, D.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; DEL PILAR SÁNCHEZ-CAMARGO, A.; IBÁÑEZ, E.; PARADA-ALFONSO, F.; CIFUENTES, A. A multi-analytical platform based on pressurized-liquid extraction, *in vitro* assays and liquid chromatography/gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for food by-products valorisation. Part 1: Withanolides-rich fractions from goldenberry (*Physalis peruviana L.*) calyces obtained after extraction optimization as case study. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, s. n., p. 155-164, 2019.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, 617-633, 1994.

BENZIE I.; STRAIN J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, s.n., p. 70-76, 1996.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. L. W. T. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S., M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos**; Appris, Ed.; 1st ed.; Curitiba, Paraná, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CASTRO-PUYANA, M.; HERREO, M.; URRETA, I.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; SUÁREZ-ALVAREZ, S. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n.13, p. 4607–16, 2013.

CHAVES, J. O.; DE SOUZA, M. C.; DA SILVA, L. C.; LACHOS PEREZ, D.; TORRES- MAYANGA, P. C.; MACHADO, A. P. D. F.; FORSTER-CARNEIRO, T.; VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-de-PEREDO, A. V.; BARBERO, G. F.; ROSTAGNO, M. A. Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, s. n., p. 864-879, 2020.

CHUNG, I. M.; HONG, S. B.; PEEBLES, C. A.; KIM, J. A.; SAN, K. Y. Effect of the engineered indole pathway on accumulation of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 327-332, 2007.

ĆUJIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIĆ, G.; IBRIĆ, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, s. n., p. 135-142, 2016.

CURRY, H. A. Naturalising the exotic and exoticising the naturalised: horticulture, natural history and the rosy periwinkle. **Environment and History**, v. 18, n. 3, p. 343-365, 2012.

DANLAMI, J. M.; ARSAD, A.; ZAINI, M. A. A.; SULAIMAN, H. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605-626, 2014.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.7, p. 1184-1187, 1959.

DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 343-356, 1977.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FARJADMAND, F.; KHANAVI, M.; EFTEKHARI, M.; HOSSEINSALARI, A.; AKBARZADEH, T.; SAFAVI, M.; ASATOURI, R.; MIRAZADEH, M.; SHAMS ARDEKANI, M. R. The effect of extraction method on the major constituents and biological effects of *Trachyspermum ammi* L. fruits. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 5, n. 1, p. 55-61, 2018.

FREITAS, P. C. D.; CARVALHO, R. M. D.; SILVA, J. S. A.; PRADO, T.; DUARTE, E. R.; FRESCURA, V. L.; CHAVES, E. S. Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 570-574, 2015.

GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; DEVI, R. V. Pharmacological activities of *Catharanthus roseus*: a perspective review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 431-439, 2013.

GALANAKIS, C. M.; TSATALAS, P.; GALANAKIS, I. M. Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. **Environmental Technology & Innovation**, v. 9, s. n., p. 160-168, 2018.

GIUSTI, F.; CAPRIOLI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; SAGRATINI, G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, v. 221, s.n, p. 689-697, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; VAN-CAMP, J.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S.; B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. **Food Chemistry**, v. 264, s. n., p. 471-475, 2018.

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises químicas, propriedades funcionais e controle de qualidade de alimentos e bebidas**: uma abordagem teórico-prática. Elsevier Ed.; 1st ed.; Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

GULCIN, I.; KAYA, R.; GOREN, A. C.; AKINCI OGLU, H.; TOPAL, M.; BINGOL, Z.; ÇAKMAK, K. C.; SARIKAYA, S. B. O.; DURMAZ, L.; Alwasel, S. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 1511-1526, 2019.

HIGASHI, T.; OGAWA, S. Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI-MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, s. n., p. 57-69, 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

JALEEL, C. A.; GOPI, R., MANIVANNAN, P.; PANNEERSELVAM, R. Soil salinity alters the morphology in *Catharanthus roseus* and its effects on endogenous mineral constituents. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 2, s.n, p. 18-25, 2008.

KARIMI, M.; RAOFIE, F. Micronization of vincristine extracted from *Catharanthus roseus* by expansion of supercritical fluid solution. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 146, s. n., p. 172-179, 2019.

KUPPUSAMY, P.; LEE, K. D.; SONG, C. E.; ILAVENIL, S.; SRIGOPALRAM, S.; ARASU, M. V.; CHOI, K. C. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 3, p. 282-288, 2018.



LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**; Átomo, Ed.; 1st Ed.; Campinas, São Paulo, 2009.

LIU, S-C.; LIN, J-T.; WANG, C-K.; CHEN, H-Y.; YANG, D-J. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. **Food Chemistry**, v. 114, s. n., p.577-581, 2009.

MA, X.; WU, H.; LIU, L.; YAO, Q.; WANG, S.; XING, S.; ZHAN; ZHOU, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MAREČEK, V.; MIKYŠKA, A.; HAMPEL, D.; ČEJKA, P.; NEUWIRTHOVÁ, J.; MALACHOVÁ, A.; CERKAL, R. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 73, s.n, p. 40-45, 2017.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; ZAKARIA, Z. A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under *in vitro* conditions. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5790-5798, 2015.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. D. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 'Pacifica White' por malhas coloridas: desenvolvimento vegetativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 514-520, 2009.

MIR, M. A.; SAWHNEY, S. S.; JASSAL, M. M. S. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. **Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 001-005, 2013.

MUSTAFA, N. R.; VERPOORTE, R. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 243-258, 2007.

NARDINI, M.; GARAGUSO, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, v. 305, s. n., p. 125437, 2020.

NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN, Y. H.; MAZIAH, M.; ABIRI, R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, s. n., p. 1-19, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, S. D.; SOUZA, G. A. D.; ECKERT, C. R.; SILVA, T. A.; SOBRAL, E. S.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 2014.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, s. 3, p. 689-702, 2009.

ONIGA, I.; PUŞÇAŞ, C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; OLAH, N. K.; SEVASTRE, B.; MARICA, R.; MARCUS, I.; SEVASTRE-BERGHIAN, A. C.; BENEDEC, D.; POP, C. E.; HANGANU, D. *Origanum vulgare* ssp. vulgare: Chemical composition and biological studies. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2077, 2018.

PAGLIANO, E.; CAMPANELLA, B.; D'ULIVO, A.; MESTER, Z. Derivatization chemistries for the determination of inorganic anions and structurally related compounds by gas chromatography-a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1025, s. n., p. 12-40, 2018.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PHAM, H. N. T.; VUONG, Q. V.; BOWYER, M. C.; SCARLETT, C. J. Effect of extraction solvents and thermal drying methods on bioactive compounds and antioxidant properties of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Patricia White cultivar). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 5, p. 1-8, 2017.

PHARM, S. C. M. M.; PHARM, V. M. M.; PHARM, A. K. D. M. Classification of extraction methods. In: **Essentials of Botanical Methods: Principles and Applications**; 2015; pp. 83–136.

PIANA, F.; CIULU, M.; QUIRANTES-PINÉ, R.; SANNA, G.; SEGURA-CARRETERO, A.; SPANO, N.; MARIANI, A. Simple and rapid procedures for the extraction of bioactive compounds from Guayule leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 116, s. n., p. 162-169, 2018.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo. 2017

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QU, Y., SAFONOVA, O.; DE LUCA, V. Completion of the canonical pathway for assembly of anticancer drugs vincristine/vinblastine in *Catharanthus roseus*. **The Plant Journal**, v. 9, s. 2, p. 257-266, 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, J. S.; SANTOS, M. J. M. C.; SILVA, L. K. R.; PEREIRA, L. C. L.; SANTOS, I. A.; DA SILVA LANNES, S. C.; DA SILVA, M. V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, s. n., p. 181-188, 2019.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, v. 234, s. n., p. 279-293, 1994.

ROCKENBACH, A. P.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; CAVERZAN, A.; SCHNEIDER, T. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018.

SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, s. n., p. 169-182, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, s.n., p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, s. n., p. 757-781, 2015.

SHARMA, S.; CHENG, S. F.; BHATTACHARYA, B.; CHAKKARAVARTHI, S. Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, s. n., p. 305-318, 2019.

SIDDIQ, M.; SOGI, D. S.; DOLAN, K. D. Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut 'Tommy Atkins' mangoes as affected by different pre-treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, s. n., p. 152-162, 2013.

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.

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. In: **Methods in Enzymology**, v. 299, s. n., p. 152-178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SPEED, M. P.; FENTON, A.; JONES, M. G.; RUXTON, G. D.; BROCKHURST, M. A. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. **New Phytologist**, v. 208, n. 4, p. 1251-1263, 2015.

THAMMANA, M. A review on high performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 22-28, 2016.

TIONG, S. H.; LOOI, C. Y.; HAZNI, H.; ARYA, A.; PAYDAR, M.; WONG, W. F.; CHEAH, S. C.; MUSTAFA, M. R., AWANG, K. Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9770-9784, 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração assistida por micro-ondas e química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n.6, p. 1713-1725, 2014.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, 2016.

VAJIĆ, U. J.; GRUJIĆ-MILANOVIĆ, J.; ŽIVKOVIĆ, J.; ŠAVIKIN, K.; GOĐEVAC, D.; MILORADOVIĆ, Z.; BUGARSKI, B.; MIHAILOVIĆ-STANOJEVIĆ, N. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 74, s. n., p. 912-917, 2015.

VERMA, P.; MATHUR, A. K.; SRIVASTAVA, A.; MATHUR, A. Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 255-268, 2012.

XIANG, J.; ZHANG, M.; APEA-BAH, F. B.; BETA, T. Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. **Food Chemistry**, v. 295, s. n., p. 214-223, 2019.

YADAV, R. N. S.; AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 12, p. 10-12, 2011.

YAHYA, H. M.; HADI, H. I. Uses of gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive chemical compounds of *Lepidium sativum*: a review. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 10, s. 11, p. 4039-4042, 2017.

YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, K.; MIZUNO, H.; ANEGAWA, A.; ISHIZAKI, K.; FUKAKI, H.; OHNISHI, M.; YAMAZAKI, M.; MASUJIMA, T.; MIMURA, T. Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 14, p. 3891-3896, 2016.

ZHANG, Y. J.; GAN, R. Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A. N.; XU, D. P.; LI, H. B. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015.

## 4 ARTIGOS

### 4.1 Artigo 1 - Metodologia miniaturizada para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista *Food Analytical Methods*.

## **Metodologia miniaturizada para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante**

### **Resumo**

Neste estudo, as metodologias convencionais para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP foram miniaturizadas. A quantidade de reagentes foi reduzida em 25; 5; 3,6; 3,0 e 3,3 vezes em relação às metodologias convencionais. Essas proporções representaram uma redução no custo das análises de 67 a 96%. As metodologias miniaturizada e convencional apresentaram linearidade na mesma faixa de concentração e coeficientes de determinação e correlação superiores a 0,99. A precisão das duas metodologias foi garantida por meio dos desvios padrões relativos inferiores a 3%. As 38 amostras constituídas por bebidas alcoólicas, chás, especiarias, geleias, energético, produtos do mel e derivados da uva foram analisadas pelas duas metodologias e, em todas as amostras, os valores médios de concentração obtidos foram similares. Por isso, a metodologia miniaturizada surge como uma alternativa eficiente, segura e econômica de determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP para diferentes tipos de matrizes.

**Palavras-chave:** DPPH; ABTS; FRAP, análises espectrofotométricas, diferentes matrizes.

## INTRODUÇÃO

A atividade antioxidante é um dos principais assuntos discutidos pela comunidade científica nos últimos anos (Gülçin 2012; Taslimi and Gülçin 2018; Gülçin 2020).. As substâncias com atividade antioxidante apresentam capacidade de estabilizar ou eliminar radicais livres (Zhang *et al.*, 2015), reduzindo a velocidade das reações de oxidação que podem degradar células vegetais e animais (Oliveira, 2015). Em geral, essas substâncias apresentam em suas estruturas químicas anéis aromáticos e grupos fenólicos (Agbo *et al.*, 2015).

Por isso, a primeira etapa em estudos que visam determinar a atividade antioxidante consiste na determinação da concentração de fenóis totais e flavonoides (Agbo *et al.*, 2015; Altemimi *et al.*, 2017), pois as concentrações dessas substâncias, geralmente, estão associadas a atividades antioxidantes (Gulcin *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2019). A determinação da concentração de fenóis totais ocorre através da reação de transferência de elétrons da substância antioxidante para o reagente Folin-Ciocalteu (Shahidi; Zhong, 2015). A determinação da concentração de flavonoides baseia-se na reação de complexação entre o flavonoide e o cloreto de alumínio (Granato *et al.*, 2018). A atividade antioxidante pode ser determinada através das metodologias mais elaboradas, como DPPH, ABTS e FRAP (Oniga *et al.*, 2018; Piana *et al.*, 2018; Nardini; Garaguso, 2020).

O método DPPH é o mais utilizado na literatura científica e baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio e/ou elétrons de compostos antioxidantes para o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Oliveira, 2015; Shahidi; Zhong, 2015). A determinação pelo método ABTS quantifica a atividade antioxidante de uma substância através da captura do cátion-radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) (Re *et al.*, 1999; Mareček *et al.*, 2017). A atividade antioxidante também pode ser determinada pelo poder de redução do íon ferro, FRAP do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*, utilizando o complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Nesse método, o mecanismo de reação envolve a transferência de elétrons do antioxidante para o complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  (Benzie; Strain, 1996).

Todas essas metodologias têm utilizado quantidades elevadas de reagentes e de amostra, dificultando a determinação da atividade antioxidante de extratos de plantas com massa vegetal reduzida e, elevando os custos das análises (Gülçin *et al.* 2008; Cakmak and Gülçin 2019; Gülçin *et al.* 2020). Alternativamente, na literatura, a metodologia usando uma microplaca foi proposta (Guo *et al.* 2016; Garcia-Vaquero *et al.*, 2018; Pinto *et al.* 2020). Esta abordagem reduz os volumes de reagentes, mas requer um leitor de microplaca específico, um sistema de limpeza, micropipetas multicanal e microplacas. Esse leitor tem um custo superior ao de um espectrofotômetro tradicional, tornando o processo caro (Horszwald e Andlauer, 2011; Hidayat *et al.* 2017). Assim, não é muito aplicável em laboratórios com estrutura de análise convencional.

Por isso, o objetivo deste estudo foi miniaturizar a quantidade de reagentes utilizados nas metodologias convencionais de determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e dos testes de atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP. E, em seguida, aplicar na análise de 38 tipos de amostras incluindo chás, especiarias, bebidas alcoólicas, energético, geleias, produtos do mel e derivados da uva.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e instrumentação

Os padrões ácido gálico ( $\geq 99\%$ ), quercetina ( $\geq 95\%$ ) e Trolox ( $\geq 99\%$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os reagentes 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) – ABTS e 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) usados na determinação da atividade antioxidante foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). O cloreto férrico, o acetato de sódio e o ácido acético foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); o ácido clorídrico a 37% da Anidrol (São Paulo, Brasil) e o persulfato de sódio a 99% foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil).

As análises para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) (Cary 60, Agilent Technologies, Austrália).

## MÉTODOS

### Fenóis totais

Para a determinação dos fenólicos totais foi utilizada a metodologia convencional proposta por Kim *et al.* (2003). Esse método se baseia em misturar 1,0 mL de extrato da amostra ou da solução padrão de referência, 9,0 mL de água ultrapura e 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso no escuro por 5 min. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução de carbonato de sódio a 7% (m/v) e 4,0 mL de água ultrapura, totalizando 25 mL da mistura reacional. A solução obtida foi, novamente, homogeneizada e deixada em repouso por 90 min à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, a 750 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência na faixa de concentração de 1,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram apresentados em termos de mg equivalente de Trolox / g ou L de amostra.

A metodologia miniaturizada utilizou 40 µL de amostra ou da solução padrão de referência, 360 µL de água ultrapura, 40 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 400 µL de solução de carbonato de sódio a 7% (m/v) e 160 µL de água ultrapura, totalizando 1000 µL da mistura reacional.

### Flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada através da metodologia convencional proposta por Boroski *et al.* (2015). Para isso, foi adicionado em um frasco ambar, 0,500 mL do extrato da amostra ou da solução padrão de referência, 0,250 mL de solução de cloreto de alumínio a 5% (m/v) e 4,25 mL de metanol, totalizando 5,00 mL de mistura reacional. Essa mistura foi homogeneizada, deixada em repouso por 30 min e, em seguida, analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, a

425 nm. A quercetina foi utilizada como padrão de referência, sendo dissolvida em metanol para obtenção da curva de calibração na faixa de concentração de 1,0 a 12 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram apresentados em termos de mg equivalente de Trolox / g ou L de amostra.

A metodologia miniaturizada utilizou 100 µL de amostra ou solução padrão de referência, 50 µL de solução de cloreto de alumínio a 5 % (m/v) e 850 µL de metanol, totalizando 1000 µL da mistura reacional.

### **Método DPPH**

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH foi realizada seguindo a metodologia convencional proposta por Brand-Williams *et al.* (1995). Inicialmente, foram preparados 25 mL de solução usando 4,0 mg do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e metanol como solvente. A solução obtida foi diluída cerca de duas vezes com metanol:água 80:20 (v/v) até obter uma solução com absorvância de  $1,1 \pm 0,02$  em 515 nm, denominada solução de trabalho. Para a determinação da atividade antioxidante, foram misturados 3,0 mL da solução de trabalho e 0,6 mL de extrato ou da solução padrão de referência, totalizando 3,6 mL de mistura reacional. Essa solução foi deixada em repouso por 45 min e, em seguida, analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, a 515 nm. O padrão de referência desse método foi o Trolox dissolvido em metanol para obtenção da curva de calibração na faixa de concentração de 1,0 a 7,0 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram apresentados em termos de mg equivalente de Trolox / g ou L de amostra.

A metodologia miniaturizada utilizou 830 µL dessa solução de DPPH e 170 µL do extrato da amostra ou solução padrão de referência, totalizando 1000 µL da mistura reacional.

### **Método ABTS**

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada seguindo a metodologia convencional proposta por Siddiq *et al.* (2013). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque contendo o ABTS. Essa solução foi preparada através da mistura de 25 mL de solução de persulfato de potássio a 2,4 mmol L<sup>-1</sup> e 25 mL da solução de ABTS a 7 mmol L<sup>-1</sup>, preparadas em água ultrapura. A mistura obtida foi homogeneizada e deixada em repouso por 16 h, no escuro, para formação do cátion-radical ABTS<sup>+</sup>. A solução obtida foi diluída cerca de 50 vezes com a mistura metanol: água 80:20 (v/v) até obter uma solução com absorvância de  $0,7 \pm 0,02$  em 734 nm, denominada solução de trabalho. Para a determinação da atividade antioxidante, foram misturados 3 mL da solução de trabalho e 0,03 mL de extrato da amostra ou da solução padrão de referência, totalizando 3,03 mL de mistura reacional. Em seguida, foi analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, a 734 nm. O padrão de referência deste método foi o Trolox com curva de calibração na faixa de concentração de 0,25 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram apresentados em termos de mg equivalente de Trolox / g ou L de amostra.

A metodologia miniaturizada utilizou 990 µL da solução contendo o cátion-radical ABTS<sup>+</sup> e 10 µL do extrato da amostra ou da solução padrão de Trolox, totalizando 1000 µL da mistura total.



## Método FRAP

A determinação do poder de redução do cloreto férrico (FRAP) foi realizada seguindo a metodologia convencional proposta por Boroski *et al.* (2015). Inicialmente foi preparada uma solução estoque de TPTZ na concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup> em ácido clorídrico a 40 mmol L<sup>-1</sup>, uma solução tampão de acetato de sódio a 300 mmol L<sup>-1</sup> e uma solução de cloreto férrico a 20 mmol L<sup>-1</sup> em água ultrapura. Em seguida, essas três soluções foram misturadas na proporção de 1:10:1 (v/v/v), respectivamente, e a mistura obtida foi homogeneizada e deixada em repouso por 3 h em banho-maria a 37 °C, denominada solução de trabalho. A atividade antioxidante foi determinada pela mistura de 0,1 mL do extrato da amostra ou da solução padrão de referência, 0,3 mL de água ultrapura e 3 mL da solução de trabalho, totalizando 3,4 mL da mistura reacional. Essa solução foi homogeneizada e deixada em repouso a 37 °C por 45 min e, em seguida, analisada em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, a 593 nm. A solução padrão de Trolox preparada em metanol foi utilizada para construção da curva de calibração na faixa de concentração de 1,0 a 7,0 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram apresentados em termos de mg equivalente de Trolox / g ou L de amostra.

A metodologia miniaturizada utilizou 30 µL do extrato da amostra ou da solução padrão de referência, 90 µL de água ultrapura e 900 µL da solução de trabalho de TPTZ, totalizando 1020 µL da mistura total.

## Comparação entre métodos

Os métodos miniaturizado e convencional foram comparados em termos dos parâmetros da linearidade. Para isso, curvas analíticas de calibração na mesma faixa de concentração foram preparadas para a determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP.

Os resultados foram submetidos à análise pelo método dos mínimos quadrados ordinários para obtenção dos coeficientes de cada modelo de regressão. A significância desses modelos foi avaliada pela análise de variância utilizando o Teste F a 5% de significância. Os coeficientes de determinação e correlação foram calculados. Em seguida, os modelos obtidos nas metodologias convencional e miniaturizada foram analisados pelo método de identidades de modelos para comparação dos parâmetros das equações de regressão. Os mesmos procedimentos foram realizados para os métodos de fenóis totais, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R-Studio (versão 1.0.153).

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, a partir de sete repetições idênticas, para as metodologias miniaturizada e convencional.

## Aplicação em amostras reais

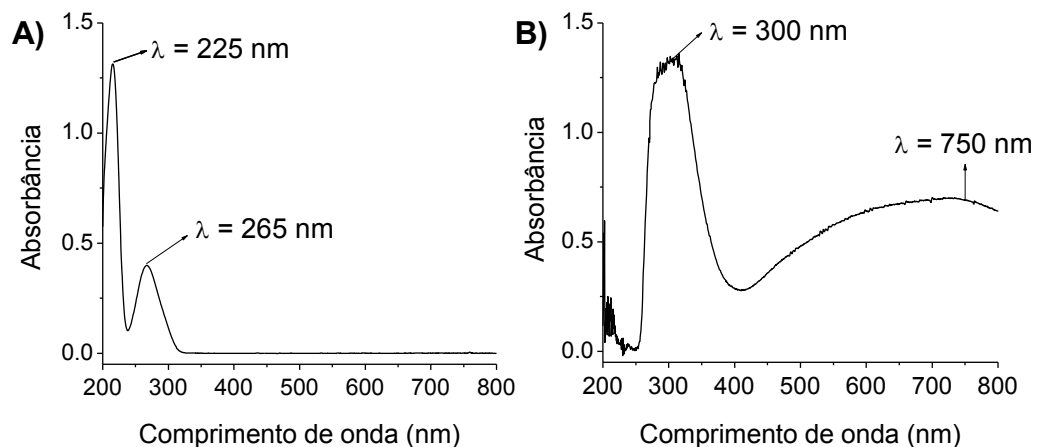
As metodologias miniaturizada e convencional foram aplicadas na determinação do teor de fenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP de amostras de quatro tipos de cachaças, nove tipos de chás, dois tipos de conhaques, dez tipos de especiarias, um

energético, dois tipos de geleias, um licor, quatro produtos à base de mel e cinco produtos derivados da uva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Fenóis totais

O ácido gálico é utilizado como padrão de referência na quantificação de fenóis totais (Singleton; Rossi, 1965; Čujić et al., 2016; Nardini; Garaguso, 2020). A solução de ácido gálico apresenta coloração levemente cinza e, após a reação com o reagente Folin-Ciocalteu em meio básico, a mistura obtida apresenta coloração azul, indicando reação positiva (Fig. 1S-A). Os espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de ácido gálico antes e após a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando a metodologia convencional, são apresentados na Fig. 1.

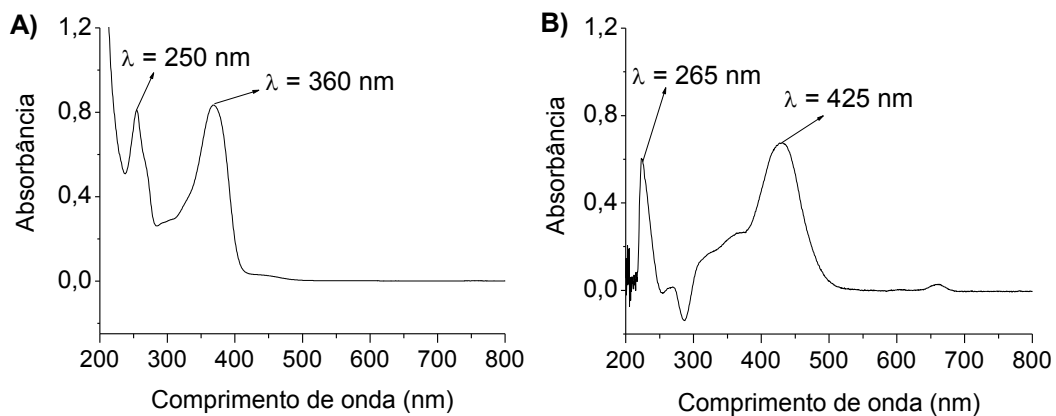


**Fig. 1** Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de ácido gálico a  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , (A) antes e (B) após a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.

A solução padrão de ácido gálico antes da reação apresentou bandas de absorção em 225 e 265 nm (Fig. 1A). Após a reação com o reagente Folin-Ciocalteu foi possível observar uma banda de absorção intensa em 300 nm. Entretanto, nessa região pode ocorrer sobreposição com bandas de absorção do ácido gálico residual, ou seja, que não reagiu com o reagente Folin-Ciocalteu. Por isso, a banda larga observada entre 500 e 800 nm é considerada a região mais segura para determinação da concentração de fenóis totais como pode ser observado na Fig. 1B. Por isso, os comprimentos de onda mais utilizados são 725 e 750 nm (Kim *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Ghomari *et al.*, 2019). Esses valores estão próximos da região do infravermelho no espectro eletromagnético, o que indica ausência de substâncias interferentes (Boroski *et al.*, 2015). Neste estudo, foi selecionado 750 nm para a determinação da concentração de fenóis totais, e este valor também é observado na metodologia convencional (Kim *et al.*, 2003).

## Flavonoides

A quercetina é o principal reagente empregado como padrão de referência na quantificação de flavonoides (Piana *et al.*, 2018; Ghomari *et al.*, 2019). A solução de quercetina apresenta coloração amarelo claro, porém após a formação do complexo quercetina-alumínio, o sistema obtido apresenta coloração amarelo intensa indicando reação positiva (Fig. 1S-B). Os espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de quercetina antes e após a reação de complexação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), utilizando a metodologia convencional, podem ser observados na Fig. 2.

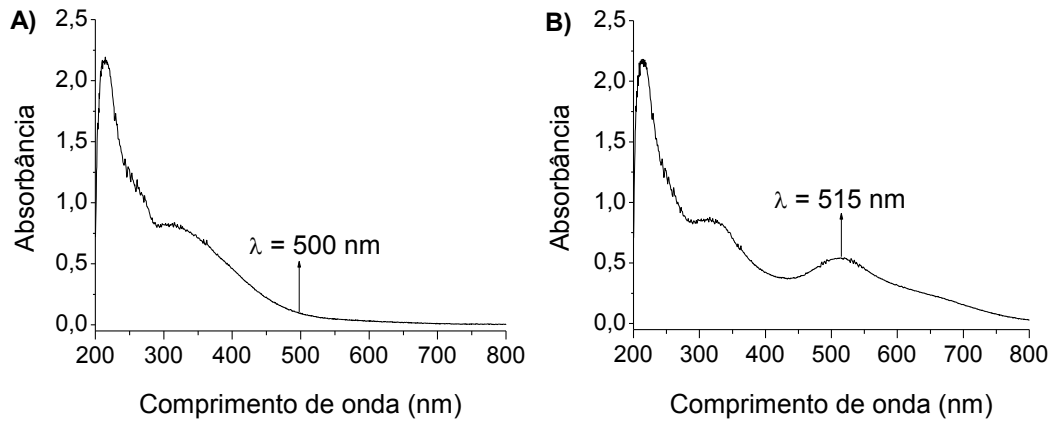


**Fig. 2** Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de quercetina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (A) antes e (B) após a reação de complexação com cloreto de alumínio.

No espectro da solução padrão de quercetina, antes da reação, podem ser observadas duas bandas de absorção em 250 e 360 nm (Fig. 2A). Após a reação com  $\text{AlCl}_3$ , o complexo formado apresenta uma banda estreita em 225 nm, a qual pode apresentar sobreposição de bandas da quercetina não complexada, ou seja, que não reagiu como observado na Fig. 2B (Papoti *et al.*, 2011). Por isso, a banda larga de absorção entre 400 e 450 nm tem sido a região mais segura na determinação da concentração de flavonoides (Peçkal; Pyrzyńska, 2014; Alves *et al.*, 2017; Kuppusamy *et al.*, 2018). Neste estudo, 425 nm foi selecionado para a determinação da concentração de flavonoides, sendo esse valor o mais utilizado pelo método convencional (Boroski, *et al.*, 2015).

## Método DPPH

Este método se caracteriza por utilizar uma solução contendo o radical DPPH. Essa solução apresenta coloração púrpura e, na presença de substâncias com atividade antioxidante como o padrão de referência Trolox, ocorre descoloração da cor púrpura, predominância da cor amarela, indicando reação positiva (Fig. 1S-C). Os espectros de absorção na região do UV-Vis da solução de DPPH antes e após a reação com o padrão de Trolox, utilizando a metodologia convencional, podem ser observados na Fig. 3.

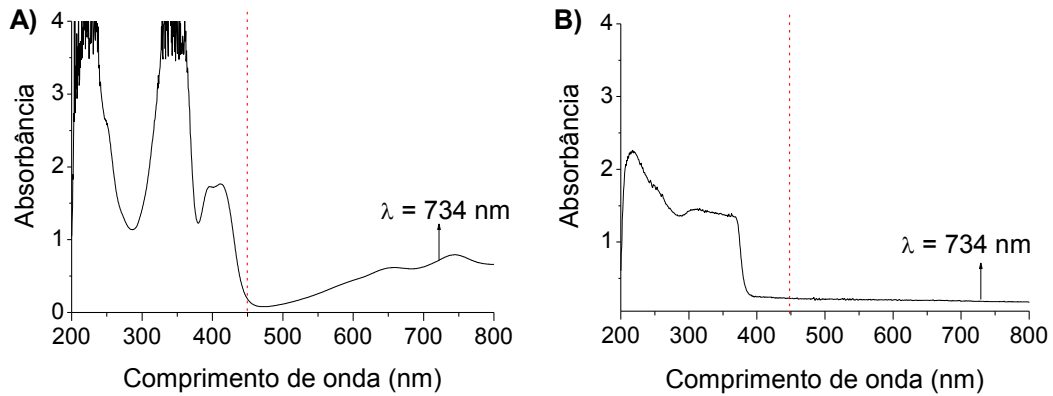


**Fig. 3** Espectros de absorção na região do UV-Vis da solução de DPPH (A) antes e (B) após a reação com o padrão de Trolox.

Pode-se observar que a solução contendo o radical DPPH apresenta uma banda de absorção na região do UV-Vis em 205 nm e uma pequena absorção em ~300 nm, não apresentando nenhuma banda de absorção na região acima de 500 nm, como pode ser observado na Fig. 3A. Entretanto, após a reação com o padrão de referência Trolox, a solução contendo o meio reacional apresenta banda de absorção entre 460 a 550 nm (Fig. 3B). Em trabalhos anteriores, empregando a metodologia convencional, foi observado que 515 e 517 nm têm sido os principais comprimentos de onda utilizados para a determinação da atividade antioxidante (Đurović *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2019). Por isso, neste estudo, 515 nm foi selecionado para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

### Método ABTS

Este método se caracteriza por utilizar uma solução contendo o cátion-radical ABTS<sup>+</sup>. Essa solução apresenta coloração azul esverdeado e, na presença de substâncias com atividade antioxidante como o padrão de referência Trolox, ocorre descoloração do meio reacional, o que indica a reação positiva, como pode ser observado na Fig. 1S-D. Os espectros de absorção na região do UV-Vis da solução contendo o cátion-radical ABTS<sup>+</sup> antes e após a reação com o padrão de Trolox, utilizando a metodologia convencional, podem ser observados na Fig. 4.

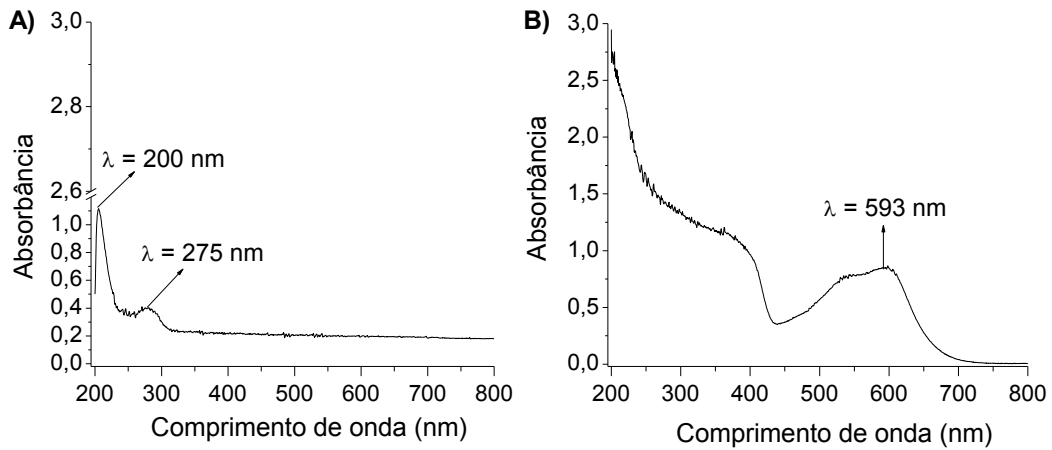


**Fig. 4** Espectro de absorção na região do UV-Vis da solução contendo o cátion-radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (A) antes e (B) após a reação com padrão de Trolox.

Nesses dois espectros podem-se observar bandas largas de absorção abaixo de 450 nm. Por isso, as bandas de absorção entre 600 e 760 nm presentes apenas no espectro da solução contendo o cátion-radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  são mais seletivas para este método (Fig. 4A). Essas bandas reduzem a intensidade após a reação com o padrão de Trolox (Fig. 4B). Isso ocorre devido à descoloração do meio reacional de verde para incolor. Neste estudo, 734 nm foi selecionado para determinação da atividade antioxidante e este valor está de acordo com trabalhos anteriores que empregaram a metodologia convencional (Siddiq *et al.*, 2013; Sogi *et al.*, 2013, Boroski *et al.*, 2015, Pham *et al.*, 2017).

### Método FRAP

Este método se caracteriza por utilizar uma solução contendo o complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ . Essa solução apresenta coloração azul claro e, na presença de substâncias com atividade antioxidante como o padrão de referência Trolox, se torna azul escuro atribuído ao complexo  $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ , como pode ser observado na Fig. 1S-E. Os espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ , antes e após a reação com o padrão de Trolox, utilizando a metodologia convencional, podem ser observados na Fig. 5.

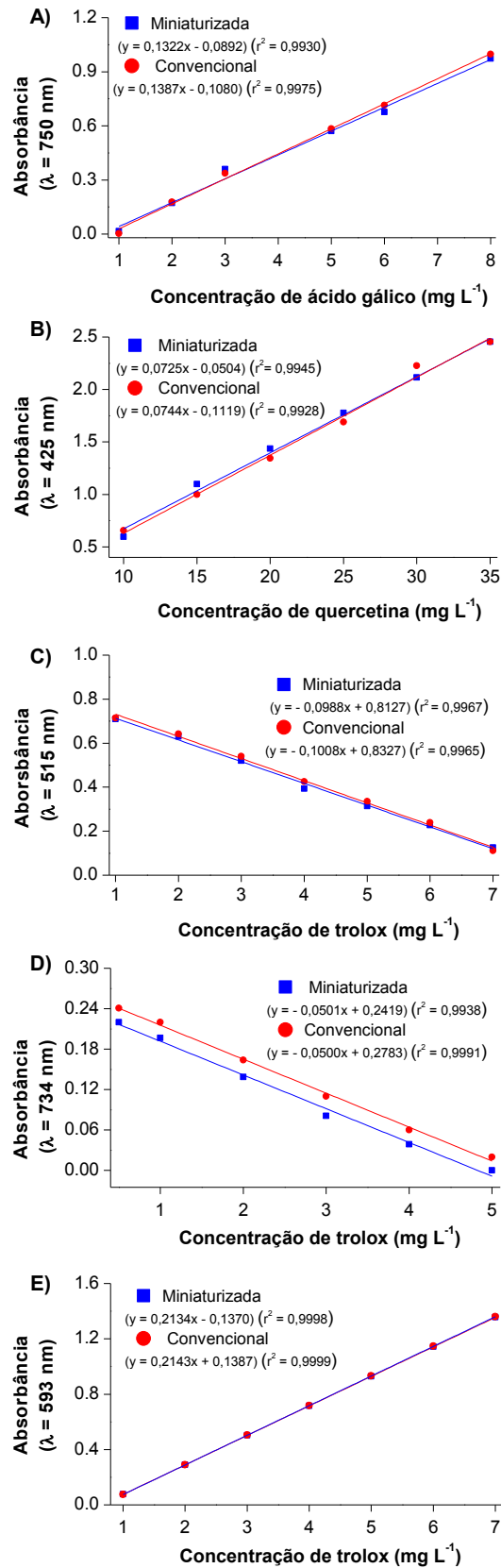


**Fig. 5** Espectro de absorção na região do UV-Vis da solução padrão de Trolox a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (A) antes e (B) após a reação com o complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ .

No espectro da solução do padrão de Trolox, podem-se observar duas bandas de absorção na região do UV-Vis em 200 e 275 nm (Fig. 5A). No espectro da solução obtida após a reação do padrão Trolox com o complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ , pode-se observar uma banda larga de absorção entre 450 e 650 nm (Fig. 5B). Neste estudo, 593 nm foi selecionado para determinação da atividade antioxidante, pois nessa região do espectro não ocorrem bandas atribuídas ao padrão de Trolox. Esse valor está de acordo com trabalhos anteriores que empregaram a metodologia convencional (Ma *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2017).

### Comparação entre métodos

Neste estudo foi avaliada a linearidade da metodologia miniaturizada e da convencional, dentro da mesma faixa de concentração. Os resultados obtidos para as curvas analíticas de calibração estão apresentados na Fig. 6.



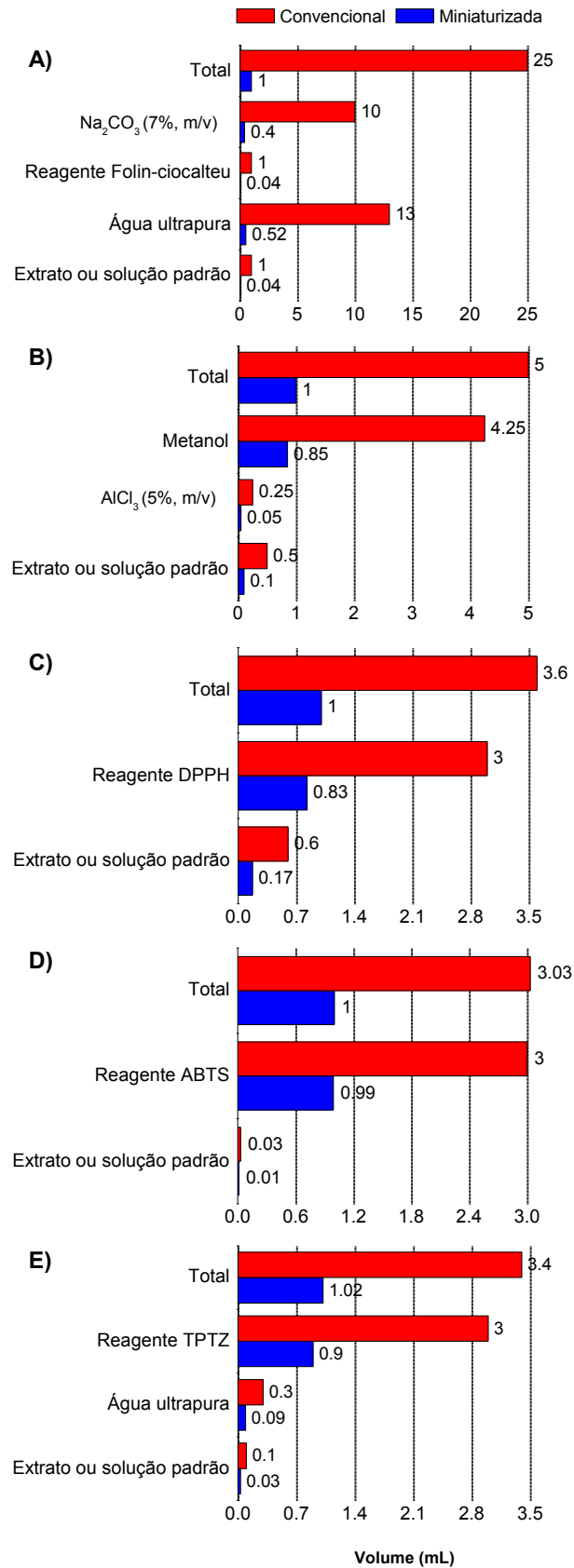
**Fig. 6** Curvas analíticas de calibração obtidas utilizando a metodologia miniaturizada e a convencional para determinação de: A) fenóis totais, B) flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos C) DPPH, D) ABTS e E) FRAP.

Como se pode observar na Fig. 6, as determinações da concentração de fenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP, empregando a metodologia miniaturizada e a convencional, apresentaram linearidade similar dentro da mesma faixa de concentração. A análise de variância apresentou significância dos modelos obtidos e desvio de regressão não significativo, indicando que o modelo aplicado para as curvas analíticas de calibração foi adequado para quantificar fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante. Os coeficientes de determinação e de correlação de Pearson observados foram superiores a 0,99, confirmando que houve correlação direta entre o incremento da concentração dos analitos e as respectivas absorbâncias.

Os resultados da análise de identidade de modelos indicaram que não houve diferença significativa entre os coeficientes do modelo ajustado para as duas metodologias. Portanto, a metodologia empregando quantidades menores de reagentes não interferiu nos métodos de determinação das concentrações de fenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP. A precisão foi confirmada pela repetitividade em que o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 3% para essas análises utilizando a metodologia miniaturizada e a convencional.

Uma comparação entre a quantidade de reagentes empregados nas metodologias miniaturizada e convencional pode ser observada na Fig. 7.





**Fig. 7** Comparação entre as quantidades de reagentes utilizados nas metodologias miniaturizada e convencional de determinação da concentração de fenóis totais (A), flavonoides (B) e atividade antioxidante por DPPH (C), ABTS (D) e FRAP (E).

Esses resultados revelaram que para determinar a concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP foi reduzida a quantidade de reagente em 25; 5; 3,6; 3,03 e 3,33 vezes, respectivamente. A miniaturização no consumo de reagentes promoveu uma redução no custo da análise de 96% para a determinação da concentração de fenóis totais, 80% para flavonoides, 72% para DPPH, 67% para ABTS e de 70% para FRAP, além de ter reduzido os volumes de resíduos gerados.

### **Aplicação em amostras reais**

A concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP das 38 amostras foi determinada usando as metodologias miniaturizada e convencional. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
Cachaças (mg L <sup>-1</sup> )	Cachaça com coquinho-azedo ( <i>Butia capitata</i> )	140,3 ± 0,09	140,2 ± 7	10,38 ± 0,06	10,35 ± 0,06	43,83 ± 0,06	44,88 ± 0,04	227,5 ± 4	228,1 ± 0,6	194,3 ± 0,2	193,3 ± 0,7
	Cachaça com miz de amarelinha ( <i>Thunbergia alata</i> )	81,75 ± 0,2	81,72 ± 0,1	5,289 ± 0,06	5,374 ± 0,2	34,01 ± 0,03	34,6 ± 0,03	55,66 ± 0,6	56,47 ± 0,9	148,6 ± 0,03	146,5 ± 1
	Cachaça com paratudo ( <i>Hortia brasiliensis</i> )	161,8 ± 0,1	161,8 ± 0,07	39,11 ± 0,01	39,46 ± 0,2	8,470 ± 0,03	8,47 ± 0,01	444,2 ± 0,7	446,8 ± 1	258,7 ± 0,2	259,7 ± 0,2
	Cachaça convencional	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chás (mg g <sup>-1</sup> )	Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	8,480 ± 0,02	8,480 ± 0,004	0,1651 ± 0,001	0,1846 ± 0,0004	4,569 ± 0,001	4,677 ± 0,004	28,65 ± 0,02	29,11 ± 0,2	23,79 ± 0,003	24,04 ± 0,01
	Amora com hibisco	9,860 ± 0,01	9,431 ± 0,01	0,5466 ± 0,001	0,4992 ± 0,003	4,355 ± 0,06	4,533 ± 0,003	45,08 ± 0,4	45,80 ± 0,07	24,62 ± 1	25,78 ± 0,02

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Continua)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
(mg g <sup>-1</sup> )	Centela ( <i>Centella asiática</i> )	9,132 ±	9,138 ±	0,7971 ±	0,8114 ±	4,743 ±	4,937 ±	38,77 ±	39,08 ±	23,69 ±	23,49 ±
		0,06	0,02	0,006	0,001	0,007	0,005	0,04	0,04	0,02	0,02
	Cravo-da-índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	92,39 ±	92,34 ±	2,480 ±	2,506 ±	51,79 ±	52,77 ±	316,5 ±	320,7 ±	242,6 ±	242,0 ±
		0,2	0,02	0,01	0,003	0,009	0,02	0,4	0,7	0,1	0,1
	Chás Hortelã ( <i>Mentha spicata</i> )	57,45 ±	57,43 ±	6,629 ±	6,616 ±	21,26 ±	21,62 ±	272,5 ±	275,2 ±	244,6 ±	244,1 ±
		0,01	0,02	0,01	0,002	0,017	0,04	0,7	0,4	0,1	0,3
	Maçã ( <i>Malus sp.</i> )	7,880 ±	7,930 ±	0,3641 ±	0,3789 ±	3,365 ±	3,436 ±	14,72 ±	14,75 ±	18,52 ±	18,12 ±
		0,05	0,04	0,001	0,002	0,005	0,002	0,3	0,07	0,007	0,1
	Morango ( <i>Fragaria sp.</i> )	17,42 ±	17,45 ±	3,477 ±	3,220 ±	3,341 ±	3,431 ±	78,02 ±	78,93 ±	26,42 ±	26,61 ±
		0,004	0,02	0,06	0,02	0,02	0,008	0,4	0,2	0,01	0,02
	Preto ( <i>Camellia sinensis</i> )	84,79 ±	84,77 ±	4,875 ±	4,823 ±	33,51 ±	34,15 ±	298,2 ±	297,2 ±	202,1 ±	201,3 ±
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	2	2	0,07	0,4

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Continua)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
Chás (mg g <sup>-1</sup> )	Verde ( <i>Camellia sinensis</i> )	109,0 ±	109,8 ±	3,734 ±	3,786 ±	33,77 ±	34,37 ±	1274 ±	1286 ±	264,1 ±	264,0 ±
		0,04	0,02	0,009	0,03	0,3	0,2	0,4	0,4	0,6	0,4
Conhaques (mg L <sup>-1</sup> )	Conhaque de alcatrão	848,0 ±	847,3 ±	58,50 ±	58,40 ±	93,74 ±	95,65 ±	2404 ±	2408 ±	680,3 ±	680,1 ±
		0,2	0,7	0,05	0,72	0,5	0,4	0,9	0,9	0,5	0,5
	Conhaque presidente (ameixas, uvas e gengibre)	1209 ±	1203 ±	107,3 ±	107,6 ±	206,3 ±	210,3 ±	1216 ±	1227 ±	2689 ±	2688 ±
		2	2	0,7	0,3	0,4	0,4	0,9	1	2	0,3
Especiarias (mg g <sup>-1</sup> )	Açafrão da terra ( <i>Curcuma longa</i> )	4,983 ±	4,960 ±	1,200 ±	1,237 ±	0,6898 ±	0,6935 ±	27,21 ±	27,72 ±	7,340 ±	7,400 ±
		0,004	0,004	0,02	0,02	0,004	0,004	0,09	0,06	0,01	0,02
	Alho desidratado ( <i>Allium sativum</i> )	4,505 ±	4,510 ±	0,3141 ±	0,3123 ±	1,900 ±	2,015 ±	4,177 ±	4,261 ±	6,270 ±	6,102 ±
		0,004	0,05	0,02	0,02	0,003	0,01	0,1	0,03	1	0,3

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Continua)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
Especiarias (mg g <sup>-1</sup> )	Canela ( <i>Cinnamomum verum</i> )	11,40 ± 0,03	11,39 ± 0,02	0,03258 ± 0,0001	0,1564 ± 0,001	4,091 ± 0,003	4,110 ± 0,06	16,71 ± 0,6	17,21 ± 0,06	22,82 ± 0,007	22,26 ± 0,02
	Cardamomo ( <i>Elettaria cardamomum</i> )	6,650 ± 0,01	6,670 ± 0,002	0,4311 ± 0,002	0,4221 ± 0,0004	2,736 ± 0,026	2,806 ± 0,003	26,44 ± 0,02	26,56 ± 0,07	16,07 ± 0,03	16,19 ± 0,3
	Coentro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	5,710 ± 0,02	5,760 ± 0,03	0,6339 ± 0,01	0,6306 ± 0,005	3,891 ± 0,003	3,953 ± 0,02	15,19 ± 0,2	15,60 ± 0,04	11,96 ± 1	11,83 ± 0,02
	Chimichurri	10,47 ± 0,01	10,48 ± 0,04	0,9514 ± 0,004	1,211 ± 0,01	4,790 ± 0,001	4,924 ± 0,009	35,69 ± 0,1	36,73 ± 0,02	18,46 ± 0,01	18,17 ± 0,001
	Louro ( <i>Laurus nobilis</i> )	10,19 ± 0,03	10,23 ± 0,007	0,5294 ± 0,002	0,5297 ± 0,001	4,564 ± 0,004	4,691 ± 0,001	31,31 ± 0,07	31,69 ± 0,09	22,95 ± 0,03	22,39 ± 0,03
	Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	48,81 ± 0,4	49,31 ± 0,02	6,8274 ± 0,3	6,8373 ± 0,2	23,89 ± 0,4	24,57 ± 0,004	155,7 ± 0,6	155,8 ± 0,9	96,34 ± 0,02	95,67 ± 0,03

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Continua)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
Especiarias (mg g <sup>-1</sup> )	Pimenta do reino	8,280 ±	8,283 ±	0,3077 ±	0,3003 ±	2,840 ±	2,928 ±	29,05 ±	29,15 ±	17,73 ±	17,70 ±
	<i>(Piper nigrum)</i>	0,01	0,002	0,002	0,002	0,02	0,009	0,2	0,09	0,01	0,01
	Tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> )	42,38 ±	42,58 ±	2,8898 ±	2,8406 ±	22,85 ±	23,32 ±	121,7 ±	122,0 ±	98,65 ±	98,13 ±
		0,03	0,005	0,002	0,01	0,02	0,01	0,4	0,9	0,02	0,2
Energético (mg L <sup>-1</sup> )	-	69,31 ±	69,39 ±	NQ <sup>4</sup>	NQ <sup>4</sup>	24,36 ±	24,75 ±	189,0 ±	191,2 ±	156,2 ±	157,1 ±
		0,2	0,09			0,2	0,03	0,7	2	1	0,07
Geleia (mg g <sup>-1</sup> )	Geleia de amora	76,39 ±	75,57 ±	11,16 ±	11,44 ±	48,39 ±	48,65 ±	295,6 ±	295,2 ±	196,9 ±	196,1 ±
	<i>(Rubus rosifolius)</i>	1	0,2	0,4	0,3	0,1	0,03	2	1	0,5	0,1
	Geleia de frutas vermelhas	106,7 ±	104,4 ±	7,118 ±	7,116 ±	2,145 ±	2,129 ±	315,0 ±	316,6 ±	196,2 ±	196,8 ±
		0,2	0,02	0,007	0,005	0,01	0,1	3	0,2	0,4	0,2
Licor (mg L <sup>-1</sup> )	Xarope de pequi	89,38 ±	89,57 ±	8,734 ±	8,760 ±	7,481 ±	7,66 ±	223,9 ±	224,1 ±	108,8 ±	108,2 ±
	<i>(Cariocar brasiliensis)</i>	0,11	0,07	0,1	0,01	0,2	0,01	0,7	0,4	0,1	0,3

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Continua)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante						
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>		
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	
(mg g <sup>-1</sup> )	Mel	0,3455	0,342±	0,03013	0,03048	0,04002	0,04005	0,7730	0,7812	0,3645 ±	0,3592	
		± 0,008	0,0008	± 0,0004	± 0,003	± 0,0002	± 0,0004	± 0,003	± 0,03	0,0008	± 0,001	
	Mel e derivados	Mel aroeira	0,3881	0,386 ±	0,01959	0,01932±	0,03133	0,0321±	0,4787	0,4968	0,1743 ±	0,1779
			± 0,001	0,0002	± 0,0001	0,00002	± 0,0001	0,00008	± 0,02	± 0,001	0,006	± 0,02
	Própolis (mg L <sup>-1</sup> )	Própolis (mg L <sup>-1</sup> )	2684 ±	2683 ±	703,8 ±	703,4 ±	1063 ±	1062 ±	14678 ±	14675	4464 ±	4466 ±
			1	1	0,2	1	2	0,4	1	± 0,4	1	2
	Pólen	Pólen	91,91 ±	91,55 ±	7,214 ±	7,234 ±	28,40 ±	28,66 ±	215,2 ±	215,5 ±	120,9 ±	120,7 ±
			0,1	0,1	0,006	0,005	0,5	0,02	0,7	0,4	0,1	0,3
	Derivados da uva (mg L <sup>-1</sup> )	Suco de uva tinto	1760 ±	1759 ±	86,42 ±	86,20 ±	74,12 ±	73,09 ±	732,4 ±	739,5 ±	2664 ±	2667 ±
			0,9	1	0,2	0,2	0,01	0,1	0,4	0,7	0,5	1
Suco de uva branco		Suco de uva branco	380,2 ±	381,0 ±	14,16 ±	14,38 ±	95,20 ±	95,50 ±	408,7 ±	408,7 ±	889,6 ±	889,9 ±
			2	1	0,06	0,4	0,7	0,1	1	0,7	0,7	0,3

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.



**Tabela 1** Concentração de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP usando os métodos miniaturizados (Mini) e convencionais (Conv).

(Conclusão)

Tipo de amostra	Amostras	Compostos fenólicos				Atividade antioxidante					
		Fenóis totais <sup>1</sup>		Flavonoides <sup>2</sup>		DPPH <sup>3</sup>		ABTS <sup>3</sup>		FRAP <sup>3</sup>	
		Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv	Mini	Conv
Derivados da uva (mg L <sup>-1</sup> )	Néctar de uva	300,4 ±	300,5 ±	12,39 ±	12,22 ±	96,85 ±	96,94 ±	27,76 ±	27,26 ±	542,4 ±	548,1 ±
		0,2	0,3	0,07	0,2	0,07	0,02	0,7	0,4	0,1	0,1
	Vinho tinto	1156 ±	1157 ±	48,16 ±	48,01 ±	98,03 ±	98,49 ±	1191 ±	1175 ±	1956 ±	1955 ±
		0,4	2	0,04	0,2	0,2	0,5	1	2	2	0,7
	Vinho branco	438,9 ±	439,0 ±	12,94 ±	12,26 ±	99,52 ±	99,25 ±	1098 ±	1097 ±	858,4 ±	858,3 ±
		0,1	0,1	0,04	0,04	0,09	0,5	0,9	0,9	0,2	0,7

<sup>1</sup>CEAG: Concentração Equivalente de Ácido Gálico. <sup>2</sup>CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina. <sup>3</sup>CET: Concentração Equivalente de Trolox.

Como pode ser observado na Tabela 1, as concentrações de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP obtidas para cada amostra, usando os métodos miniaturizados e convencionais, foram similares. Esse resultado também demonstrou que a metodologia miniaturizada não tem limitação ao tipo de amostra, pois foram avaliadas 38 amostras de nove tipos diferentes de matrizes. Essas amostras foram analisadas por representarem os principais alvos de estudos científicos associados à determinação da atividade antioxidante (Ying *et al.*, 2015; Serreli *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2019; El-Sayed; Youssef, 2019).

Comparando os resultados apresentados na Tabela 1 e Fig. 7, pode-se observar que os valores de concentração obtidos pela metodologia miniaturizada não diferiram aos das metodologias convencionais, porém com a significativa vantagem de envolver menor consumo de reagente e, conseqüentemente, menor custo. Vale destacar que a quantidade de amostra empregada em cada metodologia miniaturizada foi também significativamente menor, indicando que o método miniaturizado pode ser uma alternativa mais adequada para extratos de plantas com massa vegetal reduzida.

## **CONCLUSÃO**

O presente estudo determinou redução significativa das quantidades de reagentes e amostra utilizados nas metodologias convencionais para a determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Isso sem afetar os resultados das análises espectrofotométricas, pois as metodologias propostas apresentaram faixa de linearidade, desvio padrão, coeficientes de determinação e correlação similares.

O processo de miniaturização dos reagentes representou um avanço importante no aspecto científico e ambiental. O estudo fornece uma alternativa eficiente e segura para pesquisas futuras em diferentes tipos de amostras com potencial antioxidante. As condições miniaturizadas de análises são aplicáveis em laboratórios com estrutura convencional, sem a necessidade de equipamentos sofisticados.

Em conclusão, a metodologia miniaturizada proposta no presente estudo apresenta a mesma eficiência e segurança dos métodos convencionais, porém com a vantagem de ser significativamente mais econômica e com menor quantidade de resíduos gerados.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio financeiro e pela infraestrutura disponibilizada.

## **Conformidade com padrões éticos**

**Financiamento:** Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Project number 420637 / 2016-8), e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01429-16).

**Conflitos de interesses:** Ane Patrícia Cacique declara que não há conflito de interesse. Érica Soares Barbosa declara que não há conflito de interesse. Gevany Paulino de Pinho declara que não há conflito de interesse. Flaviano Oliveira Silvério declara que não há conflito de interesse.

**Aprovação ética:** Este artigo não contém estudos com participantes humanos ou animais realizados por qualquer um dos autores.

**Consentimento informado:** Não aplicável.

## REFERÊNCIAS

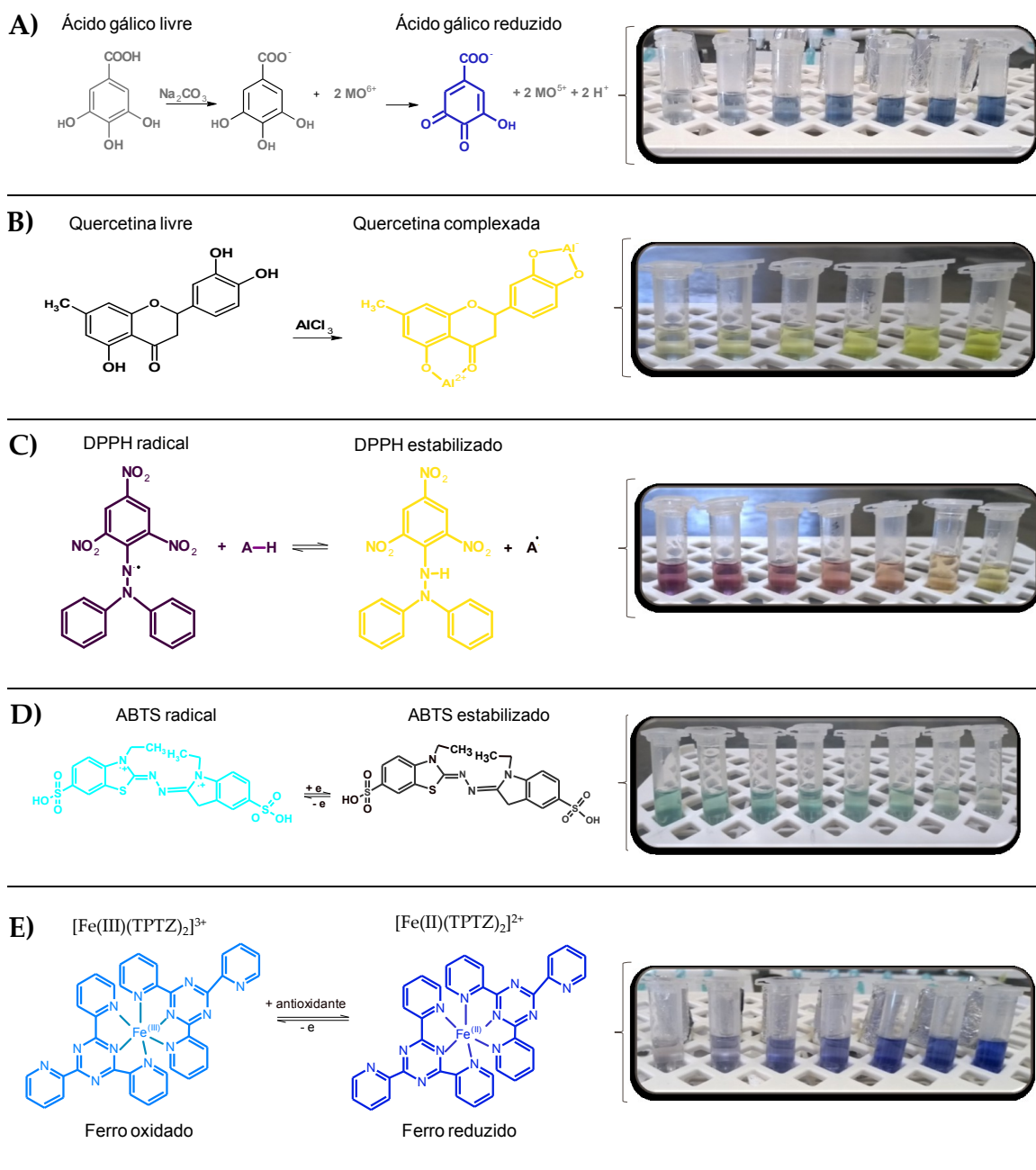
- Agbo MO, Uzor PF, Akazie-Nneji UN, et al. (2015) Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of selected Nigerian medicinal plants. *Dhaka Univ J Pharm Sci* 14:35–41. <https://doi.org/10.3329/dujps.v14i1.23733>
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, et al. (2017) Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6:42–64. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Alves DR, Maia De Morais S, Tomiotto-Pellissier F, et al. (2017) Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. *Evidence-based Complement Altern Med* 2017:1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6834218>
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Boroski M, Visentainer J V., Cottica, S. M, Morais DR (2015) Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos, 1st edn. Curitiba, Paraná
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cakmak KC, Gülçin I (2019) Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. *Toxicol Rep* 6:1273-1280. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.003>
- Ćujić N, Šavikin K, Jankovića T, et al. (2016) Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem* 194:135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>
- Da Silva, MJR, Da Silva Padilha, CV, Dos Santos Lima, M, Pereira, GE, Venturini Filho, WG, Moura, MF, Tecchio, MA (2019) Grape juices produced from new hybrid varieties grown on Brazilian rootstocks–Bioactive compounds, organic acids and antioxidant capacity. *Food Chem*. 289:714–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.060>
- Đurović S, Nikolić B, Luković N, et al. (2018) The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds. *Ind Crops Prod* 122:223–231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.078>
- El-Sayed, SM, Youssef, AM (2019). Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 5:e01989. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01989>

- Garcia-Vaquero M, Rajauria G, Tiwari B, et al. (2018) Extraction and yield optimisation of fucose, glucans and associated antioxidant activities from *Laminaria digitata* by applying response surface methodology to high intensity ultrasound-assisted extraction. *Mar Drugs* 16:257. <https://doi.org/10.3390/md16080257>
- Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, et al. (2019) Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnol Reports* 23:e00347. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347>
- Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, et al. (2018) Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem* 264:471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Gülçin I, Tel AZ, Kirecci E (2008) Antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum* (Boiss.) Manden and Scheng. *Int J Food Prop* 11:450-471. <https://doi.org/10.1080/10942910701567364>
- Gülçin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol* 86:345-391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gülçin I, Kaya R, Goren AC, et al. (2019) Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *Int J Food Prop* 22:1511–1526. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1656232>
- Gülçin I (2020) Antioxidant and antioxidant methods-an updated overview. *Arch Toxicol* 94:651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gülçin İ, Gören AC, Taslimi P, et al. (2020) Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*) -Analysis of its polyphenol contents by LC-MS / MS. *Biocatal Agric Biotechnol* 23:101441. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101441>
- Guo L, Guo J, Zhu W, et al. (2016). Optimized synchronous extraction process of tea polyphenols and polysaccharides from Huaguoshan Yunwu tea and their antioxidant activities. *Food Bioprod Process* 100:303-310. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.001>
- Hidayat MA, Fitri A, Kuswandi B (2017) Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. *Acta Pharm Sin B* 7:395-400. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.02.001>
- Horszwald A, Andlauer W (2011) Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *J Berry Res* 1:189-199. <https://doi.org/10.3233/JBR-2011-020>
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, et al. (2003) Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J Agric Food Chem* 51:6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
- Kuppusamy P, Lee KD, Song CE, et al. (2018) Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Brazilian J Pharmacogn* 28:282–288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>
- Liu SC, Lin JT, Wang CK, et al. (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (Litchi chinensis Sonn.) flowers. *Food Chem* 114:577–581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.088>
- Ma X, Wu H, Liu L, et al. (2011) Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Sci Hortic (Amsterdam)* 129:102–107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.015>

- Mareček V, Mikyška A, Hampel D, et al. (2017) ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *J Cereal Sci* 73:40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- Nardini M, Garaguso I (2020) Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chem* 305:125437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>
- Oliveira GLS (2015) Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: Estudo de revisão. *Rev Bras Plantas Med* 17:36–44. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_165](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165)
- Oniga I, Pus C, Pușcaș, C, Silaghi-Dumitrescu, R (2018) *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules* 23:1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23082077>
- Papoti VT, Xystouris S, Papagianni G, Tsimidou MZ (2011) “Total flavonoid” content assessment via aluminum [Al(III)] complexation reactions. What we really measure? *Ital J Food Sci* 23:252–259
- Pękal A, Pyrzynska K (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* 7:1776–1782 <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Pham HNT, Vuong Q Van, Bowyer MC, Scarlett CJ (2017) Effect of extraction solvents and thermal drying methods on bioactive compounds and antioxidant properties of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Patricia White cultivar). *J Food Process Preserv* 41:1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13199>
- Piana F, Ciulu M, Quirantes-Piné R, et al. (2018) Simple and rapid procedures for the extraction of bioactive compounds from Guayule leaves. *Ind Crops Prod* 116:162–169. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.057>
- Pinto D, Vieira EF, Peixoto AF, et al. (2020) Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chem* 334:127521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521>
- Re R, Pellegrini N, Proteggenete A, et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Serrelì, G, Jerković, I, Marijanović, Z, et al. (2017). Evaluation of natural occurring bioactive compounds and antioxidant activity in Nuragus white wines. *Food Res. Int.* 99:571–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.038>
- Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 18:757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Siddiq M, Sogi DS, Dolan KD (2013) Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut “Tommy Atkins” mangoes as affected by different pre-treatments. *LWT - Food Sci Technol* 53:156–162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.017>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158
- Sogi DS, Siddiq M, Greiby I, Dolan KD (2013) Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of “Tommy Atkins” mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chem* 141:2649–2655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>
- Taslimi P, Gülçin I (2018) Antioxidant and anticholinergic properties of olivetol. *J Food Biochem* 42:e12516. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12516>

- Xiang J, Zhang M, Apea-Bah FB, Beta T (2019) Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. *Food Chem* 295:214–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.058>
- Ying, L, Ying, D, Liu-juan, Z, Xian-jin, L (2015). Antioxidant activities of nine selected culinary spices from China. *J. Northeast Agric. Univ. (Engl. Ed.)* 22:50–57. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(15\)30007-6](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(15)30007-6)
- Zhang YJ, Gan RY, Li S, et al. (2015) Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 20:21138–21156. <https://doi.org/10.3390/molecules201219753>

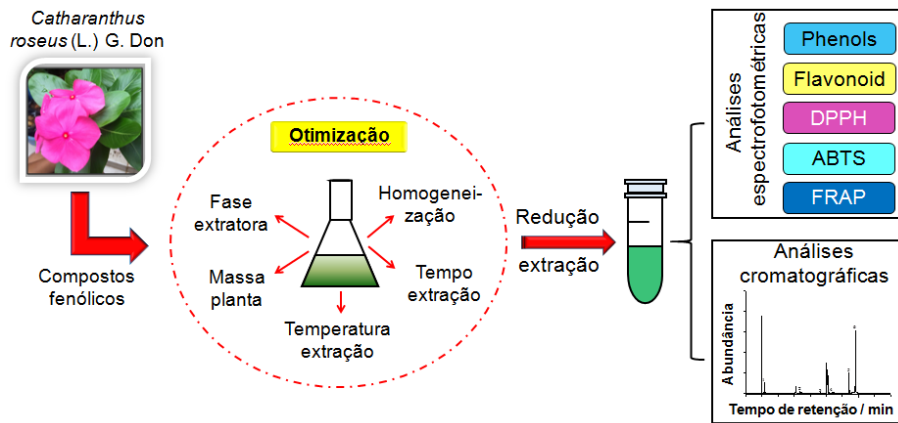
## Material suplementar



**Fig. 1S** Esquema de reação e fotografia de cada método indicando resultado positivo. A) Fenóis totais. B) Flavonoides. Atividade antioxidante pelos métodos: C) DPPH. D) ABTS. E) FRAP

#### 4.2 Artigo 2 – Condições de extração por maceração para determinação de compostos fenólicos constituintes e atividade antioxidante de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista *Ciência e Agrotecnologia*.



A imagem representa a otimização da extração de compostos fenólicos em *Catharanthus roseus* L. (G.) Don para determinação da atividade antioxidante e composição de ácidos fenólicos.



## Resumo

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma planta medicinal conhecida por importantes compostos aromáticos constituintes. Na literatura, não há estudos detalhados que elucidem os métodos de extração de compostos fenólicos para esta espécie. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de maceração para determinar a concentração de fenóis totais em *C. roseus*. Os parâmetros de massa de planta, composição da fase extratora, tipo de homogeneização, tempo de extração e temperatura foram avaliados para melhorar as condições de extração. Os extratos das plantas foram submetidos à análise espectrofotométrica para cada parâmetro e a concentração de fenóis totais foi determinada. Após estabelecer condições ótimas, os extratos foram preparados a partir de cultivares de *C. roseus*, seguidos da avaliação da atividade antioxidante por espectrofotometria, conteúdo de ácidos fenólicos por CG-EM e dissimilaridade pelo método de pares de médias aritméticas não ponderadas. As condições ótimas de extração obtidas foram: 30 mg de tecido vegetal seco em 0,72 mL de fase de extração etanol: água, 50:50 (v/v), a 50 °C por 1 h. A concentração média de fenóis totais foi de 30.3 mg g<sup>-1</sup> equivalentes de ácido gálico (EAG) e 20.0 mg g<sup>-1</sup> equivalentes de quercetina (EQ) para flavonoides. A atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP foi de 19,4; 11,8 e 23,3 mg g<sup>-1</sup> de concentração equivalente de Trolox e atividade antioxidante (CETAA), respectivamente. Houve predomínio de ácidos ferúlico (42%-56%) e cafeico (21%- 52%) nos extratos de folhas de *C. roseus*. O processo de extração aumentou o teor de fenóis totais em 55%, de 18 para 28 mg EAG.

**Termos para indexação:** fitoquímica; DPPH; ABTS; FRAP; ácidos fenólicos (CG-EM).

## INTRODUÇÃO

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma espécie vegetal pertencente à família Apocynaceae (Moon *et al.*, 2018), conhecida popularmente como vinca, maria-sem-vergonha e boa noite. Essa espécie forneceu dois alcaloides importantes com função antineoplásica, denominado de vincristina e vimblastina (Falcão *et al.*, 2017; Leonti *et al.*, 2017), sendo, portanto, reconhecida por suas propriedades medicinais em diversas partes do mundo incluindo a Índia, China e as nações europeias e americanas (Kaushik *et al.*, 2017). Embora existam vários estudos sobre o uso de *C. roseus*, como cultura de células, alcaloides indólicos e nanopartículas (Abouzeide *et al.*, 2019; Osibe; Aoyagi, 2019; Azhar *et al.*, 2020), até onde foi verificado, nenhum estudo detalhado elucidando os métodos de extração de compostos fenólicos dessa espécie foi relatado até o momento.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas fornecem proteção contra diversos estresses ambientais, como a radiação solar excessiva (Moon *et al.*, 2018) e o ataque de patógenos e pragas (Speed *et al.*, 2015). Além disso, esses compostos podem servir como potentes agentes antioxidantes, que podem auxiliar no combate ao envelhecimento e aos problemas de saúde que ocorrem em humanos (Ćujić *et al.*, 2016).

Entre esses compostos fenólicos, os ácidos salicílico, ferúlico, gálico e clorogênico, também conhecidos como ácidos fenólicos, são de particular importância, pois contribuem muito para a atividade antioxidante em plantas (Suriano *et al.*, 2018). Além disso, esses ácidos fenólicos podem ser utilizados como marcadores químicos para diferenciar espécies ou cultivares (Chen *et al.*, 2016). A extração desses compostos das plantas é uma etapa crucial, mesmo assim, nenhum consenso foi alcançado até agora sobre um método de extração padrão (Ćujić *et al.*, 2016; Wianowska; Gil, 2019).

Um dos vários métodos de extração é a extração por micro-ondas, que utiliza rotação dipolar e condução iônica como mecanismo de aquecimento da amostra para promover a migração dos compostos para fase extratora (Vinatoru *et al.*, 2017). Outro método é a extração por ultrassom, que se baseia em ondas de baixa frequência para causar o processo de cavitação com bolhas de alta energia combinada com pressão e temperatura (Freitas *et al.*, 2015; Vinatoru *et al.*, 2017). A extração por líquido pressurizado envolve a aplicação de alta pressão e temperatura para manter o solvente no estado líquido e aumentar a penetração na matriz, favorecendo a extração dos compostos de interesse (Castro-Puyana *et al.*, 2013). A extração por fluido supercrítico baseia-se no uso de substâncias que são mantidas acima do ponto crítico por meio de pressão e temperatura, sendo o dióxido de carbono o fluido supercrítico mais utilizado na extração de compostos orgânicos (Da Silva *et al.*, 2016).

Embora os métodos mencionados acima apresentem extrações eficientes, são muito caros e/ou têm desvantagens específicas. Por exemplo, a energia aplicada na extração assistida por micro-ondas pode ocasionar a oxidação de lipídios presentes na matriz e interferir no resultado final (Pharm; Pharm; Pharm, 2015). A extração por ultrassom também pode envolver efeitos deletérios nos compostos alvo de acordo com a energia e tempo de extração. As demais técnicas apresentam complexidade de operação com muitos parâmetros a serem investigados antes da aplicação (Arsad *et al.*, 2014).

Os métodos tradicionais como a maceração, maceração assistida com agitação e extração em Soxhlet são os mais utilizados no mundo (Ćujić *et al.*, 2016; Belwal *et al.*, 2018; Alara *et al.*, 2018). A extração por maceração é baseada na separação sólido-líquido, com um solvente orgânico ou água

como fase líquida. Os principais solventes usados para a extração de compostos fenólicos são: metanol, etanol, a água ou misturas desses solventes (Ćujić *et al.*, 2016; Vajić *et al.*, 2015). Vale ressaltar que, até o momento, não existe consenso sobre um solvente padrão para extrair compostos fenólicos em plantas. A eficiência da extração por maceração pode ser aumentada analisando a homogeneização, o tempo e a temperatura (Ghomari *et al.*, 2019). No entanto, a maceração também apresenta certas limitações, como um longo período de extração e a necessidade de grandes massas vegetais e, conseqüentemente, grande quantidade de solventes (Alara *et al.*, 2018). Esses parâmetros foram, portanto, avaliados no presente estudo.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de maceração para determinação do teor de fenóis totais em *C. roseus*. Os extratos das amostras foram preparados em condições ideais a partir de 12 cultivares de *C. roseus* e foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante por espectrofotometria, do teor de ácidos fenólicos por CG-EM e dissimilaridade por método de grupos de média aritmética não ponderada (UPGMA).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes e instrumentação**

Para a extração foram utilizados o etanol, metanol, acetonitrila e acetona grau P.A., obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A concentração de fenóis totais foi realizada usando o padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), com 99% de pureza. Para a determinação da concentração de flavonoides foi utilizado o padrão de quercetina obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os reagentes usados na determinação da atividade antioxidante, o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) – ABTS; 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) e o Trolox com pureza de 99%, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os ácidos vanílico ( $\geq 97\%$ ), siringico ( $\geq 98\%$ ), ferúlico, ( $\geq 99$ ) e quercetina ( $\geq 95\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis USA). Os ácidos gálico e ascórbico de 99% de pureza foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e ácido salicílico (99,8%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

No preparo dos extratos foram utilizados: (1) banho maria com agitação e aquecimento da Nova Ética (São Paulo, Brasil); (2) vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil); (3) purificador de água da Millipore (São Paulo, Brasil); chapa de aquecimento da Nova Ética (São Paulo, Brasil). As análises para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis (Cary 60, Agilent Technologies, Austrália).

### **Coleta e preparo das amostras**

As condições ideais de extração foram determinadas utilizando folhas de *C. roseus* coletadas na latitude 16°51'38" S e longitude 44°55'00" W, a 652 m de altitude. As folhas coletadas foram lavadas

com água ultrapura e secas em estufa a 60 °C por 20 h. Em seguida, foram moídas até a forma de um pó fino, peneiradas em tamiz de 500  $\mu\text{m}$  e armazenadas até a extração.

### Condições de extração

A extração inicial dos compostos fenólicos foi baseada no método de Ma *et al.* (2011) com algumas modificações. Resumidamente, 1,0 g de folhas secas de *C. roseus* foi macerada com 8 mL da fase extratora constituída por etanol:acetona (70:30, v/v). A mistura foi homogeneizada em banho com agitação a 150 rpm por 1 h a 37 °C. A mistura foi filtrada e o resíduo foi submetido a duas extrações idênticas. Posteriormente, os filtrados obtidos das três extrações foram combinados, diluídos cinco vezes e armazenados a -20 °C protegidos da luz até o momento das análises por espectrofotômetro de UV-Vis.

Com o objetivo de melhorar as condições de extração para obtenção de compostos em *C. roseus*, foi realizada a avaliação da massa de folhas, da composição da fase extratora, do tipo de homogeneização, do tempo e da temperatura de extração. A massa de amostra foi o primeiro parâmetro avaliado. Para isso, a extração inicial foi repetida, mantendo a proporção de amostra:solvente de 1:24 e variando a massa e o volume. O mesmo processo de extração foi realizado para avaliação do segundo parâmetro, com a massa selecionada no parâmetro anterior, seguida da avaliação das diferentes composições de fase extratora. A homogeneização com agitação (vórtex e banho de homogeneização mecânica a 150 rpm) ou sem agitação (sistema deixado em repouso por 24 h) foi realizada utilizando a melhor fase extratora determinada na etapa anterior, a fim de obter o terceiro parâmetro. Em seguida, foi avaliado o tempo de extração, seguido pela avaliação da temperatura de extração. Os níveis avaliados de cada um desses parâmetros estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros e níveis avaliados para extração de compostos fenólicos em *C. roseus*

Parâmetros otimizados	Níveis
Massa vegetal	30, 60, 120, 250, 500 e 1000 mg
Composição da fase extratora	Acetona
	Etanol
	Metanol
	Água
	Etanol:acetona (70:30, v/v)
	Etanol:água (50:50, v/v)
	Metanol:água (50:50, v/v)
	Vórtex / 5 min
Homogeneização	Maceração / 24 h (sem agitação)
	Maceração / 3 h (com agitação)
Tempo de extração	1, 3, 12, 24 e 48 h
Temperatura	30, 40, 50 e 60 °C

No caso de avaliação de cada parâmetro, os extratos obtidos após o processo de extração foram submetidos à análise espectrofotométrica para determinação do teor de fenóis totais, que foi então submetido à análise de variância pelo teste F a 5% de significância, utilizando o *software* R-studio (*version* 1.0.153). As médias significativas foram comparadas pelo teste de Duncan (5%). Em cada etapa, as extrações foram realizadas em triplicata e cada repetição foi submetida a quatro leituras de absorbância para o teor de fenóis totais.

No processo final de maceração, os extratos foram preparados em triplicata a partir de 12 cultivares de *C. roseus* (Vinca Cora Red, Vinca Sustorm White Eye, Vinca Sustorm Pure White, Vinca Sustorm Blush, Vinca Sustorm Rose Eye, Vinca Cora Strawberry, Vinca Sustorm Deep Orchid, Vinca Cora Deep Lavender, Vinca Sustorm Purple, Vinca Sustorm Apricot, Domestic Hybrid and wild Hybrid). As sementes das cultivares Domestic Hybrid e Wild Hybrid foram obtidas em um jardim doméstico na região do norte de Minas Gerais, enquanto as demais cultivares foram adquiridas em uma empresa comercial do estado de São Paulo. Todas as cultivares foram plantadas em condições idênticas.

Os extratos obtidos dessas cultivares foram submetidos a análises espectrofotométricas para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante. Os resultados foram apresentados como médias e erros padrão e foram analisados pelo teste de Duncan (5%). Além disso, as composições químicas dos ácidos fenólicos constituintes desses extratos foram avaliados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

### **Avaliação da concentração de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante**

O teor de fenóis totais foi determinado utilizando a metodologia proposta por Kim *et al.* (2003) com modificações. Resumidamente, 40  $\mu\text{L}$  de extrato vegetal ou da solução padrão de ácido gálico, 360  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 40,0  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso no escuro por 5 min. Em seguida, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio a 7% (m/v), 160  $\mu\text{L}$  de água ultrapura totalizando 1,00 mL. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 90 min à temperatura ambiente para reação total. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro de UV-Vis, a 750 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão na faixa de concentração de 1,0 a 8,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico / g de amostra seca da planta.

A concentração de flavonoides foi determinada pelo método de Boroski *et al.* (2015) com modificações. Resumidamente, em um microtubo foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de extrato vegetal ou solução padrão quercetina, 50,0  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio a 5% (m/v) e 850  $\mu\text{L}$  de metanol. A mistura com volume reacional de 1,00 mL foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 min. A quercetina foi utilizada como padrão e a curva analítica foi construída na faixa de concentração 1,0 a 12  $\text{mg L}^{-1}$ . A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 425 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de quercetina / g de amostra seca da planta.

A avaliação da atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, seguindo a metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com modificações. Inicialmente, 4 mg do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi completamente solubilizado em 25 mL de metanol. A solução obtida foi diluída com metanol 80% (v/v) até obter uma solução de trabalho com absorbância de  $1,1 \pm 0,02$  medida em 515

nm. Essa solução foi utilizada nas reações para verificar a atividade de eliminação de radicais pelos extratos de *C. roseus*. Para isso, uma alíquota de 830  $\mu\text{L}$  dessa solução de DPPH foi transferida para um microtubo contendo 170  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal ou da solução padrão de Trolox. A mistura de 1,0 mL foi deixada em repouso por 45 min. O padrão de Trolox em metanol foi utilizado para obtenção da curva analítica nas concentrações de 1,0 a 7,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg equivalente de Trolox / g de amostra seca da planta.

O ensaio de ABTS foi realizado pelo método de Siddiq, Sogi e Dolan (2013) com modificações. A solução estoque contendo o radical cátion  $\text{ABTS}^+$  foi obtida pela mistura da solução de persulfato de potássio 2,4  $\text{mmol L}^{-1}$  e ABTS 7  $\text{mmol L}^{-1}$  na proporção de 1:1 (v/v), ambas preparadas em água ultrapura. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 16 h no escuro para formação do radical. Em seguida, a absorbância da solução estoque foi aferida em 734 nm e diluída em metanol 80% (v/v) até obter uma solução de trabalho com absorbância de  $0,7 \pm 0,02$ . Após a diluição, 990  $\mu\text{L}$  da solução radicalar foi transferida para um microtubo contendo 10  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal ou da solução padrão de Trolox. O padrão de Trolox preparado em metanol foi utilizado na curva analítica, variando as concentrações de 0,25 a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg equivalente de Trolox / g de amostra seca da planta.

O poder de redução do cloreto férrico (FRAP) pelos extratos vegetais foi determinado utilizando a metodologia descrita por Boroski *et al.* (2015) com modificações. Foram preparadas soluções estoque de TPTZ na concentração de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  em ácido clorídrico a 40  $\text{mmol L}^{-1}$ , solução tampão de acetato de sódio a 300  $\text{mmol L}^{-1}$  e cloreto férrico a 20  $\text{mmol L}^{-1}$  em água. O reagente de trabalho foi obtido pela mistura dessas três soluções estoque na proporção de 1:10:1 (v/v/v). Em seguida, foi homogeneizado e deixado em repouso em banho de aquecimento a 37 °C sem agitação por 3 h. A reação do método foi realizada em microtubo contendo 30  $\mu\text{L}$  de extrato ou padrão, 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 900  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho de TPTZ. A mistura de 1,02 mL foi homogeneizada e deixada em repouso a 37 °C por 45 min. As análises foram realizadas em espectrofotômetro a 593 nm. O padrão de Trolox preparado em metanol foi utilizado para construção da curva analítica na faixa de concentração de 1,0 a 7,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mg equivalente de Trolox / g de amostra seca da planta.

### **Determinação da composição química dos ácidos fenólicos**

Para a determinação da composição química dos ácidos fenólicos nos extratos, foi necessário realizar uma etapa de derivatização antes da etapa principal de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

A derivatização dos extratos consiste em adicionar em um frasco internamente cônico contendo 1 mg do extrato, 100  $\mu\text{L}$  de BSTFA e 60  $\mu\text{L}$  de piridina anidra. O frasco contendo a mistura foi agitado e deixado em aquecimento a 50 °C por 30 min. Em seguida, a mistura reacional foi transferida para *vial* de injeção com *insert* e analisado por CG-EM.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A), equipado com detector de massa (CG-EM) e coluna capilar DB-5MS de 30 m comprimento x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  espessura do filme interno da Agilent Technologies. Hélio (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste e taxa de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . Utilizando autoinjeter

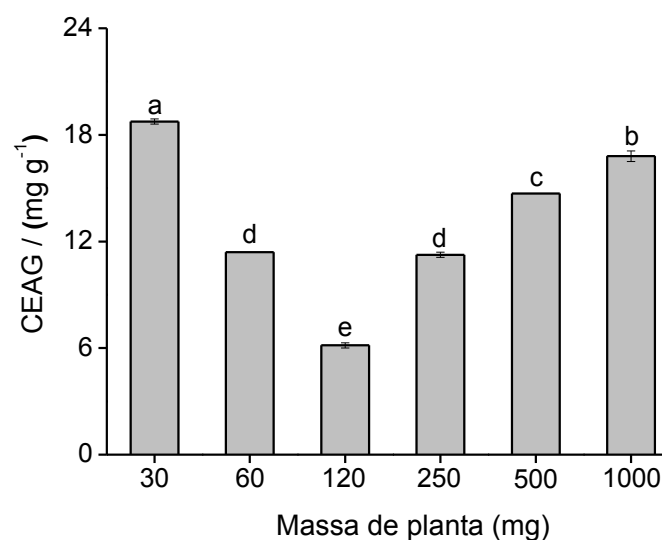
(CTC combiPaL), 1  $\mu\text{L}$  da amostra foi injetado no cromatógrafo sem razão de divisão do fluxo (*splitless*). O injetor *split/splitless* foi mantido a 290 °C. A coluna cromatográfica inicialmente a 100 °C foi aquecida até 150 °C na taxa de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . Em seguida, a temperatura foi elevada até 225 °C com taxa de 5 °C  $\text{min}^{-1}$ , seguindo o aquecimento até 300 °C com incremento de 20 °C  $\text{min}^{-1}$ . A coluna foi mantida a 300 °C por 2 min. A temperatura da interface foi mantida a 280 °C e a ionização realizada por impacto de elétrons a 70eV. A identificação dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas do padrão com a biblioteca do aparelho (NIST 2.0). Posteriormente, as análises seguiram no modo seletivo de íons. Os íons selecionados foram: 135, 267, 268 (ácido salicílico); 267, 297, 312 (ácido vanílico); 312, 327, 342 (ácido siríngico); 281, 443, 458 (ácido gálico); 338, 381, 396 (ácido ferúlico) e 219, 381, 396 (ácido cafeico).

Os resultados da quantificação dos ácidos fenólicos nos extratos por CG-EM foram expressos em média e desvio padrão. Os valores médios foram utilizados para estudar a dissimilaridade entre as cultivares de *C. roseus* pelo método UPGMA no programa R-studio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Condições de extração

As extrações por maceração se destacam por utilizar massa vegetal e volumes de solventes elevados (Alara *et al.*, 2018). Entretanto, extrações que requerem grandes volumes e massa têm sido a principal barreira para algumas plantas, como *C. roseus*, nos sistemas de cultivo em vaso, *in vitro* ou sob estresse salino, que fornecem uma matéria seca total inferior a 2,1 g planta<sup>-1</sup> (Chung *et al.*, 2007; Jaleel *et al.*, 2008). Portanto, a primeira etapa do processo de determinação das condições ideais para extração dos compostos fenólicos dessa espécie foi determinar a massa de amostra mais adequada. As concentrações de fenóis totais obtidas em cada massa avaliada estão apresentadas na Figura 1.

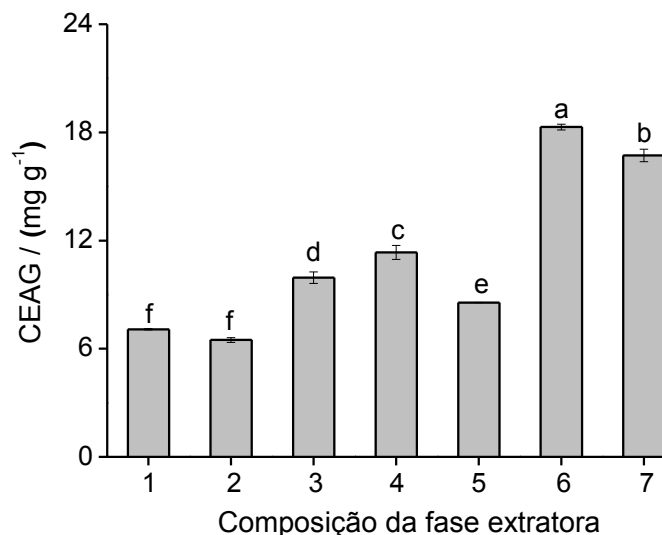


**Figura 1:** Concentrações de fenóis totais (média  $\pm$  erro padrão, n=3) obtidas para seis diferentes de massas de folhas de *C. roseus*. Os valores de concentração são expressos em equivalentes de ácido

gálico (CEAG). As condições representadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

Pode-se observar que o extrato obtido com 30 mg de folhas de *C. roseus* apresentou a maior concentração de fenóis totais, diferindo estatisticamente dos demais. A interação entre as partículas da amostra e a fase extratora é maior do que a observada na massa de 1000 mg. A aglomeração de amostra com massas maiores reduz a interação com o solvente e, por consequência, a eficiência da extração (Luthria, 2012). O teor de fenóis totais obtido para massa de 30 mg de *C. roseus* foi superior ao observado no estudo de fenóis em folhas de Guayule (15 mg EAG g<sup>-1</sup> amostra), em que foi utilizada massa de amostra 80 vezes maior do que a utilizada no presente estudo com *C. roseus* (Piana *et al.*, 2018). Portanto, a massa de 30 mg foi selecionada para as análises posteriores deste estudo.

A segunda etapa envolveu a avaliação dos solventes mais utilizados na literatura para determinar a melhor composição da fase extratora. Sete fases extradoras foram avaliadas, e as concentrações de fenóis totais obtidas estão apresentadas na Figura 2.



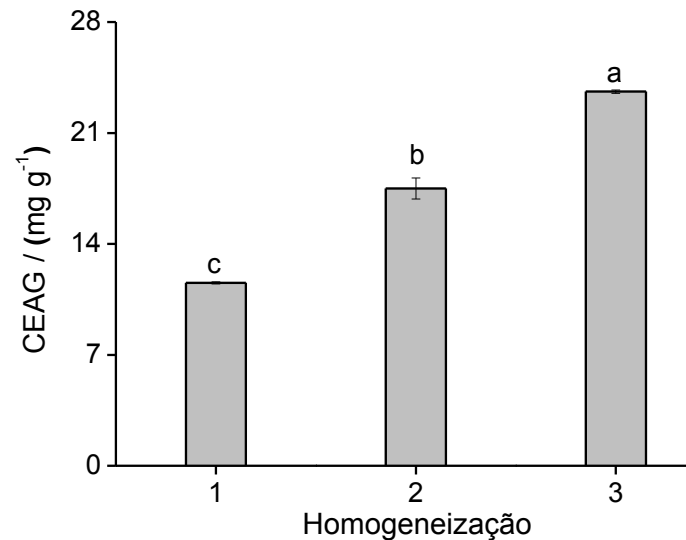
**Figura 2:** Concentrações de fenóis totais (média ± erro padrão, n=3) obtidas para sete tipos de fases extradoras. 1: acetona, 2: etanol, 3: metanol, 4: água, 5: etanol:acetona (70:30, v/v), 6: etanol:água (50%, v/v), 7: metanol:água (50%, v/v). Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

A maior concentração de fenóis totais foi observada no extrato obtido com etanol:água (50%, v/v). Essa fase extratora apresentou diferença estatística em relação às demais em termos de concentração. O resultado foi, em média, 62% superior aos obtidos com um único solvente. Resultado similar foi observado no estudo de fenóis em *chokeberry*, em que a concentração máxima de fenóis foi obtida com 50% de etanol (Ćujić *et al.*, 2016). A combinação de solvente orgânico com água promove a hidratação da amostra, afrouxa as paredes celulares e facilita a migração dos compostos fenólicos do



material vegetal para a fase extratora (Alara *et al.*, 2018). Portanto, a fase extratora constituída por etanol:água (50%, v/v) foi definida para as etapas seguintes deste trabalho.

O efeito da homogeneização foi o terceiro parâmetro avaliado neste estudo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

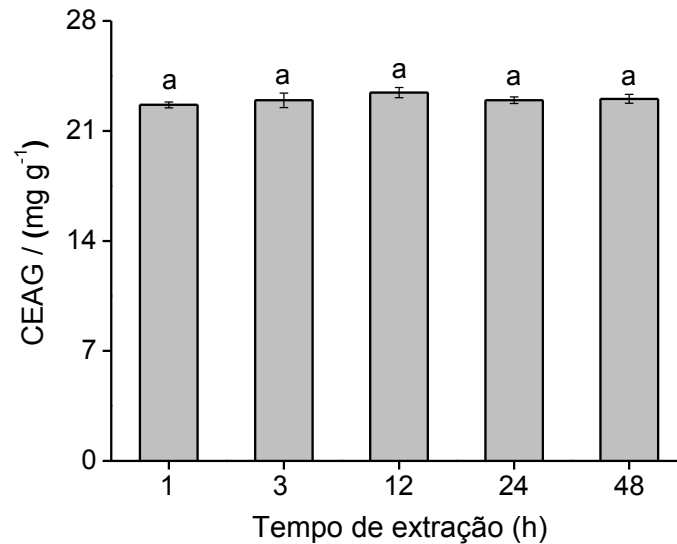


**Figura 3:** Concentrações de fenóis totais (média  $\pm$  erro padrão,  $n=3$ ) obtidas por maceração com e sem homogeneização. 1: vórtex (5 min), 2: maceração com agitação (3 h), 3: maceração sem agitação (24 h). Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

A maceração sem agitação produziu extratos com maior concentração de fenóis totais e diferiu significativamente dos demais modos de homogeneização no teste de significância. O presente estudo é o primeiro a relatar que a agitação do sistema não aumentou a eficiência do processo de maceração. De acordo com um estudo anterior, a extração de contaminantes fenólicos em água, utilizando o método de microextração eletromediada, foi mais eficiente quando realizada sem agitação. Foi indicado que a agitação em uma velocidade lenta ( $\sim 200$  rpm) ou muito rápida ( $\sim 800$  rpm), afetou negativamente a migração dos compostos da amostra para a fase extratora devido a razões desconhecidas (Chong *et al.*, 2018).

A concentração de fenóis totais obtida com maceração em repouso no presente estudo foi superior à observada em um estudo recente realizado com a *C. roseus* utilizando extração ultrassônica ( $18 \text{ mg CEAG g}^{-1}$  de amostra seca) (Pham *et al.*, 2018). Por isso, a maceração sem agitação foi selecionada para as etapas seguintes.

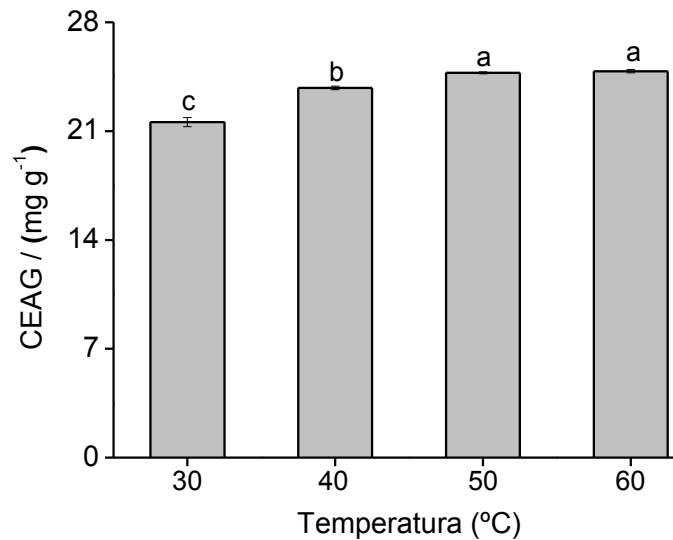
Tradicionalmente, o período de extração por maceração varia de 1 h a 5 dias (Alara *et al.*, 2018; Čujić *et al.*, 2016). Entretanto, períodos de extração prolongados podem resultar na degradação de alguns compostos presentes no extrato (Mojzer *et al.*, 2016; Mokrani; Madani, 2016). Por isso, o tempo de extração foi avaliado no presente estudo e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.



**Figura 4:** Concentrações de fenóis totais (média  $\pm$  erro padrão,  $n=3$ ) obtidas para cinco tempos de extração. Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

Conforme apresentado na Figura 4, não houve diferença significativa entre os valores de concentração de fenóis totais dos extratos obtidos em cada tempo de extração avaliado. Esse resultado é consistente com a segunda Lei de Difusão de Fick, segundo a qual a migração dos analitos deixa de ocorrer após um determinado tempo de contato e atinge um equilíbrio entre a matriz e a fase extratora (Mokrani; Madani, 2016). De acordo com os resultados, 1 h de extração foi selecionada como tempo de extração para as etapas seguintes. O mesmo período/tempo de extração foi relatado para extração de fenóis totais em chokeberry (Ćujić *et al.*, 2016) e extração de licopeno em resíduo industrial de casca de tomate (Kehili *et al.*, 2019).

Em seguida, a temperatura ideal para o processo de extração foi avaliada e os resultados são apresentados na Figura 5.



**Figura 5:** Concentrações de fenóis totais (média  $\pm$  erro padrão,  $n=3$ ) obtidas para quatro temperaturas de extração. Os valores são apresentados em termos de concentração equivalente de ácido gálico (CEAG). Condições seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

A extração de compostos fenólicos de *C. roseus* nas temperaturas de 50 e 60 °C não diferiram estatisticamente e apresentou a maior concentração de fenóis totais quando comparados com a extração à temperatura ambiente (30 °C). Esses achados indicaram a importância da adição de calor durante a preparação do extrato. O aquecimento durante o processo de extração reduz a viscosidade e tensão superficial dos solventes, promovendo maior interação entre a fase extratora com as partículas da amostra, aumentando assim a taxa de transferência de massas dos analitos para o extrato (Dai; Mumper, 2010). Além disso, o aquecimento promove a liberação dos ácidos fenólicos ligados aos glicosídeos, aumentando o conteúdo de fenóis totais extraíveis (Mokrani; Madani, 2016). Os valores de fenóis totais obtidos no presente estudo (21,0 a 25,0 mg g<sup>-1</sup>) foram maiores do que os observados na extração de compostos fenólicos em folhas de *Vinca rosea* (15,9 mg g<sup>-1</sup>) por maceração a 90 °C (Proestos *et al.*, 2005), o que indica que temperaturas acima de 60 °C são capazes de degradar os compostos de interesse. Portanto, 50 °C foi selecionado como a temperatura de extração para este estudo.

Os resultados obtidos nas análises dos extratos das 12 cultivares de *C. roseus*, utilizando as condições ótimas de extração, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Concentrações de fenóis totais (CEAG: Concentração Equivalentes de Ácido Gálico), flavonoides (CEQ: Concentração Equivalente de Quercetina) e atividade antioxidante expressa pela concentração equivalente de Trolox (CET) nos métodos DPPH, ABTS e FRAP em extratos de 12 cultivares de *C. roseus*

Cultivares	Fenóis totais	Flavonoides	DPPH	ABTS	FRAP
	CEAG (mg g <sup>-1</sup> )	CEQ (mg g <sup>-1</sup> )	-----	CET (mg g <sup>-1</sup> )	-----
1	32,4 ± 1b	22,4 ± 1 ab	17,8 ± 0,1de	11,6 ± 0,5c	16,4 ± 0,1d
2	27,5 ± 0,02d	20,7 ± 0,5cd	16,9 ± 0,1g	11,7 ± 0,4c	16,1 ± 0,01e
3	27,8 ± 0,5d	18,4 ± 0,1f	17,3 ± 0,2f	11,2 ± 0,1c	28,1 ± 0,01c
4	33,3 ± 0,5b	16,7 ± 0,2g	22,5 ± 0,02a	13,2 ± 0,1a	16,3 ± 0,01de
5	32,2 ± 0,9b	22,7 ± 0,2a	22,5 ± 0,1a	11,5 ± 0,7c	28,5 ± 0,02b
6	27,7 ± 0,2d	20,3 ± 0,2cde	22,4 ± 0,02a	11,1 ± 0,1c	16,1 ± 0,1de
7	33,7 ± 0,4b	20,2 ± 0,4cde	17,8 ± 0,07d	11,1 ± 0,1c	16,1 ± 0,1e
8	28,0 ± 0,01d	20,7 ± 0,08cd	20,7 ± 0,2c	12,7 ± 0,1ab	28,7 ± 0,02ab
9	30,1 ± 1c	21,0 ± 1bc	22,1 ± 0,01b	12,0 ± 0,09bc	28,8 ± 0,01a
10	35,6 ± 0,2a	19,2 ± 0,4def	17,9 ± 0,07d	11,7 ± 0,1c	28,2 ± 0,07c
11	28,2 ± 1d	18,5 ± 1f	17,5 ± 0,2ef	11,8 ± 0,08bc	28,7 ± 0,3ab
12	27,2 ± 0,9d	19,0 ± 0,9ef	17,4 ± 0,1f	12,0 ± 0,05bc	16,3 ± 0,01de

Os valores foram expressos em média ± desvio padrão ( $n=3$ ). 1) Vinca Cora Red, 2) Vinca Sustorm White Eye, 3) Vinca Sustorm Pure White, 4) Vinca Sustorm Blush, 5) Vinca Sustorm Rose Eye, 6) Vinca Cora Strawberry, 7) Vinca Sustorm Deep Orchid, 8) Vinca Cora Deep Lavender, 9) Vinca Sustorm Purple, 10) Vinca Sustorm Apricot, 11) Domestic Hybrid, e 12) Wild Hybrid. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

A análise de variância pelo teste F a 5% foi significativa para as análises de fenóis totais, flavonoides, DPPH, ABTS e FRAP nos extratos de *C. roseus*. A cultivar 10 (Vinca Sustorm Apricot) diferiu estatisticamente das demais na concentração de fenóis totais. As cultivares 2, 3, 6, 8, 11 e 12 não diferiram estatisticamente e apresentaram as menores concentrações de fenóis totais. Na análise dos flavonoides, as cultivares 1 e 5 não diferiram entre si, porém apresentaram diferença significativa em relação às demais cultivares.

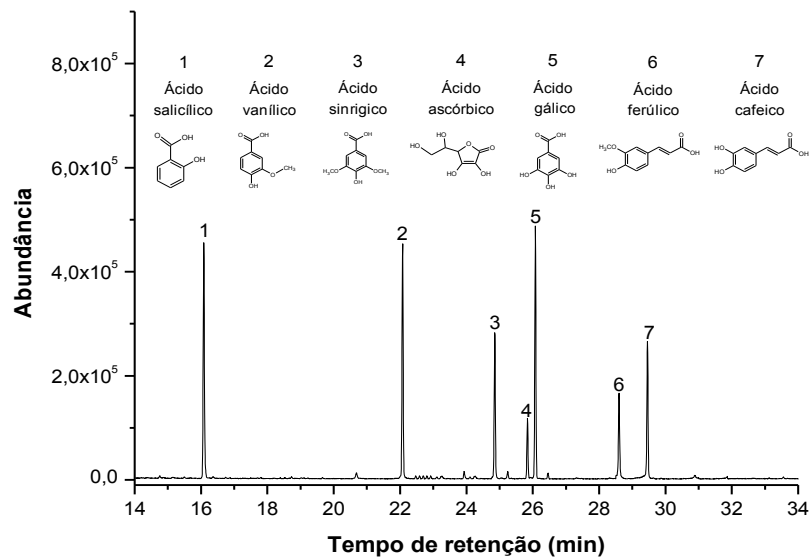
As concentrações médias de fenóis totais e flavonoides em *C. roseus* foram de 30,3 mg CEAG g<sup>-1</sup> e de 20,0 mg CEQ g<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos obtidos em extrato aquoso de folhas de *C. roseus* da cultivar Patricia White, em que foram observadas concentrações de fenóis totais de 18,1 mg CEAG g<sup>-1</sup> e de 10,0 mg CEQ g<sup>-1</sup> para flavonoides, utilizando extração ultrassônica (Pham *et al.*, 2017). Os resultados do presente estudo podem ser explicados pela presença de 50% de etanol na fase extratora, visto que o uso de misturas binárias favorece a extração quando comparados com solvente puro (Daí; Mumper, 2010). Além disso, o método de maceração permitiu a migração dos compostos fenólicos sem o risco de degradação por excesso de energia.

Em relação à atividade antioxidante, as maiores concentrações equivalentes de Trolox foram observados no método FRAP, seguido pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo foram superiores aos relatados recentemente para *C. roseus*, utilizando extração ultrassônica, em que foram observadas CET de 8,34 mg g<sup>-1</sup> para DPPH; 12,1 mg g<sup>-1</sup> para ABTS e 10,5 mg g<sup>-1</sup> para FRAP (Pham *et al.*, 2018).

O mecanismo de reação do método FRAP envolve a transferência de elétrons e pode, portanto, ser influenciado pelas condições do meio reacional e pelo tempo de reação (Prior *et al.*, 2005). O método FRAP é frequentemente aplicado em extratos com moléculas hidrofílicas (Boroski *et al.*, 2015), pois é favorecido pela fase extratora composta por etanol: água (50%, v/v). Além disso, o radical DPPH apresenta impedimento estérico para as moléculas consideradas grandes, visto que essas moléculas são impedidas de interagir com o elétron desemparelhado do nitrogênio presente na estrutura do radical (Ácsová *et al.*, 2019).

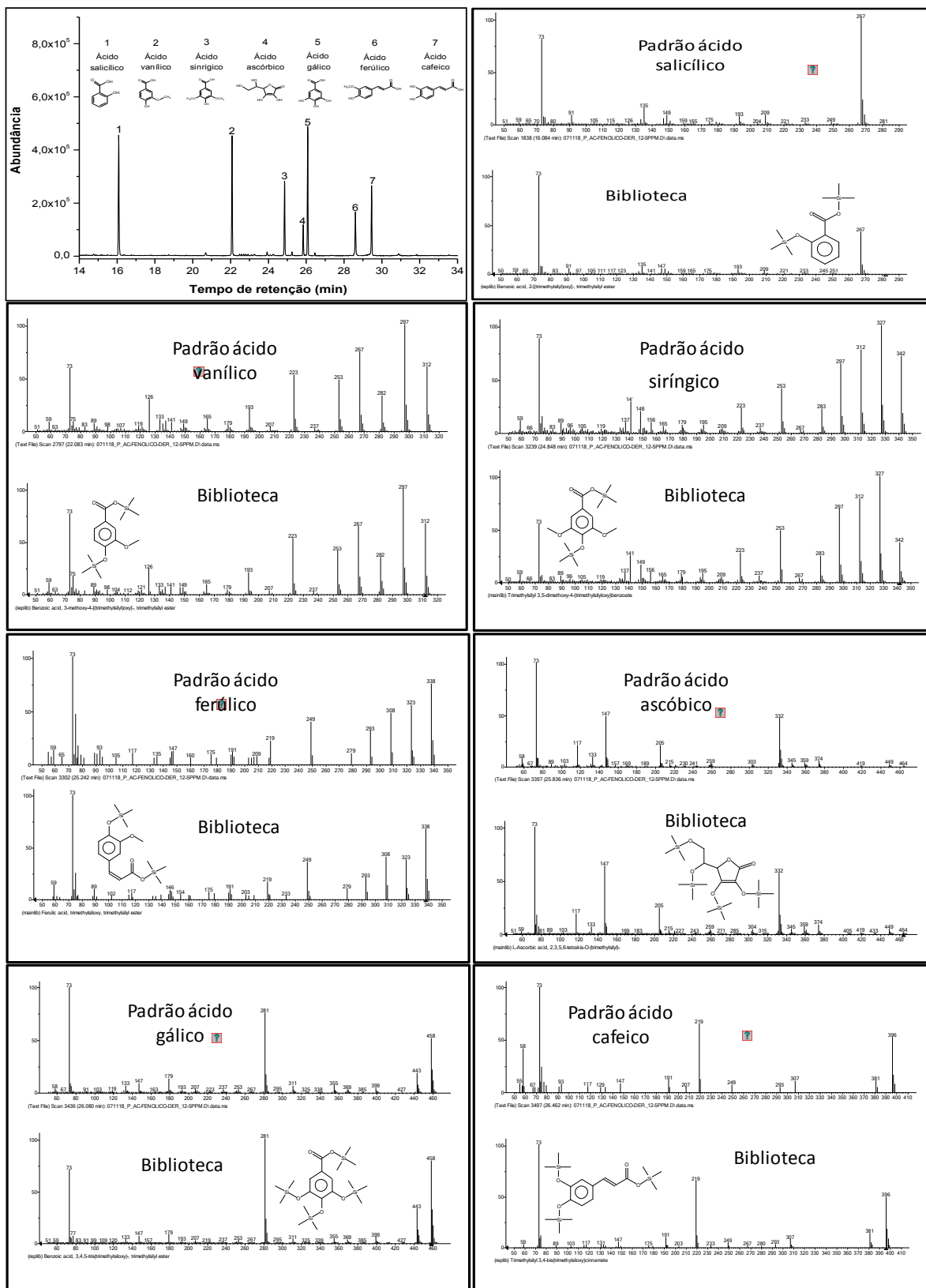
### Composição química dos ácidos fenólicos

Um trabalho anterior avaliou a presença de compostos fenólicos em extratos vegetais juntamente com suas atividades antioxidantes (Pham *et al.*, 2017). No presente estudo, o cromatograma obtido para os padrões de ácidos fenólicos está apresentado na Figura 6.



**Figura 6:** Cromatograma obtido para os padrões de ácidos fenólicos na concentração de  $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ : 1) ácido salicílico; 2) ácido vanílico; 3) ácido sirínigico; 4) ácido gálico; 5) ácido ferúlico e 6) ácido cafeico.

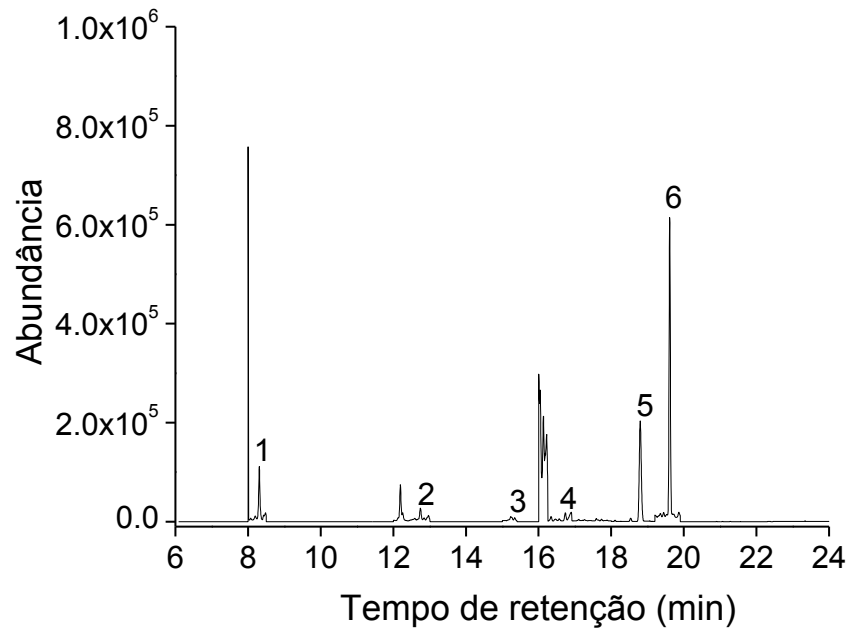
A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada a partir do perfil de fragmentação e da comparação com a biblioteca. Os espectros de massas obtidos estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7:** Espectro de massas de ácidos fenólicos e ascórbicos – comparação entre padrão e biblioteca Nist 2.0.

A partir dos espectros de massas foram selecionados três íons principais referentes a cada ácido fenólico. Esse grupo de íons foi utilizado no modo seletivo de íons para análises e quantificação desses ácidos nas amostras.

Os extratos de cada cultivar foram analisados por CG-EM, e os cromatogramas obtidos foram bastante semelhantes. Um cromatograma representativo do extrato de *C. roseus* da cultivar 11, o híbrido doméstico, está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8:** Cromatograma do extrato da cultivar 11 (Híbrida Doméstica) obtido nas condições finais de extração: 1) ácido salicílico; 2) ácido vanílico; 3) ácido siríngico; 4) ácido gálico; 5) ácido ferúlico e 6) ácido cafeico

Os seis ácidos fenólicos foram detectados nos extratos das 12 cultivares de *C. roseus* e os resultados da quantificação estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Concentrações de ácidos fenólicos em extratos de *C. roseus* oriundos de 12 cultivares

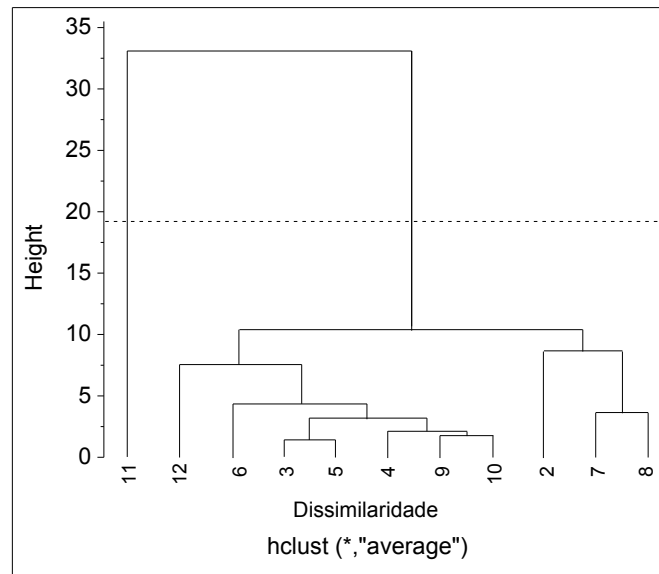
Cultivares	Ácidos fenólicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					
	Salicílico	Vanílico	Siringico	Gálico	Ferúlico	Cafeico
1	-	-	-	-	-	-
2	0,44 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,009	0,41 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,05	17 $\pm$ 1	21 $\pm$ 0,4
3	0,63 $\pm$ 0,05	1,2 $\pm$ 0,008	0,70 $\pm$ 0,001	0,61 $\pm$ 0,01	21 $\pm$ 0,7	32 $\pm$ 1
4	0,71 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,04	24 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 0,3
5	0,70 $\pm$ 0,02	1,4 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,05	22 $\pm$ 0,2	31 $\pm$ 0,1
6	0,83 $\pm$ 0,08	1,3 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,01	26 $\pm$ 0,3	31 $\pm$ 0,3
7	1,1 $\pm$ 0,003	1,6 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,03	2,1 $\pm$ 0,2	24 $\pm$ 0,3	24 $\pm$ 0,6
8	0,52 $\pm$ 0,003	1,1 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,04	1,2 $\pm$ 0,06	27 $\pm$ 2	26 $\pm$ 1
9	1,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,02	23 $\pm$ 0,6	34 $\pm$ 0,000
10	1,2 $\pm$ 0,03	2,0 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,1	24 $\pm$ 0,7	35 $\pm$ 3
11	4,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,009	0,60 $\pm$ 0,04	56 $\pm$ 1	36 $\pm$ 0,07
12	1,1 $\pm$ 0,005	1,4 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,08	1,2 $\pm$ 0,02	29 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1

Os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). 1) Vinca Cora Red (não analisada), 2) Vinca Sustorm White Eye, 3) Vinca Sustorm Pure White, 4) Vinca Sustorm Blush, 5) Vinca Sustorm Rose Eye, 6) Vinca Cora Strawberry, 7) Vinca Sustorm Deep Orchid, 8) Vinca Cora Deep Lavender, 9) Vinca Sustorm Purple, 10) Vinca Sustorm Apricot, 11) Híbrida Doméstica e 12) Híbrido Selvagem.

Os ácidos ferúlico e cafeico foram os compostos identificados em maiores concentrações nos extratos das 12 cultivares de *C. roseus*. Os demais ácidos apresentaram concentrações entre 0,44 e 4,32  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A extração de compostos fenólicos, incluindo o ácido ferúlico, é influenciada pelo tempo de extração, pH e temperatura (Kumar; Pruthi, 2014). Os parâmetros de tempo e temperatura também foram avaliados no presente estudo e podem explicar os resultados superiores obtidos em comparação aos relatados para folhas de oliveira (*Olea europaea* L.), com as concentrações de ácido ferúlico, vanílico e cafeico de 1,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 4,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  e não detectado, respectivamente (Guodong *et al.*, 2019). As concentrações de ácido vanílico e siringico obtidas no presente estudo foram menores que as obtidas no estudo de folhas de milho (*Setaria italica*), utilizando 1,0 g de amostra na extração (Xiang *et al.*, 2019).

Esses compostos, além de estarem diretamente associados à atividade antioxidante dos extratos, também podem ser utilizados como marcadores químicos para diferenciação de espécies ou variedades de plantas (Assunção *et al.*, 2019). Nesse contexto, os valores das concentrações desses ácidos fenólicos foram submetidos à análise de agrupamento das cultivares de *C. roseus*, e o dendograma obtido pelo método UPGMA está apresentado na Figura 9.





**Figura 9:** Dendrograma de agrupamento pelo método UPGMA de 12 cultivares de *C. roseus*: 1) Vinca Cora Red (não avaliado), 2) Vinca Sustorm White Eye, 3) Vinca Sustorm Pure White, 4) Vinca Sustorm Blush, 5) Vinca Sustorm Rose Eye, 6) Vinca Cora Strawberry, 7) Vinca Sustorm Deep Orchid, 8) Vinca Cora Deep Lavender, 9) Vinca Sustorm Purple, 10) Vinca Sustorm Apricot, 11) Híbrida Doméstica e 12) Híbrido Selvagem. Ponte de corte de Mojena (linha tracejada)

O ponto de corte estabelecido pelo método de Mojena foi à altura de 19,755. Na análise de agrupamento, foi observada a máxima dissimilaridade entre as cultivares de *C. roseus*, sendo observados dois *clusters* definidos. O *cluster* 1 incluiu apenas a cultivar 11, enquanto o *cluster* 2, as demais cultivares.

O extrato das folhas da cultivar 11 apresentou concentrações de ácido salicílico e ácido ferúlico quatro e duas vezes superiores, respectivamente, em relação às demais cultivares. O ácido salicílico é uma importante molécula de sinalização produzida em resposta a estresses bióticos e abióticos (Chavoushi *et al.*, 2020), particularmente na defesa contra patógenos e herbivoria (Felton *et al.*, 2018). O ácido ferúlico auxilia na resposta à infecção por patógenos e também contribui para a rigidez da parede celular, formando complexos no processo de lignificação (Kumar; Pruthi, 2014).

As cultivares 7 e 11 correspondem a “Vinca Sustorm Deep Orchid”. No entanto, as sementes da cv. 7 foram adquiridas de uma empresa comercial, enquanto as da cv. 11 foram obtidas de um jardim doméstico. Essa diferença na origem das sementes pode representar um ganho do ponto de vista de adaptação. Portanto, inferiu-se que as diferentes condições ambientais de crescimento das plantas de origem das sementes dessas cultivares (7 e 11) podem ter influenciado no desenvolvimento de maior resistência a patógenos na cultivar 11 do que na cultivar 7.

O *cluster* 2 apresentou subdivisões definidas por diferenças nas concentrações dos ácidos ferúlico e cafeico. A cultivar 12 é facilmente encontrada na natureza e, portanto, considerada selvagem. Essa cultivar foi alocada em uma subdivisão isolada e apresentou as maiores concentrações desses ácidos. Na outra extremidade do dendrograma, a cultivar 2 (Vinca Sustorm White Eye) também ficou em uma subdivisão isolada por apresentar as menores concentrações de ácido ferúlico e cafeico.

## CONCLUSÃO

O presente estudo determinou os valores ótimos de parâmetros importantes para extração de compostos fenólicos em *C. roseus*. Além disso, foi realizada uma redução significativa na massa vegetal utilizada, bem como no volume de solventes necessários na extração, sem afetar os resultados das análises espectrofotométricas e cromatográficas.

A exigência de menor quantidade de massa de amostra e de volume de solvente é um passo positivo em relação ao escopo científico e ambiental. O estudo oferece uma alternativa eficiente e segura para realizar a extração de outras plantas ou estruturas como flores, raízes e sementes, que apresentam menor quantidade de material vegetal para o processo de extração.

As condições ideais de extração determinadas no presente estudo são viáveis para uma configuração de laboratório convencionalmente estruturada, sem a necessidade de equipamentos sofisticados para preparação de amostras. Além disso, as condições podem ser aplicadas para investigação mais detalhada sobre sazonalidade, estresse ambiental e marcadores químicos de diferentes cultivares.

O presente estudo fornecerá bases para futuras pesquisas sobre a extração de compostos fenólicos de *C. roseus* usando outros modelos, como a metodologia de superfície de resposta.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (número do projeto 420637 / 2016-8), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01429-16) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio financeiro e pela infraestrutura disponibilizada.

## REFERÊNCIAS

- ABOUZEID, S. et al. The genuine localization of indole alkaloids in *Vinca minor* and *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, 168:112110, 2019.
- ÁCSOVÁ, A. et al. Selected *in vitro* methods to determine antioxidant activity of hydrophilic/lipophilic substances. *Acta Chimica Slovaca*, 12(2):200–211, 2019.
- ALARA, O. R. et al. *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. **Industrial Crops and Products**, 122:533–544, 2018.
- ARSAD, A. B. et al. comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, 30(6):605–626, 2014.
- ASSUNÇÃO, M. et al. Gallic acid, sinapic acid and catechin as potential chemical markers of *Vitis* graft success. **Scientia Horticulturae**, 246:129–135, 2019.
- AZHAR, N. A. B. et al. Suppressing growth, migration, and invasion of human hepatocellular HepG2 cells by *Catharanthus roseus*-silver nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, 67:104910–101016, 2020.
- BELWAL, T. et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 100:82–102,

2018.

- BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Editora Appris, 2015. 141p.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science Technology**, 28(1): 25–30, 1995.
- CASTRO-PUYANA, M. et al. Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405:4607–16, 2013.
- CHAVOUSHI, M., et al. Effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on growth parameters, photosynthetic pigments and secondary metabolites of safflower under drought stress. **Scientia Horticulturae**, 259:108823, 2020.
- CHEN, Q. et al. Relationship between maceration and extraction yield in the production of Chinese herbal medicine. **Food Bioproducts Processing**, 98:236–243, 2016.
- CHONG, Y. T. et al. A green solvent holder in electro-mediated microextraction for the extraction of phenols in water. **Talanta**, 176:558–564, 2018.
- CHUNG, I. M. et al. Effect of the engineered indole pathway on accumulation of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Biotechnology Progress**, 23(2):327–332, 2007.
- ĆUJIĆ, N. et al. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, 194:135–142, 2016.
- DAI, J.; MUPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, 15:7313–7352, 2010.
- DA SILVA, R. P. et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 76:40–51, 2016.
- FALCÃO, M. A. et al. 2017. Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. **Journal Supercritical Fluids**, 129:9–15, 2017.
- FELTON, G. W. et al. Herbivore oral secretions are the first line of protection against plant-induced defences. **Annual Plant Reviews-online**, 47:37–76, 2018.
- FREITAS, P. C. D. et al. Extração assistida por ultrassom para determinação colorimétrica de ferro em solo: uma comparação com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. **Química Nova**, 38:570–574, 2015.
- GHOMARI, O. et al. Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. **Biotechnology Reports**, 23:e00347, 2019.
- GUODONG, R. et al. Identification of putative genes for polyphenol biosynthesis in olive fruits and leaves using full-length transcriptome sequencing. **Food Chemistry**, 300:17–18, 2019.
- JALEEL, C. A. et al. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. **Turkish Journal of Biology**, 32(2):79–83, 2008.
- KAUSHIK, S. et al. An overview of *Catharanthus roseus* and medicinal properties of their metabolites against important diseases. **European Academic Research**, 5(2):1237–1247, 2017.
- KEHILI, M., et al. Optimization of lycopene extraction from tomato peels industrial by-product using maceration in refined olive oil. **Food Bioproducts Processing**, 117:321–328, 2019.
- KIM, D. O. et al. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. **Journal**

- of **Agricultural Food Chemistry**, 51(22):6509–6515, 2003.
- KUMAR, M.; PRUTHI, V. Potential application of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, 4:86–93, 2014.
- LEONTI, M. et al. Reverse ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, 198:417–431, 2017.
- LUTHRIA, D. L. Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetablewaste product using a pressurized liquid extractor. **Journal of Functional Foods**, 4:845–850, 2012.
- MA, X. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, 129(1):102–107, 2011.
- MOJZER, E. B. et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules**, 21(7):1–38, 2016.
- MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic peach. **Separation Purification Technology**, 162:68–76, 2016.
- MOON, S. H. et al. A rich source of potential bioactive compounds with anticancer activities by *Catharanthus roseus* cambium meristematic stem cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, 217:107–117, 2018.
- OSIBE, D. A.; AOYAGI, H. A novel strategy for the synthesis of gold nanoparticles with *Catharanthus roseus* cell suspension culture. **Materials Letters**, 238:317–320, 2019.
- PHAM, H. N. T. et al. Ultrasound-assisted extraction of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Patricia White cultivar) stem for maximizing saponin yield and antioxidant capacity. **Journal Food Processing and Preservation**, 42(5):1–12, 2018.
- PHAM, H. N. T. et al. Effect of extraction solvents and thermal drying methods on bioactive compounds and antioxidant properties of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Patricia White cultivar). **Journal Food Processing Preservation**, 41(5):1–8, 2017.
- PHARM, S. C. M. M.; PHARM, V. M. M.; PHARM, A. K. D. M. Essentials of Botanical Methods: Principles and Applications. In: Mandal, S.; MANDAL, V.; DAS, A. **Essentials of Botanical Methods: Principles and Applications**. Salt Lake City: Academic Press, 2015. v. 1, p. 83–136.
- PIANA, F. et al. Simple and rapid procedures for the extraction of bioactive compounds from Guayule leaves. **Industrial Crops and Products**, 116:162–169, 2018.
- PRIOR, R. L. et al. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53:4290–4302, 2005.
- PROESTOS, C. et al. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(4):1190–1195, 2005.
- SIDDIQ, M.; SOGI, D. S.; DOLAN, K. D. Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut “Tommy Atkins” mangoes as affected by different pre-treatments. **LWT - Food Science and Technology** 53(1), 156–162, 2013.
- SPEED, M. P. et al. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. **New Phytologist**, 208(4):1251–1263, 2015.
- SURIANO, S. et al. Phenolic acids profile, nutritional and phytochemical compounds, antioxidant properties in colored barley grown in southern Italy. **Food Research International**, 113:221–223, 2018.

- VAJIĆ, U.-J. et al. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, 74:912–917, 2015.
- VINATORU, M. et al. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 97:159–178, 2017.
- WIANOWSKA, D.; GIL, M. Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants. **Trends in Analytical Chemistry** 114: 314–325, 2019.
- XIANG, J. et al. Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. **Food Chemistry**, 295:214–223, 2019.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, conseguiu-se miniaturizar as metodologias convencionais de determinação de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP. Uma comparação ampla e detalhada entre as metodologias convencional e miniaturizada não revelou diferença expressiva. Por isso, além do impacto econômico gerado, este estudo conseguiu estender o impacto científico da pesquisa, pois essas metodologias miniaturizadas poderão ser aplicadas, com segurança, em vários tipos de matrizes.

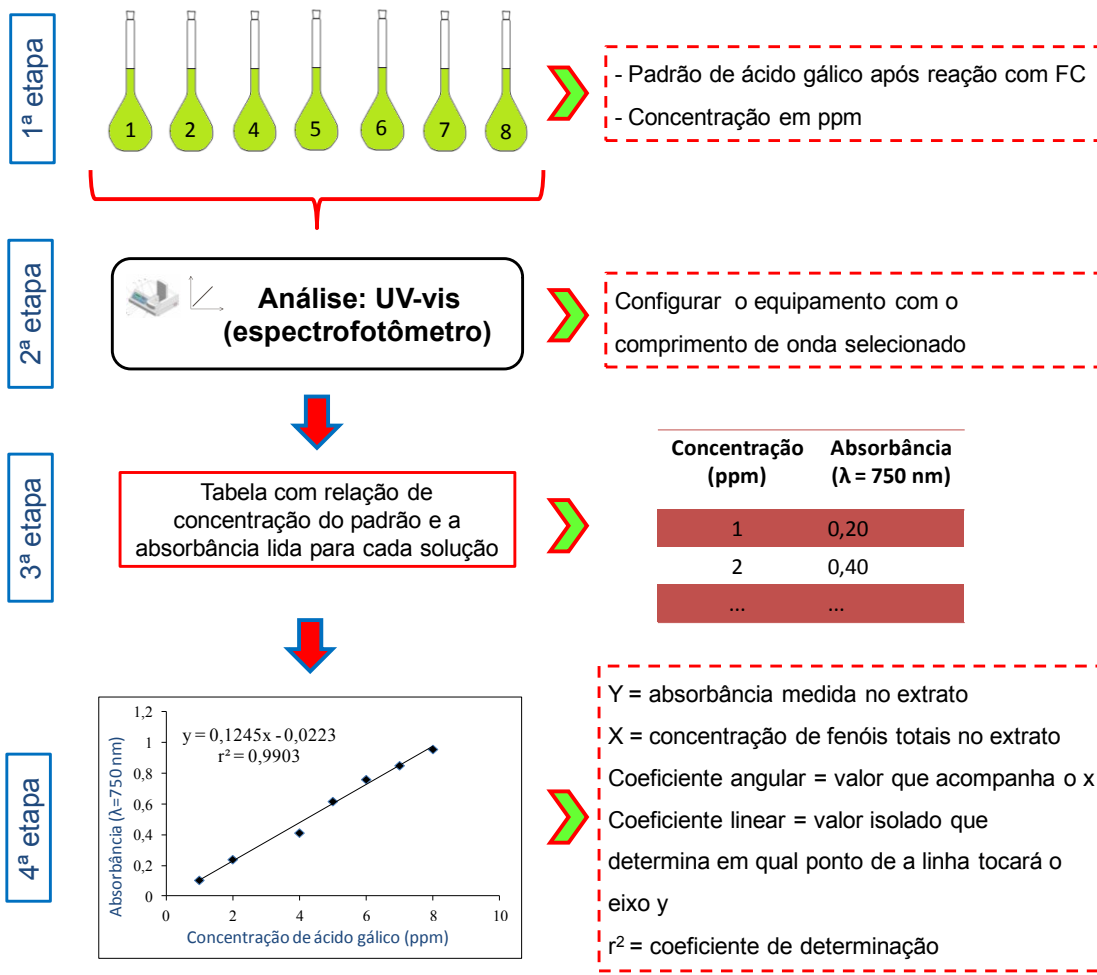
De forma similar, a otimização da maceração como método de extração dos compostos fenólicos representou um impacto científico significativo, pois apesar de termos realizado apenas para um tipo de planta, o estudo representa uma alternativa eficiente e segura, para outras amostras vegetais com massa reduzida.

Outro aspecto importante desta pesquisa foi que, apesar do volume de extrato obtido ser relativamente inferior aos dos métodos tradicionais de extração, o volume obtido de extrato foi suficiente para fazer a determinação da concentração de fenóis totais, de flavonoides, da atividade antioxidante, a derivatização e as análises cromatográficas, com suas respectivas repetições. E todos esses dados obtidos permitiram, ainda, a realização de análises multivariadas que têm estado presente, com frequência, em muitos trabalhos científicos.

Além de todos esses impactos econômicos e científicos, as metodologias adaptadas nesta pesquisa também apresentam um importante impacto social, pois o preparo de extratos vegetais e as metodologias de determinação da atividade antioxidante tornaram-se menos onerosos. Dessa forma, acreditamos que essas metodologias possam ser realizadas como atividades práticas em aulas de química, física e biologia em escolas públicas.

## APÊNDICE A – Esquema representativo para análise quantitativa de fenóis totais por espectrofotometria

### Etapas para quantificação de fenóis totais por espectrofotometria



Fonte: Da autora, 2020.

**APÊNDICE B – Esquema representativo para cálculo da concentração de fenóis totais em amostra líquida e sólida. Continuação apêndice A**

$$Y = 0,1245x - 0,0223$$

$$0,6 = 0,1245x - 0,0223$$

$$0,6 + 0,0223 = 0,1245x$$

$$X = \frac{0,6 + 0,0223}{0,1245}$$

$$X = 5 \text{ ppm EAG L}^{-1}$$

Se a amostra original fosse líquida como suco, cerveja e outros, essa seria primeira parte do cálculo.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$C1 \times 0,04 \text{ mL} = 5 \text{ ppm EAG} \times 1 \text{ mL}$$

$$C1 = 125 \text{ ppm EAG L}^{-1}$$

Cálculo considerando os valores da equação. Se fosse uma amostra originalmente líquida, o cálculo terminaria aqui.

$$125 \text{ ppm EAG} \text{ ----- } 1000 \text{ mL de extrato}$$

$$x \text{ ppm EAG} \text{ ----- } 200 \text{ mL de extrato}$$

$$x = 25 \text{ ppm EAG } 200 \text{ mL}^{-1} \text{ extrato}$$

Concentração de fenóis totais em 200 mL de extrato

$$25 \text{ ppm EAG} \text{ ----- } 2,0 \text{ g folhas de hortelã}$$

$$X \text{ ppm EAG} \text{ ----- } 1,0 \text{ g folha de hortelã}$$

$$x = 12,5 \text{ mg EAG g}^{-1} \text{ de folha de hortelã}$$

Concentração de fenóis totais nas folhas de hortelã