



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA**

BERNARDO DA SILVA PITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E DETERMINAÇÃO DO
PERFIL FENÓLICO EM AMOSTRAS DE MANJERICÃO (*OCIMUM BASILICUM*. L)**

SALVADOR

2022

BERNARDO DA SILVA PITA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E DETERMINAÇÃO DO
PERFIL FENÓLICO POR HPLC-DAD DE MANJERICÃO (*OCIMUM BASILICUM*.L)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Coorientadora: Prof.^a Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier

SALVADOR

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

P681a

Pita, Bernardo da Silva

Avaliação da atividade antioxidante in vitro e determinação do perfil fenólico em amostras de manjerição (*Ocimum Basilicum*. L.) / Bernardo da Silva Pita. - Salvador, 2022.

67 fs : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos.

Coorientador(a): Prof^o. Dr^a. Maria Celeste da Silva Sauthier.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada - PGQA, Campus I. 2022.

1.Fenóis. 2.Antioxidantes. 3.Manjerição - Brasil.
4.Espectrofotometria - Brasil. 5.Cromatografia a líquido de alta eficiência -Brasil.

CDD: 543



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E DETERMINAÇÃO DO
PERFIL FENÓLICO POR HPLC-DAD DE MANJERICÃO (*OCIMUM BASILICUM*)**

Bernardo da Silva Pita

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos (Orientador)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Prof.^a. Dra. Maria Celeste da Silva Sauthier (Coorientadora)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Prof.^a. Dra. Débora de Andrade Santana
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Prof. Dr. Jucelino Balbino da Silva Júnior
Universidade Federal da Bahia – UFBA

AGRADECIMENTOS

- Ao GPDQA (grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Química Analítica), em especial ao professor Walter, meu orientador, Celeste, minha coorientadora, Bárbara Magalhães e Geovani Brandão, amigos e parceiros de laboratório.
- A todos os professores, funcionários e alunos do PGQA (Programa de Pós-graduação em Química Aplicada) da UNEB (Universidade do Estado da Bahia).
- Ao Grupo de Pesquisa em Química Orgânica (GPQO) da UNEB pelo apoio sempre que necessário.
- Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPESB e ao projeto PRONEX pelo apoio financeiro recebido.
- A família e amigos, por seu incentivo e compreensão, em especial, Bárbara Ane Sousa que foi a minha maior parceira de estudo desde a seleção e em todas as disciplinas e minha irmã, Giulia, pelo apoio incondicional.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de métodos convencionais, não convencionais e combinadas para extração de compostos bioativos vegetais.	23
Tabela 2. Amostras de manjeriço coletadas na cidade de Salvador-Bahia	30
Tabela 3. Comparação entre duas metodologias para extração avaliada através do teor de compostos fenólicos totais	33
Tabela 4. Comparação entre dois processos de extração avaliada através do teor de compostos fenólicos totais	33
Tabela 5. Gradiente de vazão do método de análise no HPLC-DAD	42
Tabela 6. Gradiente de eluição método de análise no HPLC-DAD	42
Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas do método de análise no HPLC-DAD	43
Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial completa de dois níveis com valores codificados e reais para análise da robustez do método de extração.	45
Tabela 9. Resultados para Teor de Compostos Fenólicos Totais (TCFT), Teor de Flavonoides Totais (TFT), e Atividade Antioxidante (DPPH) em manjeriço de cultivo hidropônico e tradicional	48
Tabela 10. Resultados sobre a concentração de TCFT e TFT e a atividade antioxidante (DPPH) em diferentes tipos de plantas em vários artigos recentes	49
Tabela 11. Dados das Concentração (mg L^{-1}) de ácidos fenólicos e flavonoides dos extratos de manjeriço hidropônico e tradicional	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Ocimum basilicum</i> , L. (cultivar basilicão)	16
Figura 2	<i>Ocimum basilicum</i> , L.	16
Figura 3	<i>Ocimum basilicum</i> , L. (cultivar Maria Bonita)	17
Figura 4	Estrutura química básica dos flavonoides	19
Figura 5	Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzóico	20
Figura 6	Estrutura química básica dos ácidos hidroxicinâmico	21
Figura 7	Fluxograma da extração da amostra	35
Figura 8	Curva de calibração do Ácido Gálico para determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TCFT).	37
Figura 9	Curva de calibração da quercetina para determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT)	39
Figura 10	Curva de calibração do ácido gálico para determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais para validação (TCFT)	44
Figura 11	Gráfico de Pareto para avaliação da robustez do método de extração	45
Figura 12	Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjeriço fortificada (rosa) e não fortificada (preto)	50
Figura 13	Comparação dos cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda (260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjeriço hidropônico coletado na Feira de São Joaquim	51
Figura 14	Comparação dos cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda (260-360 nm) do extrato de uma	52

amostra de manjerição tradicional coletado no supermercado Bompreço

- Figura 15 Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) 53
do extrato de uma amostra de manjerição hidropônico coletada na feira de São Joaquim (em azul) e tradicional coletada no supermercado Bompreço (em preto)
- Figura 16 Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) 54
do extrato de uma amostra de manjerição hidropônico coletada no supermercado Bompreço (em preto), no supermercado Perini (em rosa) e na feira de São Joaquim (em azul)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS - (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazilone-6- sulfonate),

ANVISA - Associação Nacional de Vigilância Sanitária

CUPRAC - Capacidade antioxidante de redução do cobre

DAD - Detector com arranjo de diodos

DCNT- Doenças crônicas não transmissíveis

DNT - Doenças não transmissíveis

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG - Equivalente em ácido gálico

EQE - Equivalente quercetina

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação do inglês:

Food and Agriculture Organization of the United Nations

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do inglês: *High Performance Liquid*

Chromatography

IC₅₀ – Concentração inibitória média do inglês: *Median Inhibition Concentration*

OMS - Organização Mundial de Saúde

TCFT – Teor de Compostos Fenólicos Totais

TEAC - Capacidade antioxidante equivalente Trolox

TFT – Teor de Flavonoides Totais

Trolox - Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Referencial teórico	14
3.1. Caracterização do manjericão	14
3.2. Compostos bioativos.....	18
3.2.1. Classificação das substâncias fenólicas	18
3.2.1.1 Flavonoides	18
3.2.1.2. Ácidos fenólicos	20
3.3. Coleta e tratamentos preliminares das amostras.....	21
3.4. Preparo da amostra	22
3.5. Técnicas Analíticas	27
3.5.1. Técnicas Espectrofotométricas	27
3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	28
4. Parte experimental	29
4.1. Coleta das amostras	29
4.2. Pré-tratamento	31
4.3. Extração de compostos fenólicos	31
4.3.1. Estratégia para otimização do procedimento de extração	31
4.3.1.1. Reagentes	32
4.3.1.2. Instrumentos	32
4.4. Determinação de fenólicos totais por espectrofotometria	35
4.4.1. Reagentes	35
4.4.2. Instrumentos	36
4.5. Determinação de flavonoides totais	37
4.5.1. Reagentes	37
4.5.2. Instrumentos	38
4.6. Determinação da atividade antioxidante por DPPH.....	39
4.6.1. Reagentes	39
4.6.2. Instrumentos	39
4.7. Análises do perfil fenólico por HPLC-DAD	40
4.7.1. Reagentes	40

4.7.2. Instrumentos	41
5. Resultados e discussão	44
5.1. Validação da otimização do procedimento de extração	44
5.2. Determinações espectrofotométricas: teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante	46
5.3 HPLC-DAD	50
6. Considerações Finais.....	58
Referências.....	60

RESUMO

Este trabalho descreve a determinação de substâncias fenólicas e atividade antioxidante, em folhas de manjeriço verde (*Ocimum basilicum* L.), comercializadas na cidade de Salvador-Bahia, empregando a cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e espectrofotometria. Foram utilizadas amostras de manjeriços de diferentes formas de cultivo (tradicional e hidropônico) e locais de comercialização. A metodologia desenvolvida baseou-se em métodos já descritos, validados e amplamente difundidos nesses tipos de análises, que foram adaptados. A extração foi ajustada a fim de corroborar com os princípios da Química Verde e validada através de figuras de mérito. O perfil fenólico das amostras foi avaliado por um método que permitiu a separação e identificação de 17 polifenóis por HPLC-DAD. As maiores concentrações dentre os flavonoides, foram para a rutina e a crisina, enquanto nos ácidos fenólicos destacaram-se o ácido siríngico e o ácido cafeico. O teor dessas substâncias foi maior no manjeriço convencional. Também foram avaliados o Teor de Compostos Fenólicos Totais (TCFT); Teor de Flavonoides Totais (TFT); e capacidade antioxidante por DPPH (2,2 - difenil-1-picril-hidrazil). Um considerável teor de bioativos foi determinado nas amostras de manjeriço com cultivo convencional e hidropônico. Considerando-se que muitos estudos do manjeriço são realizados sob condições controladas, é importante a pesquisa que se desenvolve sobre uma perspectiva de análises do que é ofertado para a população diretamente e amplamente consumido *in natura*, incentivando o consumo saudável e o comércio sustentável. Ressalta-se também que esta é uma planta comum no Nordeste, que pode ser cultivada em jardins e quintais, sem grandes custos, o que favorece a agricultura familiar e a economia solidária.

Palavras-chave: fenólicos; antioxidantes; manjeriço; HPLC-DAD; espectrofotometria.

1. Introdução

Alimentação tem sido uma questão amplamente discutida pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os órgãos, desde 2016, propuseram a “Década de Ação pela Nutrição”, durante Assembleia-Geral da Organização das Nações Unidas visando concretizar programas que tenham como resultado uma melhoria na nutrição das pessoas. [1]

A manutenção de uma alimentação saudável ao longo da vida impede não só uma má nutrição como também DCNT e outras condições de saúde. Uma dieta que fornece todos os nutrientes para um indivíduo é composta por alimentos que se caracterizam como saudáveis e contribuem tanto para uma melhor nutrição quanto para prevenção de doenças. [2,3] Dessa forma, pesquisas têm dado ênfase a alimentos devido à grande importância na contribuição para uma vida mais saudável e longa. [4,5,6]

A busca por uma alimentação saudável perpassa pela inserção de alimentos como frutas, verduras, cereais e vegetais, os quais apresentam características benéficas para a saúde. [2] Esses alimentos possuem compostos bioativos em sua composição, os quais desempenham atividades biológicas como: anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, entre outras. Sendo assim, tem despertado o interesse de pesquisadores sobre quantificação, ação e benefícios destes bioativos, e de alimentos que possam ser fontes dessas substâncias ao serem inseridos na dieta. [7]

Os vegetais são fontes naturais desses compostos antioxidantes, substâncias que protegem o corpo do ser humano dos altos níveis de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que podem reagir facilmente com outras moléculas, causando danos ao organismo. Assim, podem eliminar esses radicais livres, sendo capazes de reduzir agentes doadores de hidrogênio e prevenir distúrbios que levam a doenças crônicas, como o câncer. [7,8]

O *Ocimum basilicum* L., conhecido como manjeriço, é uma planta ornamental, medicinal e aromática nativa da Ásia, África e Índia, mas, amplamente cultivada em diversos países sobre diferentes condições, sendo uma das principais culturas cultivadas em muitos países. [9,10, 11] Tem sido uma espécie vegetal de interesse para indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos devido ao fato de, na sua composição, apresentar substâncias antioxidantes, as quais colaboram para a sua

intensa atividade antirradicalar, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares, e redução de inflamações, incidência de câncer e diabetes. [10,12]

Os compostos fenólicos podem ser determinados por diversas técnicas analíticas.[4] Métodos baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou como é mais conhecida pela sua sigla em inglês HPLC *high performance liquid chromatography* fornecem o perfil fenólico das amostras e são amplamente utilizados nesses estudos. [4,13] Além disso, os métodos espectrofotométricos são empregados para determinação desses compostos, principalmente, por serem técnicas mais simples e de menor custo. [14,15] A associação desses métodos tem sido algo relevante para a avaliação do conteúdo fenólico e capacidade antioxidante das amostras de vegetais e alimentos. [15]

O manjeriço é uma planta que tem despertado interesse dos pesquisadores há algum tempo devido às propriedades encontradas em seus extratos. A presença de substâncias antioxidantes como compostos fenólicos no manjeriço é o que o torna alvo de pesquisas uma vez que os mesmos trazem benefícios para o organismo do ser humano. A sua utilização é muito comum na alimentação, na indústria farmacêutica e de cosméticos. [11, 16]

Na literatura encontram-se muitos estudos sobre a composição química dos óleos essenciais, existindo poucos estudos sobre seus extratos. Além disso, as pesquisas desenvolvidas fazem comparativo do perfil fenólico entre espécies do gênero *Ocimum*, ou do tipo de cultivo dentro das condições do plantio conhecidas e sobre a influência de agentes estressores. [10,12] Neste estudo, pretende-se avaliar o perfil fenólico e a capacidade antioxidante do extrato de manjeriço, de cultivo tradicional e hidropônico, desconhecidas as condições do plantio, comercializado na cidade de Salvador-BA, o qual é consumido pela população *in natura*. A partir de métodos oficiais adaptados e outros já propostos na literatura, baseados em HPLC e espectrofotometria, pode-se comparar qualitativamente esses dois tipos de manjeriço. A divulgação do perfil fenólico e os benefícios desta planta tão comum em quintais, particularmente no Nordeste, contribui para valorização do saber tradicional, que a utiliza inclusive para fins medicinais, e também estimula o consumo saudável de alimentos de origem vegetal de forma consciente, principalmente aqueles que são cultivados sem agrotóxicos, pela agricultura familiar. [3, 9, 10]

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar o perfil fenólico de amostras de manjeriço, *Ocimum basilicum* L., de cultivo normal e hidropônico, comercializadas em Salvador, Bahia, empregando diversos métodos analíticos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar métodos para extração de compostos bioativos das amostras de manjeriço;
- Validar possíveis ajustes no método de extração escolhido baseado nos princípios da Química Verde;
- Determinar o teor dos compostos fenólicos e flavonoides das amostras de manjeriço de cultivo tradicional e hidropônico empregando espectrofotometria;
- Identificar o perfil fenólico das amostras empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC);
- Comparar os resultados obtidos entre os dois tipos de cultivos das amostras de manjeriço discutindo a concentração de substâncias antioxidantes na planta;
- Contribuir com dados sobre dois tipos de manjeriço comercializados na cidade de Salvador.

3. Referencial teórico

3.1. Caracterização do manjeriço

A família *Lamiaceae* abrange cerca de 240 gêneros e 7200 espécies, sendo a 7ª maior família de plantas com flores. [17] Dentre as características apresentadas por esta família estão: serem arbustos e ervas, dificilmente como árvores, originárias do mediterrâneo, tem distribuição cosmopolita e ocorre principalmente em regiões tropicais. Destacam-se pelo seu uso medicinal, cosmético e alimentício. [3,18,19]

As espécies dessa família ganham notoriedade pela sua utilização condimentar e atividade biológica retratada na literatura. No Brasil, algumas das que mais se destacam são: *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *H. mutabilis* e *H. atrorubens*; *Lavandula angustifolia* Mill (alfazema); *Leonotis nepetaefolia* L. (cordão-do-frade); *Leonurus sibiricus* L. (macaé) *L. cardiaca* e *L. sibiricus*, *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Mentha avensis* (hortelã-do-Brasil), *M. piperita* L. (hortelã), *M. pulegium* L. (poejo), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia); *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Ocimum basilicum* L. (manjeriço). Dentre essas espécies, uma das mais cultivadas no Brasil é a *Ocimum basilicum*, conhecida popularmente como manjeriço, basilicão ou alfavaca. [9]

O gênero *Ocimum* caracteriza-se pela sua diversidade. Avalia-se a possibilidade da existência de até 160 espécies do gênero. [19] Entretanto, as comercializadas são, principalmente, da espécie *Ocimum basilicum*. Essa erva ou subarbusto é nativa da Ásia tropical, anual, cultivada em quase todo o mundo, pode atingir até 1,5 m de altura, folhas pequenas e formas diversas como difusas, lanceoladas ou ovaladas, além de serem extremamente perfumadas. [20]

A dificuldade da classificação das variedades de *Ocimum basilicum* L., possivelmente, relaciona-se com a ocorrência da polinização cruzada o que facilita hibridações e, conseqüentemente, o surgimento de várias subespécies, assim, as cultivares de manjeriço podem se diferenciar pela morfologia e quimiotipo. [19,21] A cor da folha e da flor, formato da folha, aroma e hábito de crescimento são características que as distinguem morfologicamente. Além disso, podem ser diferenciadas pela composição química, concentração de substâncias que compõem essas ervas. [22]

As folhas possuem coloração variada, a partir de tons de verde ou roxo, podendo ser lisas ou onduladas. Apresentam as flores pequenas e dispostas em racemos eretos, geralmente em grupos de três, podendo assumir coloração branca, lilás ou vermelha. O mais conhecido e cultivado é o manjeriço de folhas verdes, já as de folhas avermelhadas são espécies mais raras e mais aromáticas. [20]

A extensão territorial do Brasil apresenta características de solo e climáticas muito peculiares, o que pode influenciar positiva ou negativamente no cultivo de espécies, mesmo que apresente condições semelhantes às do seu local de origem. Sendo assim, é necessário que se tenha o conhecimento sobre seus efeitos, os tratamentos culturais e os fatores bióticos que são responsáveis pelo desenvolvimento da planta. A falta de domínio de tecnologias para o plantio poderá influenciar diretamente em uma baixa qualidade de biomassa e dos principais constituintes químicos do manjeriço que são responsáveis pelos efeitos benéficos apresentados na sua ingestão in natura, chás e óleo essencial. [23,24]

O manjeriço se desenvolve em climas quentes e amenos, características que favorecem a produção na região Nordeste do Brasil, sendo produzido principalmente por pequenos agricultores, destinados à comercialização de folhas verdes aromáticas. Entretanto, existem alguns locais da região que os cultivos em maior escala são destinados para produção de óleo essencial. [9,24] Dentre as espécies cultivadas no Nordeste, as principais são *Ocimum basilicum* L. (cultivar basilicão) (figura 1) *Ocimum basilicum* L. (figura 2) *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita). (figura 3)

Figura 1. *Ocimum basilicum* (Cultivar basilicão)



Fonte: [9]

Figura 2. *Ocimum basilicum* L. [9]



Fonte: [9]

Figura 3. *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita)



Fonte: [9]

A produção de manjeriço é desenvolvida majoritariamente através do cultivo tradicional. Entretanto, o sistema protegido, como a hidroponia, surge como uma alternativa para as limitações que os fatores ambientais impõem a fim de ajustar o plantio ao ambiente. Nesse sistema, o crescimento das plantas acontece sem solo, utiliza-se soluções ricas em minerais para nutri-las, diferentemente do cultivo tradicional que os nutrientes vêm do solo. Essa forma de cultivo permite que a absorção de nutrientes seja feita com menor esforço e ocorra uma maximização da energia para desenvolvimento dos tecidos. As plantas que são cultivadas no sistema hidropônico sofrem menos estresses ambientais como ventos, chuvas, insolação e organismos indesejados. [25,26,27]

Além de possibilitar uma menor utilização de agrotóxicos em relação ao tradicional quando o cultivo hidropônico é feito corretamente. Dessa forma, quando a nutrição e irrigação são comedidas, o controle de temperatura e a umidade são bem-feitos no ambiente em que as plantas estão, elas se desenvolvem forte e menos suscetíveis a doenças e pragas. Logo, contribui para plantas com menos danos e um aspecto mais bonito. [27]

3.2. Compostos bioativos

Os compostos fenólicos (CF) são metabólitos antioxidantes naturais encontrados em alimentos vegetais, conhecidos por sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio e, assim, proteger as células contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo [28], os quais têm na sua estrutura básica um anel aromático com uma ou mais hidroxilas como substituintes, incluindo seus grupos funcionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. [29]

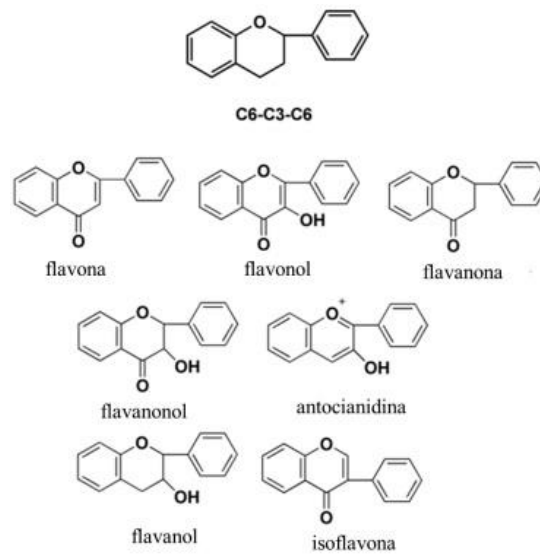
Os bioativos fenólicos agem para prevenir danos oxidativos a nutrientes e outros compostos no corpo inibindo a formação de radicais livres que são produzidos como resultado do metabolismo normal, mas também podem ser resultantes da exposição a agentes estressores ambientais, como radiação UV, poluição e outros agentes, como produtos químicos. Os radicais livres são altamente reativos e, posteriormente, destroem outras moléculas para formar ainda mais radicais livres. [29] A consequência desse processo contínuo, possivelmente, é parte integrante de várias condições patogênicas, incluindo câncer, artrite, doença cardiovascular e até mesmo o processo de envelhecimento. [28,29]

3.2.1. Classificação das substâncias fenólicas

3.2.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo dos compostos fenólicos amplamente identificados, muitos desses, responsáveis por fornecer cor de flores, frutos e folhas, além de serem importantes para o desenvolvimento do crescimento normal e defesa contra lesões e infecções. [30] Apresentam suas moléculas com estrutura benzopirona (Figura 4) e estão presentes, principalmente, como glicosídeos. Essas substâncias podem ser classificadas de acordo com o heterociclo envolvido (Figura 5) em: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas e flavonóis. [29,31]

Figura 4: Estrutura química de flavonoides



Fonte: [58]

Esse grupo destaca-se por demonstrar benefícios para a saúde, dentre eles, atividades antioxidantes, prevenção de doenças cardiovasculares, ação anti-inflamatória, hepatoprotetora, anticancerígenas e antivirais. Dessa forma, são usados com frequência para melhorar os alimentos no aspecto nutricional. Portanto, são foco de interesse para estudos nutricionais e terapêuticos. [31,33]

Os flavonoides mostram grande variação em sua estrutura. A diversidade ocorre de acordo com o grau de hidroxilação, metilação e glicosilação. As flavonas compõem-se, em boa parte, de glicosídeos da luteolina e apigenina e são encontradas em salsa e aipo, além de alguns cereais. As isoflavonas são encontradas quase com exclusividade em plantas leguminosas, em especial, nos grãos de soja, onde podem estar presentes como agliconas ou glicosídeos, dependendo da forma de preparo da soja. Flavanonas, geralmente, são glicosiladas por um dissacarídeo na posição sete, conferindo sabor amargo como a naringina ou sem sabor como a rutinose. São encontradas em plantas aromáticas como hortelã, em tomate, mas seu maior teor está apenas em frutas cítricas como laranja e limão. Isoflavonas são encontradas como agliconas ou glicosídeos, estão presentes exclusivamente em plantas leguminosas. [34,35] Os flavonóis são os flavonoides mais encontrados em alimentos. Existem em sua forma monomérica, as catequinas, presente em altas concentrações no chá verde e em chocolates. A polimérica, as protocianidinas fazem parte da constituição, principalmente, das uvas, localizadas nas cascas e sementes. Nos vegetais, os

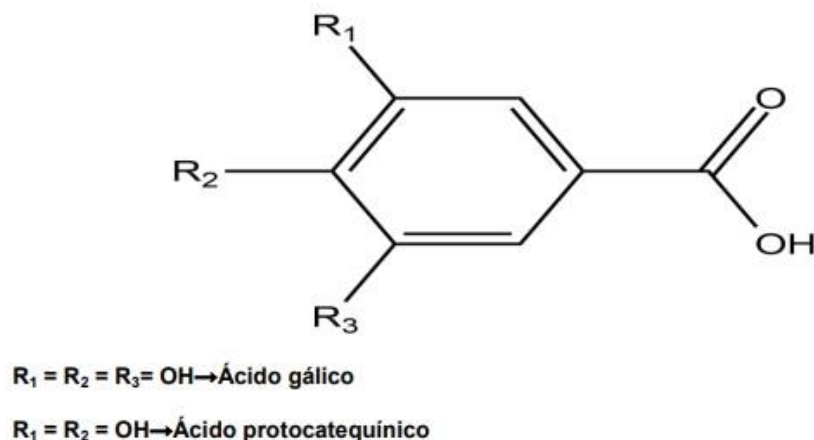
flavonóis mais frequentes são: kaempferol ou 3,5,7,4 – tetrahidroxiflavanonol, quercetina ou 3,5,7,3,4-pentahidroxiflavanonol e miricetina ou 3,5,7,3,4,5 – hexahidroxiflavanonol, destacando-se a quercetina, pela sua abundância e potencial antioxidante. [35]

3.2.1.2. Ácidos fenólicos

São encontrados em diversos alimentos, sendo abundantes em frutas, leguminosas, oleaginosas, bebidas, vegetais e ervas. Essas substâncias são benéficas à saúde pois apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, entre outras. O grande número de estudos desses compostos é consequência dos efeitos benéficos à saúde. [36,37]

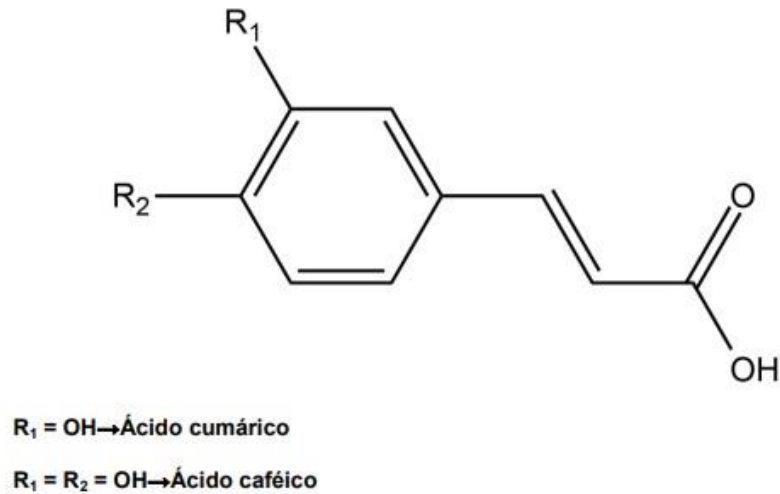
Os ácidos fenólicos derivam dos ácidos hidroxibenzoico e ácidos hidroxicinâmico. Os derivados mais comuns dos ácidos hidroxibenzoico (Figura 5) são: p-hidroxibenzoico, salicílico, elágico, gálico, vanílico, protocatecuico, siríngico, apresentam-se em baixa concentração em plantas comestíveis, entretanto, a em algumas frutas vermelhas como framboesa, cebolas e rabanetes preto estão presente em maior quantidade. Já os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 6) são mais predominantes, mais comuns são: cumárico, caféico, ferúlico, clorogênico e sinápico. [38,36] Estudos relatam a presença dessas substâncias em hortaliças como alfaces verdes e vermelho rubi, couve, mostarda, agrião, entre outras. [39,40]

Figura 5: Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzoico



Fonte: [43]

Figura 6: Estrutura química básica dos ácidos hidroxicinâmico



Fonte: [43]

3.3. Coleta e tratamentos preliminares das amostras

O processo de seleção e remoção de uma pequena parte que seja representativa e suficiente de um todo, a qual será analisada é conhecido como amostragem. A porção limitada, conhecida como amostra, deve possuir as características essenciais do conjunto. Normalmente, as amostras requisitam etapas preliminares que são importantes e indispensáveis para análise qualitativa e quantitativa, sendo feito um pré-tratamento, como: lavagem, secagem, moagem, peneiramento, refrigeração, entre outras. O processo da amostragem consiste em três etapas principais, são elas: coleta da amostra bruta, preparação da amostra laboratorial e preparo da alíquota para análise, pois, no geral, a amostra precisa ser convertida para uma forma adequada para a determinação do analito de interesse. [41,42]

Na operação de secagem, no caso de vegetais, deve-se utilizar estufas com circulação de ar e a temperatura não deve exceder 65°C para que os analitos que são voláteis não sejam perdidos. O acondicionamento da amostra deve ser feito sob vácuo, em dessecador, a fim de conservar a amostra. A moagem é feita para redução do tamanho das partículas através de liquidificadores, processadores, moinhos de facas, almofariz, entre outros equipamentos e, assim, tornar a alíquota se torne homogênea e representativa. O peneiramento das amostras é um procedimento importante e muito utilizado, feito com peneiras ou tamises de malhas ou outros

materiais, para avaliação do e classificação a distribuição do tamanho das partículas, as quais inferem sobre a homogeneidade das amostras. [43,44]

3.4. Preparo da amostra

O preparo da amostra depende da sua técnica de análise. Essa etapa pode interferir diretamente no resultado, dependendo da sua preparação correta. Dessa forma, alguns pontos devem ser considerados para análise do material: a sua homogeneidade e representatividade. [44]

Nas etapas do preparo de um material sólido, normalmente, é necessária a conversão da amostra em solução aquosa a fim de determinar os analitos de interesse. Uma das técnicas utilizadas para isso é o processo de extração que pode ser feita através da extração sólido-líquido. Dessa forma, a natureza da amostra determina a metodologia a ser usada para essa etapa de modo a garantir a sensibilidade e seletividade, por exemplo, com amostras complexas que contenham compostos como lipídios, proteínas entre outras. [43, 44]

O processo de extração de compostos bioativos de plantas pode ser influenciado por diversos fatores que afetam a eficiência dela. Dentre eles, pode-se citar a técnica de extração, propriedades da matriz de componentes da planta, solvente de extração, temperatura, pressão, tempo e tamanho das partículas. Assim, esses fatores devem ser considerados para aumentar a capacidade extrativa dos bioativos dos tecidos vegetais. [45,46]

Estudos apresentam diferentes metodologias para extração, baseadas, principalmente, em diferentes técnicas. Esses, trazem os métodos tradicionais como infusão, maceração, percolação e decocção, e métodos não tradicionais como extração de fluido supercrítico, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas com base em enzimas, extração de fluido supercrítico-extração de fluido pressurizado apontando suas vantagens e limitações. [46] O surgimento de novas técnicas e combinações apontam uma opção para uma extração rápida e eficiente. [47,48] Na Tabela 1, adaptada de uma revisão sobre as técnicas de extração, são citados métodos baseados em técnicas convencionais, não convencionais e combinações de diferentes técnicas, suas vantagens e desvantagens. [46]

Tabela 1 - Comparação de métodos convencionais, não convencionais e combinadas para extração de compostos bioativos vegetais.

(continua)

Métodos de extração		Vantagens	Limitações	Referências
Convencional	Maceração	Baixo custo de investimento, modulação da seletividade pela escolha do solvente	Destruição térmica de alguns compostos	Renard et ai. (2017) ; Soquetta et al. (2018)
	Hidrodestilação	Os compostos bioativos se separam automaticamente da água	Alguns componentes voláteis podem ser perdidos se a temperatura de extração for muito alta	Fox e outros. (2017)
	Infusão	Leva menos tempo para extração e o calor latente de vaporização é menor que o da água, então, menos calor será consumido para fazer um extrato concentrado	São necessárias grandes quantidades de solvente	Harbourne et al. (2013)
	Decocção	Os métodos de operação são simples	São necessárias grandes quantidades de solvente	Azwanida (2015)
	Percolação	Aumenta o rendimento da extração por proporcionar melhor tempo de contato entre o solvente e o material vegetal	Leva muito tempo e usa muitos solventes	Hussein (2019)

Fonte: [50] *modificada pelo autor

Tabela 1 - Comparação de métodos convencionais, não convencionais e combinadas para extração de compostos bioativos vegetais.

(continua)

Métodos de extração	Vantagens	Limitações	Referências	
Não convencional	Extração de fluido supercrítico	Baixa temperatura, altos rendimentos; principalmente para compostos de baixa polaridade, mas pode ser ajustado	Altos custos de investimento	Fox e outros. (2017)
	Extração assistida por micro-ondas	O tempo de processo e o uso de solvente são reduzidos	Altas temperaturas locais; solventes polares.	Fox e outros. (2017)
	Extração assistida por ultrassom	Redução do tempo de processamento, baixa temperatura	Inchaço do material vegetal	Fox e outros. (2017)
	Extração assistida por enzimas	Extração facilitada de um tecido vegetal	Operação longa adicional em condições úmidas	Fox e outros. (2017)

Fonte: [50] *modificada pelo autor

Tabela 1 - Comparação de métodos convencionais, não convencionais e combinadas para extração de compostos bioativos vegetais.

(continua)

Métodos de extração	Vantagens	Limitações	Referências
Técnicas combinadas	Extração baseada em enzima-ultra-som-assistida por micro-ondas (EUMAE)	Maior rendimento de extração e tempos de extração mais rápidos.	Liu et al. (2014)
	Extração de Fluido Supercrítico-Extração de Fluido Pressurizado (SFE-PLE)	As extrações podem ser concluídas de 2 a 2,5 vezes mais rápido do que as extrações típicas, resultando em rendimentos de extração mais altos.	Golmakani et al. (2014)
	Extração de fluido supercrítico assistida por ultrassom (SFE-UAE)	Maior rendimento de extração para melhor cinética	Zekovic et al. (2015)
	Extração de agitação de alta pressão hidrostática (HHPE-AE)	Distribuição uniforme em toda a amostra e tempos de extração rápidos.	Uribe et al. (2015)

Fonte: [50] *modificada pelo autor

Tabela 1 - Comparação de métodos convencionais, não convencionais e combinadas para extração de compostos bioativos vegetais.

(conclusão)

Métodos de extração	Vantagens	Limitações	Referências	
Técnicas combinadas	Extração de ultrassom de alta pressão hidrostática (HHPE-UE)	É o método de extração mais eficiente de compostos bioativos	Operação em lote ou semicontínua	Uribe et al. (2015)
	Extração de dióxido de carbono supercrítico (SCCO 2) - Extração de água subcrítica (SWE)	Nenhuma filtração é necessária, nenhum resíduo perigoso	Maior complexidade técnica	Zabot et al. (2015)
	Extração assistida por ultrassom - Extração de líquido pressurizado	Mais eficiente e melhoria na extração	Alto custo de processo	Tome et al. (2018) .
	Campo elétrico pulsado e técnicas de alta tensão	É viável extrair antioxidantes e proteínas da casca da manga	Alto custo inicial e de capital	Parniakov et al. (2016)

Fonte: [50] *modificada pelo autor

A escolha do método de extração está associada a propósitos diferentes conforme a análise. Entretanto, algumas condições nos processos de extração, como a natureza dos solventes, tem sido uma das questões relevantes, considerando-se os impactos que estes podem causar à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse sentido, nos últimos anos, as técnicas de extração mais ecológicas ou “verdes” vêm ganhando notoriedade, pois contribuem para a eliminação de solventes orgânicos, como hexano, clorofórmio, metanol, acetato de etila, entre outros. [49]

Uma alternativa é usar a água como solvente, sua alta polaridade e ponto de ebulição caracterizam-na como um solvente único, fácil manuseamento e não perigoso. Estudos já mostram que a água em temperaturas elevadas tem sido destinada para processos industriais desde a extração até a limpeza, além de ser um solvente utilizado no cozimento de alimentos. [45]

Apesar de muitos estudos já terem sido realizados no sentido de reduzir a quantidade de solventes, a química verde visa otimizar também outras etapas do processo, como evitar desperdício, síntese química menos perigosa, descarte de produtos químicos de forma responsável, além de solventes mais seguros. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de solventes alternativos, redução do consumo de energia, garantia da segurança e qualidade do extrato obtido para que a técnica de extração seja considerada “verde”. [50]

3.5. Técnicas Analíticas

3.5.1. Técnicas Espectrofotométricas

Os métodos espectroscópicos de análise baseiam-se na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse. A técnica tem como instrumentos de medida os espectrômetros, dentre estes, o espectrofotômetro é um instrumento espectroscópico que utiliza um monocromador ou policromador juntamente com um transdutor para converter as intensidades radiantes em sinais elétricos. Dessa forma, a espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis) tem ampla aplicação em laboratório, principalmente para análises quantitativas. Cada espécie molecular é capaz de absorver suas próprias frequências características de radiação eletromagnética. Esse

processo transfere energia para a molécula e resulta em um decréscimo da intensidade da radiação eletromagnética. [51]

A espectrofotometria UV-Vis baseia-se na absorção da radiação eletromagnética por uma espécie absorvente. A região do espectro a qual isso ocorre varia aproximadamente de 190-800 nm, onde ocorrem mudanças em nível eletrônico de uma molécula, denominada de cromóforo. Assim, essa técnica utiliza a atenuação da medição da radiação que está associada à reflexão, espalhamento, absorção ou interferências. [52] A medição dessa atenuação pode ser registradas através da absorbância pois, respeitando alguns limites, essa medição pode ser relacionada proporcionalmente à concentração de um determinado analito com a distância para a luz passar pela amostra durante a irradiação, sendo chamada de "Lei de Beer" e escrita a partir da equação: $A = \epsilon \times b \times c$, sendo A absorbância, ϵ é o coeficiente de absorbância molar (dependente do comprimento de onda) dado em $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, b é o comprimento do caminho em cm e c é a concentração do absorvedor em mol L^{-1} . [53, 54] Alguns fatores podem influenciar essa relação, dentre eles, destacam-se as características do espectrofotômetro, a fotodegradação das moléculas, presença de interferências de espalhamento ou absorção das amostras, interações entre o analito e o solvente e o pH. Os métodos baseados na espectrofotometria que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) são os mais difundidos nos estudos sobre alimentos e pesquisa de nutrição por serem mais simples e menos dispendioso para determinar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) com leituras em espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm. [55,56,57,58]

3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Essa técnica é utilizada para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos. O tipo de cromatografia líquida de alta eficiência é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária, os quais são: partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quiral. [51]

Uma ampla variedade de métodos analíticos pode ser usada para determinar os fenólicos bioativos; entretanto, técnicas de separação com alto poder de resolução são necessárias, devido à complexidade da matriz e à quantidade de formas que o analito pode estar presente na amostra. [42]

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido a técnica analítica mais avançada e que tem dominado a separação e caracterização de compostos fenólicos, sendo acessível e fornecendo resultados precisos. Nessa técnica, a detecção das moléculas é feita por um sistema fotomultiplicador que detecta os comprimentos de onda individuais. Sendo utilizados diferentes tipos de suporte e fases móveis para a análise desses fitoquímicos em extratos vegetais. [8,56]

Na análise por HPLC o solvente utilizado na separação dos compostos fenólicos é chamado de fase móvel, dentre os modificadores orgânicos mais utilizados os melhores são acetonitrila e metanol. A natureza dos compostos que são extraídos é fator determinante para a escolha da coluna e da fase móvel. A coluna de HPLC exerce influência na separação de composto fenólicos, normalmente, a coluna C18 é utilizada para esse tipo de separação. Os detectores mais comumente utilizados são: UV-Vis, detector de fluorescência e o detector de arranjo de diodos (DAD). [57]

4. Parte experimental

4.1. Coleta das amostras

As amostras de manjeriço foram compradas em alguns pontos comerciais de Salvador, Bahia, como mostra a Tabela 2, entre junho de 2021 a janeiro de 2022. Tendo como critérios para selecioná-las o tipo de cultivo ser normal ou hidropônico e de coloração verde. Os manjeriços escolhidos para serem analisados apresentavam-se “frescos” e próprios para consumo.

Tabela 2 - Amostras de manjeriço coletadas na cidade de Salvador-Bahia

Variedade	Cultivo	Local de coleta	Legenda das amostras
Manjeriço comum verde	Hidropônico	Supermercado Bompreço	HB
	Tradicional		TB
Manjeriço comum verde	Hidropônico	Supermercado Perini	HP
	Tradicional		TP
Manjeriço comum verde	Hidropônico	Feira de São Joaquim	HS
	Tradicional		TS
Manjeriço comum verde	Tradicional	Mercado do Rio Vermelho	TR
Manjeriço comum verde	Tradicional	Ambulante Cabula	TC

Fonte: Autor

4.2. Pré-tratamento

As amostras foram lavadas com água corrente e água ultrapura. Foram secas à temperatura ambiente, e, em seguida, foram selecionadas as folhas de manjeriço mais conservadas e, posteriormente, colocadas na estufa até sua completa secagem com circulação de ar (TECNAL, TE-394), a 60°C.[52]

O material seco foi triturado no liquidificador (ARNO, Optimix plus 550W) até que toda a amostra se tornasse um pó. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com um auxílio de um pincel em peneira (granulometria 32 mesh, abertura de 0,50 mm).

4.3. Extração de compostos fenólicos

Plantas medicinais são fontes naturais de substâncias antioxidantes como os compostos fenólicos, o que desperta o interesse da utilização das mesmas no dia a dia das pessoas. Assim, dentre as formas de consumo destaca-se o chá que é obtido através do processo de extração, seja por infusão ou decocção. Através desses processos é possível ingerir a bebida com as propriedades antioxidantes preservadas. [58]

Estudos retratam muitos procedimentos de extração que são realizados com solventes inadequados para o consumo e, conseqüentemente, tornando impossível aproveitar os benefícios esperados para a saúde com a sua ingestão. [45] Nesse sentido, utilizar os métodos de preparo de chás para estudos de substâncias fenólicas permite correlacionar a capacidade antioxidante dessas bebidas com o seu perfil fenólico, contribuindo para impactos benéficos na saúde. [58]

4.3.1. Estudo sobre métodos de extração

A extração é uma etapa essencial para fornecer um produto que apresente os compostos fenólicos, qualitativamente e quantitativamente. O teor dessas substâncias é influenciado por alguns fatores, como: a relação entre quantidade de amostra e solvente, tempo de extração, o tipo do solvente, temperatura de extração, entre outros. Assim, utiliza-se ferramentas quimiométricas, as quais contribuem para mitigar o gasto de tempo e reagentes quando se faz uma otimização tradicional. [58]

Na otimização tradicional, ou univariada, além de ser um método trabalhoso e demorado, pode não levar a resultados confiáveis, já que um fator de cada vez é considerado, sem levar em conta as interações que existem entre os fatores, concomitantemente. [59] A utilização de planejamentos experimentais que se baseiam em princípios estatísticos, possibilita aos pesquisadores a obtenção do máximo de informações úteis com o mínimo de experimentos. Nos planejamentos fatoriais completos são realizados experimentos das possíveis combinações das variáveis em todos os níveis, os quais são valores que as variáveis podem assumir em um domínio experimental delineado previamente. A quantidade de experimentos realizados é definida por $n=2^k$ onde n é o número de experimentos e k o número de variáveis. Os níveis são codificados em dois valores: -1 (nível inferior) e +1 (nível superior). Para a determinação do erro experimental geralmente são acrescentados os chamados pontos centrais (valor codificado 0), que devem corresponder a cerca de 30% do número total de experimentos (n). [60,61]

4.3.1.1. Reagente

- Água ultrapura.

4.3.1.2. Instrumentos

- Balança analítica (SHIMADZU, AUX 220);
- Placa aquecedora (QUIMIS);
- Funil;
- Tubo Falcon;
- Suporte universal;
- Garra;
- Erlenmeyer;
- Papel filtro;
- Pissete;
- Tampa de balão volumétrico;
- Espátula.

Inicialmente, realizou-se algumas comparações entre metodologias de extração. A primeira, entre metodologias diferentes [62][63] e outra entre uma mesma metodologia por processos de extração distintos: infusão, o qual era proposto na metodologia e por decocção. Avaliou-se o teor de compostos fenólicos totais [64] para definir qual dos dois processos seria utilizado. Os dados obtidos das comparações estão dispostos nas tabelas 3 e 4 abaixo, respectivamente.

Tabela 3 - Comparação entre duas metodologias para extração avaliada através do teor de compostos fenólicos totais de manjeriço

Amostra de manjeriço	Tipo de solvente	Referência	Fenólicos totais mg EAG 100 g ⁻¹ DW ± DP
CC	Água	[62]	1603 ± 0,92
	Metanol	[63]	347 ± 1,10

Média da concentração ± desvio padrão; DW (massa seca); EAG: Equivalente de ácido gálico.

Tabela 4 - Comparação entre dois processos de extração avaliada através do teor de compostos fenólicos totais de manjeriço

Amostra de manjeriço	Processo de extração	Fenólicos totais mg EAG 100 g ⁻¹ DW ± DP
CC	Infusão	1489 ± 2,06
	* Infusão proporcional	1302
	Decocção	2101 ± 0,05

Média da concentração ± desvio padrão; DW (massa seca); EAG: Equivalente de ácido gálico.

A partir disso, definiu-se a metodologia a ser utilizada para a extração com adaptações. [62] A fim de melhorar as condições experimentais, fez-se um experimento proporcional para o processo de extração por infusão, o qual teve a quantidade descrita, na metodologia, da relação massa:solvente reduzida. Dessa forma, realizou-se uma validação utilizando parâmetros propostos por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais [64,65,66] como:

exatidão através de experimentos de recuperação, precisão através da repetibilidade, extração sucessiva e robustez através do delineamento de um planejamento fatorial de dois níveis para minimizar a quantidade de experimentos e, conseqüentemente, mitigar os gastos de reagente, amostra, tempo e descarte.

Após a validação da metodologia, iniciaram-se as extrações das amostras selecionadas para o desenvolvimento do trabalho.

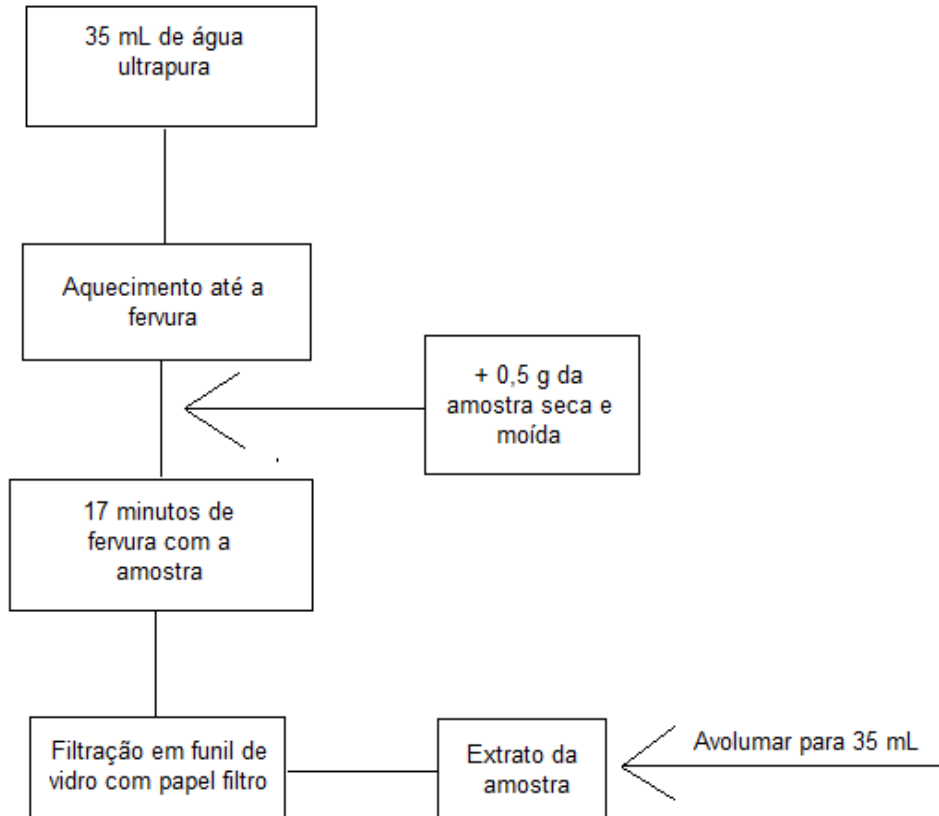
As amostras foram pesadas diretamente nos erlenmeyers identificados de acordo com o tipo de cultivo e local de coleta. Pesou-se 0,5 g de cada amostra em duplicata. Tampou-se os erlenmeyers usando tampas de balão volumétrico.

Colocou-se 35 ml de água ultrapura em erlenmeyers, em seguida, tampou-se para evitar perda do vapor e colocou-se na placa aquecedora. Quando iniciada a ebulição transferiu-se a água para o erlenmeyer com amostra, tampou-se e colocou-se novamente na placa aquecedora. Após 17 minutos em ebulição, o material foi filtrado, sem resfriamento, em funil de vidro com papel de filtro, coletando-se o extrato em tubo Falcon identificado.

Repetiu-se o mesmo procedimento para todas as amostras, sempre priorizando realizar as extrações de cada tipo de cultivo e local de coleta simultaneamente, além de colocar as mesmas quantidades de erlenmeyers na placa aquecedora para tentar garantir condições semelhantes para todos os processos de extração, considerando que muitas vezes a placa aquecedora não aquece uniformemente.

O esquema abaixo (Figura 7) demonstra o procedimento de extração:

Figura 7 - Fluxograma da extração da amostra



Fonte: Autor

4.4. Determinação de fenólicos totais por espectrofotometria

4.4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Reagente Folin-Ciocalteu (êxodo científica, Brasil);
- Carbonato de sódio (Vetec, Brasil);
- Ácido gálico anidro (êxodo científica, Brasil);
- Água ultrapura.

4.4.2. Instrumentos

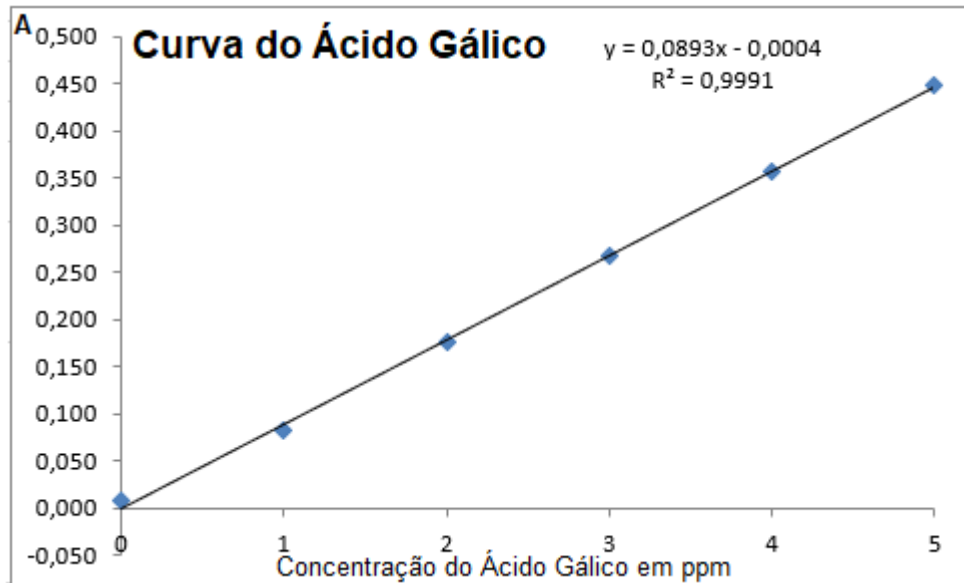
- Espectrofotômetro (BIOSPECTRO, SP-22);
- Micropipeta de 10-100 μL ;
- Micropipeta de 20-200 μL ;
- Micropipeta de 100-1000 μL ;
- Tubo Falcon;
- Suporte para tubos;
- Pissete.

A determinação dos fenólicos totais seguiu a metodologia já descrita na literatura com adaptações. [67] Do extrato aquoso de cada amostra de manjeriço, tomou-se alíquotas: 20 μL , em triplicata, que foram transferidas para tubos falcon de 15 mL. Adicionou-se 3,18 mL de água ultrapura e 200 μL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 min, adicionou-se 600 μL de solução de carbonato de sódio 20 % (m/v) nos tubos, na ordem da adição do reagente e, a solução foi homogeneizada. Após finalizar a adição do carbonato em todos os tubos, decorridas 2h de repouso no escuro, foram realizadas as leituras em triplicata das absorvâncias em espectrofotômetro (BIOSPECTRO, SP-22) a 765 nm.

Utilizou-se como padrão o ácido gálico, para a curva de calibração. Para o preparo das soluções da curva, foi realizado o mesmo procedimento descrito para as amostras, substituindo-se o extrato pelo volume necessário de ácido gálico 100 ppm para se obter as concentrações da curva (0-5 ppm). O volume de água variou de acordo com a concentração estabelecida para cada ponto da curva: de 3,2 mL a 3,00 mL.

A partir da equação da reta (Figura 8), realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais (TCFT) que foram expressos como equivalentes de ácido gálico por 100 g em massa seca ($\text{EAG}100\text{g}^{-1}$ DW).

Figura 8 - Curva de calibração do Ácido Gálico para determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TCFT).



Fonte: Autor

Após todas as leituras, os materiais foram lavados com água e sabão, passou-se água ultrapura e colocou-se no banho de HNO₃, 10 % (v/v) durante 24h para descontaminação.

4.5. Determinação de flavonoides totais

4.5.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Cloreto de alumínio AlCl₃.6H₂O (êxodo científica, Brasil);
- Álcool metílico (metanol) (Synth, Brasil);
- Água ultrapura;
- Quercetina (Sigma-Aldrich, EUA).

4.5.2. Instrumentos

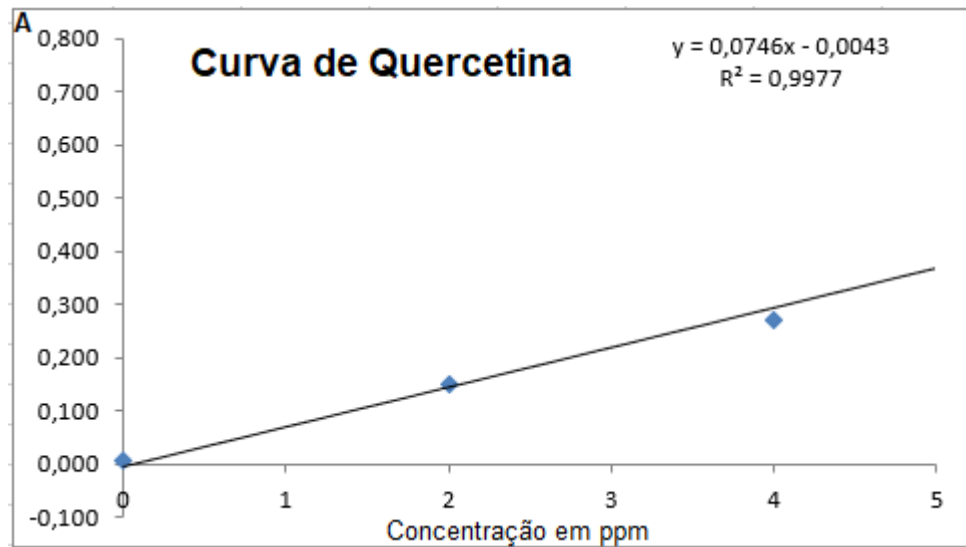
- Espectrofotômetro (BIOSPECTRO, SP-22);
- Micropipeta de 10-100 μL ;
- Micropipeta de 20-200 μL ;
- Micropipeta de 100-1000 μL ;
- Balança analítica (SHIMADZU, AUX220);
- Tubo Falcon;
- Suporte para tubos;
- Béquer de 100 mL;
- Balão volumétrico de 100 mL;
- Espátula;
- Pissete.

O Teor de Flavonoides Totais (TFC) foi determinado utilizando-se a metodologia que emprega cloreto de alumínio [4] adaptada.

Preparou-se a solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado 2% (m/v) em um balão volumétrico de 100 mL. Para isso, pesou-se 2 g do $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diretamente em um béquer, em seguida, adicionou-se um pouco de metanol para solubilizá-lo. Transferiu-se para o balão volumétrico e aferiu-se. Após isso, todos os tubos Falcon foram identificados de acordo com a amostra de manjeriço.

Do extrato aquoso de cada amostra de manjeriço, tomou-se alíquotas: 50 μL , em triplicata, que foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL. Adicionou-se 2,45 mL de cloreto de alumínio hexahidratado a 2,0% (m/v em metanol) e o volume foi completado com 1,55 mL de metanol. Agitou-se e decorrida 1h de repouso no escuro, foram realizadas as leituras em triplicata das absorvâncias em espectrofotômetro (BIOSPECTRO, SP-22) a 415 nm. Utilizou-se como padrão a quercetina, para a curva de calibração. Para o preparo das soluções da curva, foi realizado o mesmo procedimento descrito para o ensaio com as amostras, substituindo-se o extrato pelo volume necessário de quercetina 100 ppm para se ter as concentrações necessárias à curva (0-10 ppm). A partir da equação da reta (Figura 9), realizou-se o cálculo do Teor de Flavonoides Totais (TFT) que foram expressos como equivalentes de quercetina por 100 g em massa seca ($\text{EQ } 100 \text{ g}^{-1}$).

Figura 9 - Curva de calibração da quercetina para determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT).



Fonte: Autor

Após todas as leituras, os materiais foram lavados com água e sabão, depois com água ultrapura e colocados em banho de HNO₃, 10 % (v/v) durante 24h para descontaminação.

4.6. Determinação da atividade antioxidante por DPPH

4.6.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Álcool metílico (Synth, Brasil);
- Água destilada;
- 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH•) (Sigma-Aldrich, EUA).

4.6.2. Instrumentos

- Espectrofotômetro (BIOSPECTRO, SP-22);
- Micropipeta de 10-100 µL;
- Balança analítica (SHIMADZU, AUX220);
- Tubo Falcon;
- Suporte para tubos;
- Pissete;

- Béquero de 100 mL;
- Balão volumétrico de 100 mL;
- Tampa para balão volumétrico.

A determinação da atividade antioxidante por DPPH foi realizada através do método já proposto anteriormente [68] com adaptações.

Preparou-se uma solução de 0,06 mM de DPPH•, no mesmo dia da análise. Para isso, utilizou-se uma balança analítica para medir a massa 2,4 g de DPPH com o auxílio de um béquer preparar a solução 0,06 mM no mesmo dia da análise, 2,4 mg de DPPH, em seguida, adicionou-se metanol para solubilizá-lo e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e aferiu-se. A solução foi acondicionada em frasco de vidro âmbar. Para a determinação da atividade antioxidante, adicionou-se 100 µL de extrato e 3,9 mL da solução metanólica de DPPH • em tubo falcon, fechou-se e agitou-se. Preparou-se o branco adicionando-se 100 µL de água ultrapura e 3,9 mL da solução metanólica de DPPH •. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Após 60 minutos, as absorvâncias foram lidas a 515 nm em um espectrofotômetro UV-vis (Biospectro, Brasil). A atividade de eliminação de radicais foi expressa como percentagem de inibição [8], calculada como se segue: % de inibição = 100 x (branco de ABS - amostra de ABS)/branco de ABS.

4.7. Análises do perfil fenólico por HPLC-DAD

4.7.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Ácido acético glacial grau de HPLC (AVANTOR, EUA);
- Álcool metílico grau de HPLC (Merck, Alemanha);
- Água ultrapura;
- Mix de padrões (Sigma-Aldrich, EUA).

4.7.2. Instrumentos

- Sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Scientific Instruments, Japão):
 - ✓ Modelo Prominence-i LC-2030C 3D Plus;
 - ✓ Bomba quaternária de alta pressão (LC-40B XR);
 - ✓ Detector de arranjo de fotodiodos (SPD-40V);
 - ✓ Auto-amostrador (SIL-40C);
 - ✓ Forno de aquecimento para coluna (CTO-40C);
 - ✓ Módulo de comunicação (CBM-40Life).
- ✓ Coluna C18 (5 µm, 4,0 x 250 mm) (Sigma-Aldrich, EUA).
- Vials;
- Filtro de seringa;
- Balão volumétrico de 1 L;
- Seringa;
- Proveta de 10 mL;
- Banho ultrassônico Banho ultrassônico (UNIQUE, Maxiclean 1450);
- Sistema de filtração a vácuo;
- Frasco de vidro âmbar 1 L.

A análise do perfil fenólico dos extratos de manjeriço foi feita por metodologia já descrita na literatura [69] com adaptações.

Preparou-se a solução de ácido acético glacial 1% (v/v) medindo-se 10 mL de ácido acético glacial em uma proveta, em seguida transferiu-se para o balão volumétrico e adicionou-se água ultrapura e aferiu-se, fez-se a homogeneização. Após isso, com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo, filtrou-se a solução diretamente para um frasco de âmbar e em seguida colocou-se em banho ultrassônico por 5 minutos. Realizou-se as análises HPLC-DAD em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, Japão) modelo Prominence, equipado com bomba quaternária de alta pressão (modelo LC-2030C 3D Plus), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-40V), auto-amostrador (modelo SIL-40C), forno de aquecimento para coluna (modelo CTO-40C) e módulo de comunicação (modelo CBM-40Life), operado pelo software programa LCsolutions (Shimadzu Scientific Instruments, Japão). Realizou-se a separação cromatográfica em uma coluna C18 (5

μm , 4,0 x 250 mm) (Sigma-Aldrich, EUA) a 42 °C usando o gradiente de vazão da tabela 5 de uma mistura de solventes: solução de ácido acético glacial 1% (v/v) (A) e metanol grau HPLC (B), sendo o programa gradiente descrito na tabela 6.

Tabela 5 - Gradiente de vazão do método de análise no HPLC-DAD

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)
0-12	0,8
24,5	1,0
37	1,2
39	1,3
42-43	0,8

Fonte: [69]

Tabela 6 - Gradiente de eluição método de análise no HPLC-DAD

Tempo (min)	HAc 1% (v/v)	Metanol
0	100	0
10	80	20
23	60	40
36	40	60
39	30	70
39,5-43	100	0

HAc: ácido acético

Fonte: [69]

Para identificação dos picos cromatográficos comparou-se os tempos de retenção e espectros UV-Vis com os mesmos resultados dos padrões de referência. Obteve-se os cromatogramas em diferentes comprimentos de onda, de acordo com a literatura, sendo, 260 nm para os ácidos protocatecuico e ácido elágico; 272 nm para ácido gálico, ácido siríngico e crisina; 280 nm para catequina, vanilina, ácido trans-cinâmico e naringenina; 310 nm para ácido p-cumárico; 330 nm para ácidos clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico, e 360 nm para rutina,

quercetina e kaempferol. Todas as análises dos extratos foram realizadas em triplicatas e utilizou-se os parâmetros descritos na tabela 7 para determinação dos compostos fenólicos.

Tabela 7 - Parâmetros das curvas analíticas do método de análise no HPLC-DAD

Analito	Equação de regressão	r	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	$y = 69058x - 987,92$	0,9988	0,16	0,48
Ácido protocatecuico	$y = 132697x - 8605$	0,9997	0,08	0,24
Catequina	$y = 11344x + 3841,1$	0,9979	0,21	0,63
Ácido clorogênico	$y = 65056x + 5481,7$	0,9973	0,14	0,41
Ácido cafeico	$y = 149675x - 15785$	0,9999	0,04	0,13
Ácido siríngico	$y = 73260x - 8065,3$	0,9999	0,04	0,11
Vanilina	$y = 92846x - 620,8$	1,0000	0,02	0,07
Ácido p-cumárico	$y = 173234x - 16450$	1,0000	0,03	0,09
Ácido ferúlico	$y = 106019x - 10833$	0,9998	0,06	0,17
Ácido sinápico	$y = 107178x - 10354$	0,9998	0,06	0,18
Rutina	$y = 31435x - 3903$	1,0000	0,01	0,04
Ácido elágico	$y = 180471x - 6206,8$	0,9992	0,13	0,39
Ácido trans-cinâmico	$y = 156741x - 16963$	1,0000	0,03	0,08
Naringenina	$y = 63685x - 6429,1$	0,9995	0,10	0,29
Quercetina	$y = 45981x - 10078$	0,9985	0,18	0,54
Kaempferol	$y = 23417x - 4108,7$	0,9925	0,40	1,20
Crisina	$y = 23736x - 10191$	0,9903	0,44	1,34

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; r: coeficiente de correlação

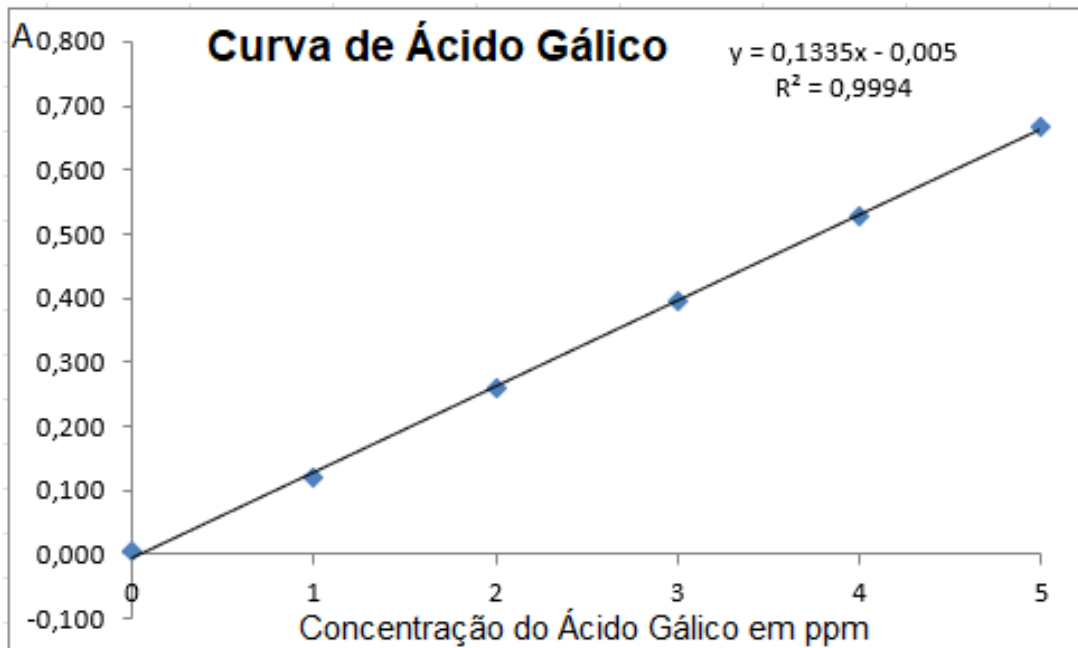
Fonte: [69]

5. Resultados e discussão

5.1. Validação do ajuste da extração

A validação do ajuste feito no método de extração foi obtida através da avaliação de alguns parâmetros analíticos [64,65,66]. A resposta avaliada foi o teor de compostos fenólicos totais através do método espectrofotométrico [67], com uma curva analítica tendo como padrão o ácido gálico, na faixa de concentração de 0-5 ppm (Figura 10) ($y = 0,1335x - 0,005$, $R^2 = 0,9994$).

Figura 10 - Curva de calibração do ácido gálico para determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais para validação (TCFT)



Fonte: Autor

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações e foi estimada delineando-se um planejamento fatorial completo de dois níveis, 2^2 das variáveis estudadas, razão massa/solvente e tempo de extração estabelecendo como ponto central a condição ótima e variando 10% em torno do valor ótimo para cada variável: razão amostra-solvente (1:63, 1:70, 1:77), tempo de decocção (15,3, 17, 18,7 min) como mostra a tabela 8.

Tabela 8 - Matriz de planejamento fatorial completa de dois níveis com valores codificados e reais para análise da robustez do método de extração.

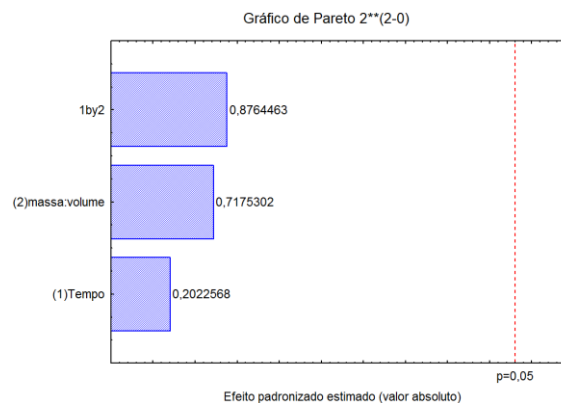
Experimento	Tempo (min)	Proporção amostra-solvente
1	-1 (15,3)	-1 (1:63)
2	+1 (18,7)	-1 (1:63)
3	-1 (15,3)	+1 (1:77)
4	+1 (18,7)	+1 (1:77)
5 (PC)	0 (17)	0 (1:70)
6 (PC)	0 (17)	0 (1:70)
7 (PC)	0 (17)	0 (1:70)

PC: Ponto central

Fonte: Autor

O gráfico de Pareto (Figura 11) gerado evidenciou que nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa, indicando que o método de extração é robusto à variação de 10% em torno das condições ótimas. Não apresentando nenhuma influência significativa na extração dos compostos fenólicos pois, dentro do domínio estudado, os valores apresentados no gráfico de Pareto sinalizam que as variáveis não interferem na resposta. Portanto, a redução da massa da amostra e do volume proporcionalmente foi selecionada para otimização.

Figura 11 - Gráfico de Pareto para avaliação da robustez do método de extração



Fonte: Autor

A precisão foi estimada pelo desvio padrão relativo para o teor de fenólicos totais de 7 extratos de manjeriço, obtendo-se 10,5 %, demonstrando que está dentro do valor permitido, portanto, sendo o método preciso. A precisão foi estimada por experimentos de repetibilidade.

A exatidão foi estimada em ensaios de recuperação para a adição de ácido gálico como padrão (em três níveis de concentração) e manjeriço como amostra de referência. Para adição de 200, 300 e 400 ppm de ácido gálico à amostra de manjeriço foram obtidos valores de recuperação de $101,3 \pm 11,8$, $98,1 \pm 11,6$ e $83,3 \pm 7,7$, respectivamente.

A capacidade de extração do método foi avaliada por extrações sucessivas. Assim, após a filtração ao final da primeira etapa de extração, a massa da amostra foi coletada e submetida novamente ao processo de extração sob as mesmas condições. Do conteúdo fenólico total extraído em três etapas, a primeira etapa foi responsável por extrair aproximadamente 48 % dos fenólicos, a segunda 30 % e a terceira 13,5 %. Apesar da segunda extração apresentar uma porcentagem próxima a primeira, no dia a dia, no preparo de chás, esse procedimento, geralmente, não é realizado. Portanto, uma única etapa de extração é suficiente para inferir o teor de fenólicos no preparo de chás utilizando manjeriço.

5.2. Determinações espectrofotométricas: teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante

Os resultados para as determinações do teor compostos fenólicos totais (TCFT), flavonoides totais (TFT) e atividade antioxidante *in vitro* estão dispostos na tabela 9. Para o extrato de manjeriço hidropônico TCFT variou entre 700 e 2960 mg GAE por 100 g de amostra de manjeriço, TFT variou entre 600 e 1480 mg EQE por 100 g de amostra de manjeriço e porcentagem de inibição variou de 37,2 a 78,7 % para DPPH. Para o extrato de manjeriço tradicional TCFT variou de 1270 e 3170 mg GAE por 100 g de amostra de manjeriço, TFT variou entre 730 e 1570 mg EQE por 100 g de amostra de manjeriço e a porcentagem de inibição variou de 56,1 a 92,5 % para DPPH.

Comparando-se os resultados obtidos dos extratos de manjeriço hidropônico e tradicional, em média, o segundo, apresentou maior teor de fenólicos totais, maior teor de flavonoides totais e atividade antioxidante. Pode-se observar também que entre os extratos de manjeriço hidropônico, o que apresentou melhores resultados

foi o do manjeriço coletado na feira de São Joaquim. Já para os extratos de manjeriço tradicional, os resultados foram maiores para a amostra coletada no mercado do Rio Vermelho. Entretanto, na atividade antioxidante o do manjeriço coletado no feirante do Cabula apresentou uma atividade antioxidante relativamente maior.

Entre os extratos de manjeriço hidropônico, o que apresentou maiores resultados para TCFT, TFT e DPPH foi o da amostra coletada na feira de São Joaquim.

A comparação entre vegetais cultivados através de técnicas diferentes tem sido retratada em pesquisas recentes. Segundo um estudo comparativo entre alface cultivada hidroponicamente e no solo, sob as mesmas condições ambientais, fazendo uma análise morfológica, do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante a fim de avaliar o impacto na qualidade funcional.[70] O resultado obtido nesse estudo mostra que a alface cultivada no solo apresentou o teor de fenólicos totais 21,15% maior do que o de cultivo hidropônico, o qual está alinhado com outros estudos. [71]

Muitos estudos descrevem que vegetais cultivados tradicionalmente apresentam resultados para teor de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante superiores. Apesar disso, existem estudos que os contrapõem, em 2014 pesquisadores investigaram TCFT e TFT para folhas de Jambu (*A. oleracea*) cultivadas em sistemas hidropônico e tradicional, e concluíram que as plantas cultivadas hidroponicamente apresentaram os maiores valores, contrastando com os resultados observados neste estudo. [71] Essa variação pode se dar devido a diferentes metodologias analíticas, amostras, métodos de cultivo hidropônico e regiões geográficas de cultivo.

Os metabólitos secundários das plantas podem ser afetados por diversos fatores. Dentre estes, pode-se citar: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, altitude, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos etc. Assim, tais fatores podem justificar as diferenças observadas nos resultados de TCFT, TFT DPPH das amostras analisadas. [73]

Tabela 9 - Resultados para Teor de Compostos Fenólicos Totais (TCFT), Teor de Flavonoides Totais (TFT), e Atividade Antioxidante (DPPH) em manjeriço de cultivo hidropônico e tradicional

Amostra	Fenólicos totais		DPPH % de inibição
	mg EAG 100 g ⁻¹ DW ± DP	Flavonoides totais mg EQE 100 g ⁻¹ DW ± DP	
HB	770,0 ± 1,3	600,0 ± 0,7	37,2 ± 0,03
CB	1270,0 ± 3,2	730,0 ± 1,4	56,1 ± 0,1
CPE	2250,0 ± 1,4	1240,0 ± 0,6	92,0 ± 0,0
HPE	1040,0 ± 0,5	1040,0 ± 0,5	47,9 ± 0,03
CS	2060,0 ± 1,7	1500,0 ± 0,8	92,3 ± 0,0
HS	2960,0 ± 6,1	1480,0 ± 1,3	78,7 ± 0,2
CC	2560,0 ± 2,8	1530,0 ± 1,5	92,5 ± 0,0
CR	3170,0 ± 2,6	1570,0 ± 1,4	92,3 ± 0,0

Média da concentração ± desvio padrão; DW (massa seca); EAG: Equivalente de ácido gálico; EQE: equivalente em quercetina

Fonte: Autor

Em pesquisa sobre quimiotipagem de manjeriço, realizada nos EUA, os resultados mostraram que para o cultivar de manjeriço “Dolly” que se obteve o maior valor para o teor de composto fenólico total foi de 499 mg EQE 100 g⁻¹ [19] ao comparar com os resultados obtidos no presente estudo, o valor está abaixo do menor valor obtido para o manjeriço hidropônico 770,0 ± 1,3 mg EQE 100 g⁻¹ de amostra. A variação dos resultados apresentados no estudo e neste trabalho pode ser justificado pela diversidade existente de cultivares de manjeriço, além de todos os fatores que influenciam na presença dos metabólitos secundários nas plantas.

A presença de metabólitos secundários desperta interesse, principalmente, devido a capacidade antioxidante dessas substâncias. Pesquisas voltadas para a

quantificação de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante têm sido desenvolvidas em diversos vegetais, como alface, *Camellia sinensis* [72, 74]. Além desses vegetais, o manjeriço tem sido estudado por diversos pesquisadores. Os resultados referentes a alguns estudos, os quais fizeram análises baseados nos métodos mais difundidos estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados sobre a concentração de TCFT e TFT e a atividade antioxidante (DPPH) em Manjeriço de em vários artigos recentes.

Amostra	Fenólicos	Flavonoides	Capacidade antioxidante	Local da pesquisa	Referência
	totais mg EAG 100 g ⁻¹ DW ± D	totais mg EQE 100 g ⁻¹ DW ± D			
<i>Ocimum basilicum</i> L.	6525 ± 2,19	4063 ± 2,14	IC ₅₀ = 0,22 ± 0,01 µg mL ⁻¹	Sérvia	[12]
<i>Ocimum basilicum</i>	5410 ± 3,5	-	IC ₅₀ = 175,4 ± 14,7 µg mL ⁻¹	Itália	[75]
<i>Ocimum basilicum</i>	4085 ± 0,86	-	51,34 µ mol Trolox/g	Egito	[76]
<i>Ocimum basilicum</i>	499 ± 0,44	-	5,20 ± 0,82 mmol 100 g ⁻¹ DW TEAC	EUA	[19]
<i>Ocimum basilicum</i>	3170±2,6	1570±1,4	92,3±0,0 %	Brasil	Este trabalho

Fonte: Autor

O manjeriço é uma planta amplamente cultivada em diversos locais do mundo. Na tabela 10, ao comparar-se os resultados obtidos neste trabalho e em outros estudos divulgados para manjeriço referentes aos metabólitos secundários, observa-se que os valores dos dados apresentam diferença considerável. Essas substâncias apresentam uma relação entre as plantas e o ambiente no qual ocorre seu cultivo, pois, com frequência, a síntese das mesmas é afetada pelas condições ambientais. Como mencionado anteriormente, alguns fatores podem influenciar no teor desses compostos nas plantas, o que pode justificar a diferença desses valores. Outro fator

pertinente é a existência de mais de 160 espécies de manjeriço relatadas na literatura e a dificuldade de determinar o tipo de cultivar utilizado nos estudos. Assim, além das diferenças nas características morfológicas, existe uma distinção da composição química também.

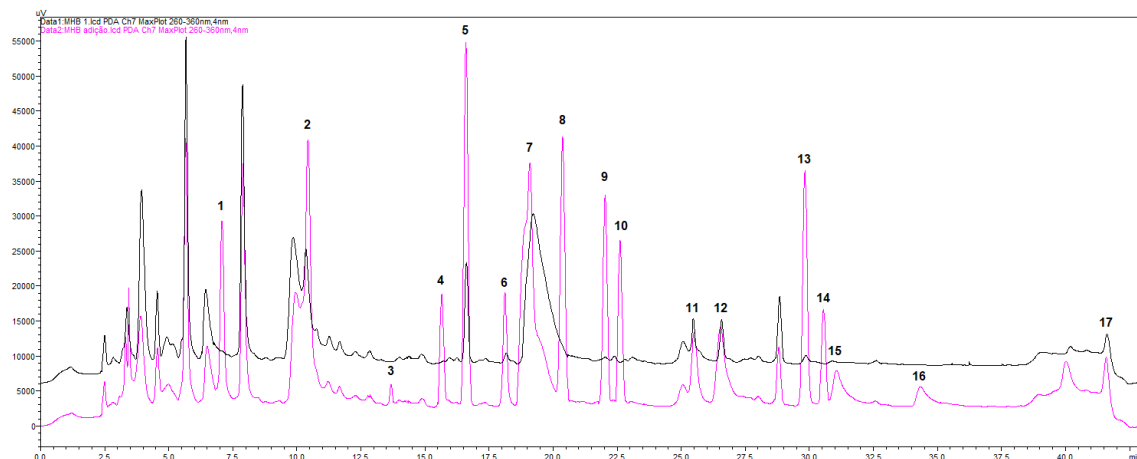
Os resultados sobre capacidade antioxidante pelo método de DPPH têm sido apresentados de diversas formas e a falta de padronização dificulta a comparação da capacidade antioxidante de um mesmo tipo de amostra ou de diferentes tipos.

5.3 HPLC-DAD

A partir das análises feitas no HPLC-DAD foram obtidos cromatogramas que permitem fazer uma comparação qualitativa entre os extratos trabalhados e a presença dos analitos.

A sobreposição do cromatograma do extrato de uma amostra fortificada pelo mix dos padrões dos analitos ao cromatograma do mesmo extrato da amostra (Figura 12) mostra que a intensidade dos picos é aumentada. Assim, permite inferir sobre a existência de alguns analitos presentes no manjeriço de forma confiável, uma vez fora da faixa dos padrões não é possível afirmar qual o comportamento a ser obtido.

Figura 12 - Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjeriço fortificada (rosa) e não fortificada (preto) destacando os picos dos analitos (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido clorogênico; 5: ácido cafeico; 6: ácido siríngico; 7: vanilina; 8: ácido p-cumárico; 9: ácido ferúlico; 10: ácido sinápico; 11: rutina; 12: ácido elágico; 13: ácido trans-cinâmico; 14: naringenina; 15: quercetina; 16: kaempferol; 17: crisina)

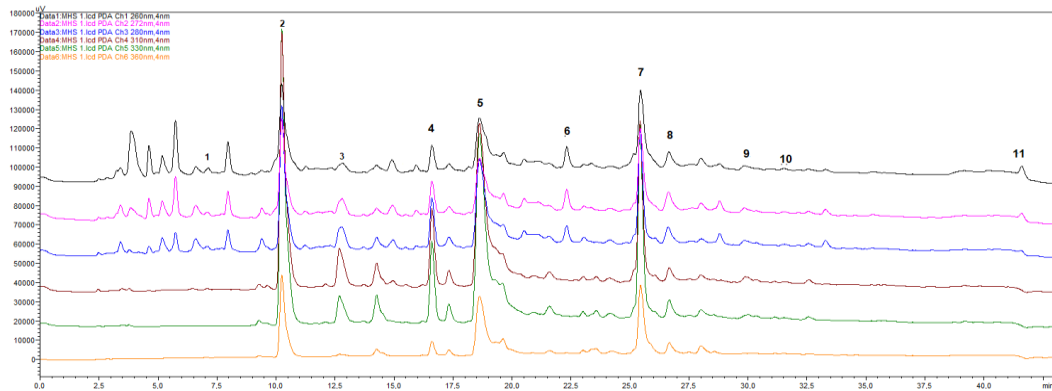


Fonte: Autor

Ao analisar os cromatogramas comparando os picos da amostra fortificada e não fortificada infere-se que não há a presença dos analitos: ácido gálico, ácido p-cumárico, naringenina, ácido sinápico e kaempferol.

Na Figura 13 e na Figura 14, há uma comparação de cromatogramas do extrato de manjeriço hidropônico coletado na feira de São Joaquim e extrato de manjeriço tradicional coletado no supermercado Bompreço, respectivamente, nos diferentes comprimentos de onda analisados, destacando-se os picos dos analitos identificados, alguns dos quais não são visíveis devido à escala do gráfico.

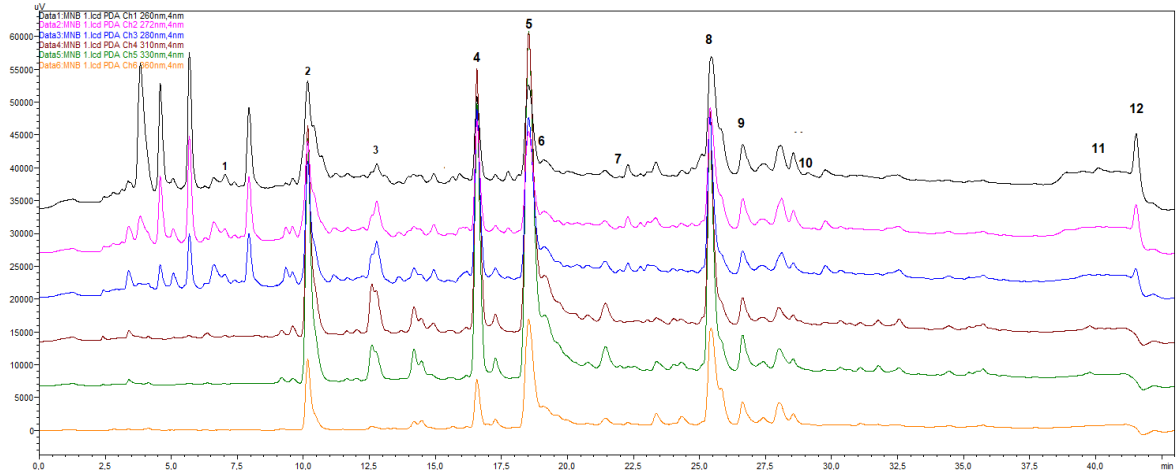
Figura 13 - Comparação dos cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda (260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjeriço hidropônico coletado na Feira de São Joaquim, destacando os picos dos analitos identificados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido cafeico; 5: ácido siríngico; 6: ácido ferúlico; 7: rutina; 8: ácido elágico; 9: ácido trans-cinâmico; 10: quercetina; 11: crisina)



Legenda: Cromatogramas 260 nm (preto), 272 nm (rosa), 280 nm (azul), 310 nm (vermelho), 330 nm (verde), 360 nm (amarelo)

Fonte: Autor

Figura 14 - Comparação dos cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda (260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjerição tradicional coletado no supermercado Bompreço, destacando os picos dos analitos identificados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido cafeico; 5: ácido sirínigico; 6: vanilina; 7: ácido ferúlico; 8: rutina; 9: ácido elágico; 10: ácido trans-cinâmico; 11: quercetina; 12: crisina)

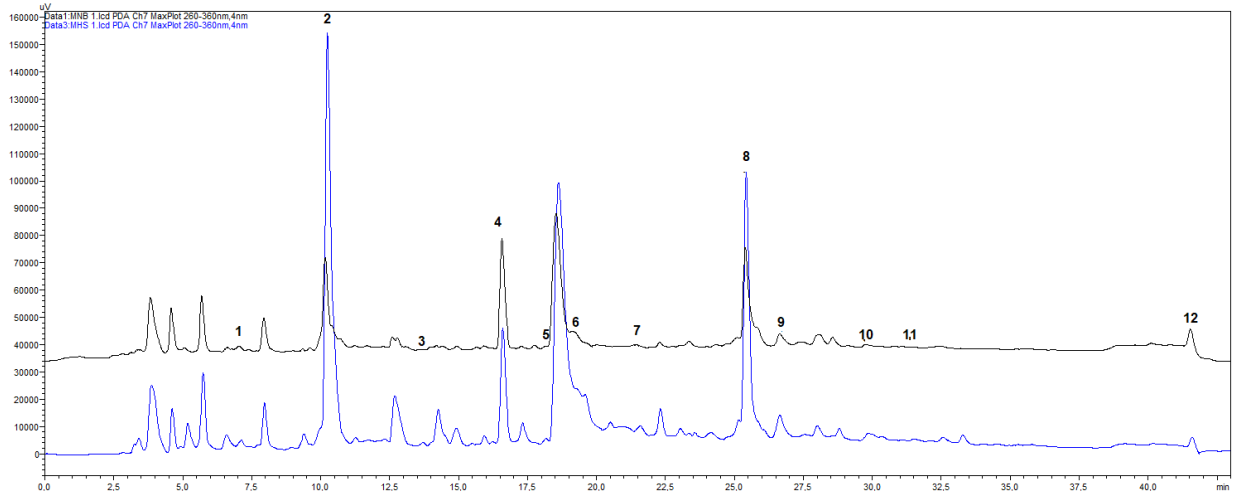


Legenda: Cromatogramas 260 nm (preto), 272 nm (rosa), 280 nm (azul), 310 nm (vermelho), 330 nm (verde), 360 nm (amarelo)

Fonte: Autor

Observando a sobreposição dos cromatogramas dos extratos das amostras de manjerição hidropônico coletado na Feira de São Joaquim e tradicional coletado no supermercado Bompreço (Figura 15), percebe-se que as amostras apresentaram perfil cromatográfico semelhante, entretanto, com intensidade dos picos maior para alguns analitos do manjerição da Feira de São Joaquim, como: ácido protocatecuico e rutina. O que é justificado pela diferença entre o tipo de cultivo, logo, foram desenvolvidos sobre diferentes condições ambientais e de estresse.

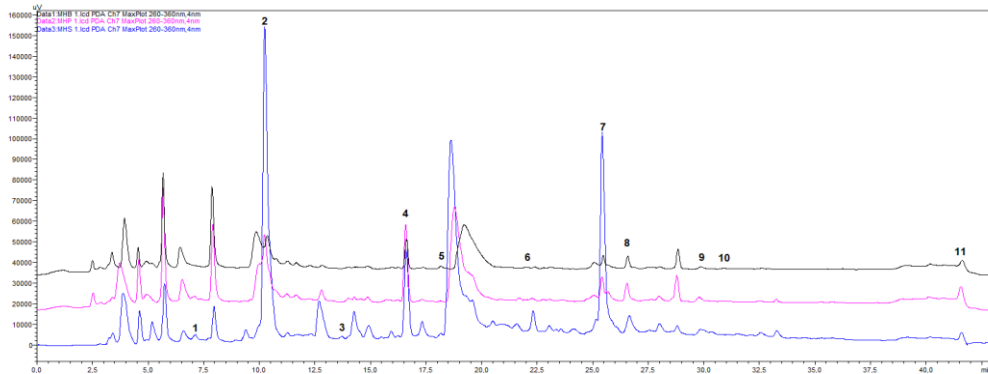
Figura 15 - Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjeriço hidropônico coletada na feira de São Joaquim (em azul) e tradicional coletada no supermercado Bompreço (em preto) destacando os picos dos analitos identificados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido cafeico; 5: ácido siríngico; 6: vanilina; 7 ácido ferúlico; 8: rutina; 9: ácido elágico; 10: ácido trans-cinâmico; 11: quercetina; 12: crisina)



Fonte: Autor

Na comparação entre os cromatogramas dos extratos da amostra de manjeriço hidropônico, coletado no supermercado Bompreço (em preto), no supermercado Perini (em rosa) e na feira de São Joaquim (em azul) (Figura 16), percebe-se que os cromatogramas que mais se assemelham são os do manjeriço coletado no Bompreço e na Perini. Apesar de todos terem picos para a maioria dos analitos semelhantes, observa-se que apenas o cromatograma referente ao manjeriço da feira de São Joaquim apresenta picos para ácido gálico e catequina, além disso, é a amostra que tem picos mais intensos, principalmente, para o ácido protocatecuico e para a rutina.

Figura 16 - Comparação dos cromatogramas (max plot 260-360 nm) do extrato de uma amostra de manjerição hidropônico coletada no supermercado Bompreço (em preto), no supermercado Perini (em rosa) e na feira de São Joaquim (em azul) destacando os picos dos analitos identificados (1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido cafeico; 5: ácido siríngico; 6: ácido ferúlico; 7: rutina; 8: ácido elágico; 9: ácido trans-cinâmico; 10: quercetina; 11: crisina)



Fonte: Autor

Os resultados do teor dos compostos bioativos das amostras de manjerição obtidos pela análise por HPLC-DAD estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11 - Dados das Concentração (mg L⁻¹) de ácidos fenólicos e flavonoides dos extratos de manjeriço hidropônico e tradicional

Amostra	ACP	AE	AG	ASG	CRN	CTQ	ATC	VN	ACPC	ACFE	ACF	ASN	RT	QCT
HB	0,45±0,0 0	0,23±0,0 2	nd	0,16±0,00	2,16 ± 0,48	* 0,42 ±	0,24 ± 0,01	nd	nd	0,14 ± 0,01	0,61 ± 0,07	nd	0,96 ± 0,1	0,24 ± 0,00
TB	0,1 ± 0,01	0,37 ± 0,08	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,00	3,14 ± 0,16	0,42 ± 0,14	0,22 ± 0,01	0,17 ± 0,03	nd	3,19 ± 0,68	0,12 ± 0,00	nd	5,19 ± 1,25	0,28 ± 0,01
TP	0,11± 0,02	0,25 ± 0,00	0,17 ± 0,00	7,73 ± 0,17	3,66 ± 0,18	1,02 ± 0,01	0,31 ± 0,07	0,27 ± 0,12	0,15 ± 0,00	4,17 ± 0,08	0,14 ± 0,00	nd	27,20 ± 0,35	0,42 ± 0,01
HP	1,13 ± 0,12	0,30 ± 0,02	nd	0,14 ± 0,00	3,33 ± 0,09	* 0,36 ±	0,36 ± 0,01	nd	nd	3,25 ± 0,14	0,85 ± 0,01	nd	1,26 ± 0,07	0,27 ± 0,02
TS	0,16 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,02	14,19 ± 0,07	2,97 ± 0,20	0,84 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,69 ± 0,05	nd	4,74 ± 0,05	0,13 ± 0,00	0,34 ± 0,1	29,12 ± 0,54	0,45 ± 0,01
HS	5,01 ± 0,44	0,80 ± 0,03	0,25 ± 0,00	0,14 ± 0,02	2,21 ± 0,35	0,54 ± 0,04	0,39 ± 0,03	nd	nd	3,81 ± 0,01	0,12 ± 0,01	nd	15,14 ± 0,19	0,29 0,00
TC	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,18 ± 0,17	19,47 ± 0,17	3,41 ± 0,09	1,11 ± 0,02	0,29 ± 0,00	nd	nd	4,23 ± 0,07	0,11 ± 0,00	nd	25,76 ± 0,57	0,40 ± 0,11
TR	0,20 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,22 ± 0,00	10,93 ± 0,27	3,70 ± 0,21	0,97 ± 0,03	0,24 ± 0,00	nd	nd	4,98 ± 0,09	0,13 ± 0,00	nd	26,26 ± 0,25	0,27 ± 0,00

ACP: ácido protocatecuico; AE: ácido elágico; AG: ácido gálico; ASG: ácido siríngico; CRN: crisina; CTQ: catequina; ATC: ácido trans-cinâmico; VN: vanilina; NG: naringenina; ACPC: ácido p-cumárico; ACL: ácido clorogênico; ACFE: ácido cafeico; ACF: ácido ferúlico; ASN: ácido sinápico; RT: rutina; QCT: quercetina; KPF: kaempferol; nd: não detectado; *: não quantificado; H: cultivo hidropônico; T: cultivo tradicional; B: supermercado Bompreço; P: supermercado Perini; S: feira de São Joaquim; C: ambulante Cabula; R: mercado do Rio Vermelho.

Fonte: Autor

Como pode-se verificar na tabela 11, as maiores concentrações para ácidos fenólicos em manjeriço foram para: ácido siríngico e ácido cafeico variando de $0,12 \pm 0,00$ a $19,47 \pm 0,17$ e $0,14 \pm 0,01$ a $4,98 \pm 0,09$, respectivamente. Entre os flavonoides os analitos com maior concentração foram: rutina que variou de $0,96 \pm 0,1$ a $29,12 \pm 0,54$ e crisina de $2,16 \pm 0,48$ a $3,70 \pm 0,21$. A ordem crescente do teor dos analitos foi ácido p-cumárico < ácido gálico < ácido sinápico < ácido trans-cinâmico < quercetina < vanilina < ácido elágico < ácido ferúlico < catequina < crisina < ácido cafeico < ácido protocatecuico < ácido siríngico < rutina.

Ao comparar-se os resultados individuais das amostras, a maioria obteve resultados relevantes para os analitos que apresentaram maiores concentrações. Exceto para a amostra de manjeriço hidropônico coletado no supermercado Bompreço.

A comparação dos resultados obtidos das amostras cultivadas da forma tradicional e da forma hidropônica revela que o teor de compostos fenólicos é maior para manjeriço cultivado tradicionalmente, que tiveram resultados próximos. Para a rutina, o analito que apresentou maior concentração, as amostras coletadas no Bompreço e na Perini são as de menor concentração.

Somando-se os valores médios dos dois analitos de maior concentração das amostras de cultivo tradicional e de cultivo hidropônico, ao compará-los, obtêm-se que, para a rutina, a concentração é aproximadamente 4 vezes maior do que o tradicional. Já para o ácido siríngico, é aproximadamente 374,6 vezes maior.

O perfil fenólico das amostras, no geral, segue um padrão. Apresentam teores relevantes para mesmos analitos. O ácido protocatecuico aparece em maior concentração nas amostras de manjeriço hidropônico. A crisina é o analito que aparece com o teor mais próximo em todas as amostras. A catequina aparece na maioria das amostras, apesar de uma concentração mais baixa em relação aos outros analitos. Entretanto, em duas amostras, a coletada no Bompreço e a da Perini, não foi possível fazer a identificação devido à coeluição.

A vanilina foi identificada em algumas amostras, todas de cultivo tradicional, coletadas no Bompreço, na Perini e na Feira de São Joaquim, sendo a do último local a que apresentou maior teor desse analito.

A partir dos resultados obtidos para o manjeriço hidropônico e tradicional a comparação é qualitativa, uma vez que é difícil compará-los pois esses sistemas são

essencialmente diferentes. O mecanismo de absorção de água e nutrientes são distintos. Enquanto na hidroponia a água é absorvida por osmose pelas raízes das plantas e os nutrientes são transportados por água das raízes para as folhas. O cultivo tradicional beneficia-se da mineralização de nutrientes do solo e da atividade microbiana. Assim, o controle desses sistemas para que ambos tenham nutrientes idênticos é impossível.

Além disso, fatores que podem influenciar são a localização geográfica e a maturidade da planta, tudo pode afetar o teor de compostos bioativos e conseqüentemente na qualidade da mesma. Estudos mostram que estressores podem desencadear alterações no metabolismo da planta e alterar concentrações dos fitoquímicos. [70]

Além das análises do teor dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante, alguns estudos se debruçam sobre o perfil fenólico de vegetais. Uma pesquisa recente, comparou diferentes cultivares de alface que se desenvolveram sob condições controladas. Analisou-se o teor de alguns ácidos fenólicos, dentre eles, o ácido clorogênico que apresentou a segunda maior concentração. Esse ácido é amplamente distribuído no reino vegetal, mas, como mostram os resultados dessa pesquisa, para as amostras de manjeriço tanto tradicional quanto hidropônico não foi detectado esse analito.

Ainda em pesquisas sobre a composição fenólica de vegetais. Pesquisadores analisaram diversas partes da planta Jambu, cultivada no sistema hidropônico e tradicional, desenvolvido no Brasil. Relataram em resultados que a planta desenvolvida no sistema tradicional apresentou valores significativamente maiores do que do sistema hidropônico, para flavonoides totais e capacidade antioxidante. [77] Na análise do perfil fenólico, foram encontrados principalmente ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados, dentre eles, a rutina, analito de maior concentração média identificado nas amostras de manjeriço desta pesquisa. Esse analito já havia sido identificado em outros estudos. [78]

Em estudo sobre a interferência dos solventes para extração de compostos fenólicos de vegetais do gênero Brassicaceae, sendo eles repolho, couve-flor e brócolis, os autores observaram que, no geral, existe um aumento do rendimento dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais na seguinte ordem acetona:água:ácido acético<etanol<metanol. Entretanto, verificou-se que há uma variação nessa ordem de acordo com a matriz vegetal do extrato e o solvente utilizado. [79]

Os pesquisadores ao analisarem o perfil fenólico dessas amostras perceberam que dentre os analitos estudados por eles, alguns não foram detectados independente do solvente e do tipo de amostra como a naringenina e kaempferol, esse resultado está de acordo ao obtido para as amostras de manjeriço deste estudo. Em relação a outros analitos, como ácido clorogênico, ácido trans-cinâmico, os estudos divergem nos resultados. Variáveis como diferenças na matriz vegetal e nos métodos utilizados para extração são fatores pertinentes que afetam os resultados do perfil fenólico obtido nas pesquisas. [79]

A presença de uma diversidade de compostos no manjeriço caracteriza-o como um vegetal fonte de inúmeros benefícios para a saúde. Estudos mostram a atividade funcional de diversas substâncias fenólicas. A rutina, analito de maior teor encontrado nas amostras de manjeriço apresenta atividade anticonvulsivante, efeito antidepressivo, prevenção de neuroinflamação, melhora circulação sanguínea. Já o ácido cafeico, um dos ácidos de maior teor, apresenta efeito antidiabético, anticancerígeno, prevenção do envelhecimento precoce, prevenção de doenças neurodegenerativas e redução da inflamação. [80,81]

6. Considerações Finais

A avaliação entre métodos para extração da amostra de manjeriço mostrou que a extração com a água como solvente era tão eficiente quanto com metanol, o que é importante para mitigar os efeitos ambientais da pesquisa.

Os ajustes do método de extração foram validados possibilitando a utilização de uma proporção da relação massa:solvente menor corroborando com os princípios da Química Verde e os custos da análise.

A amostra com maior teor de compostos fenólicos e flavonoides ($3170,0 \pm 2,6$ mg EAG 100 g^{-1} e $1570,0 \pm 1,4$ mg EQE 100 g^{-1} , respectivamente) foi a adquirida no mercado do Rio Vermelho, de cultivo tradicional.

O perfil fenólico das amostras de manjeriço revelou que, dentre os 17 analitos propostos no método utilizado, o identificado, que apresentou maior concentração foi a rutina $29,12 \pm 0,54 \text{ mg L}^{-1}$, referente a amostra manjeriço tradicional, adquirida na Feira de São Joaquim.

O ácido fenólico de maior teor foi o ácido siríngico ($19,47 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$) referente a amostra de manjeriço tradicional, adquirida com o ambulante do Cabula.

O perfil fenólico elucidado do manjeriço permite inferir que é uma planta com diversos benefícios associados aos compostos fenólicos encontrados, como: ação anti-inflamatória, redução do risco de doenças cardíacas, prevenção de doenças neuroinflamação, atividade anticonvulsiva, efeitos antidepressivos, melhorar a circulação sanguínea etc.

Os resultados indicam que o manjeriço é uma boa e barata alternativa para obtenção de compostos fenólicos antioxidantes naturais, podendo ser empregado na forma de chás, temperos e outras, sendo necessário um estudo mais abrangente, dado ao grande número de espécies e as variações das amostras de acordo clima, solo, tipo de plantio etc.

Referências

- [1] Associação Brasileira de Nutrição (ASBRAN). **Década da Nutrição: FAO e OMS detalham ações**. São Paulo. 2017. Disponível em: <<https://www.asbran.org.br/noticias/decada-da-nutricao-fao-e-oms-detalham-acoes>>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- [2] Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). **Alimentação saudável**. [S.l.] 2019. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/alimentacao-saudavel>>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- [3] TEOFILOVIĆ, B. *et al.* Analysis of functional ingredients and composition of *Ocimum basilicum*. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 227–234, set. 2021.
- LEE, SJ. *et al.* Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**. v. 91, p. 131-137, jun. 2005.
- [4] SANTOS, W. N. L. DOS *et al.* Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 583–592, jul. 2017.
- [5] DA SILVA SAUTHIER, M. C. *et al.* Screening of *Mangifera indica* L. functional content using PCA and neural networks (ANN). **Food Chemistry**, v. 273, p. 115–123, fev. 2019.
- [6] GRANATO, D. Functional foods to counterbalance low-grade inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases: a multilayered strategy combining food and health sciences. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100894, out. 2022.
- [7] BANWO, K. *et al.* Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101320, out. 2021.
- [8] DE MAGALHÃES, B. E. A. *et al.* Determination of phenolic composition of oilseed whole flours by HPLC-DAD with evaluation using chemometric analyses. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104683, jun. 2020.
- [9] PEREIRA, R. C. A. **Manjeriço**: cultivo e utilização. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, 2011. 31 p.
- [10] AHMED, A. F. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 3, p. 299–305, set. 2019.
- [11] HUSSAIN, A. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986–995, jun. 2008.

- [12] TEOFILOVIĆ, B. *et al.* Experimental and chemometric study of antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum*) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 100, p. 176–182, jun. 2017.
- [13] JAISWAL, N.; KUMAR, A. HPLC in the discovery of plant phenolics as antifungal molecules against *Candida* infection related biofilms. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107572, ago. 2022.
- [14] NIKZAD, N.; PARASTAR, H. Evaluation of the effect of organic pollutants exposure on the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using UV–Vis spectrophotometry and chemometrics. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106632, nov. 2021.
- [15] ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. p. 1-9, 2007.
- [16] JAVANMARDI, J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 547–550, dez. 2003.
- [17] SOARES, A. DE S.; PASTORE, J. F. B.; JARDIM, J. G. Lamiaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, p. e03312017, 2019.
- [18] 20MAY, A. *et al.* **Manjeriço (*Ocimum basilicum*)**. Instituto Agrônomo de Campinas. 4 p.
- [19] BAJOMO, E. M. *et al.* Chemotyping of commercially available basil (*Ocimum basilicum* L.) varieties: Cultivar and morphotype influence phenolic acid composition and antioxidant properties. **NFS Journal**, v. 26, p. 1–9, mar. 2022.
- [20] CORDEIRO, S. Z. ***Ocimum basilium* L.** Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/ocimum-basilicum-l>>. Acesso: 06 jul. 2022.
- [21] BLANK, A. F. *et al.* Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 22, n. 1, p. 113–116, mar. 2004.
- [22] SIMON, J.E. **Sweet basil: a production guide**. West Lafayette: Purdue University, 1985. 3 p.
- [23] BLANK, A. F. *et al.* Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1811–1813, dez. 2007.
- [24] FAVORITO, P. A. *et al.* Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. spe, p. 582–586, 2011.
- [25] FERNANDES, P. C. *et al.* Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 260–264, jun. 2004.

- [26] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Produção de hortaliças em cultivo hidropônico é tema de curso**. Brasília. 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2161082/producao-de-hortaliças-em-cultivo-hidroponico-e-tema-de-curso>>. Acesso em: 27 agos. 2022.
- [27] LEI, C.; ENGESETH, N. J. Comparison of growth characteristics, functional qualities, and texture of hydroponically grown and soil-grown lettuce. **LWT**, v. 150, p. 111931, out. 2021.
- [28] BARRAZA-GANZA, G. *et al.* Antioxidant effect of phenolic compounds (PC) at different concentrations in IEC-6 cells: A spectroscopic analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy**, v. 227, p. 117570, 2020.
- [29] ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolf Lutz (Impre)**, v. 66, n. 1, 2007.
- [30] AMMAR, R. B. *et al.* Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 258–264, set. 2009.
- [31] SIHAG, S. *et al.* Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels: An in-vitro study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102368, jul. 2022.
- [32] JIMENEZ-LOPEZ, C. *et al.* Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 341, p. 128262, mar. 2021.
- [33] BABU, P. V. A.; LIU, D. Chapter 18 - Flavonoids and Cardiovascular Health. **Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 371–392.
- [34] ZHONG, Y. *et al.* Flavonoids enhance gel strength of ovalbumin: Properties, structures, and interactions. **Food Chemistry**, v. 387, p. 132892, set. 2022.
- [35] KANDAR, C. C. Herbal flavonoids in healthcare. **Herbal Biomolecules in Healthcare Applications**, p. 295–311, 1 jan. 2022.
- [36] EL GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 12, p. 2512–2518, 2009.
- [37] 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, p. 820–897, out. 2015.
- [38] CHANDRASEKARA, A. Phenolics acids. **Encyclopedia of Food Chemistry**. p. 535–545, 2019.

- [39] PADMANABHAN, P.; CORREA-BETANZO, J.; PALIYATH, G. Berries and Related Fruits. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 364-371, 2016.
- [40] RASHMI, H. B.; NEGI, P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. 109298, out. 2020.
- [41] KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1.ed. Piracicaba, 2010.
- [42] ZHOU, T. *et al.* Recent progress of selective adsorbents: From preparation to complex sample pretreatment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 121, p. 115678, dez. 2019.
- [43] DA SILVA SAUTHIER, M. C. **Determinação de Substâncias Fenólicas(Ácidos Fenólicos, Flavonoides e Antocianinas) e Atividade Antioxidante em Frutas**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.
- [44] FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 814–826, jun. 2011.
- [45] DAUD, N. M. *et al.* Valorisation of plant seed as natural bioactive compounds by various extraction methods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 201–214, jan. 2022.
- [46] JHA, A. K.; SIT, N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 579–591, jan. 2022.
- [47] SANTOS, M. B. *et al.* Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. **Industrial Crops and Products**, v. 186, p. 115231, out. 2022.
- [48] DA SILVA, R. F. *et al.* Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. **Microchemical Journal**, v. 175, p. 107184, abr. 2022.
- [49] BASAK, S.; ANNAPURE, U. S. The potential of subcritical water as a “green” method for the extraction and modification of pectin: A critical review. **Food Research International**, v. 161, p. 111849, nov. 2022.
- [50] LÓPEZ-LORENTE, Á. I. *et al.* The ten principles of green sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 148, p. 116530, mar. 2022.
- [51] SKOOG, W.; HOLLER, C. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8. ed. norte-americana, Editora Thomson. São Paulo-SP, 2006.

- [52] ANDERSON, R. J.; BENDELL, D. J.; GROUNDWATER, P. W. **Organic Spectroscopic Analysis**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2004.
- [53] AKOMENG, N.; ADUSEI, S. Organic solvent extraction and spectrophotometric quantification of total phenolic content of soil. **Heliyon**, v. 7, n. 11, p. e08388, nov. 2021.
- [54] PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement**, v. 135, p. 896–904, march 2019.
- [55] ABDERRAHIM, M.; ARRIBAS, S. M.; CONDEZO-HOYOS, L. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assesement of reducing capacity of foods. **Talanta**, v. 152, p. 82-89,2016.
- [56] SANTOS, B. R. S. *et al.* Chemometric Tools Applied to Evaluation of Fruit Bioactive Compouns Extration. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 1176-1189, 2020.
- [57] JAISWAL, N.; KUMAR, A. HPLC in the discovery of plant phenolics as antifungal molecules against Candida infection related biofilms. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107572, ago. 2022.
- [58] MAGALHÃES, B. E. A. D.; SANTOS, W. N. L. D. **Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais**. p. 235-246, [s.d.]
- [59] PRASAD, K.N. *et al.* Response surface optimization for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised Mangifera pajang Kosterm.peels. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.1121-1127, 2011.
- [60] BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 4.ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- [61] SILVELLO, G. C.; ALCARDE, A. R. Experimental design and chemometric techniques applied in electronic nose analysis of wood-aged sugar cane spirit (cachaça). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100037, dez. 2020.
- [62] MAGALHÃES, B. E. A. D.; SANTOS, W. N. L. D. Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs: Optimization of phenolic extraction and HPLC-DAD method. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 3, p. e20190646, 2020.
- [63] SÁ, R. R. *et al.* Determination of bioactive phenolics in herbal medicines containing Cynara scolymus, Maytenus ilicifolia Mart ex Reiss and Ptychopetalum uncinatum by HPLC-DAD. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 10–15, nov. 2017.
- [64] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº899**, de 29/05/2003.

[65] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DQO-CGRE-008, 2003.

[66] United States Pharmacopeia Convention. US Pharmacopeia 24. **Validation of compendial methods** <1225>, Rockville, 1999.

[67] SOUZA, G. R. *et al.* Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248–254, 17 ago. 2017.

[68] RUFINO, M.S.M. *et al.* **Metodologia Científica**: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico Online - Embrapa. ISSN 1679-6535 (2007)

[69] MAGALHÃES, B.E.A. **Estratégias analíticas para determinação do teor de bioativos fenólicos em farinhas integrais e suas potenciais atividades antioxidante e antibacteriana**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2022.

[70] LEI, C.; ENGESETH, N. J. Comparison of growth characteristics, functional qualities, and texture of hydroponically grown and soil-grown lettuce. **LWT**, v. 150, p. 111931, out. 2021.

[71] ZAPATA-VAHOS. *et al.* Comparison of antioxidant contents of green and red leaf lettuce cultivated in hydroponic systems in greenhouses and conventional soil cultivation. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, p. 9077-9088, 2020.

[72] ABEYSINGHE, D. C.; WIJERATHNE, S. M. N. K.; DHARMADASA, R. M. Secondary Metabolites Contents and Antioxidant Capacities of *Acmella Oleraceae* Grown under Different Growing Systems. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 4, p. 163–167, 13 jul. 2014.

[73] 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, abr. 2007.

[74] AZEVEDO, R. S. A. *et al.* Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39–44, fev. 2019.

[75] CASTRONUOVO, D. *et al.* Influence of shading treatment on yield, morphological traits and phenolic profile of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 254, p. 91-98, 2019.

[76] MAHMOUD, E. *et al.* Determination of volatiles, antioxidant activity, and polyphenol content in the postharvest waste of *Ocimum basilicum* L. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131692, maio 2022.

[77] JNASCIMENTO, L. E. S. *et al.* Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen): A comparison between hydroponic

and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p. 127393, dez. 2020.

[78] KASPER, J.; MELZIG, M.; JENETT-SIEMS, K. Novos compostos fenólicos de *Acmella ciliata*. **Planta Médica**, p. 633-635, 2010.

[79] RAHMAN, M. M. *et al.* Relative evaluation of in-vitro antioxidant potential and phenolic constituents by HPLC-DAD of Brassica vegetables extracted in different solvents. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e10838, out. 2022.

[80] GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. O potencial farmacológico da catequina. **Indian J. of Biochem. Biophys.** 505-511, 2020.

[81] PERTO, A. *et al.* Ácido cafeico: uma breve visão geral de sua presença, metabolismo e bioatividade. **Bioact. Comp. Curar. Dis.** p. 74-81, 2020.