

**Caracterização Química, Bioatividade e Toxicidade de Algumas Plantas da Europa:
Avaliação da Aplicabilidade no Desenvolvimento de um Produto Industrial**

Breno Martins de Deus

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança
para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química
no âmbito de Dupla Diplomação com a
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Ponta Grossa

Orientado por:

Tiane Cristine Finimundy (CIMO/IPB)
Maria da Conceição Constantino Fernandes (ESA/IPB)
Simone Delezuk Inglez (UTFPR)

Bragança

2022

“O bem que praticares em algum lugar é o teu advogado em toda parte”

- Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Muito trabalho foi feito e nada disso seria possível sem a colaboração de pessoas incríveis, às quais admiro muito pela competência.

Às minhas orientadoras, Tiane Cristine Finimundy, Conceição Fernandes e Simone Delezuk Inglez, agradeço pelo tamanho aprendizado, lições que vão muito além de questões técnicas e acadêmicas.

Agradeço também, por toda disponibilidade e suporte na execução deste trabalho, Leonardo Corrêa na extração, Débora Bortolini, Suelen Frantz e Mikel Ortega na execução dos ensaios de atividade antioxidante, Tânia Pires na execução dos ensaios de atividade antimicrobiana, Filipa Mandim na execução dos ensaios para atividade anti-inflamatória e de citotoxicidade, Beatriz Paschoalinotto na cromatografia e Bruno Melgar e Prof Dr José Mario Escudeiro na análise estatística.

Sou imensamente grato a Deus, N. Sra. de Fátima e todos os espíritos e pessoas de luz que me ampararam nos meus momentos de dificuldade e me abençoaram com a oportunidade de viver algo fantástico ao lado de pessoas fantásticas.

Agradeço muito a mim pelo esforço, dedicação, persistência e entrega que no passado me permitiram tomar a decisão de embarcar nessa jornada e que atualmente refletem no ser humano e profissional que sou. Vou continuar sempre entregando o meu melhor enquanto batalho pelo que sonho e acredito. Sempre!

Maria Helena, Iremar e Marcel, minha família, meu alicerce, sou muito grato pelo suporte incondicional ao longo de toda a minha trajetória acadêmica e também por tudo que vocês fazem por mim e representam na minha vida, um gigantesco obrigado! Amo vocês!

Aos meus amigos do apartamento 3º esquerdo, Joãozinho, Nayrinha, Pão, Tesuka, JP e Gold, sou muito grato que foram vocês a viver tudo isto comigo. Descobrimos um mundo novo juntos, aprendemos muito uns com os outros e tenho certeza que construímos laços que são para sempre.

Aos meus amigos do Brasil e também aos que conheci em Bragança, vocês em muitos momentos foram minha fortaleza e me ajudaram a me manter centrado nas escolhas que fiz para a minha vida. Vivemos tantos momentos juntos, momentos especiais que ficarão para sempre na memória. Não vou citar os nomes, mas no seu coração, você sabe que esse agradecimento é para você e do quanto eu sou legitimamente feliz por ter sua amizade.

Me sinto privilegiado por estar cercado de pessoas com coração de ouro! Sou abençoado com uma grande família! Obrigado Bragança, obrigado Portugal!

Sou grato às instituições de tanto prestígio e excelência que me acolheram por todos esses anos e das quais tenho muito orgulho em fazer parte.

Agradeço imensamente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), aos meus professores do curso de Engenharia Química, aos projetos de extensão que fiz parte e ao acordo de Dupla Diplomação. Viva a Universidade Pública e a educação de qualidade!

Agradeço ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) por me receber de forma tão calorosa, por possibilitar-me conhecer essa cultura tão rica e pelo acordo de Dupla Diplomação, a oportunidade que abriu minha cabeça para novos sonhos e possibilidades. Em facto, cá pude conhecer amigos que são para sempre. Obrigado, família IPB.

Ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e aos laboratórios de Química e Bioquímica Aplicada (LQBA), de Agroindústria e de Aquacultura agradeço pela estrutura, oportunidade e pelas pessoas excepcionais.

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e aos fundos nacionais FCT/MCTES (PIDDAC) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2021).



Resumo

Frente a um mercado consumidor cada vez mais preocupado com a saúde e efeitos deletérios de aditivos químicos, as plantas vem sendo objetos de estudo por suas propriedades bioativas, funcionais e terapêuticas diretamente associadas aos seus fitoconstituintes, em especial os compostos fenólicos. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis de compostos fenólicos, as bioatividades e a toxicidade *in vivo* dos extratos obtidos por maceração utilizando como solvente etanol:água (80:20; v/v) de espécies vegetais da flora Europeia, nomeadamente *Calendula officinalis* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Hippophae rhamnoides* L., *Juglans regia* L., *Mentha cervina* L., *Populus nigra* L., *Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Sambucus nigra* L. e *Vitis vinifera* L., visando a valorização de recursos naturais em potenciais aplicações para as indústrias alimentícia, cosmética e/ou farmacêutica.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, sendo identificados ácidos fenólicos, a exemplo de derivados do ácido cafeico, assim como elagitaninos, flavonóis e flavonas. O total de compostos fenólicos em cada amostra foi de 130 mg/g (*C. scoparius*), 123 mg/g (*H. rhamnoides*), 106 mg/g (*S. nigra*), 100 mg/g (*R. idaeus*), 96 mg/g (*J. regia*), 80 mg/g (*C. vulgaris*), 82 mg/g (*R. fruticosus*), 78 mg/g (*M. cervina*), 29,3 mg/g (*P. nigra*), 21,0 mg/g (*C. officinalis*), 16,0 mg/g (*V. vinifera*) de extrato seco. No que diz respeito às bioatividades, as diferentes espécies, em geral demonstraram potencial antioxidante nas metodologias utilizadas, nomeadamente, inibição da peroxidação lipídica por espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Em relação a atividade antimicrobiana, todos os extratos apresentaram alguma atividade sobre os fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em especial *H. rhamnoides* com valores de concentração inibitória mínima (CIM) menores que 2,5 mg/mL para a maioria das bactérias de contaminação de produtos alimentares e cosméticos testadas.

Na avaliação da toxicidade *in vitro* em linhas celulares tumorais (AGS: adenocarcinoma gástrico; CaCo-2: adenocarcinoma colorrectal; MCF-7: adenocarcinoma de mama) e não tumorais (VERO: rim de macaco; PLP₂: fígado de porco), o extrato da *P. nigra* apresentou maior atividade citotóxica com valores de CI₅₀ entre 51 e 85 µg/mL enquanto os extratos da *S. nigra* e *V. vinifera* evidenciaram pouca ou nenhuma atividade na concentração máxima testada (400 µg/mL). Os resultados de toxicidade *in vivo* em microcrustáceos *Artemia salina* sugerem potencial de baixa toxicidade para os extratos, com LC₅₀ > 400 mg/L. Desta forma, foi demonstrado que esses extratos podem ser ingredientes promissores

para aplicações industriais e em oportunidades de inovação devido à riqueza no conteúdo e na expressão de propriedades bioativas, agregando valor para a cadeia produtiva.

Palavras-chave: Compostos Fenólicos; Bioatividades; Atividade Antioxidante; Atividade Antimicrobiana; Toxicidade *in vitro*; Toxicidade *in vivo*; *Artemia salina*; Flora Europeia; Potencial de Desenvolvimento de Produto.

Abstract

Due to the increasing concern of the consumer market with health and the deleterious effects of chemical additives, plants have been objects of study for their bioactive, functional and therapeutic properties directly associated with its phytoconstituents, especially the phenolic compounds. From this perspective, the present study aimed to evaluate the phenolic compounds profiles, bioactivities and *in vivo* toxicity of extracts obtained by maceration using ethanol:water (80:20; v/v) as solvent of plant species from European flora, namely *Calendula officinalis* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Hippophae rhamnoides* L., *Juglans regia* L., *Mentha cervina* L., *Populus nigra* L., *Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Sambucus nigra* L. and *Vitis vinifera* L., in order to promote the valorization of natural resources in potential applications for the food, cosmetic and/or pharmaceutical industries.

The profile of phenolic compounds was determined by HPLC-DAD-ESI-MS/MS, and phenolic acids, such as caffeic acid derivatives, as well as ellagitannins, flavonols and flavones were identified. The total of phenolic compounds in each sample was 130 mg/g (*C. scoparius*), 123 mg/g (*H. rhamnoides*), 106 mg/g (*S. nigra*), 100 mg/g (*R. idaeus*), 96 mg/g (*J. regia*), 80 mg/g (*C. vulgaris*), 82 mg/g (*R. fruticosus*), 78 mg/g (*M. cervina*), 29.3 mg/g (*P. nigra*), 21.0 mg/g (*C. officinalis*), 16.0 mg/g (*V. vinifera*) of dry extract. Regarding the bioactivities, the different species, in general, showed antioxidant potential in the applied methodologies, namely, inhibition of lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive species (TBARS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals scavenging (DPPH) and inhibition of oxidative hemolysis (OxHLIA). Regarding antimicrobial activity, all extracts showed some activity against fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria, especially *H. rhamnoides* with minimum inhibitory concentration values (MIC) lower than 2.5 mg/mL for most of tested food and cosmetics contaminant bacteria.

In the evaluation of *in vitro* toxicity in tumor (AGS: gastric adenocarcinoma; CaCo-2: colorectal adenocarcinoma; MCF-7: breast adenocarcinoma) and non-tumor (VERO: monkey kidney; PLP₂: pig liver) cell lines, the extract from *P. nigra* showed higher cytotoxic activity with GI₅₀ values between 51 and 85 µg/mL while extracts from *S. nigra* and *V. vinifera* showed little or no activity at the maximum concentration tested (400 µg/mL). The results of *in vivo* toxicity in *Artemia salina* microcrustaceans suggest potential of low toxicity for the extracts, with LC₅₀ > 400 mg/L. Therefore, it was demonstrated that these extracts can be promising ingredients for industrial applications and innovation opportunities

due to the richness in content and bioactive properties expression, adding value to the production chain.

Key-words: Phenolic Compounds; Bioactivities; Antioxidant Activity; Antimicrobial Activity; *In vitro* Toxicity; *In vivo* Toxicity; *Artemia salina*; European Flora; Product Development Potential.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Plantas como Componentes Naturais.....	3
2.2. Plantas como Fontes de Compostos Bioativos.....	4
2.3. Propriedades Bioativas dos Compostos Fenólicos.....	5
2.3.1. <i>Atividade Antioxidante</i>	7
2.3.2. <i>Atividade Anti-inflamatória</i>	8
2.3.3. <i>Atividade Antimicrobiana</i>	9
2.4. Avaliação da Toxicidade de Extratos Vegetais.....	10
2.4.1. <i>Toxicidade in vivo em Microcrustáceos Artemia salina</i>	11
2.4.2. <i>Citotoxicidade em Células Tumoriais e Não Tumoriais</i>	13
2.5. Importância Etnofarmacológica e Etnobotânica das Plantas Europeias.....	14
2.5.1. <i>Calendula officinalis</i> L.....	14
2.5.2. <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.....	16
2.5.3. <i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link.....	17
2.5.4. <i>Hippophae rhamnoides</i> L.....	17
2.5.5. <i>Juglans regia</i> L.....	18
2.5.6. <i>Mentha cervina</i> L.....	19
2.5.7. <i>Populus nigra</i> L.....	20
2.5.8. <i>Rubus fruticosus</i> L. e <i>Rubus idaeus</i> L.....	21
2.5.9. <i>Sambucus nigra</i> L.....	22
2.5.10. <i>Vitis vinifera</i> L.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Seleção e Tratamento das Espécies Vegetais.....	26
4.2. Obtenção do Extrato Hidroetanólico.....	27
4.3. Perfil dos Compostos Fenólicos obtidos por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ.....	28

4.4.	Ensaio para Avaliação da Atividade Antioxidante.....	29
4.4.1.	Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	29
4.4.2.	Método da Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA).....	31
4.4.3.	Método do Efeito Captador de Radicais Livres (DPPH).....	32
4.5.	Atividade Anti-inflamatória pela Inibição da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos de Rato RAW 264.7.....	32
4.6.	Atividade Antimicrobiana pelo Método da Microdiluição.....	33
4.7.	Citotoxicidade em Linhas Celulares Tumorais e Não Tumorais pelo Método SRB.....	35
4.8.	Determinação da Toxicidade Aguda em Microcrustáceos <i>Artemia salina</i>	37
4.9.	Análise Estatística.....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1.	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	39
5.2.	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	42
5.3.	Avaliação da Atividade Anti-inflamatória.....	44
5.4.	Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	45
5.5.	Avaliação da Toxicidade Aguda <i>in vivo</i>	47
5.6.	Avaliação do Perfil de Compostos Fenólicos e do Rendimento da Extração.....	48
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A.....	66
	ANEXO B.....	67
	ANEXO C.....	68
	ANEXO D.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Classificação geral dos compostos fenólicos.....	6
Figura 2. <i>Artemia salina</i> : (a) Macho adulto; (b) Fêmea adulta; (c) Ciclo de vida.....	12
Figura 3. Espécies vegetais estudadas: (a) <i>Calendula officinalis</i> L.; (b) <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull; (c) <i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link; (d) <i>Hippophae rhamnoides</i> L.; (e) <i>Juglans regia</i> L.; (f) <i>Mentha cervina</i> L.; (g) <i>Populus nigra</i> L.; (h) <i>Rubus fruticosus</i> L.; (i) <i>Rubus idaeus</i> L.; (j) <i>Sambucus nigra</i> L.; (k) <i>Vitis vinifera</i> L.....	15
Figura 4. Localização geográfica da origem das espécies vegetais.....	27
Figura 5. Processo de extração: (a) Extração sob agitação magnética; (b) Filtração; (c) Evaporação rotativa; (d) Frascos antes da liofilização; (e) Frascos após a liofilização.....	27
Figura 6. HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ : sistema disponível nos laboratórios do CIMO.....	29
Figura 7. Aspeto das microplacas para o ensaio TBARS: (a) Ao final das reações oxidativas; (b) Para leitura.....	30
Figura 8. Aspeto da microplaca para leitura no ensaio DPPH.....	32
Figura 9. Materiais para ensaio da microdiluição: (a) Crescimento bacteriano em placas; (b) Aspeto da microplaca após adição do indicador INT.....	35
Figura 10. Ensaio com <i>Artemia salina</i> : (a) Sistema para eclosão dos quistos; (b) Placa com as soluções dos extratos.....	37
Figura 11. Dendrogramas com destaque para menores IC ₅₀ : (a) Resultados TBARS; (b) Resultados DPPH; (c) Resultados OxHLIA com $\Delta t = 60$ minutos; (d) Resultados OxHLIA com $\Delta t = 120$ minutos.....	41
Figura 12. Quantificação das classes de compostos fenólicos identificadas nos extratos.....	51
Figura D1. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Calendula officinalis</i> em 280 e 370 nm.....	79
Figura D2. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Calluna vulgaris</i> em 280 e 370 nm.....	79
Figura D3. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Cytisus scoparius</i> em 280 e 370 nm.....	80
Figura D4. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Hippophae rhamnoides</i> em 280 e 370 nm.....	80
Figura D5. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Juglans regia</i> em 280 e 370 nm.....	81

Figura D6. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Mentha cervina</i> em 280 e 370 nm.....	81
Figura D7. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Populus nigra</i> em 280 e 370 nm.....	82
Figura D8. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Rubus fruticosus</i> em 280 e 370 nm.....	82
Figura D9. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Rubus idaeus</i> em 280 e 370 nm.....	83
Figura D10. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Sambucus nigra</i> em 280 e 370 nm.....	83
Figura D11. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da <i>Vitis vinifera</i> em 280 e 370 nm.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Códigos, partes vegetais e origens das amostras.....	26
Tabela 2. Resultados da atividade antioxidante para os métodos TBARS, DPPH e OxHLIA - Concentração inibitória média (IC ₅₀), em µg/mL.....	39
Tabela 3. Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), em mg/mL.....	43
Tabela 4. Resultados da atividade citotóxica dos extratos - Concentração de inibição da proliferação celular média (CI ₅₀), em µg/mL.....	46
Tabela 5. Resultados de toxicidade aguda em microcrustáceos <i>A. salina</i> - Concentração Letal (LC ₅₀) às 24 horas, em mg/L.....	48
Tabela 6. Resultados dos rendimentos de extração por maceração dos extratos.....	49
Tabela 7. Compostos fenólicos maioritários identificados nos extratos.....	50
Tabela A1. Resultados de CIM, CBM e CFM para os controlos utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana.....	66
Tabela B1. Curvas de calibração ($R^2 \geq 0,999$) obtidas a partir dos padrões disponíveis.....	67
Tabela C1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Calendula officinalis</i>	69
Tabela C2. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Calluna vulgaris</i>	68
Tabela C3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Cytisus scoparius</i>	70
Tabela C4. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Hippophae rhamnoides</i>	71
Tabela C5. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Juglans regia</i>	72
Tabela C6. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Mentha cervina</i>	73
Tabela C7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Populus nigra</i>	74
Tabela C8. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Rubus fruticosus</i>	75

Tabela C9. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Rubus idaeus</i>	76
Tabela C10. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Sambucus nigra</i>	77
Tabela C11. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da <i>Vitis vinifera</i>	78

LISTA DE ACRÓNIMOS

- AAPH** – Dicloridrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano)
- AGS** – Linha de células tumorais do adenocarcinoma gástrico
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BHA** – Hidroxianisol butilado
- BHT** – Hidroxitoluna butilada
- CaCo-2** – Linha de células tumorais do adenocarcinoma colorrectal
- CAS** – Número de registo de um composto no *Chemical Abstract Services*
- CBM** – Concentração bactericida mínima
- CFM** – Concentração fungicida mínima
- CI₅₀** – Concentração que inibe a proliferação celular em 50%
- CIM** – Concentração inibitória mínima
- CIMO** – Centro de Investigação de Montanha
- CosIng** – *Cosmetic Ingredient database*
- DMEM** – Meio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- E211** – Aditivo sintético benzoato de sódio
- E224** – Aditivo sintético metabissulfito de potássio
- ERN** – Espécies Reativas de Nitrogénio
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigénio
- H1N1** – Vírus da *influenza*
- HeLa** – Linha de células tumorais do carcinoma cervical
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPLC-DAD-ESI-MS/MS** – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detetores de arranjo de díodos e espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray
- HSV** – Herpes-vírus simples
- Ht₅₀** – Tempo de meia hemólise
- IC₅₀** – Concentração inibitória média
- INT** – Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio

- LC₅₀** – Concentração letal a 50% dos organismos de teste
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- MCF-7** – Linha de células tumorais do adenocarcinoma de mama
- MEB** – Meio de cultivo *Malt Extract Broth*
- MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina
- MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- NCI-H460** – Linha de células tumorais do carcinoma pulmonar
- OCDE** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
- OxHLIA** – Inibição da hemólise oxidativa
- PBS** – Tampão fosfato salino
- PLP₂** – Cultura primária de células não tumorais do fígado de porco
- RAW 264.7** – Linha de macrófagos de ratos
- RPMI-1640** – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
- SRB** – Sulforodamina B
- TBARS** – Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
- Tr** – Tempo de retenção
- Tris** – Tris(hidroximetil)aminometano
- Trolox** – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
- TSB** – Meio de cultivo *Tryptone Soy Broth*
- TWEEN** – Tensoativo não iónico
- UFC** – Unidades formadoras de colónias
- UV** – Radiação ultravioleta
- UV-Vis** – Espectro visível da radiação ultravioleta
- VERO** – Linha de células não tumorais do rim de macaco verde africano
- λ_{\max} – Comprimento de onda de absorção máxima

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem inestimável importância no equilíbrio de ecossistemas, sendo utilizadas pelo ser humano para diversas finalidades além da alimentação [1]. Uma das aplicações mais amplas é na medicina tradicional, a partir da qual o conhecimento prático é secular, sendo empregadas no tratamento e prevenção de uma série de enfermidades [2]. Nos últimos anos, tem sido despertado o interesse de pesquisadores de todo o mundo em relação aos efeitos benéficos dos fitoquímicos, podendo ser utilizados em aplicações industriais, especialmente na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica [3]. Agregar valor a esses produtos é de elevado interesse econômico e ambiental para a indústria, o que exige pesquisas científicas e tecnológicas que permitam seu uso eficiente, econômico e seguro [4].

Com a crescente preocupação da população com os riscos que aditivos sintéticos podem representar à saúde, a demanda por produtos contendo ingredientes de fonte natural vem crescendo cada vez mais. Os compostos obtidos a partir de plantas, se mostram como potenciais substitutos com propriedades biológicas únicas que agregam valor funcional ao produto final [1], [3], [5], [6]. Nesse sentido, a inserção de plantas da flora europeia no ciclo de valor surge como uma importante prática de inovação orientada para a sustentabilidade ao contribuir para a utilização mais eficiente dos biorecursos.

De entre os fitoquímicos, destacam-se os compostos fenólicos, um numeroso grupo de compostos que são biossintetizados pelas plantas em funções metabólicas e em resposta a estresses do ambiente e que se encontram diretamente associados à propriedades bioativas, como por exemplo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana [7–9]. Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante ao atuar na neutralização de radicais livres por meio de diferentes mecanismos, protegendo o organismo e retardando o processo de envelhecimento [10] enquanto podem atuar como antimicrobianos através da inibição do crescimento ou matando microrganismos, sendo extremamente visados para conservação de produtos em substituição a conservantes químicos e na avaliação de potencial terapêutico como alternativo aos antibióticos comerciais [6].

A introdução de novas substâncias químicas em produtos levanta uma preocupação a respeito do impacto que pode representar aos organismos vivos e ao meio ambiente, de modo que ensaios de toxicidade se configuram de extrema relevância para avaliar os efeitos adversos [14], [15]. Os ensaios *in vitro* são importantes para fornecer um panorama inicial sobre como pode ser a resposta de um organismo à substância e representam meios

amplamente empregados no estudo do potencial terapêutico de compostos de origem biológica ou de síntese [12]. Ensaio *in vivo*, por sua vez, permitem avaliar de forma mais completa e sistêmica os efeitos toxicológicos de uma substância em um organismo de teste, representando importantes passos para a validação da segurança do uso de uma determinada substância para diferentes finalidades [13], [14]. O microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* tem sido largamente utilizado para a determinação da toxicidade aguda de substâncias devido à facilidade em obter indivíduos viáveis em qualquer momento do ano a partir de ovos com metabolismo interrompido (quistos) que podem ser armazenados por muito tempo [15].

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho é caracterizar quimicamente os extratos obtidos das plantas da flora europeia, avaliar suas bioatividades e a toxicidade visando a aplicação e desenvolvimento de um produto industrial, em potencial nas áreas cosmética, alimentícia ou de medicamentos. As plantas selecionadas como objeto de estudo são autóctones da Europa, nomeadamente *Calendula officinalis* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Hippophae rhamnoides* L., *Juglans regia* L., *Mentha cervina* L., *Populus nigra* L., *Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Sambucus nigra* L. e *Vitis vinifera* L.. O facto de poderem ser encontradas em território europeu promove a valorização de recursos regionais e corrobora para a viabilização da obtenção de matéria-prima, com vista a aplicações práticas para a indústria.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas como Componentes Naturais

Historicamente, as plantas possuem um papel crucial no equilíbrio dos ecossistemas devido ao facto de se configurarem como fonte primária de alimentação animal e humana, sendo também essenciais para a regulação climática. Seus usos podem ser aplicáveis para diversas finalidades, como abrigo, vestimenta, medicina, expressões artísticas e culturais, ornamentação, entre outras [1], [3], [5].

Algumas propriedades observadas nas plantas são estudadas como resultados da sabedoria da medicina tradicional, através da qual as plantas vêm sendo aplicadas por séculos para o tratamento e prevenção de diversas enfermidades de modo mais acessível e com efeitos colaterais reduzidos [2], [5], [9], [16], [17].

Os compostos obtidos das plantas também são objeto de estudo para aplicações industriais, a exemplo das áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica, devido ao potencial de apresentar bioatividades benéficas para a manutenção geral da saúde humana [3], [5], [8], [18]. Neste contexto, seus benefícios vão além de seu valor nutricional, elevando o valor económico agregado e estimulando o avanço na investigação para garantir a segurança e qualidade [17], [19]. Mesmo resíduos vegetais de processos produtivos podem representar fontes para a obtenção de moléculas bioativas que estão presentes, contribuindo para a valorização de cadeias produtivas e para a perspectiva da economia circular e da inovação [6], [20].

Atualmente, existe elevada preocupação por parte do mercado consumidor com relação aos ingredientes das formulações dos produtos que consomem, realçada pela associação de alguns compostos sintéticos, a exemplo de conservantes e corantes, com o desencadeamento de doenças crónicas, como cancro, diabetes, hipertensão, problemas cardiovasculares e gastrointestinais, males de Parkinson e Alzheimer, e até mesmo o processo de envelhecimento precoce [18], [21–24]. Aliado a esta preocupação, há também o receio do surgimento de microrganismos resistentes a antibióticos e aos métodos de preservação aplicados atualmente, os quais podem apresentar efeitos deletérios ao organismo [6], [25], [26]. Frente a esta demanda cada vez mais urgente, a indústria vem buscando substâncias capazes de agregar valor funcional aos produtos, em substituição aos compostos

sintéticos, sendo as plantas e seus extratos promissores candidatos, por se configurarem como um importante “celeiro” de compostos com propriedades únicas [1], [27].

Apesar da grande evolução no estudo dos fitoquímicos, ainda há a necessidade de muito esforço para caracterizar as espécies vegetais e compreender a resposta biológica dos seus componentes (de forma combinada e individualmente) para que seu uso possa ser avaliado para larga escala [23], [28].

2.2 Plantas como Fontes de Compostos Bioativos

A investigação acerca da composição química da matéria vegetal possui notória importância científica, uma vez que moléculas com propriedades bioativas podem ser encontradas em todas as partes anatômicas [8]. Existem diversos fatores que podem afetar diretamente a produção e a composição dos compostos fenólicos nos tecidos da planta, de modo que, mesmo para uma mesma espécie, variações são observáveis em uma ou mais partes. Isso está dependente de fatores como: tipo de solo, clima, altitude e fotoperíodo, estágio de maturidade, práticas agronômicas utilizadas no cultivo e no armazenamento, processamento do material após a colheita, bem como condições de estresse às quais a planta foi submetida [7], [8], [28–30].

Para além do exposto, os métodos empregados na extração dos compostos afetam diretamente os resultados da caracterização química, o que pode dificultar a comparabilidade de resultados [24], [31], [32], por isso, a metodologia de extração deve ser padronizada. A extração de compostos bioativos depende de vários fatores, tais como a temperatura, o solvente utilizado e a sua concentração, a pressão, o tempo de extração e a razão sólido/solvente [33], [34]. Diversos solventes podem ser utilizados, sendo que os polares como metanol, etanol, água, acetona e acetato de etilo são tidos como os melhores para a extração de compostos fenólicos, sendo que as extrações com soluções etanólicas ou hidroetanólicas possuem a vantagem de envolverem processos mais sustentáveis, uma vez que fazem uso de um solvente “verde”, de origem renovável, de fácil recuperação e reuso, ao mesmo tempo que preserva a qualidade e segurança dos produtos finais [9], [31], [35], [36].

A temperatura da extração também é determinante para os resultados e deve ser considerada em função do tipo de composto que se procura. O emprego de temperaturas elevadas pode degradar componentes sensíveis à temperatura (termolábeis), enquanto

temperaturas baixas, podem não ser efetivas para a extração de determinados compostos químicos [10], [32], [33]. Neste contexto, é essencial proceder investigação detalhada a respeito da matriz vegetal que se está a estudar, bem como sobre a composição que se deseja para o extrato.

Existem várias técnicas para a extração de compostos fenólicos de origem natural. Relativamente à extração propriamente dita, existem essencialmente duas tipologias de métodos: os convencionais, como maceração, a hidrodestilação e a extração com Soxhlet, e os não-convencionais, como a extração por fluído supercrítico, a assistida por ultrassom e por micro-ondas [31], [34].

Os extratos contêm uma grande diversidade de componentes químicos, e dada a sua utilização posterior para aplicação no estudo da sua atividade biológica, têm de passar por uma fase de purificação com o intuito de remover os interferentes, os quais poderiam influenciar os resultados dos testes subsequentes [34]. Nos estudos mais recentes, o método mais empregado para separação, quantificação e identificação dos compostos presentes em extratos vegetais consiste na combinação das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada aos detetores de Arranjo de Díodos e Espectrometria de Massas (HPLC-DAD-MS) [28].

2.3 Propriedades Bioativas dos Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um importante e numeroso grupo de compostos cuja estrutura genérica consiste em um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo como substituintes, podendo se subdividir em diversos subgrupos de acordo com a sua estrutura química e reatividade. Podem apresentar estruturas moleculares simples (com um anel benzénico e um ou mais grupos hidroxilo) e até mesmo estruturas poliméricas mais complexas [7], [8], [21], [31], [37].

Com respeito à classificação, podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos, dos quais os dois primeiros são os maiores grupos. Os ácidos fenólicos são derivados hidroxilados dos ácidos benzoico e cinâmico. Os flavonoides são divididos em diversas subclasses de acordo com a sua estrutura química: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas e sua estrutura básica é de difenilpropano, consistindo em dois anéis aromáticos conectados por três átomos de carbono (C6 – C3 –

C6), sendo diferenciados pela quantidade, tipo e localização dos substituintes [8], [21], [38]. A **Figura 1** representa de forma esquemática a classificação geral dos compostos fenólicos.

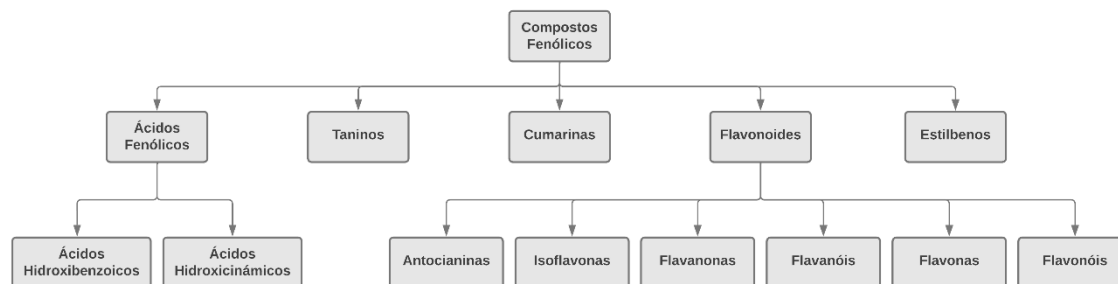


Figura 1. Classificação geral dos compostos fenólicos – Fonte: Adaptado de J. Araújo (2019). *Química de Alimentos: teoria e prática*. 7. ed.. Viçosa. UFV. 666 p.

Nas plantas, os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos a partir de diferentes mecanismos enzimáticos em resposta a estresses do ambiente externo e para exercer funções como: atração de polinizadores, pigmentação, atuação em mecanismos de defesa da planta contra estresse oxidativo, raios UV, patógenos e danos aos tecidos vegetais, estando também envolvidos em diversos processos fisiológicos como o crescimento e o desenvolvimento de frutos [7], [21], [30], [31].

Esses compostos são importantes para a saúde humana devido aos efeitos benéficos na prevenção ou redução da incidência de várias doenças, pois são antioxidantes naturais [39]. A atividade biológica dos compostos fenólicos depende primariamente da sua absorção e metabolização, que, por sua vez, está relacionada com a estrutura química, conjugação com outras substâncias, grau de polimerização e solubilidade [8], [39], [40]. A literatura reporta propriedades bioativas dos compostos fenólicos que incluem a ação antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras atividades [9], [21], [26], [30], [31], [40], [41].

O efeito biológico individual de uma molécula química pode não ser o mesmo quando falamos de uma mistura complexa de compostos presentes em um extrato vegetal. A medicina tradicional utiliza extratos de plantas para prevenir e tratar algumas patologias, e não compostos isolados [2], [12]. De facto, muitas das utilizações tradicionais de plantas já foram cientificamente comprovadas. Além disso, se um extrato apresentar uma atividade biológica, cujo efeito poderá ser resultado de interações sinérgicas, então, a nível de viabilização industrial, a sua obtenção será economicamente mais rentável se comparada ao isolamento de compostos bioativos [1], [2], [8], [12].

2.3.1 Atividade Antioxidante

A oxidação se configura como um processo essencial para a geração de energia para as atividades celulares em regime aeróbico, contudo, há também a geração de radicais livres como consequência deste processo [21], [31], [42]. As Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) causam danos estruturais às células através de reações em cadeia, que induzem a oxidação de lípidos da membrana celular, das proteínas dos tecidos e do DNA, sendo precursores de processos inflamatórios e doenças como cancro, mal de Alzheimer e aterosclerose [6], [8], [21], [43]. Os danos ao DNA causados pelos processos oxidativos ao longo da vida estão altamente relacionados com condições como a carcinogénese, mutações e o processo de envelhecimento [10], [21], [22], [42]. Alguns exemplos de ERO são radicais hidroxilo, superóxidos, radicais orgânicos e inorgânicos, peróxido de hidrogênio, entre outros [21], [31].

As propriedades antioxidantes atribuídas aos compostos fenólicos são pautadas na capacidade do anel aromático de estabilizar e deslocar elétrons desemparelhados devido ao sistema de ligações duplas conjugadas, bem como à existência dos grupos hidroxilo. A presença destes elementos permite a ocorrência de diferentes mecanismos reativos responsáveis pela neutralização de radicais livres já existentes e evitando a formação de novos quando promove a formação de um “produto final” estável, impedindo a propagação das reações em cadeia [1], [6], [22], [29]. O mecanismo através do qual o composto fenólico atua depende do potencial de oxi-redução apresentado pelos hidroxilos substituintes, conferindo o caráter de agente redutor (captura de elétron), doador de hidrogênio ou capturador de oxigênio [1], [29]. É reportado pela literatura a capacidade de os compostos fenólicos atuarem como agentes quelantes de iões metálicos e também pela contenção de singletos de oxigênio, os principais precursores da formação de ERO [1], [6].

Como os antioxidantes são responsáveis por proteger o corpo humano contra o estresse oxidativo e, consequentemente, das doenças a ele associadas, é de crescente interesse que cada vez mais estes elementos sejam fornecidos ao organismo através de alimentos, cosméticos ou fármacos [1], [10], [21].

Na indústria alimentícia, os antioxidantes são empregues com a finalidade de aumentar o tempo de prateleira dos produtos, especialmente dos que contém lípidos insaturados em sua composição, mais sujeitos a ação oxidativa dos radicais livres [18], [44], [45]. Com a crescente preocupação sobre o uso de antioxidantes sintéticos, a exemplo do

hidroxianisol butilado (BHA) e a hidroxitoluna butilada (BHT), aos quais diversos estudos sugerem efeitos tóxicos e mutagênicos, as plantas contendo diversos compostos fenólicos se configuram como fontes de antioxidantes de origem natural potencialmente oferecendo menor toxicidade e efeitos colaterais reduzidos [22], [43–45].

Não há um método padrão para a determinação do potencial antioxidante de um extrato vegetal, o que pode levar a dificuldades na interpretação de resultados oriundos de diferentes ensaios. Tal disparidade é observada por conta de que diferentes ensaios podem se basear em diferentes mecanismos de atuação dos compostos com relação à espécie reativa. Frente a isto, o procedimento a se adotar é a realização de um conjunto de ensaios, cujos resultados são complementares, no sentido de investigar melhor o mecanismo através do qual o composto atua com melhor desempenho [24], [46].

Dos métodos *in vitro* disponíveis para a determinação da atividade antioxidante, o mais difundido é o método DPPH, baseado na captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil principalmente através do mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio. É tido como um método simples, barato, rápido e com boa reprodutibilidade, contudo, a relevância dos resultados para efeitos práticos pode ser questionável por conta dos radicais DPPH não estarem presentes no organismo [1], [8], [30], [31], [38].

Frente a isso, métodos que mimetizam o sistema humano podem ser utilizados. O ensaio TBARS é baseado na inibição da peroxidação de lípidos pelas espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, tendo como fonte de lípidos o cérebro de porco [34], [47]. O ensaio OxHLIA é baseado na inibição da hemólise oxidativa de eritrócitos do sangue de ovinos saudáveis pela ação de radicais peróxido gerados a partir da substância dicloridrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano), conhecida pela sigla AAPH [48].

2.3.2 Atividade Anti-inflamatória

Um processo inflamatório consiste em uma resposta do sistema imunológico a, por exemplo, patógenos ou alergênicos, acarretando danos aos tecidos. Em decorrência de uma resposta imunológica, células especiais são acionadas para combater os agentes externos [6], [7]. Neutrófilos e macrófagos promovem a geração de radicais livres de oxigênio (ERO) e também de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), especialmente de óxido nítrico (NO) na região lesionada com o objetivo de ativar enzimas e fatores de transcrição que regulam a

secreção de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias, causando inflamação do tecido e acionamento de células do sistema imune [6], [7].

A produção em excesso destas moléculas sinalizadoras está associada com o aumento do risco do desenvolvimento de doenças crônicas, como problemas cardiovasculares, obesidade, diabetes e cancro [7], [18]. Frente ao exposto, substâncias antioxidantes possuem um papel essencial na atenuação da reação inflamatória das doenças mencionadas.

Um método para a avaliação da atividade anti-inflamatória reportado na literatura de forma recorrente é o ensaio com macrófagos de rato (RAW 264.7), cujo princípio está na verificação da capacidade do extrato em inibir a produção de óxido nítrico (NO) após o estímulo da resposta dos macrófagos com uma solução de lipopolissacarídeo (LPS) [49].

2.3.3 Atividade Antimicrobiana

A presença de fungos e bactérias é uma preocupação constante na indústria por conta do comprometimento da qualidade e da segurança dos produtos, podendo causar intoxicações ou patologias ao consumidor por conter microrganismos infecciosos ou as toxinas por eles produzidas. As contaminações ocasionam processos que levam a alterações nas características dos produtos, gerando desperdícios e perdas financeiras [7], [35], [44].

Os compostos fenólicos podem apresentar atividade antimicrobiana (fungistática, fungicida, bacteriostática e bactericida), tornando-os fontes de interesse para as indústrias alimentar e cosmética em substituição aos conservantes e farmacêutica em substituição aos antibióticos, cujo uso em demasia pode levar ao surgimento de espécies microbianas resistentes [6], [18].

O mecanismo de atuação dos compostos fenólicos consiste em provocar alterações na estrutura da membrana celular dos microrganismos ao se acumular na bicamada lipídica, de modo a conseguir penetrar na célula e causar sua ruptura após exercer seus efeitos inibitórios, comumente associados ao número de grupos hidroxilo e ao grau de polimerização das moléculas, no citoplasma [6].

De entre os métodos mais conhecidos para a avaliação da atividade antimicrobiana podem ser citados o método da microdiluição e o método de disco-difusão. O método da microdiluição é tido como um dos mais confiáveis por não sofrer influência da velocidade de crescimento do microrganismo e por fornecer resultados quantitativos [50].

2.4 Avaliação da Toxicidade de Extratos Vegetais

A introdução de novas substâncias químicas para uso em maior escala, como na formulação de produtos comerciais, leva a preocupações sobre o impacto que podem ter ao entrar em contato com organismos vivos. Neste sentido, agências regulatórias exigem que sejam apresentados relatórios de evidências sobre a segurança para o uso no tocante à toxicidade de seus componentes anteriormente à autorização da comercialização dos produtos [11], [13], [14].

Através de ensaios de toxicidade é possível avaliar a ocorrência de efeitos adversos de uma ou várias substâncias em sistemas biológicos [11], [51], [52]. Os ensaios *in vitro*, via de regra, avaliam a viabilidade celular com base no metabolismo das células, sendo pertinente a avaliação de diferentes linhas de células tumorais e não tumorais [53]. Já os ensaios *in vivo* são realizados geralmente em animais como microcrustáceos, peixes e ratos, avaliando as respostas globais dos organismos [11], [14], [54], [55].

Existem diversos métodos para a determinação da citotoxicidade *in vitro*, estando os métodos MTT e SRB entre os mais aplicados. Ambos os métodos se baseiam na determinação colorimétrica de proteínas para determinar o número de células ao final do período de incubação, verificando a ocorrência de potenciais efeitos inibitórios causados pela adição dos extratos, contudo, sem conseguir distinguir entre efeitos citostáticos (que promovem a estagnação do crescimento celular) ou citotóxicos (que promovem a diminuição do número de células) [53], [54]. De acordo com a literatura, o método SRB permite quantificar indiretamente o número de células e a proliferação celular. É utilizado o corante Sulforodamina B de cor rosa brilhante, capaz de ligar – em condições fracamente ácidas – os resíduos básicos de proteínas por meio de seus dois grupos sulfônicos. Este teste então mede o conteúdo total de proteína celular, que deve ser proporcional ao número de células no poço [53], [54].

A maioria absoluta dos registos de ensaios de toxicidade são *in vitro* devido a serem mais difundidos, mais baratos, rápidos e simples, e também por conta de ensaios *in vivo* estarem sujeitos a barreiras éticas e legislativas. Desta forma, é mais indicado realizar um *screening* inicial com os ensaios *in vitro* e partir para experimentações em animais apenas com as substâncias que se mostrarem mais seguras e com propriedades promissoras. Contudo, mesmo que resultados de citotoxicidade *in vitro* não sejam positivos, bons

resultados podem eventualmente ser obtidos em ensaios *in vivo*. Daí a importância de, na medida do possível, se realizar ambas as experimentações [14], [51], [53], [54].

A literatura reporta a tendência do desenvolvimento de modelos estatísticos de previsão da toxicidade com base na presença ou ausência de determinadas estruturas em uma molécula, o que poderia refinar, reduzir e até mesmo substituir a experimentação em animais. Contudo, para que os modelos apresentem elevada precisão, é necessária a obtenção de um banco de dados mais robusto sobre a toxicidade aguda de uma maior gama de substâncias [56], [57].

2.4.1 Toxicidade *in vivo* em *Microcrustáceos Artemia salina*

Para além do conhecimento das interações toxicológicas no organismo, visando a garantia da segurança no uso e consumo de diferentes produtos, a importância dos ensaios de toxicidade também está na avaliação de potenciais impactos ambientais, uma vez que ecossistemas aquáticos podem ser destino final de substâncias resultantes das atividades antropogénicas (incluindo os processos industriais). A exposição de organismos aquáticos a substâncias tóxicas pode apresentar uma vasta gama de efeitos deletérios, inclusive se estendendo a diversos níveis tróficos devido ao facto dos componentes químicos poderem bioacumular-se, representando maior risco de efeitos tóxicos às espécies que estiverem “na ponta” da cadeia alimentar, incluindo o ser humano [11], [13], [14], [52], [55].

Neste contexto, bioensaios podem ser realizados com diferentes organismos de teste, idealmente com representantes de diferentes níveis tróficos, como algas, microcrustáceos, peixes, entre outros, sendo que as condições de teste dependem do organismo selecionado. A partir destes ensaios é possível investigar os efeitos que uma ou um conjunto de substâncias pode apresentar em um organismo vivo (incluindo efeitos sinérgicos), permitindo avaliar os efeitos agudos e crónicos da exposição. O efeito agudo configura uma resposta rápida do organismo a uma exposição isolada à substância. Já o efeito crónico envolve a avaliação dos efeitos de uma exposição a longo prazo, podendo compreender o ciclo de vida do organismo como um todo ou parcialmente [11], [14], [15], [52].

A *Artemia salina* (**Figura 2** – a, b) é uma espécie de microcrustáceo de água salgada comumente chamada de camarão da salmoura, detentora de um sistema osmorregulatório muito eficiente, sendo encontrada com ampla distribuição geográfica em ambientes de elevada salinidade como oceanos, lagos salgados permanentes e lagoas costeiras. Possui

indispensável importância na cadeia alimentar por se configurar como consumidor primário, se alimentando através de filtração de detritos orgânicos, algas e bactérias, servindo de alimento para peixes, o que faz com que possua valor económico agregado por ser fonte de nutrientes para alevins na piscicultura [15], [58–60].

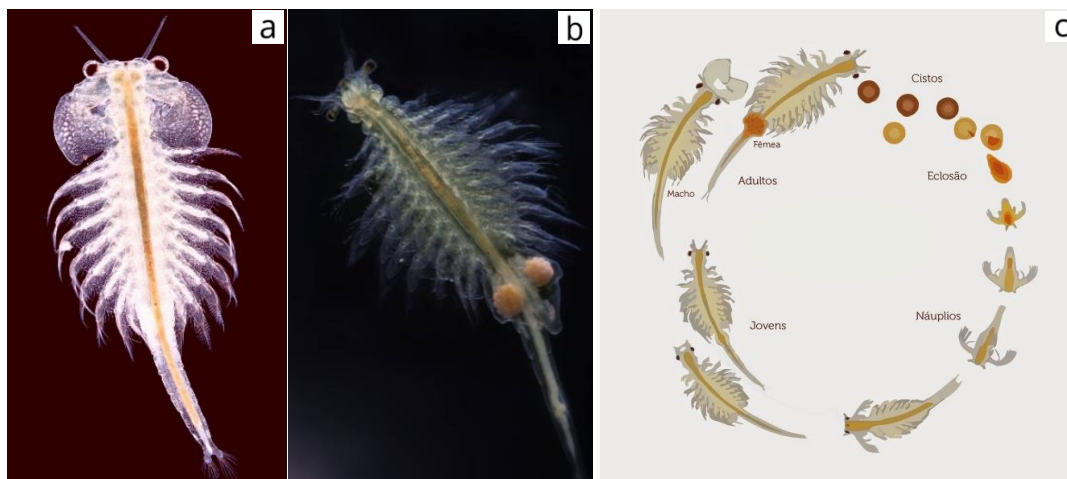


Figura 2. *Artemia salina*: (a) Macho adulto – Fonte: Kim Taylor, Warren Photographic; (b) Fêmea adulta – Fonte: Dmitriy12, Shutterstock; (c) Ciclo de vida – Fonte: Adaptado de J.pets.

A literatura reporta o uso amplo destes microcrustáceos em ensaios de toxicidade para uma gama diversa de substâncias, incluindo extratos de plantas, por apresentar vantagens como: ciclo de vida curto (**Figura 2** – c), capacidade de se reproduzir rápido de forma sexuada ou por partenogénese, a possibilidade de manter os organismos armazenados por muito tempo na forma de ovos dormentes (quistos) e de obter indivíduos viáveis de forma fácil e em qualquer época do ano, e por ser de pequeno tamanho, o que facilita na redução de materiais e espaço necessários para a manutenção de cultivos e realização dos ensaios, sendo o ensaio consideravelmente simples, rápido, de baixo custo e correlacionável com a sensibilidade de diferentes espécies de organismos de testes [15], [58–61]. Mesmo uma resposta que revele toxicidade pode apresentar correlações positivas para a presença de componentes que possuem atividade antitumoral ou aplicabilidade como pesticidas [62–64].

Por se tratar de um ensaio com um ser vivo, visando também eliminar disparidades para a interpretação de resultados, a metodologia para a determinação da toxicidade aguda é padronizada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), da qual diversos países fazem parte. O ensaio, determinado pela Diretriz 202 de 2004, consiste na exposição dos organismos jovens (com menos de 24 horas de vida) a diferentes concentrações da substância teste por 24 e 48 horas, de modo a determinar a concentração

média que causa a imobilização de 50% do total de organismos utilizados (LC₅₀). Por imobilização, entende-se que o organismo perdeu a capacidade natatória, não necessariamente estando morto [11], [14], [64], [65].

2.4.2 Cítotoxicidade em Células Tumorais e Não Tumorais

O cancro é uma doença crónica desencadeada pela proliferação acelerada e descontrolada de uma célula, levando a formação de um tumor que se configura como maligno ao se alastrar para outros tecidos do corpo. Podem ser destacadas duas principais razões para o desenvolvimento do cancro. A primeira está atrelada com a mutação de um proto-oncogene, responsável por auxiliar no crescimento celular, para um oncogene, que causa a multiplicação celular desregulada. Já a segunda está atrelada com a falha de genes supressores de tumores [27].

Na investigação na área da oncologia, estudos de substâncias quimiopreventivas (capazes de prevenir, inibir ou reverter a carcinogénese) são promissores [7]. Neste contexto, as plantas possuem elevada relevância como fontes de moléculas bioativas na identificação de novas opções terapêuticas [12], [54].

De forma rigorosa, o termo “antitumoral” deve ser empregue quando refere-se a substâncias que apresentam resultados experimentais em animais, enquanto o termo “anticancerígeno” é mais adequado para aquelas que possuem resultados clínicos em humanos. Com isso, no tocante às testagens *in vitro*, deve-se ter o cuidado de referir-se não a propriedades antitumorais, mas sim aos efeitos inibitórios que o extrato apresenta em determinada linha de células tumorais [54].

A atividade antitumoral pode ocorrer através de diferentes mecanismos, como a indução à apoptose (morte celular programada) através da perturbação da atuação de proteínas ligantes ao DNA, levando à inibição da produção de ATP pelas mitocôndrias e à geração de radicais livres no interior das células tumorais, bem como por meios que comprometem a proliferação das células, como a inibição da atuação de enzimas específicas e a inibição da angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos) [6], [54].

Apesar do exposto, tratamentos antitumorais encontram grandes limitações no tocante à resistência aos fármacos e ao baixo índice terapêutico, o qual está relacionado com os efeitos tóxicos que as substâncias individuais ou de extratos de forma holística representam a outras células do corpo [12]. Mesmo a radioterapia e a quimioterapia,

tratamentos amplamente utilizados, apresentam falta de seletividade às células tumorais (em diferentes intensidades a depender do tipo de tumor), o que realça a importância e necessidade de identificar perfis farmacotológicos mais seletivos para células tumorais visando a redução de efeitos colaterais [12], [54].

2.5 Importância Etnofarmacológica e Etnobotânica das Plantas Europeias

No contexto deste projeto de investigação, foram selecionadas 11 plantas que crescem naturalmente no continente Europeu (**Figura 3**). Com base nas espécies selecionadas, foi realizado um levantamento a respeito de informações gerais e de suas principais aplicações, em especial, na etnofarmacologia e nas indústrias cosmética e alimentícia.

2.5.1 *Calendula officinalis* L.

A *Calendula officinalis* é uma representante da família Asteraceae, conhecida pelos nomes comuns de calêndula, margarida ou maravilha. Trata-se de uma planta com flores amarelas e alaranjadas integrante da flora do Mediterrâneo, sendo aplicada amplamente com finalidades ornamentais [5], [16], [17], [67], [68].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões, pomadas e tinturas [17], [67], com aplicações no tratamento e prevenção de lesões cutâneas [5], [16], [17], [67], queimaduras de frio, varizes [16], feridas [5], [17], eczemas [17], [68], edemas [5], [16], úlceras [5], [16], [17], dor de garganta, anemia [17], inflamações em mucosas, gastrite, amenorreia, angina, febre, vômitos, hipotensão, icterícia, reumatismo e na regulação do ritmo cardíaco [5], com propriedades analgésicas, diaforéticas, hepatoprotetoras [16], curativas, cicatrizantes e de reepitelização [16], [17], [68], imunomodulatórias, antitumorais [5], espasmolíticas, anti-inflamatórias, antivirais, gastroprotetoras, cardioprotetoras e genoprotetoras [5], [16], expetorantes, antioxidantes [5], [67], antimicrobianas [5], [16], [17].

A literatura ainda reporta o uso contra infecções virais como o HIV [5], o sarampo, a varíola e o herpes (HSV) [16] e a infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. É reportado potencial abortivo associado à planta devido a propriedades uterotônicas, além de propriedades espermicidas e de antifertilidade [17].

Na indústria cosmética, reporta-se o uso amplo desta planta em formulações de perfumes, enxaguantes bucais, cremes, loções, xampus, produtos pós-sol, produtos de cuidados com a pele para peles sensíveis e para a região dos olhos [5], [16], [67].

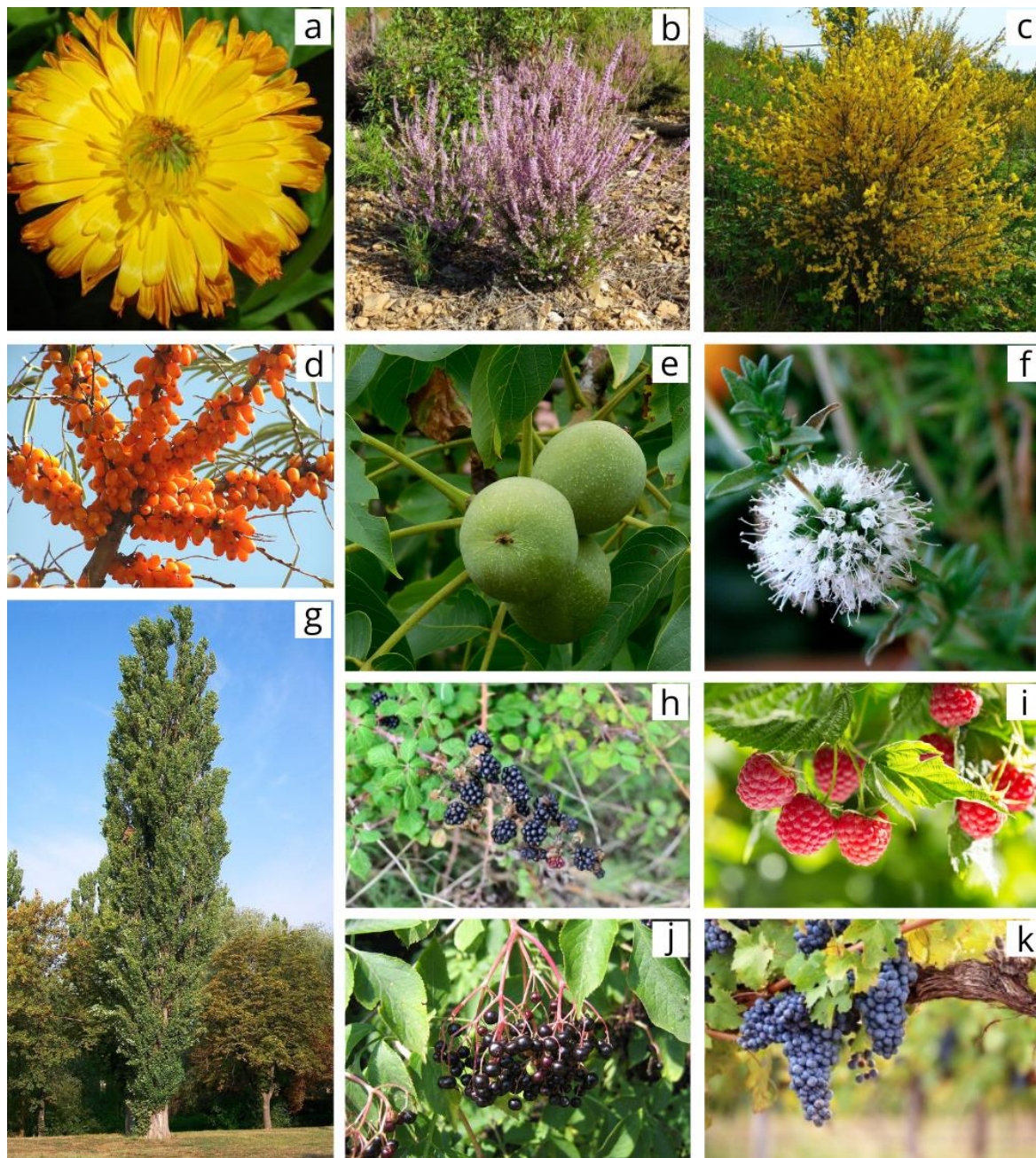


Figura 3. Espécies vegetais estudadas: (a) *Calendula officinalis* L. – Fonte: Museu Virtual de Biodiversidade (MVB); (b) *Calluna vulgaris* (L.) Hull – Fonte: Museu Virtual de Biodiversidade (MVB); (c) *Cytisus scoparius* (L.) Link – Fonte: H. Zell; (d) *Hippophae rhamnoides* L. – Fonte: licenciado sob domínio público; (e) *Juglans regia* L. – Fonte: licenciado sob domínio público; (f) *Mentha cervina* L. – Fonte: Daniel Feliciano; (g) *Populus nigra* L. – Fonte: László Szalai; (h) *Rubus fruticosus* L. – Fonte: J. Franco, Revista Jardins; (i) *Rubus idaeus* L. – Fonte: J. Franco, Revista Jardins; (j) *Sambucus nigra* L. – Fonte: Agnieszka Kwiecień; (k) *Vitis vinifera* L. – Fonte: J. Franco, Revista Jardins.

A plataforma CosIng (que é um banco de dados da Comissão Europeia para o registo do uso de substâncias em cosméticos) indica os extratos da *C. officinalis* (CAS: 84776-23-8) em formulações cosméticas podem apresentar propriedades condicionantes e de proteção à pele, emolientes e na conferência de aroma, fragrância e sabor.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o uso como condimento, corante alimentar e em chás [5], [67]. Outras aplicações incluem o uso como inseticida e como corante natural de tecidos [5].

2.5.2 *Calluna vulgaris* (L.) Hull

A *Calluna vulgaris* é uma representante da família *Ericaceae*, conhecida pelos nomes comuns de urze, urze escocesa, urze vulgar ou queiró. É integrante da flora do sul da Europa e do norte da África, sendo bem-adaptada a regiões mais quentes e solos mais secos e pobres em nutrientes. Trata-se de uma planta arbustiva que apresenta flores, as quais se configuram como as partes anatómicas mais amplamente estudadas e possuem propriedades nectaríferas excelentes para a produção de mel [9], [29], [35], [36], [66].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões ou decocções [9], [29], com aplicações no tratamento e prevenção de distúrbios do trato urinário [9], [66], infeções vaginais, eczemas, feridas, acne [9], reumatismo [9], [29], artrite e distúrbios do sono, com propriedades expetorantes, antissépticas, cardioprotetoras, hepatoprotetoras e genoprotetoras [29], diuréticas, desinfetantes [36], [29], sedativas [36], antioxidantes [9], [29], [35], [66], antimicrobianas [9], [35], anti-inflamatórias [9], antivirais [9], [29] e ansiolíticas [29], [36].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *C. vulgaris* (CAS: 84603-54-3) em formulações cosméticas são condicionantes à pele.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o emprego como condimento [9] e caracterizações nutricionais da planta demonstraram elevado teor de fibras e carboidratos [35].

2.5.3 *Cytisus scoparius* (L.) Link

A *Cytisus scoparius* é uma representante da família *Fabaceae*, conhecida pelos nomes comuns de escova escocesa, vassoura, chamiça, giesta-amarela ou giesteira-das-vassouras. É integrante da flora do centro-sul da Europa, do norte da África e do Oeste Asiático, sendo bem-adaptada a solos mais secos e pobres em nutrientes, tendo a capacidade de realizar a fixação de nitrogénio. Trata-se de uma planta arbustiva que apresenta flores que são polinizadas por abelhas [22], [27].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões ou decocções, com aplicações no tratamento e prevenção de diabetes e problemas hepáticos [22] e como reguladora do ritmo cardíaco e da respiração [27], com propriedades diuréticas [22], [27], catárticas, eméticas, vasoconstritoras, antioxidantes, antitumorais [27], sedativas, útero estimulantes e antiespasmódicas [22].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que os extratos da *C. scoparius* (CAS: 84696-48-0) em formulações cosméticas podem apresentar propriedades condicionantes à pele, antioxidantes e para conferir fragrância. Não foram reportadas aplicações desta planta com finalidades alimentares na literatura consultada.

2.5.4 *Hippophae rhamnoides* L.

A *Hippophae rhamnoides* é uma representante da família *Elaeagnaceae*, conhecida pelo nome comum de espinheiro-marítimo, sendo encontrada em regiões de clima temperado, especialmente em países da Europa e da Ásia. Trata-se de uma planta arbustiva espinhosa que produz frutas amareladas ou alaranjadas, sendo adaptada ao crescimento sob condições inóspitas, como temperatura e salinidade elevadas e solo seco [19], [33].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões, xaropes e óleo essencial [33], com aplicações no tratamento e prevenção de problemas cardiovasculares como hipertensão, isquemia e reperfusão, úlceras, queimaduras por frio, calor e radiação [19], [33], problemas hepáticos, cervicite, dermatites, doença do olho seco [19], asma, lúpus, psoríase, icterícia, tosse, feridas, acne, melanoses, edemas e inflamações nos órgãos genitais, com benefícios na melhora da circulação, no alívio das dores [33] na regeneração de tecidos [19], [33], na potencialização da flora probiótica intestinal e no alívio de sintomas da menopausa, com propriedades curativas,

imunoestimulantes, antitumorais, antioxidantes [19], anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-envelhecimento [19], [33], digestivas, laxativas, purificantes, proteção UV e tonificante [33]. A literatura ainda reporta a capacidade da planta de exibir respostas antivirais contra o vírus da dengue [19].

Na indústria cosmética, é reportada a aplicação na formulação de produtos como cremes hidratantes, cremes anti-envelhecimento, loções, xampus, condicionadores, pastas, linimentos, protetores-solares, máscaras, depilatórios, óleos de banho e sérums. Os cosméticos para a pele estão associados com propriedades de rejuvenescimento, suavização, antirugas, cicatrizantes e para queimaduras. Os cosméticos com finalidades capilares estão associados com propriedades de nutrição do couro cabeludo, combate à perda de cabelo e promoção de crescimento e brilho [33]. A plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *H. rhamnoides* (CAS: 90106-68-6) em formulações cosméticas são condicionantes à pele, umectantes, abrasivas, emolientes e para conferir sabor, aroma e fragrância.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o emprego de extratos da *H. rhamnoides* com a finalidade de promover proteção antimicrobiana e fornecer substâncias probióticas, importantes para pessoas intolerantes à lactose que possuem dificuldades em obtê-las de outras fontes, além de agregar no valor nutricional do produto. Na indústria de cárneos, é reportado que o uso do pó e infusões da planta na formulação de salsichas aumentou o tempo de prateleira por inibir a peroxidação lipídica. O fruto é caracterizado pelo elevado teor de ácido ascórbico, tendo aplicações na produção de sumos, chás, geleias, iogurtes, vinhos, licores, cervejas e tortas, não sendo usual consumir o fruto *in natura* por conta de sua acidez e adstringência elevadas [19]. A literatura reporta que na Índia os resíduos vegetais desta planta são utilizados para a alimentação de gado e aves [19].

2.5.5 *Juglans regia* L.

A *Juglans regia* é uma representante da família *Juglandaceae*, conhecida pelos nomes comuns de noqueira, noqueira persa ou noqueira inglesa. Trata-se de uma árvore bastante comum no mundo todo, cultivada há muito tempo na Europa, especialmente ao sul [12], [69].

Na etnofarmacologia, é reportado o uso de diversas partes anatómicas, como a noz (madura ou verde), a casca da noz, o epicarpo, a raiz, a casca da árvore e as folhas [12], [25],

com aplicações no tratamento e prevenção de problemas vasculares como a aterosclerose [12], [69], hipertensão, hemorroidas, acne [25], obesidade [12], reumatismo [12], [25], [37], [69], úlceras [37], diabetes [12], [25], [69], inflamações na pele [37], [69], feridas [25], [69], sinusite, gripe, febre, inchaços nas juntas, artrite, inflamações intestinais, dor de estômago, dor de dente, asma, problemas na próstata, escrófula, eczemas, coceiras, caspa, queimaduras, queimaduras solares e no controlo do excesso de transpiração [69], com propriedades adstringentes, hipoglicémicas, carminativas, cardioprotetoras, osteoprotetoras [69], anti-helmínticas, antioxidantes, anti-inflamatórias [25], [37], queratolíticas, digestivas [37], [69], antidiarreicas, purificantes, tonificantes, hepatoprotetoras [25], [69], neuroprotetoras, anti-histamínicas, analgésicas, imunomodulatórias, lipolíticas, broncodilatadoras [25], antimicrobianas [25], [37], [69] e antitumorais [12], [25], [37]. A literatura ainda reporta a aplicação no tratamento da malária [69].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *J. regia* (CAS: 84012-43-1) em formulações cosméticas são condicionantes à pele, antioxidantes, suavizantes (calmantes), abrasivas, adstringentes, de limpeza e para conferir fragrância. A literatura menciona a aplicabilidade de partes da planta no estímulo do crescimento capilar e na manutenção da higiene bucal.

No âmbito da indústria de alimentos, a noz é tida como essencial para a nutrição humana por apresentar conteúdo altamente proteico e rico em fibras e lípidos. Apresentam elevada relevância na culinária no preparo de bolos, biscoitos, saladas, sorvetes, sobremesas, barras de cereais e licores [12], [25], [37], [69]. Outras aplicações incluem o uso como inseticida [25].

2.5.6 *Mentha cervina* L.

A *Mentha cervina* é uma planta aromática da família *Lamiaceae*, conhecida pelos nomes comuns de erva-peixeira, hortelã da ribeira, poejo de Hart ou poejo-fino. É integrante da flora Europeia e Africana, crescendo naturalmente em regiões rochosas próximas às margens de rios ou em áreas alagadas [5], [70].

Na etnofarmacologia, são reportadas aplicações no tratamento e prevenção de problemas gástricos e respiratórios [5] e infeções cutâneas [5], [70], com propriedades antiespasmódicas, coleréticas, antiflatulentas, expetorantes, antimicrobianas [70], antioxidantes, antitumorais [5].

Não há registos sobre a *M. cervina* na plataforma CosIng e a literatura consultada não reporta sua aplicação na indústria cosmética.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o emprego amplo como tempero em pratos à base de peixes e no uso do óleo essencial como conservante alimentar [5].

2.5.7 *Populus nigra* L.

A *Populus nigra* é uma representante da família *Salicaceae*, conhecida pelos nomes comuns de álamo, álamo negro, álamo da terra, almo ou amieiro. É bastante comum no hemisfério norte, especialmente na Europa e na Ásia. Trata-se de uma árvore adaptada a regiões de clima temperado e subtropical cujos botões são fontes de matéria-prima para a produção do própolis por abelhas melíferas [18], [23], [42], [71].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões, pós, pomadas, óleo e tinturas [18], [23], [38], com aplicações no tratamento e prevenção de diabetes, dor de garganta, gripe, hemorroidas, fissuras anais, lesões superficiais na pele, queimaduras solares, picadas de insetos [23], reumatismo [23], [38], [71], hiperuricemia e gota [18], [23], artrite [18], dores na região lombar, problemas urinários, renais [71], circulatórios [38], digestivos (como úlceras) [23], [71], respiratórios (como asma e bronquite) [18], [23], [38], [71] e hepáticos [18], [71], febre, escorbuto, contusões e no alívio das dores de cólicas menstruais [71], com propriedades neuroprotetoras [18], espasmolíticas, expetorantes [38], vasorelaxantes, anti térmicas [71], adstringentes, antissépticas, antienvhecimento [23], anti-inflamatórias [18], [23], [38], [42], antioxidantes [18], [42] e antimicrobianas [18], [23], [38]. A literatura ainda reporta a capacidade de extratos em reduzir os efeitos neurotóxicos e hepatotóxicos produzidos por contaminações com alumínio em ratos [18].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *P. nigra* (CAS: 84650-39-5) em formulações cosméticas são condicionantes à pele.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o emprego como conservante natural, para a produção de chás e na aromatização de bebidas alcoólicas [18], [38].

2.5.8 *Rubus fruticosus* L. e *Rubus idaeus* L.

A *Rubus fruticosus* e a *Rubus idaeus* são representantes da família *Rosaceae*, sendo a primeira conhecida pelos nomes comuns de amoreira, amoreira-silvestre, amoreira-preta e framboesa-negra e a segunda por framboeseiro. Trata-se de plantas arbustivas bastante comuns em toda a Europa, onde representam elevada importância económica [7], [24], [46], [72], [73].

Na etnofarmacologia, é reportado o consumo de *R. fruticosus* geralmente na forma de infusões, com aplicações no tratamento e prevenção de diabetes [63], [73], problemas respiratórios, asma, queimaduras, anemia [24], gripes e resfriados, febre, sangramentos, hematomas, inflamações intestinais, eczemas, acne, gota, dores de dente, escorbuto [73], inflamações na gengiva, tosse, dores de garganta, úlceras [24], [73], feridas, hemorroidas e diarreia [24], [63], [73], com propriedades de relaxamento uterino, adstringentes [24], [73], de reepitelização, antivirais, laxantes [73], antimicrobianas, antioxidantes [63], [72], [73], anti-inflamatórias [7], [63], [72], [73], antitumorais [7], [72], [73], imunoestimulantes, cicatrizantes, antissépticas, desinfetantes e diuréticas [24].

Já para a *R. idaeus*, é reportado que o consumo ocorre geralmente na forma de infusões, com aplicações no tratamento e prevenção de problemas de pele [8], trombose, diabetes, cólica, diarreia [8], [74], feridas, enjojo com propriedades de relaxamento uterino (facilitando o trabalho de parto) [74], antimicrobianas, anticoagulantes, relaxantes [8], anti-inflamatórias e antioxidantes [46].

Para as indústrias cosmética e de alimentos, ambas espécies encontram aplicações muito semelhantes. Na indústria cosmética, a plataforma CosIng coloca que para a *R. fruticosus* (CAS: 84787-69-9), as propriedades são condicionantes à pele, adstringentes, tonificantes e para conferir aroma e fragrância. Para o caso da *R. idaeus* (CAS: 84929-76-0), as principais propriedades dos extratos em formulações cosméticas são de proteção e condicionantes à pele, adstringentes, queratolíticas, suavizantes (calmantes), tonificantes, abrasivas, emolientes e para conferir fragrância. A literatura reporta o uso da *R. fruticosus* na formulação de produtos antirrugas, produtos de cuidados com a pele, enxaguantes faciais, produtos para o cabelo, para o tratamento de pele oleosa e desodorantes [24].

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o consumo dos frutos de ambas as plantas *in natura* e o amplo uso como insumos para o processamento de diversos produtos alimentares como geleias, gelatinas, doces, iogurtes, xaropes, sumos, chás, vinhos, cerveja,

licores, sorvetes, sobremesas e produtos de panificação. A literatura também reporta o uso em corantes alimentares naturais [7], [24], [72], [73]. A literatura ainda reporta o emprego da *R. fruticosus* como tinta natural para tecidos e para o cabelo [73].

2.5.9 *Sambucus nigra* L.

A *Sambucus nigra* é uma representante da família *Adoxaceae*, conhecida pelos nomes comuns de sabugueiro, sabugueirinho, sabugueiro europeu, sabugueiro negro. É bastante comum no hemisfério norte, especialmente na Europa (estando presente na maior parte do território), Ásia e América do Norte e no norte da África. Trata-se de uma planta arbustiva adaptada ao crescimento em regiões de solos pobres em nutrientes, produzindo flores e frutos característicos [27], [63], [64].

Uma observação pertinente é que partes da planta como sementes, raízes, folhas, a casca e as frutas verdes apresentam substâncias conhecidas como glicosídeos cianogênicos que, por si só, não são tóxicos, mas que quando consumidos são convertidos em cianeto de hidrogênio (HCN) e aldeídos através de mecanismos enzimáticos. O cianeto é altamente tóxico e, para efetuar o consumo seguro, algumas práticas como descascar, triturar, ralar ou efetuar tratamento térmico são recomendadas [2], [76].

Na etnofarmacologia, é reportado que seu consumo ocorre geralmente na forma de infusões e óleos [2], [10], com aplicações no tratamento e prevenção de gripes e resfriados [2], [66], [76], catarros, febre, edemas, constipação [2], [76], congestão nasal, dor de garganta, conjuntivite [76], de lesões cutâneas, problemas digestivos e do trato respiratório, inflamações, dores nas juntas [2], reumatismo, epilepsia, problemas urinários [75], diabetes, problemas cardiovasculares [30], [40], com propriedades anti-inflamatórias [30], [76], antimicrobianas, antidepressivas, diaforéticas, laxativas, analgésicas [76], imunoestimulantes, purificantes [75], [76], antitumorais [40], [76], antioxidantes [66], [76], antivirais e diuréticas. A literatura ainda reporta a ação antiviral contra os vírus da *influenza* (H1N1), do herpes (HSV), e AIDS (HIV positivo) [2], [75], [76].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *S. nigra* (CAS: 84603-58-7) em formulações cosméticas são condicionantes à pele, emolientes, antioxidantes, refrescantes, suavizantes (calmantes), tonificantes, adstringentes e para conferir fragrância.

No âmbito da indústria de alimentos, é reportado o emprego como corante e flavorizante naturais e como ingrediente na produção de chás, geleias, sumos, gelatinas, tortas, sorvetes, iogurtes, xaropes, bolos, doces e bebidas alcoólicas, como vinhos, espumantes, aguardentes e licores [2], [30], [40], [66], [76]. Suas propriedades nutricionais corroboram para o seu uso para a suplementação alimentar através de xaropes, cápsulas, comprimidos, pastilhas, emulsões, entre outros formatos. Outros usos compreendem a ornamentação, ração animal e fertilizante orgânico [76].

2.5.10 *Vitis vinifera* L.

A *Vitis vinifera* é uma representante da família *Vitaceae*, conhecida pelos nomes comuns de videira ou parreira. É bastante comum em diversas regiões do mundo, especialmente na região do Mediterrâneo, Ásia e América do Norte. Geralmente ocorre em plantações, mas pode crescer de forma natural próxima a margem de rios [77].

Na etnofarmacologia, são reportadas aplicações no tratamento e prevenção de úlceras [78], inflamações gástricas [79], [80], diarreia, hemorragias, varizes [80], colesterol alto e cáries, sendo benéfica para a promoção da sensação de saciedade [79], com propriedades digestivas [80], anti envelhecimento, anti-inflamatórias [78], antioxidantes [20], [78], [79] e antimicrobianas [41], [78], [80].

Na indústria cosmética, a plataforma CosIng indica que as principais propriedades dos extratos da *V. vinifera* (CAS: 84929-27-1 ou 85594-37-2) em formulações cosméticas são condicionantes e protetivas à pele, emolientes, antioxidantes, antimicrobianas, anti seborreicas, de absorção UV e para conferir fragrância, sendo também utilizadas para produtos de cuidados bucais. A literatura reporta a sua aplicação em produtos de higiene bucal na prevenção da formação de cáries [79] e para a formulação de cosméticos para a região dos olhos [80].

No âmbito da indústria de alimentos, para além da finalidade do consumo direto do fruto, é reportado o uso para a produção de produtos de panificação (como pães), vinhos, sumos, chás, licores, iogurtes e uvas passas, sendo que a indústria do vinho representa a principal atividade económica na qual a uva está envolvida [6], [34], [77], [81]. Especialmente pela ação antioxidante e antimicrobiana, é reportado o emprego como conservante natural para produtos cárneos (como frango) e lácteos (como queijos) [34], [81]. É também empregue como corante alimentar [81]. Para além disso, a literatura reporta o uso

de partes da planta para obtenção de fibras alimentares, concentrados de proteína vegetal, sendo a folha amplamente empregada na culinária de diversos países [80].

A literatura reporta que o beneficiamento do resíduo da fermentação da *V. vinifera* é uma das formas empregadas para a obtenção de ácido tartárico e de etanol [34]. Outros usos envolvem a aplicação como fertilizante, no controlo de pragas e para nutrição animal [34], [78].

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho envolve uma etapa de caracterização química, da bioatividade e da toxicidade dos extratos hidroetanólicos liofilizados das plantas. Na sequência, considerando os resultados obtidos, visa-se avaliar o potencial de desenvolvimento de um produto industrial incorporando um ou mais extratos, nas áreas da cosmética, alimentar e/ou farmacológica.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Obtenção do extrato seco de cada espécie;
- Caracterização do perfil de compostos fenólicos dos extratos através da identificação e quantificação dos componentes;
- Caracterização da atividade antioxidante dos extratos;
- Caracterização da atividade anti-inflamatória dos extratos;
- Caracterização da atividade antimicrobiana dos extratos (em fungos e bactérias);
- Caracterização da citotoxicidade dos extratos *in vitro* em linhas de células tumorais;
- Caracterização da citotoxicidade dos extratos *in vitro* em células renais e hepáticas;
- Caracterização da toxicidade aguda dos extratos *in vivo* em microcrustáceos *Artemia salina*;
- Avaliação da aplicabilidade dos extratos no desenvolvimento de um produto industrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias descritas foram aplicadas nas mesmas condições para todas as 11 espécies vegetais.

4.1. Seleção e Tratamento das Espécies Vegetais

As espécies vegetais utilizadas foram selecionadas principalmente através do critério da disponibilidade natural das plantas em território europeu, o que corrobora para viabilizar potenciais aplicações futuras e agrega valor a recursos locais. As partes vegetais correspondentes às amostras e suas origens estão devidamente identificadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Códigos, partes vegetais e origens das amostras.

Amostra	Código	Partes Vegetais	*Origem
<i>Calendula officinalis</i>	CAO	Flores	I
<i>Calluna vulgaris</i>	CAV	Caules, folhas e flores	II
<i>Cytisus scoparius</i>	CYS	Caules, folhas e flores	II
<i>Hippophae rhamnoides</i>	HIR	Galhos, ramos, flores e folhas	II
<i>Juglans regia</i>	JUR	Folhas	I
<i>Mentha cervina</i>	MEC	Folhas	I
<i>Populus nigra</i>	PON	Casca	III
<i>Rubus fruticosus</i>	RUF	Folhas	I
<i>Rubus idaeus</i>	RUI	Folhas	II
<i>Sambucus nigra</i>	SAN	Folhas	I
<i>Vitis vinifera</i>	VIV	Folhas	I

*I: Adquirido de ERVITAL – Plantas Aromáticas e Mediciniais, Viseu, Portugal; II: Fornecido pela Universidade de Tecnologia de Brandenburgo, Cottbus-Senftemberg, Alemanha; III: Fornecido pela Universidade Stefan cel Mare, Suceava, Romênia.

A **Figura 4** apresenta a localização geográfica associada à origem das espécies vegetais, no mapa da Europa, destacadas como marcadores amarelos. Todas as amostras foram submetidas a secagem em estufa a $40\pm 0,5$ °C por um período de 48 horas e submetidas à moagem.



Figura 4. Localização geográfica da origem das espécies vegetais – Fonte: Adaptado de Google Earth, 2022.

4.2. Obtenção do Extrato Hidroetanólico

Para cada grama de amostra pesada, foram utilizados 30 mL de mistura etanol/água na proporção 80:20 (v/v) como solvente. Procedeu-se a extração sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 1 hora, filtrou-se (Whatman nº 4), reservando a porção líquida em balão e retornando a parte sólida para o béquer, acrescentando novamente a mistura hidroetanólica e realizando nova extração por 1 hora, conforme feito por Caleja et al. (2017) [82]. Ao final, realizou-se nova filtração, reservando a parte líquida no balão e desprezando a parte sólida. A **Figura 5** ilustra as etapas do processo de extração.

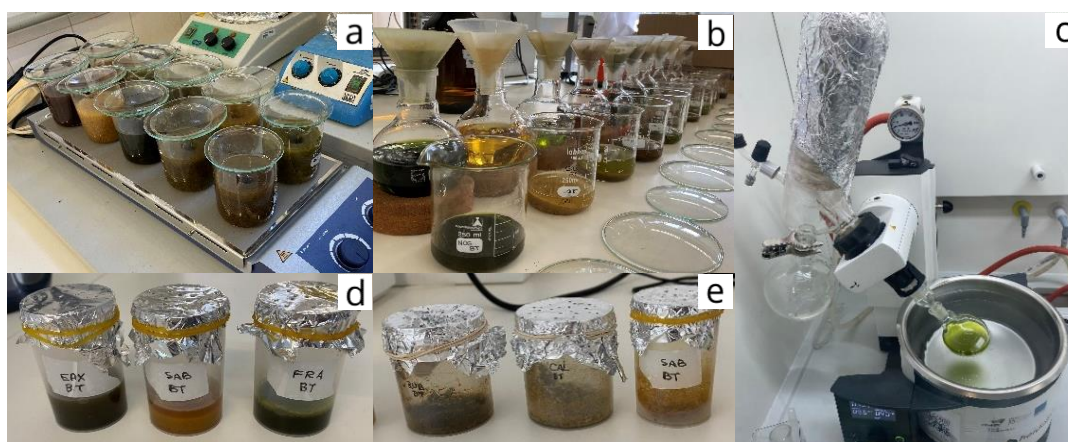


Figura 5. Processo de extração: (a) Extração sob agitação magnética; (b) Filtração; (c) Evaporação rotativa; (d) Frascos antes da liofilização; (e) Frascos após a liofilização.

A porção líquida foi submetida a evaporação rotativa sob vácuo em temperatura não superior a 40 °C até que se removesse o etanol. A porção aquosa restante foi transferida para um frasco previamente pesado em balança analítica, congelada e submetida à liofilização (Freeze Dryer Telstar LyoQuest-55, Milão, Itália) por 48 horas a $-55 \pm 0,5$ °C. Ao final, o frasco foi novamente pesado e por diferenças de massas foi determinado o rendimento da extração.

4.3. Perfil dos Compostos Fenólicos obtidos por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ

Foram pesados 10 mg de extrato e adicionados 2 mL da mistura etanol/água (80:20; v/v). A solução foi filtrada com filtro de seringa de nylon de 0,2 µm para um vial e a solução foi encaminhada para injeção em UPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), equipado com injetor automático com temperatura controlada a 5 °C, degaseificador e compartimento de coluna com termostato a 35 °C, conforme realizado por Barros et al. (2012) [83].

A detecção de compostos foi realizada através de detetor de arranjo de díodos (DAD) nos comprimentos de onda de 280, 330 e 370 nm. A separação de compostos foi realizada utilizando a coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (4,6 x 150 mm; 3 µm; Milford, EUA) em fase reversa empregando (A) ácido fórmico (0,1%) e (B) acetonitrilo na fase móvel, com fluxo de 0,5 mL/min, em regime de eluição de gradiente: 10 a 15% de B por 5 minutos, 15 a 20% de B por 5 minutos, 20 a 25% de B por 10 minutos, 25 a 35% de B por 10 minutos, 35 a 50% de B por 10 minutos e reequilibrando a coluna por 10 minutos. Os reagentes utilizados foram padrão analítico.

O sistema foi conectado a um espectrômetro de massas Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) empregando o azoto como gás de carreamento a 50 psi, com tensão de pulverização de 5 kV, temperatura inicial de 325 °C, tensão capilar de -20 V e tensão de deslocamento da lente de -66 V. Os espectros foram registados no modo negativo entre 100 e 1500 da razão massa carga (m/z), sendo a energia de colisão mantida em 35 unidades arbitrárias. A **Figura 6** apresenta o sistema utilizado.

Os dados foram coletados, processados e interpretados através software Xcalibur versão 2.2 (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). Para identificação dos compostos, foram

comparados os dados de tempo de retenção (T_r), comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}), íon pseudomolecular ($[M-H]^-$), espectros UV-Vis, espectros de massas e padrões da quebra dos iões (MS^2) com a literatura e com padrões comerciais disponíveis. A quantificação dos componentes se deu utilizando de curvas de calibração obtidas a partir dos padrões disponíveis.



Figura 6. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ: sistema disponível nos laboratórios do CIMO.

4.4. Ensaios para Avaliação da Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, foi selecionado um conjunto de ensaios de modo a gerar complementaridade na avaliação do desempenho dos extratos frente a diferentes mecanismos de atuação.

4.4.1. Método da Inibição da Peroxidação Lipídica por Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Foi pesada em tubo falcon uma determinada massa de cérebro de porco e adicionado o dobro desta massa de tampão Tris-HCl (20 mM; pH = 7,4). Após agitação, o tubo foi levado à centrífuga a 3500 rpm por 10 minutos. Conforme realizado por Pinela et al. (2012) [47], em microplacas de 48 poços, foram adicionados 200 μ L de solução de extrato em mistura hidroetanólica utilizada na extração e realizada diluição em série de modo a obter 8 concentrações distintas, a depender do extrato testado e em triplicata. Foi usado como controlo negativo o solvente da extração.

Foram adicionados nos poços, nesta sequência: 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato de ferro (10 mM) e 100 µL do sobrenadante da suspensão de cérebro de porco. A placa foi incubada em estufa a 37±0,5 °C por 1 hora. Foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (28%; *p/v*) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%; *p/v*) preparado na hora. A placa foi incubada em estufa a 80±0,5 °C por 20 minutos (**Figura 7 – a**).

O conteúdo de cada poço foi transferido para eppendorfs que foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (**Figura 7 – b**) e levado para leitura de absorbância no espectrofotômetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha) a 532 nm de comprimento de onda.

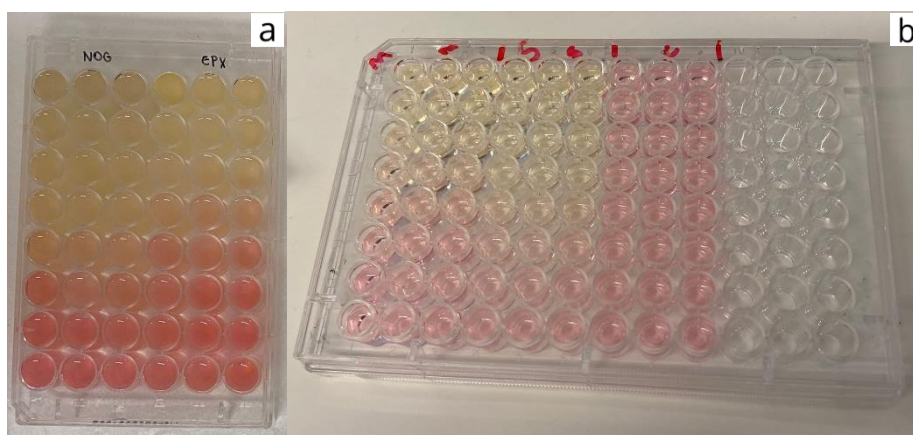


Figura 7. Aspeto das microplacas para o ensaio TBARS: (a) Ao final das reações oxidativas; (b) Para leitura.

A partir da **Equação 1**, foi determinado o percentual da inibição da peroxidação lipídica (I).

$$I(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

em que A refere-se à absorbância apresentada pelo controlo negativo e B à apresentada pelo extrato. Os resultados são expressos em termos da concentração de extrato capaz de inibir a peroxidação lipídica em 50% (IC₅₀), obtidas a partir da correlação entre as concentrações e o percentual de inibição.

4.4.2. Método da Inibição da Hemólise Oxidativa (OxHLIA)

O extrato foi dissolvido em tampão fosfato salino (PBS; pH = 7,4) em concentrações que variaram entre 800 – 6,25 µg/mL. Em microplacas de 48 poços, foram adicionados 400 µL da solução de extrato e realizada diluição em série com PBS de modo a obter 6 concentrações distintas, a depender do extrato testado e em triplicata. Foram usados como controlos positivos a água destilada (que leva à hemólise completa) e o Trolox (substância reconhecida pela atividade antioxidante) e como controlo negativo o PBS. Conforme feito por Othman et al. (2021) [84], foram adicionados 200 µL de solução 2,8% de eritrócitos ovinos em PBS e a placa foi incubada a 37±0,5 °C por 10 minutos com agitação.

Foram adicionados 200 µL de uma solução de dicloridrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) em PBS (160 mM) nos poços. A placa foi levada para leitura inicial da densidade óptica em leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 690 nm e retornada para incubação a 37±0,5 °C por mais 1 hora. Após este período, foram realizadas novas leituras de densidade óptica em intervalos de 10 minutos até se observar a hemólise completa, sempre retornando as placas para incubação entre as leituras. Curvas hemolíticas foram geradas para as diferentes concentrações do extrato e para o PBS através do cálculo do percentual de eritrócitos intactos ao longo do tempo (P), determinado pela **Equação 2**.

$$P(\%) = \frac{(S_t - CH_0)}{(S_0 - CH_0)} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

em que S_t e S_0 referem-se à densidade óptica do extrato nos tempos t e 0 min, respectivamente, e CH_0 refere-se à densidade óptica da hemólise completa no tempo 0 min, obtida a partir do controlo positivo. Foram determinados os valores de tempo de meia hemólise (H_{t50}) para o PBS e para cada uma das concentrações do extrato quando cada curva atingiu 50% de eritrócitos intactos. Com base na **Equação 3**, foi determinado o tempo de atraso da hemólise (Δt), estabelecendo uma correlação com concentração, permitindo a determinação dos valores de concentração de inibição (IC_{50} ; µg/mL) para $\Delta t = 60$ min e $\Delta t = 120$ min.

$$\Delta t = H_{t50}(\text{amostra}) - H_{t50}(\text{controle}) \quad \text{Eq. (3)}$$

4.4.3. Método do Efeito Captador de Radicais Livres (DPPH)

Conforme feito por Brand-Williams et al. (1994) [85], foi preparada uma solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) na concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ M em metanol. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 30 μ L de extrato dissolvido em água destilada e realizada diluição em série de modo a obter 8 concentrações distintas, a depender do extrato testado e em triplicata. Foi usado como controlo negativo o solvente da extração.

Foram adicionados 270 μ L da solução DPPH em cada poço. Após 1 hora em temperatura ambiente e em abrigo da luz, a placa foi levada para leitura de absorbância no espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha) a 515 nm (**Figura 8**). O cálculo do valor de IC₅₀ ocorre de forma semelhante à aplicada para o método TBARS.

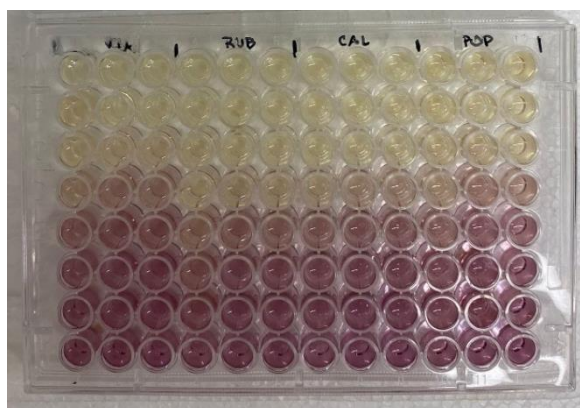


Figura 8. Aspeto da microplaca para leitura no ensaio DPPH.

4.5. Atividade Anti-inflamatória pela Inibição da Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos de Rato RAW 264.7

Foi preparada uma solução estoque de extrato em água estéril de 8 mg/mL a partir da qual foram feitas diluições em série obtendo soluções intermediárias de concentrações entre 8 – 0,125 mg/mL. A linha de macrófagos de rato RAW 264.7 foi obtida de *Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* e cultivada em meio DMEM com soro fetal bovino (10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), sendo a manutenção da linha feita em incubadora a $37 \pm 0,5$ °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Em acordo com o aplicado por Mandim et al. (2018) [86], em microplaca de 96 poços foram colocados 300 μL de suspensão celular de macrófagos com densidade celular de $5,0 \times 10^5$ células/mL e com proporção de células mortas inferior a 5% (verificado com o teste de exclusão do azul de Trypan). A microplaca foi incubada por 24 horas nas mesmas condições da manutenção celular para promover a aderência e multiplicação adequada das células. Após este período, foram adicionados 15 μL da solução do extrato nas concentrações preparadas, estando as concentrações efetivamente testadas entre 400 – 6,25 $\mu\text{g/mL}$. A placa foi incubada por 1 hora e, após este período, foi realizada a estimulação dos macrófagos com adição de solução de lipopolissacarídeo (LPS) extraído da membrana celular de *Escherichia coli* de modo a obter uma concentração final desta substância de 1 mg/mL nos poços, sendo incubada por 24 horas, na sequência, nas mesmas condições da manutenção. Foi usada como controlo positivo a dexametasona na concentração de 50 nM e como controlos negativos as células na ausência de LPS e as células com LPS, mas na ausência do extrato ou agentes anti-inflamatórios.

Ao final do período de incubação, a quantificação do óxido nítrico foi feita utilizando um kit do sistema de reagentes Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração do nitrito (nitrito de sódio entre 100 – 1,6 mM) preparada em placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado por leitura de absorbância a 540 nm em leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) e por comparação com a linha de calibração padrão. Os resultados foram obtidos através da representação gráfica da porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico pela concentração do extrato e expressos em relação à concentração que leva à inibição de 50% da produção do óxido nítrico (IC_{50}).

4.6. Atividade Antimicrobiana pelo Método da Microdiluição

Foi avaliado o potencial antimicrobiano dos extratos seguindo a metodologia aplicada por Pires et al. (2017) [87] para um conjunto de microrganismos, sendo as cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) adquiridas da empresa Frilabo em Porto, Portugal e as bactérias clínicas foram obtidas a partir de isolados de doentes internados da unidade de saúde local do Nordeste em Bragança, Portugal e do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro em Vila Real, Portugal.

- Bactérias ATCC Gram-negativas: *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* subsp (ATCC 13076), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610);
- Bactérias ATCC Gram-positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Staphylococcus aureus* (ATCC 204305);
- Bactérias Clínicas Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* (isolados da urina), *Proteus mirabilis* (isolado da secreção de feridas), *Pseudomonas aeruginosa* (isolado de expetoração);
- Bactérias Clínicas Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (isolado da urina), *Listeria monocytogenes* (isolado do líquido cefalorraquidiano), *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA; isolado de expetoração);
- Fungos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Os microrganismos foram previamente incubados em diferentes condições de modo a obtê-los em fase exponencial de crescimento para uso nos ensaios (**Figura 9 – a**). As bactérias *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* e *M. morganii* foram incubadas a $37\pm 0,5$ °C em meio de cultura *MacConkey agar* por 24 horas. As demais bactérias foram incubadas nas mesmas condições, mas em *Blood agar*. Os fungos foram incubados em *Malt Extract Broth* (MEB) a $25\pm 0,5$ °C por 72 horas. Foram preparadas suspensões das bactérias em *Tryptone Soy Broth* (TSB) padronizadas em $1,5\times 10^6$ UFC/mL, quantificadas através de densitômetro. Foram preparadas suspensões dos fungos em PBS e TWEEN (0.1%) padronizadas em $1,0\times 10^6$ UFC/mL, quantificadas através de contagem em câmara de Neubauer. Foi preparada uma solução estoque de 20 mg/mL de extrato em DMSO (5%; v/v) e meio de cultura TSB.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 90 µL da solução de extrato em 100 µL de TSB e realizada a diluição em série. Na sequência, foram adicionados 10 µL de inóculo em cada um dos poços, obtendo concentrações de extrato efetivamente testadas, em duplicatas, entre 10 – 0,075 mg/mL. Foram preparados controlos negativos do extrato e do meio de cultura TSB. Foram usados como controlos positivos os antibióticos ampicilina, imipenem e vancomicina para as bactérias clínicas, a estreptomicina, metilicina e ampicilina para as bactérias ATCC e o cetoconazol para os fungos. Todo o trabalho foi realizado com materiais estéreis manipulados em fluxo laminar.

As placas com bactérias foram cobertas e incubadas a $37\pm 0,5$ °C por 24 horas. Após este período, foram adicionados 40 µL de uma solução 0,2 mg/mL do indicador colorimétrico cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) preparado em água estéril e a placa foi incubada a $37\pm 0,5$ °C por 30 minutos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano visível determinado pela mudança da coloração de amarelo para rosa se os microrganismos forem viáveis (**Figura 9 - b**). Para a determinação de concentração bactericida mínima (CBM), definida como a concentração mais baixa necessária para matar a bactéria, 50 µL de líquido de cada poço que não apresentou alteração de cor foi semeado em meio sólido e incubado a 37 °C por 24 horas. A concentração mais baixa que não produziu crescimento determinou a CBM.

A placa com fungos foi incubada a $25\pm 0,5$ °C por 72 horas. Após este período, a CIM foi determinada de forma direta a partir da comparação com o controlo positivo de modo a identificar a concentração mais baixa na qual não houve crescimento fúngico visível, determinado pela visualização de esporos. Já para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), definida como a concentração mais baixa necessária para matar um fungo, a placa foi incubada por mais 72 horas a $25\pm 0,5$ °C e foi realizada nova observação de modo a verificar se houve crescimento fúngico visível.

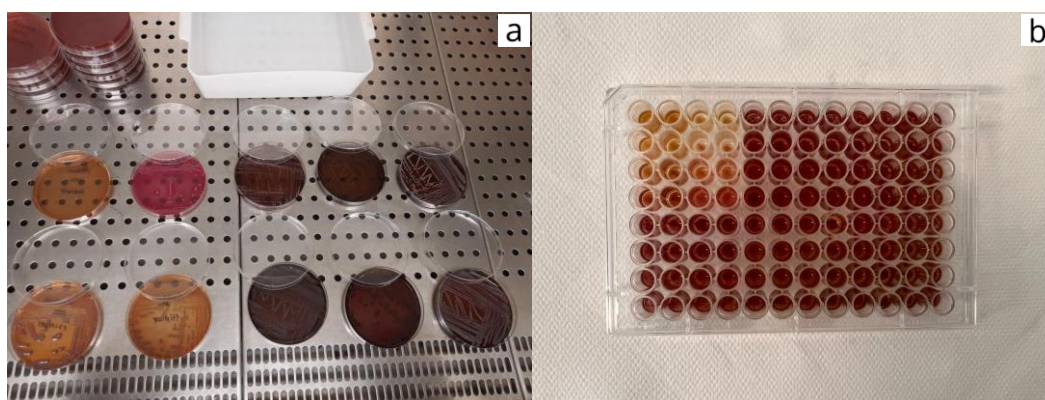


Figura 9. Materiais para ensaio da microdiluição: (a) Crescimento bacteriano em placas; (b) Aspeto da microplaca após adição do indicador INT.

4.7. Citotoxicidade em Linhas Celulares Tumorais e Não Tumorais pelo Método SRB

Foi avaliada a citotoxicidade dos extratos conforme a metodologia utilizada por Mandim et al. (2018) [86] para o seguinte conjunto de linhas celulares:

- Linhas Tumorais: AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo-2 (adenocarcinoma colorrectal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama);
- Linhas Não Tumorais: VERO (rim de macaco verde africano) e PLP₂ (cultura primária de fígado de porco).

Todas as linhas celulares foram obtidas de *Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, exceto PLP₂, obtida a partir do fígado de porco abatido em matadouro local. A manutenção da linha VERO foi realizada em meio DMEM e a manutenção das demais linhas celulares foi realizada em meio RPMI-1640, ambos os meios enriquecidos com de soro fetal bovino (10%), glutamina (2 mM) e os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Os frascos de cultura foram incubados a 37±0,5 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂, sendo utilizadas as células quando apresentaram entre 70 e 80% de confluência.

Foi preparada uma solução estoque de extrato em água estéril de 8 mg/mL a partir da qual foram feitas diluições em série obtendo as concentrações entre 8 – 0,125 mg/mL. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 10 µL de cada uma das concentrações do extrato e 190 µL da suspensão de linhas celulares, em duplicatas. Foi usada como controlo positivo uma elipticina (classe de moléculas com atividade antitumoral) e como controlo negativo a suspensão celular sem adição de outros componentes. Após verificação da aderência das células, as microplacas foram incubadas por um período de 72 horas a 37±0,5 °C em ambiente húmido e com 5% de CO₂. A linha VERO foi testada em densidade de 1,9x10⁴ células/poço. As demais linhas foram testadas na densidade de 1,0x10⁴ células/poço.

Após a incubação, a reação foi interrompida com 100 µL de ácido tricloroacético (10%; *p/v*) previamente resfriado. As placas foram incubadas a 4±0,5 °C por 1 hora, lavadas com água e, após a secagem, foram adicionados 100 µL de SRB (0,057%; *p/v*), deixando em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. O SRB não aderido foi removido através de lavagens com solução de ácido acético (1%; *v/v*) e o aderido foi solubilizado com 200 µL de Tris (10 mM) e a placa foi levada para leitura de absorbância no leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 540 nm.

Os resultados são expressos em termos da concentração de extrato capaz de inibir o crescimento celular em 50% (CI₅₀), sendo determinados de forma semelhante à aplicada para o ensaio TBARS.

4.8. Determinação da Toxicidade Aguda em Microcrustáceos *Artemia salina*

Quistos de *Artemia salina* foram obtidos a partir do ArtoxKit M (MicroBio Tests, Gent, Bélgica). Com auxílio de rede de 60 µm, lavaram-se os quistos com água da torneira abundante e foram hidratados por cerca de 2 horas em água destilada até que se observasse um formato mais arredondado. Foi preparado o meio de incubação que simula a água do mar conforme Sorgeloos et al. (1986) [88].

Os quistos hidratados foram transferidos para um frasco Erlenmeyer com 250 mL de água de incubação sob aerificação e iluminação (3000 – 4000 lux) constantes e à temperatura de $21,5 \pm 0,5$ °C até a eclosão (**Figura 10 – a**), de modo a obter náuplios instar II-III (metanáuplios) efetivamente usados no ensaio. Foram preparadas soluções do extrato em água do meio de incubação nas concentrações de 200 e 400 mg/L, sem a adição de solventes. Foi preparada uma solução estoque de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$; 1000 mg/L) a partir da qual foram preparadas diluições em água do meio de incubação nas concentrações de 100, 56, 32, 18 e 10 mg/L, usadas como o controlo de sensibilidade do ensaio (controlo negativo). O controlo positivo foi a água do meio de incubação.

A solução de extrato e os controlos foram submetidos a aerificação por 2 horas antes de iniciar o ensaio nas placas. Os poços de placas de teste foram preenchidos com 5 mL de solução de extrato com 4 replicatas para cada concentração testada e com os controlos, bem como para um poço de lavagem (**Figura 10 – b**).

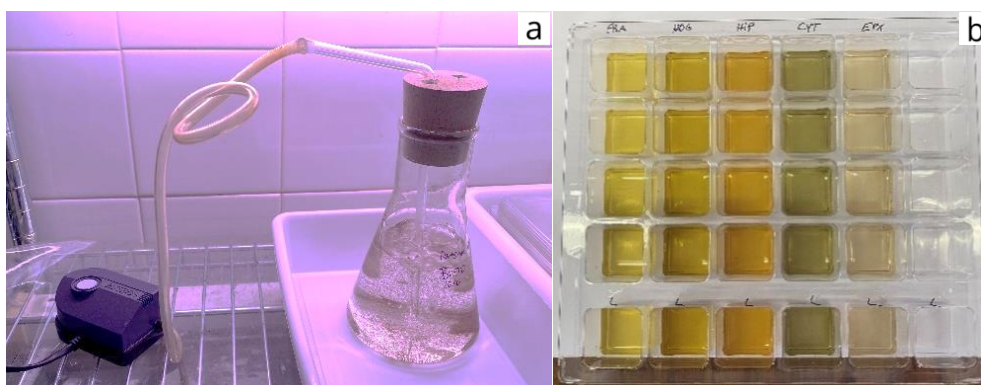


Figura 10. Ensaio com *Artemia salina*: (a) Sistema para eclosão dos quistos; (b) Placa com as soluções dos extratos.

Usando pipeta Pasteur de vidro, os náuplios foram recolhidos para os poços de lavagem primeiramente e depois transferidos para os poços do ensaio, de modo a acrescentar

em cada poço 5 ou 6 indivíduos (densidade de 0,8 a 1 indivíduo/mL), garantindo um grupo de observação de no mínimo 20 indivíduos por concentração testada. As placas foram mantidas no escuro e em temperatura controlada de $21,5 \pm 0,5$ °C, sendo efetuadas contagens do número de indivíduos imobilizados às 12 e 24 horas de ensaio. Os resultados foram expressos em relação à faixa em que se encontra a concentração letal a 50% da população de organismos de teste (LC_{50}), determinada com base na mortalidade ao final de 24 horas.

4.9. Análise Estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como valor médio \pm desvio padrão (DP), exceto para os resultados de atividade antimicrobiana e rendimentos de extração. Foi utilizada a variável n para acusar o número de replicatas de cada ensaio, descrito na legenda dos elementos utilizados para a apresentação dos resultados.

Para colaborar com a compreensão e discussão dos resultados da atividade antioxidante, foram utilizados dendrogramas como ferramentas estatísticas obtidos a partir de análise hierárquica ascendente realizada no software RStudio, sendo aplicada a parametrização dos dados e os cálculos de distâncias feitos através do método euclidiano. O número de clusters ideal foi definido pelo método do cotovelo.

O cálculo para o parâmetro LC_{50} , aplicável para o controlo negativo do ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* (o dicromato de potássio), foi realizado considerando os dados de percentagem de mortes por concentração testada, às 24 horas, através de regressão linear do Log_{10} da concentração em função dos valores Probit.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

Diferentes métodos para a determinação da atividade antioxidante foram selecionados de modo a avaliar a resposta dos extratos através de diferentes mecanismos. O método TBARS é baseado na inibição da peroxidação lipídica por espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, o OxHLIA na inibição da hemólise oxidativa por espécies reativas do AAPH e o ensaio DPPH na capacidade de captura do radical orgânico colorimétrico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Os resultados, expressos como o valor da média e desvio padrão, estão apresentados na **Tabela 2** em termos da concentração que leva a inibição de 50% do mecanismo oxidativo (IC₅₀).

Tabela 2. Resultados da atividade antioxidante para os métodos TBARS, DPPH e OxHLIA - Concentração inibitória média (IC₅₀), em µg/mL. (n = 3)

	IC ₅₀ (µg/mL)			
	TBARS	DPPH	OxHLIA	
			Δt = 60 min	Δt = 120 min
CAO	129±22	64±3	266±12	500±14
CAV	6±1	8,7±0,3	23±1	47±1
CYS	69,6±4,2	31,6±0,4	45±1	67±1
HIR	1,2±0,1	5,3±0,4	43±1	79±1
JUR	25±1	26,39±0,04	27±1	51±1
MEC	50±3	32±1	112±6	331±14
PON	9±1	12±1	7,6±0,4	45±1
RUF	4,5±0,1	8±1	60±1	109±2
RUI	6±0,3	9,9±0,3	88±3	222±4
SAN	123±4	14,0±0,3	28±1	44±1
VIV	9±1	11,7±0,2	22±1	49±1
Trolox	*N/A	N/A	22±1	44±1

*N/A: não aplicável. CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*. Controle: Trolox.

Observa-se que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante para todos os métodos. Tendo que a atividade é maior conforme menor for a concentração necessária para inibir 50% da oxidação, ao tomar por base o valor de IC₅₀ de 9,1±0,3 µg/mL para o Trolox obtido por Mandim et al. (2018) [86] no ensaio TBARS, tem-se que os extratos de algumas das plantas apresentaram desempenhos semelhantes e até mesmo melhores, como foi o caso dos extratos VIV, PON, CAV, RUF, RUI e com destaque para HIR, que apresentou

desempenho de aproximadamente 7,6 vezes melhor que o do Trolox. O elevado potencial antioxidante do extrato HIR já foi anteriormente avaliado pelo método TBARS e encontra aplicações reportadas na literatura especialmente para a conservação de produtos com elevado teor lipídico, como carnes [19], [89], a exemplo do realizado no trabalho de Salejda et al. (2014) [90] no melhoramento da conservação de carne suína com preparados das frutas da *H. rhamnoides*. No ensaio DPPH, Rivero-Cruz et al. (2020) [91] obteve um valor de IC₅₀ de 6,3±1,4 µg/mL para o Trolox, resultado que reforça o desempenho do extrato HIR na expressão da atividade antioxidante.

Para o ensaio OxHLIA, considerando Δt de 60 minutos, temos que CAV e VIV apresentaram desempenhos muito próximos ao do Trolox, com destaque para PON que apresentou um desempenho 2,9 vezes melhor do que o desta substância. Já para Δt de 120 minutos, PON e SAN apresentaram desempenhos equiparáveis ao do Trolox. Ao melhor do nosso conhecimento, não foi reportada anteriormente a avaliação da atividade antioxidante através do método OxHLIA para estas espécies.

Para efeito de compreender de forma visual as diferenças dos desempenhos foram utilizados dendrogramas com a definição de três clusters (**Figura 11** – a,b,c,d), sendo considerados os valores para o Trolox obtidos por Mandim et al. (2018) [86] e Rivero-Cruz et al. (2020) [91] para os resultados dos ensaios TBARS e DPPH, conforme citado anteriormente.

Ao considerar como referência o extrato de melhor desempenho, é possível conferir destaque aos demais extratos que primeiro formaram cluster com esta espécie. Neste sentido, CAV obteve um desempenho a se destacar dentro de todos os métodos ensaiados, sendo os resultados obtidos muito semelhantes aos reportados na literatura, como no trabalho de Rieger et al. (2008) [66], em que se obteve uma faixa entre 8,2 – 9,4 µg/mL (para o extrato hidroetanólico) no ensaio DPPH e no trabalho de Mandim (2018) que obteve o valor de 8±0,2 µg/mL no ensaio TBARS (para o extrato de acetona das inflorescências) e 34,0±0,6 µg/mL no ensaio OxHLIA em $\Delta t = 60$ minutos (para o extrato metanólico das inflorescências).

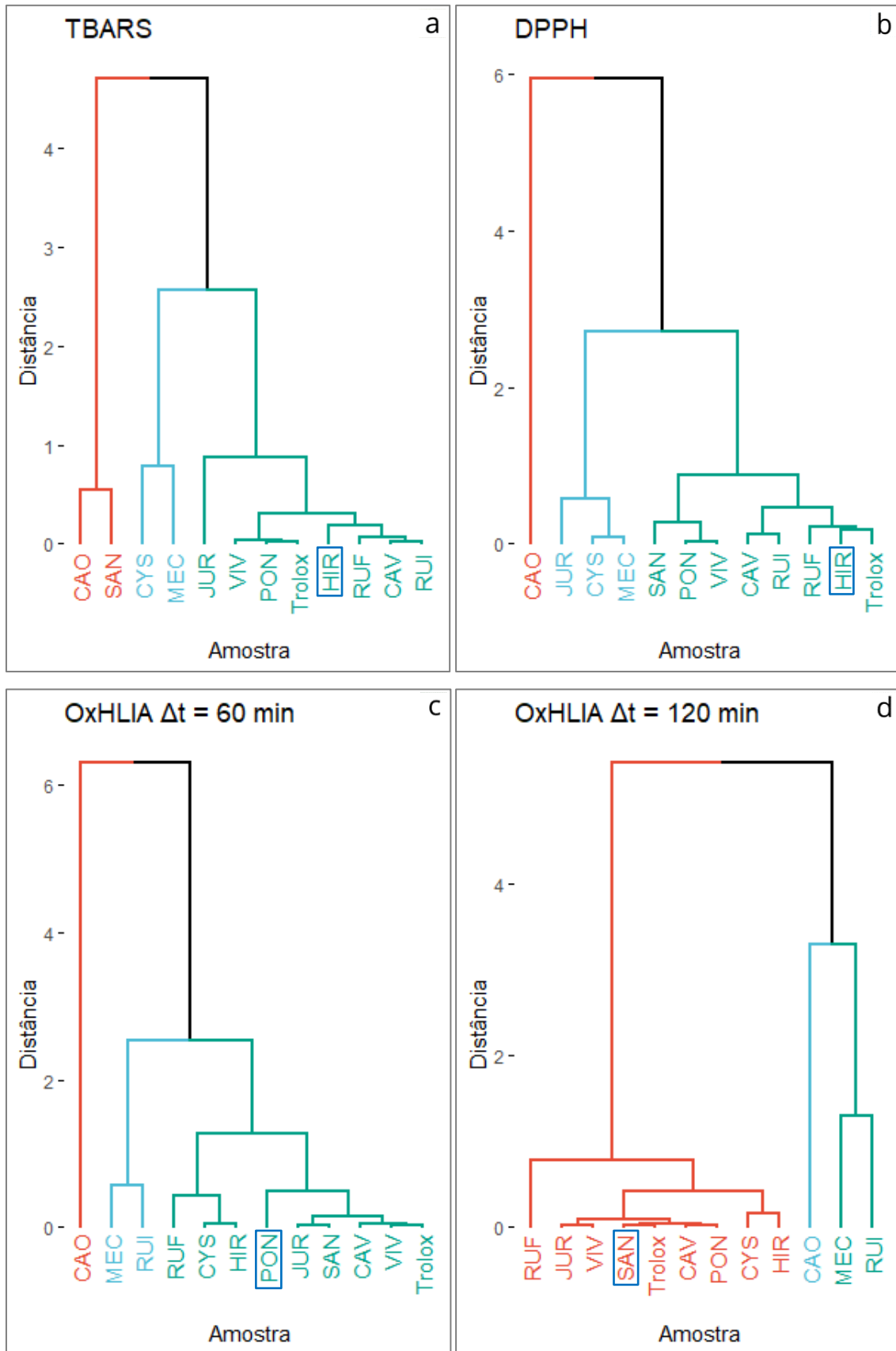


Figura 11. Dendrogramas com destaque para menores IC_{50} : (a) Resultados TBARS; (b) Resultados DPPH; (c) Resultados OxHLIA com $\Delta t = 60$ minutos; (d) Resultados OxHLIA com $\Delta t = 120$ minutos.

5.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Foi realizado um *screening* da atividade antimicrobiana dos extratos através do método da microdiluição em uma variedade de microrganismos causadores de patologias (referidos como bactérias clínicas) e microrganismos que são indicadores no controlo de qualidade microbiológica para a indústria alimentar e cosmética (referidos como bactérias e fungos contaminantes). A concentração mais alta testada foi 10 mg/mL e os resultados obtidos para as concentrações inibitórias mínimas (CIM), nas quais se observou atividade bacteriostática / fungistática, estão apresentados na **Tabela 3**, sendo os melhores desempenhos (por microrganismo) destacados em negrito. Destaca-se inicialmente que não foram registados valores de CBM e CFM (concentrações bactericida e fungicida mínimas, respectivamente) para os extratos, exceto CYS, o que será discutido mais adiante. Os resultados referentes aos valores de CIM, CBM e CFM obtidos para os controlos positivos estão apresentados na **Tabela A1** (ver **Anexo A**).

É possível observar que apenas HIR, RUI e RUF apresentaram atividade para todos os microrganismos testados. Tendo que os menores valores de CIM representam os melhores resultados, se mostra altamente promissor o extrato HIR, em especial pela atividade registada para as bactérias contaminantes.

O trabalho de Othman et al. (2021) [84] avaliou a atividade antimicrobiana de extratos da casca do marmelo (*Cydonia oblonga* Mill.) em uma diversidade de representantes de bactérias de contaminação alimentar em comparação com os aditivos sintéticos benzoato de sódio (E211) e metabissulfito de potássio (E224), empregados com a finalidade de conservantes na indústria de alimentos. Tomando os valores de CIM obtidos por esses autores para os aditivos, na faixa de 4 – 0,5 mg/mL para o E211 e 2 – 0,5 mg/mL para o E224, é possível inferir que os resultados obtidos para HIR representam potencial na avaliação como substituinte de conservantes sintéticos, com destaque para a resposta observada para os microrganismos *S. aureus* e *L. monocytogenes*, que foram equiparáveis ou mesmo melhores que a resposta dos aditivos para os mesmos microrganismos.

A respeito das bactérias clínicas, destacam-se as atividades dos extratos RUI e RUF para a *E. coli* de origem e também do extrato JUR para *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA).

Tabela 3. Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), em mg/mL. (n = 2)

Bactérias Clínicas	Gram	CIM (mg/mL)										
		CAO	CAV	CYS	HIR	JUR	MEC	PON	RUF	RUI	SAN	VIV
<i>E. coli</i>	-	5	5	5	1,25	1,25	2,5	2,5	0,6	0,6	5	2,5
<i>K. pneumoniae</i>	-	>10	10	10	5	10	10	10	10	10	10	5
<i>M. morgani</i>	-	5	10	2,5	5	2,5	5	5	5	5	5	5
<i>P. mirabilis</i>	-	>10	10	5	5	5	10	10	5	5	>10	10
<i>P. aeruginosa</i>	-	>10	10	10	5	10	>10	>10	1,25	1,25	10	10
<i>E. faecalis</i>	+	5	5	5	5	2,5	5	5	5	5	5	5
<i>L. monocytogenes</i>	+	2,5	10	5	2,5	10	10	2,5	5	2,5	2,5	10
*MRSA	+	5	1,25	2,5	1,25	0,6	5	1,25	2,5	1,25	5	2,5
Bactérias Contaminantes												
<i>E. cloacae</i>	-	>10	5	10	2,5	10	>10	10	5	2,5	10	10
<i>E. coli</i>	-	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	10	10	>10	>10
<i>P. aeruginosa</i>	-	>10	10	>10	5	10	>10	>10	10	10	>10	10
<i>S. enterica</i>	-	10	10	10	2,5	10	10	10	2,5	2,5	10	10
<i>Y. enterocolitica</i>	-	10	10	5	1,25	2,5	10	2,5	5	5	10	5
<i>B. cereus</i>	+	2,5	10	10	1,25	5	10	2,5	5	5	5	10
<i>L. monocytogenes</i>	+	2,5	2,5	5	0,6	2,5	10	2,5	2,5	2,5	1,25	10
<i>S. aureus</i>	+	5	5	5	0,6	2,5	10	5	1,25	2,5	10	5
Fungos Contaminantes												
<i>A. brasiliensis</i>	**N/A	10	10	5	10	1,25	5	10	5	5	10	10
<i>A. fumigatus</i>	N/A	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Nenhum dos extratos apresentou CBM e CFM, exceto CYS, que apresentou um CFM de 10 mg/mL para o fungo *A. brasiliensis* (dados não mostrados).

*MRSA: *S. aureus* Resistente à Meticilina; **N/A: não aplicável. CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*.

Já a respeito dos representantes de fungos, todos os extratos apresentaram atividade fungistática, com destaque para as atividades dos extratos JUR e CYS para o *A. brasiliensis*, sendo CYS o único a registar concentração fungicida mínima (CFM), 10 mg/mL. Ao melhor do nosso conhecimento, é a primeira vez que é reportada esta atividade para a *C. scoparius*, para as espécies de fungos avaliadas. No trabalho de Lores et al. (2015) [92], os extratos da planta obtidos usando lactato de etilo como solvente através do método de extração por líquido pressurizado apresentaram valores de CIM para o fungo *Candida albicans* comparáveis ao do controlo do solvente utilizado, tornando os resultados dos autores inconclusivos.

De um modo geral, é possível observar que as bactérias Gram-positivas foram mais afetadas, uma vez que todas as representantes testadas sofreram efeito bacteriostático para todos os extratos. Esta descoberta está conforme o também observado por Mandim et al. (2018) [9], ao avaliar a atividade antimicrobiana de extratos da *C. vulgaris* em um conjunto de bactérias. Bactérias Gram-negativas são inerentemente mais resistentes à agentes externos devido a presença de lipopolissacarídeos em suas membranas externas, enquanto a camada de peptidoglicano presente nas bactérias Gram-positivas não se configura como barreira de permeabilidade tão eficaz [89].

No grupo das bactérias contaminantes, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram as representantes que apresentaram maior resistência, o que também foi observado no trabalho de Baydar et al. (2003) [93], na avaliação da atividade antimicrobiana para extratos da *Vitis vinifera*. Tomando os resultados dos valores de CIM para os controlos positivos utilizados (**Anexo A**), nota-se que concentrações mais altas do antibiótico foram necessárias para as representantes citadas em comparação com as demais do grupo, o que verifica a maior resistência mesmo para compostos isolados. A estreptomicina apresentou CIM de 0,01 mg/mL para a *E. coli* e de 0,06 mg/mL para a *P. aeruginosa*, sendo aproximadamente 1,4 e 8,6 vezes maiores do que o CIM para as demais espécies do grupo (0,007 mg/mL), respectivamente. A ampicilina apresentou CIM de 0,63 mg/mL para a *P. aeruginosa*, sendo 4,2 vezes maior que o registado pra as demais espécies do mesmo grupo (0,15 mg/mL).

5.3. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória dos extratos foi avaliada através da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de rato RAW 264.7 após

estímulo à resposta inflamatória por lipopolissacarídeos (LPS). Nenhum dos extratos apresentou atividade anti-inflamatória para as concentrações testadas, sendo a mais elevada a de 400 µg/mL, o que se encontra discordante do que já foi reportado na literatura e abordado na seção de Revisão da Literatura deste trabalho.

O estudo de Novais et al. (2021) [94] reportou algo semelhante ao avaliar as propriedades bioativas de preparados condimentares feitos a partir de plantas medicinais e aromáticas. Para o caso da mistura desenvolvida para aplicação em saladas, apesar de apresentar boa atividade antioxidante no ensaio TBARS ($IC_{50} = 6,6 \pm 0,4$ µg/mL), a mistura não apresentou atividade anti-inflamatória no ensaio da inibição da produção de NO por macrófagos de rato RAW 264.7, sendo levantada a hipótese de que possam estar a ocorrer efeitos sinérgicos antagônicos que carecem de maiores investigações.

O trabalho de Mandim et al. (2018) [86] com a *C. vulgaris* avaliou o efeito do solvente utilizado na extração na resposta anti-inflamatória no ensaio com macrófagos de rato RAW 264.7, sendo observado que extratos obtidos usando solventes menos polares, a exemplo do n-hexano, apresentaram melhores resultados, o que pode justificar a ausência de atividade observada neste trabalho, já que foi utilizado solvente com maior polaridade.

Em seu estudo com as folhas da *J. regia*, Vieira et al. (2020) [95] também reportou a ausência de atividade anti-inflamatória para o extrato hidroetanólico para as concentrações testadas, registrando $IC_{50} > 500$ µg/mL, tendo sido realizada a extração assistida por calor (50 °C) e sob agitação magnética.

5.4. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da toxicidade *in vitro* foi realizada através do ensaio com células tumorais e não tumorais (hepáticas e renais) através do método SRB. Os resultados, expressos como o valor da média e desvio padrão, estão apresentados na **Tabela 4** em termos da concentração que leva a inibição da proliferação celular em 50% (CI_{50}).

Tendo que menores valores de CI_{50} representam maior atividade inibitória, para as linhas tumorais, valores de CI_{50} baixos são preferíveis, pois indicam a capacidade do extrato em exercer efeito no impedimento da proliferação das células. Já para as linhas não tumorais, valores altos de CI_{50} são preferíveis de modo que sugere maior segurança para a integridade das células normais.

Tabela 4. Resultados da atividade citotóxica dos extratos - Concentração de inibição da proliferação celular média (CI₅₀), em µg/mL. (n = 2)

	CI ₅₀ (µg/mL)				
	Linhas Tumorais			Linhas Não Tumorais	
	AGS	CaCo-2	MCF-7	VERO	PLP ₂
CAO	340±17	213±20	241±17	261±27	214±7
CAV	124±2	282±21	274±19	257±24	261±10
CYS	>400	248±23	226±11	237±6	261±8
HIR	183±11	194±11	209±11	219±19	178±3
JUR	231±21	219±4	253±12	69±1	193±18
MEC	277±25	297±21	>400	228±8	238±10
PON	70±6	59±2	60±5	85±6	51±3
RUF	222±14	267±23	229±18	231±6	84±1
RUI	134±7	174±17	208±16	>400	175±6
SAN	>400	>400	>400	314±5	381±3
VIV	313±30	>400	>400	>400	>400
Elipticina	1,23±0,03	1,21±0,02	1,02±0,02	1,40±0,10	1,40±0,10

CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*. Controlo: Elipticina.

O extrato PON foi o que apresentou a maior atividade citotóxica com os valores de CI₅₀ mais baixos (51 – 85 µg/mL), tendo efeito tóxico tanto para as linhas tumorais como para as normais. De acordo com Kis et al. (2020) [23], ainda são restritos os estudos encontrados sobre as propriedades da *P. nigra*, sendo que a maioria dos disponíveis tem os botões da planta como parte vegetal estudada. No caso dos estudos do potencial antitumoral, estes autores reportam o uso de substâncias isoladas dos botões, não tendo sido efetuada a avaliação com extratos holísticos da casca, ao melhor do nosso conhecimento.

Os extratos SAN e VIV sugerem maior inocuidade, apresentando valores mais elevados de CI₅₀. O extrato da amostra SAN não apresentou atividade para nenhuma das linhas tumorais nas concentrações testadas. No trabalho de da Silva et al. (2019) [96] foi avaliado o perfil de bioatividades do sumo do fruto da *S. nigra* com ênfase nas antocianinas, onde se verificou maior inocuidade às células PLP₂ (CI₅₀ > 400 µg/mL) e elevada capacidade de resposta citotóxica a células tumorais, a exemplo das células do carcinoma cervical, carcinoma pulmonar e adenocarcinoma de mama (linhas HeLa, NCI-H460 e MCF-7, respectivamente), com valores de CI₅₀ na faixa entre 16 – 58 µg/mL. Estas descobertas diferem das encontradas por nós, o que pode ser justificado pelo uso de diferentes partes vegetais. O extrato VIV não apresentou atividade para as linhas CaCo-2 e MCF-7 e não apresentou atividade para nenhuma das linhas normais, o que se encontra concordante com

as descobertas de Corrêa et al. (2017) [97] no estudo de propriedades bioativas do bagaço da uva.

Estabelecendo comparação entre a resposta das linhas normais e das linhas tumorais para um mesmo extrato, é possível destacar as respostas inibitórias que VIV, CAV e RUI apresentaram para a linha AGS, de modo a se verificar a inibição da proliferação das células tumorais em concentrações consideravelmente mais baixas do que aquelas que se configuram como inibitórias às linhas normais. Dos demais extratos, os valores de CI_{50} para pelo menos uma das linhas de células normais acaba por ser inferior ao necessário para causar efeitos inibitórios nas células tumorais.

5.5. Avaliação da Toxicidade Aguda *in vivo*

A avaliação da toxicidade *in vivo* foi realizada através de ensaios empregando o microcrustáceo *Artemia salina* como organismo de teste em exposição aos extratos em concentrações de 200 e 400 mg/L por um período de 24 horas. As concentrações usadas nos ensaios foram definidas em alinhamento com as aplicadas no ensaio de citotoxicidade, sendo uma primeira aproximação para compreender a resposta dos extratos numa mesma faixa de concentrações para diferentes ensaios. Os resultados apresentados na **Tabela 5** estão expressos como uma faixa em que se estima o valor de LC_{50} , estando a classificação de toxicidade de acordo com os critérios de Meyer et al. (1982) [61]. Não foi observada mortalidade superior a 10% dos indivíduos no controlo positivo do ensaio.

O controlo negativo utilizado atesta a sensibilidade do lote de organismos de teste, estando o valor calculado para o LC_{50} (48 ± 4 mg/L) coerente com a mortalidade em função do aumento da concentração. Tapia-Salazar et al. (2022) [98], reportou valores de LC_{50} na faixa entre 9 – 78 mg/L para a *A. salina*.

A partir dos resultados obtidos, para os extratos que apresentaram toxicidade moderada, se faz necessário efetuar o ensaio com concentrações intermediárias entre 200 e 400 mg/L para a determinação dos valores exatos de LC_{50} . Para os demais extratos, é necessário efetuar a testagem com concentrações mais elevadas para a determinação deste parâmetro.

Tabela 5. Resultados de toxicidade aguda em microcrustáceos *A. salina* - Concentração Letal (LC₅₀) às 24 horas, em mg/L. (n = 20 a 23, em função do extrato testado)

Extrato / Controle	LC ₅₀ (mg/L)	Classificação
CAO	200 < LC ₅₀ < 400	Toxicidade moderada
CAV	200 < LC ₅₀ < 400	Toxicidade moderada
CYS	>400	Provável baixa toxicidade
HIR	>400	Provável baixa toxicidade
JUR	>400	Provável baixa toxicidade
MEC	>400	Provável baixa toxicidade
PON	200 < LC ₅₀ < 400	Toxicidade moderada
RUF	>400	Provável baixa toxicidade
RUI	>400	Provável baixa toxicidade
SAN	>400	Provável baixa toxicidade
VIV	>400	Provável baixa toxicidade
Dicromato de Potássio	48±4	Toxicidade elevada

CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*. Controle: Dicromato de Potássio.

Verifica-se que os extratos PON, CAV e CAO apresentaram toxicidade moderada no ensaio *in vivo*. Ao comparar com os resultados dos ensaios *in vitro*, a amostra PON sugere maior efeito tóxico geral se comparada a CAV e CAO, frente aos efeitos inibitórios observados para todas as linhas testadas (células tumorais e não tumorais) no ensaio *in vitro*. Estas diferenças podem ser justificadas pelo efeito toxicológico no organismo completo (*A. salina*) versus na célula.

Mitić et al. (2022) [62] referem que resultados em que sejam verificados efeitos tóxicos podem sugerir a presença de compostos com potencial antitumoral ou para aplicações em pesticidas, sendo promissoras investigações mais aprofundadas para a identificação das espécies químicas responsáveis pela expressão destas propriedades. Para o caso dos extratos SAN e VIV, há concordância entre os resultados obtidos nos ensaios tanto *in vitro*, como *in vivo*, sugerindo maior inocuidade.

5.6. Avaliação do Perfil de Compostos Fenólicos e do Rendimento da Extração

A extração foi realizada à temperatura ambiente e sob agitação magnética, utilizando a mistura etanol/água (80:20; v/v) como solvente. Os rendimentos da extração, apresentados

na **Tabela 6**, foram determinados através da razão entre a massa de extrato obtida após a liofilização e a massa inicial de amostra.

Tabela 6. Resultados dos rendimentos de extração por maceração dos extratos. ($n = 1$)

Extrato	Rendimento (%)
CAO	29,5
CAV	17,0
CYS	18,5
HIR	21,7
JUR	22,7
MEC	25,2
PON	3,6
RUF	16,1
RUI	16,3
SAN	32,6
VIV	18,4

CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*.

A respeito do rendimento de extração, é essencial levar em consideração que a espécie vegetal, a parte vegetal selecionada e o tipo de extração, bem como as condições que a extração ocorre (solvente, temperatura, pressão, tempo, entre outros fatores), são determinantes para esses resultados.

Verifica-se que a espécie PON apresentou o menor rendimento, o que pode estar a ocorrer devido à parte vegetal utilizada, a casca. O trabalho de Tanase et al. (2019) [99] pontuou que a maioria dos trabalhos desenvolvidos com cascas de plantas são voltados para otimização de extração, em especial pela complexidade em acessar os compostos fenólicos desta matriz formada por um conjunto de tecidos mortos (não vascularizados) e com elevada composição de celulose, lignina e hemicelulose. Neste sentido, métodos não convencionais de extração (como a extração por micro-ondas ou por fluido supercrítico) podem ser mais eficientes em acessar e quebrar as interações dos compostos fenólicos com a matriz, acelerando a cinética de dissolução. Os autores afirmam, ainda, que as cascas se configuram como importantes fontes para a obtenção de compostos fenólicos, apesar de muitas vezes serem tratadas como resíduos de processos produtivos, o que em facto foi observado nos resultados de caracterização química do extrato PON, pois demonstrou maior diversidade de componentes identificados.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado a partir da identificação e quantificação dos componentes por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Cento e cinquenta e nove compostos foram identificados provisoriamente, incluindo ácidos fenólicos (ácidos cafeoilquínicos), flavan-3-óis, (+)-catequina, dímeros de (*epi*)catequina, elagitaninos e flavonoides glicosídeos, que foram descritos anteriormente nas espécies estudadas [5], [8], [32], [36], [38], [42], [46], [66], [72], [78], [79], [86], [92], [95], [100–106]. A identidade dos compostos foi atribuída comparando os dados cromatográficos com os da literatura. A quantificação dos componentes se deu utilizando curvas de calibração ($R^2 \geq 0,999$) obtidas a partir dos padrões disponíveis, apresentadas no **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

A **Tabela 7** apresenta os compostos majoritários identificados em cada extrato, bem como a sua proporção percentual em relação ao total de compostos fenólicos quantificados (%FT). Os resultados completos referentes à identificação e quantificação dos compostos estão apresentados nas **Tabelas C1 – C11** (ver **Anexo C**), bem como os espectros UV-Vis, apresentados nas **Figuras D1 – D11** (ver **Anexo D**).

Tabela 7. Compostos fenólicos majoritários identificados nos extratos.

Extrato	Composto Fenólico Majoritário	%FT
CAO	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	39,8
CAV	Dímero do ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	34,3
CYS	Metil diosmetina-malonil-hexosídeo	25,5
HIR	Galoil-HHDP-glucosídeo	45,7
JUR	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	26,0
MEC	Ácido salvianólico L	36,8
PON	(+)-Catequina	29,5
RUF	Galoil-bis-HHDP-glucosídeo	36,8
RUI	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	18,9
SAN	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	49,0
VIV	Ácido caftárico	25,2

CAO: *C. officinalis*; CAV: *C. vulgaris*; CYS: *C. scoparius*; HIR: *H. rhamnoides*; JUR: *J. regia*; MEC: *M. cervina*; PON: *P. nigra*; RUF: *R. fruticosus*; RUI: *R. idaeus*; SAN: *S. nigra*; VIV: *V. vinifera*.

Os elagitaninos foram os compostos majoritários na HIR, correspondendo a aproximadamente 48% dos compostos fenólicos quantificados no extrato. Os ácidos fenólicos foram identificados em maior quantidade na amostra MEC (70 mg/g de extrato). Avaliando a quantificação de compostos fenólicos totais, as maiores concentrações obtidas foram para CYS (130±4 mg/g de extrato) e HIR (123±2 mg/g de extrato), tendo também bons resultados para SAN (106±2 mg/g de extrato) e RUI (100±2 mg/g de extrato), conforme

pode ser verificado na **Figura 12**, organizada em ordem decrescente do conteúdo total de compostos fenólicos quantificados.

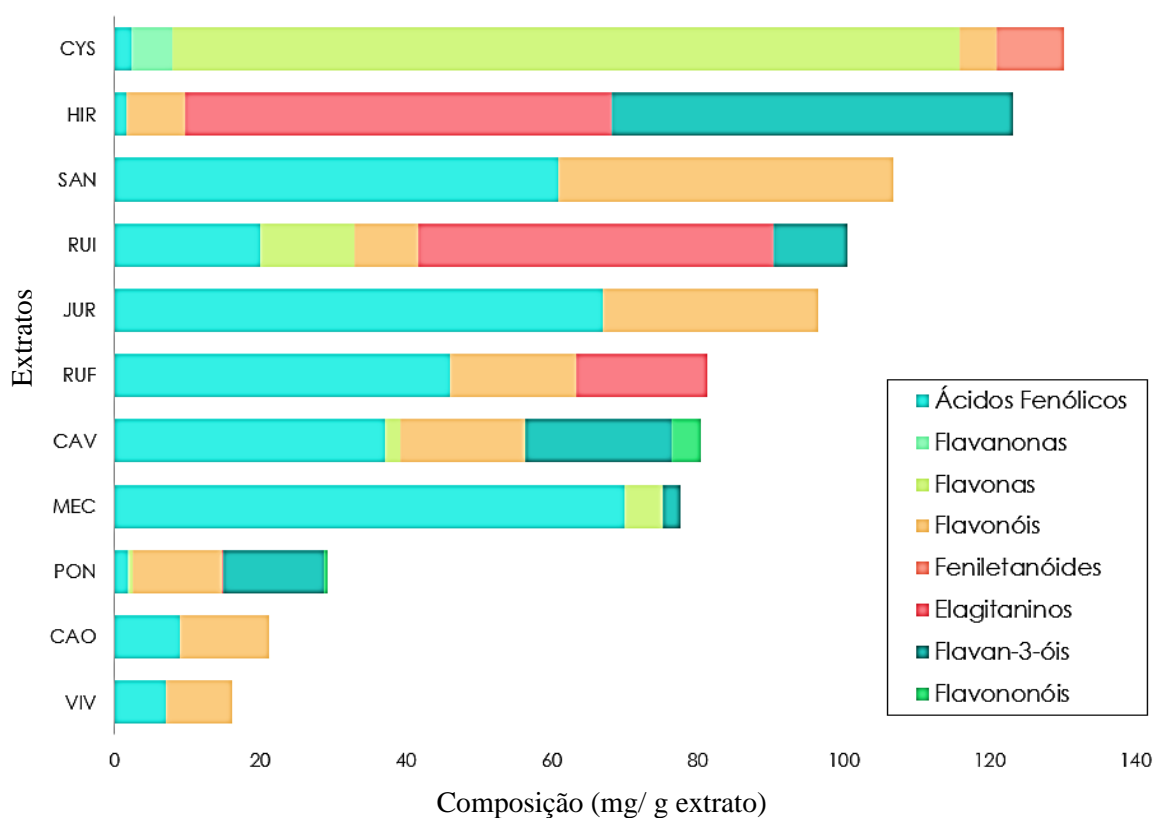


Figura 12. Quantificação das classes de compostos fenólicos identificadas nos extratos.

Aliando os resultados de rendimento de extração com as quantificações de compostos identificados, é possível verificar que as espécies vegetais estudadas podem configurar-se como ricas fontes para a obtenção de compostos fenólicos de diferentes classes. Pode-se destacar o elevado teor de ácidos fenólicos da MEC e de flavonas para a CYS. É importante salientar que para o caso do extrato RUI, a presença de poucos compostos, nomeadamente Lambertianina C e Galoil-bis-HHDP-glucosídeo, em quantidade elevada que levaram os elagitaninos a ser a classe mais representativa, sendo que uma diversidade maior de componentes quantificados em menores proporções tornam o perfil desta planta diverso em ácidos fenólicos e também flavonóis. Algo semelhante é observado para PON, em que apenas os compostos (+)-Catequina e Dímero da procianidina foram quantificados em proporções bastante expressivas com relação aos demais componentes, tornando os flavan-3-óis a classe mais representativa, sendo notável a diversidade de flavonóis quantificados

em menores proporções. Para os demais extratos, foi observada maior diversidade de componentes contribuindo para a composição total da classe mais representativa.

Outros trabalhos já estudaram o perfil de compostos fenólicos da *C. vulgaris*. O trabalho de Starchenko et al. (2020) [36] avaliou os extratos aquosos e hidroetanólicos das partes aéreas da planta obtidos a partir de extração com temperaturas entre 80 – 90° C. Os resultados obtidos por estes autores sugerem maior conteúdo de derivados do Ácido hidroxicinâmico, como os compostos dos ácidos Clorogénico e Cafeico, o que está concordante com nossos resultados. O trabalho de Mandim et al. (2018) [86] avaliou extratos das sumidades (extremidades) das flores da *C. vulgaris* obtidos a partir de extrações por maceração fazendo uso de diferentes solventes orgânicos e aquosos. O perfil de compostos obtido por estes autores apresentou maior teor de flavonoides, sendo obtido um perfil distinto do obtido neste trabalho, o que pode ser explicado por distinções nas partes vegetais usadas.

Para a *C. officinalis*, o trabalho de Miguel et al. (2016) [5] avaliou o perfil dos extratos aquosos (obtidos por infusão) e hidrometanólicos (obtidos por extração sob agitação magnética e à temperatura ambiente) das flores. Os autores reportam a predominância do conteúdo de flavonóis, o que está em conformidade com o encontrado neste trabalho. A maioria dos compostos identificados também foram identificados no trabalho dos autores, com exceção dos compostos Quercetina-7-*O*-malonil-hexosídeo e Canferol-*O*-rutinosídeo, o que pode estar a ocorrer devido ao uso de diferentes solventes para a extração. Neste mesmo trabalho citado foram caracterizados extratos das folhas da *M. cervina*, nos quais também verificou quantidades muito expressivas de ácidos fenólicos, contudo, os autores não identificaram outras classes de compostos fenólicos presentes, o que se encontra discordante com o nosso trabalho, pois foram detetadas flavonas e flavan-3-óis. Isto pode estar a ocorrer devido ao solvente e técnica de extração utilizadas e, ainda, pelas condições de cultivo da planta.

Em seu recente artigo de revisão sobre as aplicações de plantas do gênero *Cytisus*, Caramelo et al. (2022) [107] reportaram a escassez de estudos acerca da caracterização química destas espécies, bem como sobre aplicações práticas. O trabalho de Lores et al. (2015) [92] avaliou o perfil de compostos fenólicos do extrato da *C. scoparius* como um todo e de partes separadas usando lactato de etilo como solvente através do método de extração por líquido pressurizado, sendo reportadas as crisinas como flavonas mais abundantes, mas sem efetuar a proposição de identificação dos compostos separadamente.

No nosso trabalho, foram detetados derivados da crisina, sendo propostas as suas identificações.

O trabalho de Zheng et al. (2019) [106] apresentou resultados da caracterização de extratos hidrometanólicos de diversas partes da *H. rhamnoides* (incluindo galhos, folhas e frutos) obtidos através de extração por ultrassom. Os resultados destes autores indicam que o perfil do conteúdo dos galhos e folhas possui maior similaridade entre si, sendo a composição dos frutos com maiores distinções. O perfil obtido pelos autores difere pelo obtido por nós neste trabalho, o que pode ser justificado por envolver também o fruto e por diferenças na origem da planta e pelas diferenças nas técnicas de extração e no solvente utilizado.

A respeito da *J. regia*, o trabalho de Vieira et al. (2019) [108] com extratos das folhas obtidos a partir de extração hidroetanólica também reportou o maior teor de ácidos fenólicos. Os autores obtiveram um perfil diferente do identificado por nós neste trabalho inclusive para as quantificações dos componentes em comum entre os perfis, o que pode ter justificativa na diferença da localidade da coleta das folhas e nos parâmetros adotados no método de extração (os autores mencionam o uso de uma metodologia otimizada baseada em outros trabalhos).

No trabalho de revisão de Guleria et al. (2021) [71] foi observada que a maioria dos trabalhos envolvendo a caracterização química das plantas do gênero *Populus* investigou a respeito dos botões da planta. Ao melhor do nosso conhecimento, é a primeira vez que é reportado na literatura a caracterização e proposta de identificação de compostos de uma extração a partir da casca desta espécie vegetal. O trabalho de Benedec et al (2014) [38] avaliou o perfil de compostos fenólicos de extratos aquosos e etanólicos dos botões de duas espécies do gênero *Populus*. Os resultados demonstraram predominância no conteúdo de ácidos fenólicos, contudo, nossas descobertas revelaram maior conteúdo de flavan-3-óis na casca.

O trabalho de Pavlovic et al. (2016) [109] fez uma avaliação do perfil de compostos fenólicos dos extratos hidrometanólicos das folhas das espécies *R. fruticosus* e *R. idaeus*, obtidos em extração por ultrassom e em temperatura ambiente. A grande maioria dos compostos identificados por nós foram previamente identificados por estes autores.

O trabalho de Skowrońska et al. (2022) [104] avaliou o perfil de compostos fenólicos de extratos hidroetanólicos das folhas da *S. nigra* obtidos a partir de extrações a frio (maceração) e a quente (decocção). O que foi reportado pela autora está condizente com o

encontrado por nós, a respeito do conteúdo de ácidos fenólicos, sendo as folhas as partes vegetais com maiores quantidades destes componentes. O trabalho de Dawidowicz et al. (2005) [10] avaliou os extratos hidroetanólicos das folhas, flores e frutos da *S. nigra* obtidos a partir de extração por líquido pressurizado, com ênfase na detecção de flavonóis. Os resultados obtidos pelos autores sugerem a presença de significativo conteúdo de derivados da rutina (flavonóis) para as folhas, o que também foi observado nos nossos resultados e nos resultados de Skowrońska et al. (2022) [104].

As folhas da *V. vinifera* também foram objeto de estudo no trabalho de Fernandes et al. (2013) [102], sendo a extração realizada por decocção. O perfil de compostos fenólicos obtido neste trabalho foi distinto do obtido pelos autores citados, o que pode estar a ocorrer devido a diferenças na origem da espécie vegetal e na técnica e condições de extração utilizadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu identificar, em diferentes aspetos, a riqueza no conteúdo das espécies vegetais estudadas e desempenhos promissores para aplicações práticas e oportunidades de inovação, sendo exetável de agregar contribuições para a literatura e o fomento de trabalhos futuros. Em facto, a literatura reportou que algumas espécies demandavam de maior investigação acerca da caracterização, como a *Cytisus scoparius* (CYS) e a casca da *Populus nigra* (PON), de modo que informações, a exemplo da atividade antioxidante pelo método OxHLIA, tenham sido reportadas pela primeira vez, ao melhor do nosso conhecimento.

Frente à busca das indústrias alimentícia e cosmética por substituintes naturais aos aditivos químicos capazes de conservar e prevenir contaminações microbiológicas em produtos, são promissores os extratos com elevada atividade antioxidante e antimicrobiana. Neste contexto, destaca-se o desempenho do extrato HIR nos ensaios TBARS ($IC_{50} = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) e DPPH ($IC_{50} = 5,3 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$). Já no ensaio OxHLIA, PON ($IC_{50} = 7,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$; $\Delta t = 60 \text{ min}$) e SAN ($IC_{50} = 44 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$; $\Delta t = 120 \text{ min}$) obtiveram melhores resultados. Para o grupo de microrganismos referenciados como contaminantes, fungos e bactérias ATCC, verificou-se que a HIR apresentou atividade inibitória para todos os microrganismos avaliados, em especial para *L. monocytogenes* e *S. aureus* (CIM = 0,6 mg/mL). Isto revela elevado potencial de aplicabilidade deste extrato para a finalidade de controlo de contaminações. Outras descobertas a se destacar envolvem a atividade da JUR (CIM = 1,25 mg/mL) e CYS (CFM = 10 mg/mL) para o fungo *A. brasiliensis*.

A substituição segura de aditivos químicos por componentes de origem natural em produtos envolve a necessidade de se conhecer o perfil de toxicidade do extrato. Ao considerar os resultados para o ensaio com linhagens celulares hepáticas e renais, os resultados sugerem a maior inocuidade para VIV e SAN, o que está concordante com o observado no ensaio com *A. salina* ($LC_{50} > 400 \text{ mg/L}$). A maior toxicidade foi determinada para PON, com os menores valores de CI_{50} (51 – 85 $\mu\text{g/mL}$) para todas as linhas testadas. Os resultados obtidos para o ensaio *in vivo* sugerem que os extratos PON, CAV e CAO apresentam o valor de LC_{50} dentro da faixa de concentrações testadas (200 – 400 mg/L), sendo necessário efetuar o ensaio com concentrações intermediárias para determinar o valor exato do LC_{50} . Para as demais espécies, é necessário efetuar a testagem com concentrações mais elevadas para a determinação deste parâmetro.

Para além de fornecer um panorama sobre a resposta de toxicidade, o ensaio em linhas tumorais pode avaliar o potencial do extrato apresentar efeitos inibitórios à proliferação de tumores. Destaca-se a atividade dos extratos VIV, CAV e RUI na linha AGS, observada em concentrações mais baixas que as inibitórias às células normais, sendo possíveis maiores investigações acerca do potencial terapêutico dos componentes destas espécies.

Os compostos de origem vegetal também podem apresentar potencial terapêutico na proteção do organismo contra processos inflamatórios e patologias. Neste trabalho, para as concentrações máximas testadas (400 µg/mL), não foi verificada atividade anti-inflamatória para os extratos, sendo cabível a realização de maiores estudos acerca desta propriedade através de outros métodos reportados na literatura. No caso da resposta antimicrobiana a bactérias causadoras de patologias, destacam-se os efeitos inibitórios da PON para a *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA; CIM = 0,6 mg/mL) e RUI e RUF para a *E. coli* (CIM = 0,6 mg/mL).

Há necessidade de maiores investigações a respeito da otimização da extração de modo a se determinar as condições que levariam a maiores rendimentos e maior teor de compostos fenólicos, sendo que para as condições utilizadas, as proporções mais elevadas foram obtidas para CYS (130±4 mg/g de extrato) e HIR (123±2 mg/g de extrato). Apesar de identificados e quantificados os compostos fenólicos para os extratos, não foram estabelecidas correlações destes componentes com a expressão das propriedades bioativas, o que pode ser objeto de trabalhos futuros.

Perspetivando oportunidades de inovação no desenvolvimento de produtos funcionais, o extrato HIR configura-se como o mais promissor devido a sua elevada capacidade antioxidante, bom desempenho geral na inibição das bactérias contaminantes testadas, baixa toxicidade e conteúdo elevado de compostos fenólicos. Intende-se investigar a incorporação deste extrato na formulação de produto funcional cosmético ou cosmocêutico. Frente ao produto desenvolvido, é cabível a realização de maiores investigações visando atestar suas propriedades, nomeadamente a realização de testes de estabilidade, testes de desafio e ensaios clínicos, para a obtenção de um produto seguro e de benefícios comprovados.

REFERÊNCIAS

- [1] R. C. Fierascu, A. Ortan, I. C. Fierascu, and I. Fierascu, “*In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review,” *Current Opinion in Food Science*, vol. 24. Elsevier Ltd, pp. 1–8, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.cofs.2018.08.006.
- [2] S. S. Ferreira, A. M. Silva, and F. M. Nunes, “*Sambucus nigra* L. Fruits and Flowers: Chemical Composition and Related Bioactivities,” *Food Reviews International*. Taylor and Francis Inc., pp. 1–29, 2020. doi: 10.1080/87559129.2020.1788578.
- [3] D. S. Dezmirean, C. Paşca, A. R. Moise, and O. Bobiş, “Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis,” *Plants*, vol. 10, no. 1. MDPI AG, pp. 1–20, Jan. 01, 2021. doi: 10.3390/plants10010022.
- [4] A. Schieber, F. C. Stintzing, and R. Carle, “By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments” *Trends in Food Science and Technology*, Elsevier, pp. 1-13, Dez 2001. ISBN: 09242244/01.
- [5] M. Miguel *et al.*, “Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves),” *Food Funct*, vol. 7, no. 5, pp. 2223–2232, May 2016, doi: 10.1039/c6fo00398b.
- [6] I. Gouvinhas, M. Queiroz, M. Rodrigues, and A. I. R. N. A. Barros, “Evaluation of the Phytochemistry and Biological Activity of Grape (*Vitis vinifera* L.) Stems: Toward a Sustainable Winery Industry,” in *Polyphenols in Plants*, Elsevier, 2019, pp. 381–394. doi: 10.1016/b978-0-12-813768-0.00023-2.
- [7] M. Schulz and J. F. Chim, “Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries,” *Food Bioscience*, vol. 31. Elsevier Ltd, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.fbio.2019.100438.
- [8] M. Staszowska-Karkut and M. Materska, “Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* L.), raspberry (*Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*),” *Nutrients*, vol. 12, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020. doi: 10.3390/nu12020463.
- [9] F. Mandim *et al.*, “*Calluna vulgaris* (L.) Hull: Chemical characterization, evaluation of its bioactive properties and effect on the vaginal microbiota,” *Food Funct*, vol. 10, no. 1, pp. 78–89, Jan. 2019, doi: 10.1039/c8fo01910j.
- [10] A. L. Dawidowicz, D. Wianowska, and B. Baraniak, “The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts),” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 39, no. 3, pp. 308–315, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.lwt.2005.01.005.
- [11] C. Rubinger, M. Leão, “Seleção de Métodos Biológicos para a Avaliação Toxicológica de Efluentes Industriais”, Dissertação de Pesquisa, Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. pp. 89. 2009

- [12] E. Catanzaro, G. Greco, L. Potenza, C. Calcabrini, and C. Fimognari, “Natural products to fight cancer: A focus on *Juglans regia*,” *Toxins*, vol. 10, no. 11. MDPI AG, Nov. 14, 2018. doi: 10.3390/toxins10110469.
- [13] O. v. Tinkov, V. Y. Grigorev, A. N. Razdolsky, L. D. Grigoryeva, and J. C. Dearden, “Effect of the structural factors of organic compounds on the acute toxicity toward *Daphnia magna*,” *SAR QSAR Environ Res*, vol. 31, no. 8, pp. 615–641, Aug. 2020, doi: 10.1080/1062936X.2020.1791250.
- [14] M. de Fátima and S. Barroso, “Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna*,” Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. pp. 70. Jul 2009.
- [15] G. Kalčíková, J. Zagorc-Končan, and A. Ž. Gotvajn, “*Artemia salina* acute immobilization test: A possible tool for aquatic ecotoxicity assessment,” *Water Science and Technology*, vol. 66, no. 4, pp. 903–908, 2012, doi: 10.2166/wst.2012.271.
- [16] S. Sharma and K. Kumari, “An Overview on *Calendula officinalis* Linn: (Pot Marigold)”, ScienSage, pp. 7, Dez 2021, ISSN: 0976-9595.
- [17] E. F. Silva, S. R. Silva, J. I. Guerra Junior, and T. C. de L. Vasconcelos, “Aspectos botânicos e propriedades farmacológicas de *Calendula officinalis*: uma revisão,” *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, no. 5, pp. 31125–31132, 2020, doi: 10.34117/bjdv6n5-546.
- [18] N. Debbache, D. Atmani, and D. Atmani, “Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria,” *Ind Crops Prod*, vol. 53, pp. 85–92, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.018.
- [19] A. Jaśniewska and A. Diowksz, “Wide spectrum of active compounds in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) for disease prevention and food production,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/antiox10081279.
- [20] I. I. Rockenbach, L. V. Gonzaga, V. M. Rizelio, A. E. de S. S. Gonçalves, M. I. Genovese, and R. Fett, “Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking,” *Food Research International*, vol. 44, no. 4, pp. 897–901, May 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.049.
- [21] A. B. Pereira-Netto, “Tropical Fruits as Natural, Exceptionally Rich, Sources of Bioactive Compounds,” *International Journal of Fruit Science*, vol. 18, no. 3. Taylor and Francis Inc., pp. 231–242, Jul. 03, 2018. doi: 10.1080/15538362.2018.1444532.
- [22] R. Sundararajan *et al.*, “*Cytisus scoparius* Link - A natural antioxidant,” *BMC Complement Altern Med*, vol. 6, Mar. 2006, doi: 10.1186/1472-6882-6-8.
- [23] B. Kis *et al.*, “Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of *Populus nigra* L. Buds,” *Plants*, vol. 9, no. 11. MDPI AG, pp. 1–17, Nov. 01, 2020. doi: 10.3390/plants9111464.
- [24] M. Zia-Ul-Haq, M. Riaz, V. de Feo, H. Z. E. Jaafar, and M. Moga, “*Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses,” *Molecules*, vol. 19, no. 8. MDPI AG, pp. 10998–11029, 2014. doi: 10.3390/molecules190810998.

- [25] A. Gupta, T. Behl, and P. Panichayupakaranan, “A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*,” *Obesity Medicine*, vol. 16. Elsevier Ltd, Dec. 01, 2019. doi: 10.1016/j.obmed.2019.100142.
- [26] I. Oliveira, A. Sousa, I. C. F. R. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho, and J. A. Pereira, “Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 7, pp. 2326–2331, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.fct.2008.03.017.
- [27] M. V. N. L. Chaitanya, P. Suresh, P. Dhanabal, and S. Jubie, “Human Topopoisons From Weeds: A Review,” *Current Traditional Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 4–15, Feb. 2018, doi: 10.2174/2215083804666180123153001.
- [28] G. Suryakumar and A. Gupta, “Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 138, no. 2. pp. 268–278, Nov. 18, 2011. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.024.
- [29] V. Chepel, V. Lisun, and L. Skrypnik, “Changes in the content of some groups of phenolic compounds and biological activity of extracts of various parts of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) at different growth stages,” *Plants*, vol. 9, no. 8, pp. 1–19, Aug. 2020, doi: 10.3390/plants9080926.
- [30] A. Viapiana and M. Wesolowski, “The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L.,” *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 72, no. 1, pp. 82–87, Mar. 2017, doi: 10.1007/s11130-016-0594-x.
- [31] A. Jahanban-Esfahlan, A. Ostadrahimi, M. Tabibiazar, and R. Amarowicz, “A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree,” *Molecules*, vol. 24, no. 11. MDPI AG, Jun. 05, 2019. doi: 10.3390/molecules24112133.
- [32] R. Domínguez *et al.*, “Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties,” *Food Chem*, vol. 330, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127266.
- [33] S. Pundir *et al.*, “Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: A review,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 266. Elsevier Ireland Ltd, Feb. 10, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2020.113434.
- [34] A. R. Fontana, A. Antonioli, and R. Bottini, “Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics,” *J Agric Food Chem*, vol. 61, no. 38, pp. 8987–9003, Sep. 2013, doi: 10.1021/jf402586f.
- [35] F. Rodrigues *et al.*, “The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Calluna vulgaris* L. flowers,” *Food Research International*, vol. 111, pp. 724–731, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2018.06.012.
- [36] G. Starchenko, A. Hrytsyk, A. Raal, and O. Koshovyi, “Phytochemical profile and pharmacological activities of water and hydroethanolic dry extracts of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. herb,” *Plants*, vol. 9, no. 6, pp. 1–17, Jun. 2020, doi: 10.3390/plants9060751.

- [37] A. Croitoru, D. Ficaï, L. Craciun, A. Ficaï, and E. Andronescu, "Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, *Juglans regia*" *Curr Pharm Des*, vol. 25, no. 2, pp. 119–131, Apr. 2019, doi: 10.2174/1381612825666190329150825.
- [38] D. Benedec *et al.*, "Contrast between water- and ethanol-based antioxidant assays: Aspen (*Populus tremula*) and black poplar (*Populus nigra*) extracts as a case study," *J Food Qual*, vol. 37, no. 4, pp. 259–267, 2014, doi: 10.1111/jfq.12090.
- [39] J. A. Pereira *et al.*, "Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 11, pp. 2287–2295, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
- [40] R. Veberic, J. Jakopic, F. Stampar, and V. Schmitzer, "European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols," *Food Chem*, vol. 114, no. 2, pp. 511–515, May 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080.
- [41] G. Allegro, C. Pastore, G. Valentini, and I. Filippetti, "The evolution of phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. Red berries during ripening: Analysis and role on wine sensory—a review," *Agronomy*, vol. 11, no. 5. MDPI AG, 2021. doi: 10.3390/agronomy11050999.
- [42] S. Dudonné *et al.*, "Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: Individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging," *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 9, pp. 4527–4536, May 2011, doi: 10.1021/jf104791t.
- [43] S. Geetha, M. S. Ram, V. Singh, G. Ilavazhagan, and R. C. Sawhney, "Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-an *in vitro* study," 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/jethpharm
- [44] G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, and K. K. Sakariah, "Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodres
- [45] G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, and K. K. Sakariah, "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchem
- [46] I. Gülçin, F. Topal, R. Çakmakçi, M. Bilsel, A. C. Gören, and U. Erdogan, "Pomological Features, Nutritional Quality, Polyphenol Content Analysis, and Antioxidant Properties of Domesticated and 3 Wild Ecotype Forms of Raspberries (*Rubus idaeus* L.)," *J Food Sci*, vol. 76, no. 4, May 2011, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02142.x.
- [47] J. Pinela, L. Barros, M. Dueñas, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, "Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: Effects of drying and oral preparation methods," *Food Chem*, vol. 135, no. 3, pp. 1028–1035, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.038.
- [48] J. Takebayashi, N. Iwahashi, Y. Ishimi, and A. Tai, "Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis

- inhibition assay (OxHLIA),” *Food Chem*, vol. 134, no. 1, pp. 606–610, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.086.
- [49] I. Teotônio; Y. Nóbrega, “Efeitos Anti-Inflamatórios de Espécies de *Pouteria spp.* Sobre Macrófagos Murinos RAW 264.7 Estimulados com LPS”, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília. pp. 93, 2015.
- [50] E. A. M. de Bona, F. G. da S. Pinto, T. K. Fruet, T. C. M. Jorge, and A. C. de Moura, “Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos,” *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*, vol. 81, no. 3, pp. 218–225, Sep. 2014, doi: 10.1590/1808-1657001192012.
- [51] W. LI, J. ZHOU, and Y. XU, “Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices,” *Biomed Rep*, vol. 3, no. 5, pp. 617–620, Sep. 2015, doi: 10.3892/br.2015.481.
- [52] K. S. Laitano and W. G. Matias, “Testes de Toxicidade com *Daphnia magna* Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB,” *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, vol. 1, no. 1, pp. 43–47, 2006, doi: 10.5132/jbse.2006.01.009.
- [53] I. Alami Merrouni and M. Elachouri, “Anticancer medicinal plants used by Moroccan people: Ethnobotanical, preclinical, phytochemical and clinical evidence,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 266. Elsevier Ireland Ltd, Feb. 10, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2020.113435.
- [54] P. Taylor, L. Colman, and J. Bajoon, “The search for plants with anticancer activity: Pitfalls at the early stages,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 158, no. PART A. Elsevier Ireland Ltd, pp. 246–254, Dec. 02, 2014. doi: 10.1016/j.jep.2014.10.034.
- [55] M. Moosus and U. Maran, “Quantitative structure-activity relationship analysis of acute toxicity of diverse chemicals to *Daphnia magna* with whole molecule descriptors,” *SAR QSAR Environ Res*, vol. 22, no. 7–8, pp. 757–774, 2011, doi: 10.1080/1062936X.2011.623317.
- [56] A. Golbamaki, A. Cassano, A. Lombardo, Y. Moggio, M. Colafranceschi, and E. Benfenati, “Comparison of *in silico* models for prediction of *Daphnia magna* acute toxicity,” *SAR QSAR Environ Res*, vol. 25, no. 8, pp. 673–694, 2014, doi: 10.1080/1062936X.2014.923041.
- [57] R. Kühne, R. U. Ebert, P. C. Vonderohe, N. Ulrich, W. Brack, and G. Schüürmann, “Read-across prediction of the acute toxicity of organic compounds toward the water flea *Daphnia magna*,” *Mol Inform*, vol. 32, no. 1, pp. 108–120, Jan. 2013, doi: 10.1002/minf.201200085.
- [58] P. Sorgeloos, P. Lavens. Food and Agriculture Organization of the United Nations., *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996.
- [59] Y. Dağlıoğlu, İ. Altınok, H. İlhan, and M. Sökmen, “Determination of the acute toxic effect of ZnO-TiO₂ nanoparticles in brine shrimp (*Artemia salina*).” *Acta Biologica Turcica*, 2016. E-ISSN: 2458-7893.

- [60] Y. Dağlıoğlu and M. S. Çelebi, “The evaluation of the acute toxic effects of Polyvinylferrocenium supported platinum nanoparticles on *Artemia salina* (Brine shrimp),” 2008, [Online]. Available: www.biodicon.com
- [61] BN Meyer et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45:31-4. doi: 10.1055/s-2007-971236.
- [62] Z. S. Mitić et al., “Essential Oils of Three Balkan Abies Species: Chemical Profiles, Antimicrobial Activity and Toxicity toward *Artemia salina* and *Drosophila melanogaster*,” *Chem Biodivers*, vol. 19, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.1002/cbdv.202200235.
- [63] N. Ali et al., “Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg,” *BMC Complement Altern Med*, vol. 13, Jun. 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-138.
- [64] S. A. Dar, F. A. Ganai, A. R. Yousuf, M. U. H. Balkhi, T. M. Bhat, and P. Sharma, “Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*,” *Pharm Biol*, vol. 51, no. 2, pp. 170–180, Feb. 2013, doi: 10.3109/13880209.2012.715172.
- [65] OECD/OCDE, “Guideline for Testing of Chemicals. *Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*”, Guideline 202, 13 Abr 2004.
- [66] G. Rieger, M. Müller, H. Guttenberger, and F. Bucar, “Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*,” *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 19, pp. 9080–9086, Oct. 2008, doi: 10.1021/jf801104e.
- [67] T. Ercetin, F. S. Senol, I. Erdogan Orhan, and G. Toker, “Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L.,” *Ind Crops Prod*, vol. 36, no. 1, pp. 203–208, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.indcrop.2011.09.007.
- [68] L. M. L. Parente et al., “Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil.”, *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.4, p.383-391, 2009.
- [69] N. A. Taha and M. A. Al-Wadaan, “Significance and use of walnut, *Juglans regia* Linn: A review,” 2021. [Online]. Available: www.internationalscholarsjournals.org
- [70] M. J. Gonçalves, A. M. Vicente, C. Cavaleiro, and L. Salgueiro, “Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal,” *Nat Prod Res*, vol. 21, no. 10, pp. 867–871, Aug. 2007, doi: 10.1080/14786410701482244.
- [71] I. Guleria et al., “A review on the genus *Populus*: a potential source of biologically active compounds,” *Phytochemistry Reviews*. Springer Science and Business Media B.V., 2021. doi: 10.1007/s11101-021-09772-2.
- [72] M. T. Monforte, A. Smeriglio, M. P. Germanò, S. Pergolizzi, C. Circosta, and E. M. Galati, “Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, and gastroprotective properties of *Rubus fruticosus* L. fruit juice,” *Phytotherapy Research*, vol. 32, no. 7, pp. 1404–1414, Jul. 2018, doi: 10.1002/ptr.6078.
- [73] H. U. Rasheed, H. Nawaz, R. Rehman, A. Mushtaq, and U. Rashid, “The Blackberry: A Review on its Composition and Chemistry, Uses and Bioavailability and Potential Health Benefits,” 2017. [Online]. Available: www.iscientific.org/Journal.html

- [74] P. R. Venskutonis, A. Dvaranauskaitė, and J. Labokas, “Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania,” *Fitoterapia*, vol. 78, no. 2, pp. 162–165, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.fitote.2006.10.001.
- [75] M. Akram *et al.*, “Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review,” *Phytotherapy Research*, vol. 32, no. 5. John Wiley and Sons Ltd, pp. 811–822, May 01, 2018. doi: 10.1002/ptr.6024.
- [76] K. Młynarczyk, D. Walkowiak-Tomczak, and G. P. Łysiak, “Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry,” *Journal of Functional Foods*, vol. 40. Elsevier Ltd, pp. 377–390, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.025.
- [77] J. F. Terral *et al.*, “Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars.,” *Ann Bot*, vol. 105, no. 3, pp. 443–455, 2010, doi: 10.1093/aob/mcp298.
- [78] C. Leal *et al.*, “Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product,” *Ind Crops Prod*, vol. 154, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112675.
- [79] C. di Lorenzo *et al.*, “Phenolic profile and antioxidant activity of different raisin (*Vitis vinifera* L.) samples ,” *BIO Web Conf*, vol. 7, p. 04006, 2016, doi: 10.1051/bioconf/20160704006.
- [80] M. Vinceković *et al.*, “The enhancement of bioactive potential in *Vitis vinifera* leaves by application of microspheres loaded with biological and chemical agents,” *J Plant Nutr*, vol. 42, no. 6, pp. 543–558, Apr. 2019, doi: 10.1080/01904167.2019.1568467.
- [81] J. Yu and M. Ahmedna, “Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications,” *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no. 2. pp. 221–237, Feb. 2013. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x.
- [82] C. Caleja, L. Barros, M. A. Prieto, M. F. Barreiro, M. B. P. P. Oliveira, and I. C. F. R. Ferreira, “Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat-, microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques: A comparative study through response surface analysis,” *Sep Purif Technol*, vol. 186, pp. 297–308, 2017, doi: 10.1016/j.seppur.2017.06.029.
- [83] L. Barros *et al.*, “Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts,” *Ind Crops Prod*, vol. 41, no. 1, pp. 41–45, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.03.038.
- [84] S. Othman, J. Pinela, and L. Barros, “Valorisation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) peel as a source of nutrients and bioactive polyphenols.” *Master’s Dissertation in Biotechnological Engineering*. Instituto Politécnico de Bragança, pp. 61, 2021.
- [85] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,” *Département Science de l’Aliment*, ENSIA, Massy, pp.6, 1995.

- [86] Mandim *et al.*, “Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull” *Dissertação de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais*. Instituto Politécnico de Bragança. Pp. 115. 2018.
- [87] T. C. S. P. Pires *et al.*, “Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe),” *Food Chem*, vol. 240, pp. 701–706, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.010.
- [88] Patrick. Lavens, Patrick. Sorgeloos, and Food and Agriculture Organization of the United Nations., *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996.
- [89] P. S. Negi, A. S. Chauhan, G. A. Sadia, Y. S. Rohinishree, and R. S. Ramteke, “Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts,” *Food Chem*, vol. 92, no. 1, pp. 119–124, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.07.009.
- [90] A. Salejda, U. Tril, G. Krasnowska, “The effect of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries on some quality characteristics of cooked pork sausages. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*. Vol:08, No:6, 2014.
- [91] J. F. Rivero-Cruz *et al.*, “Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of mexican brown propolis,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/antiox9010070.
- [92] M. Lores, M. Pájaro, M. Álvarez-Casas, J. Domínguez, and C. García-Jares, “Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems,” *Talanta*, vol. 140, pp. 134–142, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.03.034.
- [93] N. G. Baydar, G. Özkan, and O. Sağdıç, “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts,” *Food Control*, vol. 15, no. 5, pp. 335–339, Jul. 2004, doi: 10.1016/S0956-7135(03)00083-5.
- [94] C. Novais *et al.*, “Bioactive and nutritional potential of medicinal and aromatic plant (Map) seasoning mixtures,” *Molecules*, vol. 26, no. 6, Mar. 2021, doi: 10.3390/molecules26061587.
- [95] V. Vieira *et al.*, “Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 137, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.fct.2020.111189.
- [96] R. F. R. da Silva, J. C. M. Barreira, S. A. Heleno, L. Barros, R. C. Calhelha, and I. C. F. R. Ferreira, “Anthocyanin profile of elderberry juice: A natural-based bioactive colouring ingredient with potential food application,” *Molecules*, vol. 24, no. 13, 2019, doi: 10.3390/molecules24132359.
- [97] R. C. G. Corrêa *et al.*, “Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation,” *J Funct Foods*, vol. 36, pp. 410–417, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.07.030.
- [98] M. Tapia-Salazar, V. R. Diaz-Sosa, and D. L. Cárdenas-Chávez, “Toxicological effect and enzymatic disorder of non-studied emerging contaminants in *Artemia salina*

- model,” *Toxicol Rep*, vol. 9, pp. 210–218, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.toxrep.2022.01.007.
- [99] C. Tanase, S. Cosarcă, and D. L. Muntean, “A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity,” *Molecules*, vol. 24, no. 6. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/molecules24061182.
- [100] A. Santos *et al.*, “Leaves and decoction of *Juglans regia* L.: Different performances regarding bioactive compounds and *in vitro* antioxidant and antitumor effects,” *Ind Crops Prod*, vol. 51, pp. 430–436, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.003.
- [101] P. Goufo, R. K. Singh, and I. Cortez, “A reference list of phenolic compounds (Including stilbenes) in grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots, woods, canes, stems, and leaves,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/antiox9050398.
- [102] F. Fernandes *et al.*, “*Vitis vinifera* leaves towards bioactivity,” *Ind Crops Prod*, vol. 43, no. 1, pp. 434–440, May 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.031.
- [103] A. Bouziane *et al.*, “Phenolic compounds and bioactivity of *Cytisus villosus* Pourr.,” *Molecules*, vol. 23, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.3390/molecules23081994.
- [104] W. Skowrońska, S. Granica, M. E. Czerwińska, E. Osińska, and A. Bazyłko, “*Sambucus nigra* L. leaves inhibit TNF- α secretion by LPS-stimulated human neutrophils and strongly scavenge reactive oxygen species.” 2022. [Online]. Available: <https://ssrn.com/abstract=3993339>
- [105] M. Chaitanya, S. Dhanabal, S. Jubie, M. Pavithra, “Phytochemical, cytotoxic investigation and molecular docking studies of *Cytisus scoparius* Link for its dual human topo poisoning (I&II) activity”, *Journal of Harmonized Research (JOHR)*, pp. 16-35, 2016. ISSN: 2321-0958.
- [106] W. H. Zheng *et al.*, “Analysis on the Constituents of Branches, Berries, and Leaves of *Hippophae rhamnoides* L. by UHPLC-ESI-QTOF-MS and Their Anti-Inflammatory Activities,” *Nat Prod Commun*, vol. 14, no. 8, 2019, doi: 10.1177/1934578X19871404.
- [107] D. Caramelo, C. Barroca, R. Guiné, E. Gallardo, O. Anjos, and J. Gominho, “Potential Applications of the *Cytisus* Shrub Species: *Cytisus multiflorus*, *Cytisus scoparius*, and *Cytisus striatus*,” *Processes*, vol. 10, no. 7. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/pr10071287.
- [108] V. Vieira *et al.*, “Phenolic profile, antioxidant and antibacterial properties of *Juglans regia* L. (walnut) leaves from the Northeast of Portugal,” *Ind Crops Prod*, vol. 134, pp. 347–355, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.04.020.
- [109] A. v. Pavlović *et al.*, “Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia,” *Ind Crops Prod*, vol. 87, pp. 304–314, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2016.04.052.

ANEXO A

Tabela A1. Resultados de CIM, CBM e CFM para os controlos utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana.

	Estreptomicina		Meticilina		Ampicilina		Imipenem		Vancomicina		Cetoconazol	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
Bactérias Clínicas												
<i>E. coli</i>	**N/A	N/A	N/A	N/A	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>K. pneumoniae</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	10	>10	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>M. morgani</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	>10	>10	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>P. mirabilis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>P. aeruginosa</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	>10	>10	0,5	1	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>E. faecalis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	<0,15	<0,15	N/A	N/A	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A
<i>L. monocytogenes</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	N/A	N/A	N/A	N/A
*MRSA	N/A	N/A	N/A	N/A	<0,15	<0,15	N/A	N/A	0,25	0,5	N/A	N/A
Bactérias Cont.												
<i>E. cloacae</i>	0,007	0,007	N/A	N/A	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>E. coli</i>	0,01	0,01	N/A	N/A	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>P. aeruginosa</i>	0,06	0,06	N/A	N/A	0,63	0,63	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>S. enterica</i>	0,007	0,007	N/A	N/A	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Y. enterocolitica</i>	0,007	0,007	N/A	N/A	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>B. cereus</i>	0,007	0,007	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>L. monocytogenes</i>	0,007	0,007	N/A	N/A	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>S. aureus</i>	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Fungos Cont.												
<i>A. brasiliensis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,06	0,125
<i>A. fumigatus</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,5	1

*MRSA: *S. aureus* Resistente à Meticilina; **N/A: não aplicável.

ANEXO B

Tabela B1. Curvas de calibração ($R^2 \geq 0,999$) obtidas a partir dos padrões disponíveis.

Código	Padrão	Curva de Calibração
A	Ácido Cafeico	$y = 388345x + 406369$
B	Naringenina	$y = 18433x + 78903$
C	Apigenina-7-O-glucosídeo	$y = 10683x - 45794$
D	Verbascosídeo	$y = 124233x - 18873$
E	Apigenina-6-C-glucosídeo	$y = 107025x + 61531$
F	Quercetina-3-O-glucosídeo	$y = 34843x - 160173$
G	Ácido Clorogénico	$y = 168823x - 161172$
H	Ácido Elágico	$y = 26719x - 317255$
I	Ácido Gálico	$y = 131538x + 292163$
J	Quercetina-3-O-rutinosídeo	$y = 13343x + 76751$
K	Ácido Hidroxibenzoico	$y = 208604x + 173056$
L	Catequina	$y = 84950x - 23200$
M	Luteolina-6-C-glucosídeo	$y = 4087,1x + 72589$
N	Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 301950x + 6966,7$
O	Taxifolina	$y = 203766x - 208383$
P	Mircetina	$y = 23287x - 581708$
Q	Ácido Ferúlico	$y = 633126x - 185462$
R	(<i>epi</i>)catequina	$y = 10314x + 147331$
S	Ácido Siringico	$y = 376056x + 141329$
T	Ácido Rosmarínico	$y = 191291x - 652903$

ANEXO C

Tabela C1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Calendula officinalis*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	6.31	322	353	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	8,4 \pm 0,5
2 ^A	8.71	326	341	Ácido Cafeico hexosídeo	0,61 \pm 0,01
3 ^F	13.50	346	755	Quercetina-3- <i>O</i> -rhamnosil-rutinosídeo	0,737 \pm 0,001
4 ^F	14.99	350	609	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1,01 \pm 0,02
5 ^J	15.93	354	769	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -rhamnosil-rutinosídeo	0,65 \pm 0,04
6 ^F	16.69	353	595	Quercetina- <i>O</i> -pentosil-hexosídeo	1,26 \pm 0,02
7 ^F	16.67	353	623	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -neohesperidosídeo	1,31 \pm 0,02
8 ^F	19.17	346	549	Quercetina-7- <i>O</i> -malonil-hexosídeo	0,99 \pm 0,03
9 ^F	19.84	343	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	0,660 \pm 0,002
10 ^F	20.82	354	623	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	3,5 \pm 0,2
11 ^F	22.02	343	477	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,86 \pm 0,01
12 ^F	24.64	353	519	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -(6''-acetil)-glucosídeo	1,06 \pm 0,03
Ácidos Fenólicos					9 \pm 0,5
Flavonóis					12,1 \pm 0,4
Compostos Fenólicos Totais					21,0 \pm 0,8

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C2. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Calluna vulgaris*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média±desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	4.36	324	353	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	4,70±0,03
2 ^L	4.94	279	575	Dímero de Proantocianidina tipo A	5,56±0,08
3 ^L	5.32	287	1151	Tetrâmero de Procianidina tipo A	7,67±0,04
4 ^G	6.34	324	707	Dímero do Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	27,5±0,5
5 ^G	7.41	321	353	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	4,90±0,01
6 ^F	8.64	340	465	Diidroquercetina-6- <i>C</i> -hexosídeo	1,72±0,03
7 ^F	9.77	341	465	Diidroquercetina- <i>C</i> -hexosídeo	0,83±0,02
8 ^O	13.08	285	435	Taxifolina- <i>O</i> -pentosídeo	4,026±0,003
9 ^L	14.35	283	1153	Dímero de Procianidina tipo B	6,8±0,1
10 ^F	14.73	350	595	Quercetina- <i>O</i> -pentosil-hexosídeo	1,50±0,02
11 ^F	16.49	350	493	Miricetina-3- <i>O</i> -glicuronídeo	1,43±0,03
12 ^F	17.36	355	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	6,11±0,06
13 ^F	19.26	350	609	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1,18±0,02
14 ^F	20.14	352	433	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo	2,11±0,02
15 ^F	21.10	347	477	Quercetina-3- <i>O</i> -glicuronídeo	1,21±0,02
16 ^F	21.90	341	447	Quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo	1,00±0,01
17 ^M	23.15	346	621	Luteolina acetil pentosil-hexosídeo	2,1±0,1
Ácidos Fenólicos					37,1±0,5
Flavan-3-óis					20,1±0,2
Flavonas					2,1±0,1
Flavonóis					17,1±0,2
Flavanonóis					4,026±0,003
Compostos Fenólicos Totais					80±1

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Cytisus scoparius*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média±desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^A	5.82	318	335	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilshiquímico	2,33±0,02
2 ^B	7.61	311	431	Emodina- <i>O</i> -glucosídeo	5,53±0,08
3 ^C	8.61	321	593	Isovitexina-4'- <i>O</i> -glucosídeo	5,77±0,06
4 ^D	10.69	308	623	Verbascosídeo	9,3±0,5
5 ^E	12.60	320	461	Trihidroximetoxi- <i>C</i> -hexosídeo Flavona	11,2±0,5
6 ^F	13.51	321	447	Canferol-7- <i>O</i> -hexosídeo	5,0±0,2
7 ^E	15.35	331	563	Apigenina-6- <i>C</i> -pentosídeo-8- <i>C</i> - hexosídeo	12,8±0,5
8 ^E	17.79	345	461	Crisoeriol- <i>C</i> -hexosídeo isómero I	9,8±0,6
9 ^E	18.61	330	461	Crisoeriol- <i>C</i> -hexosídeo isómero II	4,81±0,03
10 ^E	19.11	330	461	Crisoeriol- <i>C</i> -hexosídeo isómero III	1,68±0,07
11 ^C	20.04	345	593	Isovitexina-7- <i>O</i> -glucosídeo (Saponarina)	12,6±0,5
12 ^E	20.78	344	547	Luteolina- <i>C</i> -malonil-glucosídeo	11,8±0,6
13 ^C	22.85	346	589	Metil Diosmetina-malonil-hexosídeo	33,1±0,3
14 ^C	24.78	328	1035	Tricina- <i>O</i> -dehidrodiferuloil- glucosídeo- <i>O</i> -glicuronídeo	4,55±0,06
Ácidos Fenólicos					2,33±0,02
Flavanonas					5,53±0,08
Flavonas					108±3
Flavonóis					5,0±0,2
Feniletanoides					9,3±0,5
Compostos Fenólicos Totais					130±4

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C4. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Hippophae rhamnoides*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média±desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁺ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^I	5.61	274	633	Galoil-HHDP-glucose	56,3±0,9
2 ^I	6.31	276	935	Galoil-bis-HHDP-glucose isómero I	0,61±0,03
3 ^R	7.73	275	577	Dímero de Procianidina	51±1
4 ^L	9.12	274	865	Trímero de Procianidina	1,10±0,01
5 ^F	10.62	350	831	Isorhamnetina- <i>O</i> -hidroxiferuloil-hexosídeo- <i>O</i> -hexosídeo	1,32±0,02
6 ^L	11.48	274	1441	Pentâmero de (<i>epi</i>)catequina tipo B	0,98±0,03
7 ^I	11.89	275	935	Galoil-bis-HHDP-glucose	0,184±0,007
8 ^F	12.56	352	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,96±0,03
9 ^L	13.51	275	865	Trímero de Procianidina	0,887±0,001
10 ^L	14.58	281	1153	Tetrâmero de Procianidina	1,31±0,05
11 ^I	15.02	275	1567	Sanguiin-H10	0,47±0,02
12 ^F	16.63	350	609	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1,37±0,03
13 ^H	17.31	362	433	Ácido Elágico pentosídeo	1,70±0,03
14 ^F	17.67	282	935	Quercetina- <i>O</i> -glucosil-glucosídeo	1,60±0,02
15 ^I	18.29	350	961	Galoil-bis-HHDP-glucose isómero II	1,12±0,04
16 ^F	20.82	353	623	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1,24±0,03
17 ^F	22.01	350	477	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,87±0,02
18 ^F	31.90	338	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	0,581±0,003
Ácidos Fenólicos					1,70±0,03
Flavonóis					7,9±0,2
Elagitaninos					59±1
Flavan-3-óis					55±1
Compostos Fenólicos Totais					123±2

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C5. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Juglans regia*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média±desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	4.28	322	353	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	25,0±0,4
2 ^G	5.57	312	337	Ácido <i>cis</i> 4- <i>p</i> -Cumaroilquínico	12,4±0,4
3 ^G	6.28	324	353	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	11,8±0,5
4 ^G	7.32	311	337	Ácido <i>trans</i> 4- <i>p</i> -Cumaroilquínico	3,99±0,03
5 ^G	8.57	314	337	Ácido <i>cis</i> 5- <i>p</i> -Cumaroilquínico	3,89±0,02
6 ^G	10.54	325	337	Ácido <i>trans</i> 5- <i>p</i> -Cumaroilquínico	5,20±0,03
7 ^F	16.51	331	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,92±0,01
8 ^F	17.31	354	463	Quercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo	13,4±0,1
9 ^F	19.17	350	433	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo isómero I	1,82±0,02
10 ^F	20.01	351	433	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo isómero II	7,11±0,08
11 ^F	21.08	348	447	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	3,5±0,2
12 ^C	22.85	344	417	Luteolina- <i>O</i> -pentosídeo	4,0±0,1
13 ^A	24.29	328	501	Derivado do Ácido Cafeico	0,68±0,02
14 ^F	25.69	332	431	Canferol- <i>O</i> -desoxihexosil	0,89±0,01
15 ^F	26.71	340	489	Acetil Quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo isómero I	0,90±0,01
16 ^F	28.67	341	489	Acetil Quercetina- <i>O</i> -ramnosídeo isómero II	0,92±0,03
Ácidos Fenólicos					67±1
Flavonóis					29,5±0,5
Compostos Fenólicos Totais					96±2

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C6. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Mentha cervina*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^S	4.16	278	197	Ácido Siringico	0,89 \pm 0,01
2 ^L	6.51	318	305	Galocatequina	2,42 \pm 0,07
3 ^T	8.23	322	313	Ácido Salvianólico F	1,48 \pm 0,03
4 ^E	8.79	319	593	Apigenina 6,8-C-diglucosídeo	5,18 \pm 0,07
5 ^T	13.35	322	537	Ácido Litospérmico A isómero I	2,61 \pm 0,05
6 ^T	14.52	320	539	Ácido Yunnaneico D isómero I	4,32 \pm 0,04
7 ^T	16.25	321	539	Ácido Yunnaneico D isómero II	4,7 \pm 0,3
8 ^T	17.41	321	717	Ácido Salvianólico A	6,0 \pm 0,3
9 ^T	19.98	321	719	Ácido Sagerínico	2,68 \pm 0,04
10 ^T	20.48	327	717	Ácido Salvianólico L	28,7 \pm 0,3
11 ^T	21.87	328	359	Ácido <i>cis</i> -Rosmarínico	5,37 \pm 0,03
12 ^T	22.87	331	359	Ácido <i>trans</i> -Rosmarínico	2,54 \pm 0,02
13 ^T	23.95	325	537	Ácido Litospérmico A isómero II	3,28 \pm 0,04
14 ^T	25.89	322	521	Ácido Rosmarínico hexosídeo	1,33 \pm 0,03
15 ^T	29.73	323	537	Ácido Litospérmico A isómero III	6,11 \pm 0,08
Ácidos Fenólicos					70 \pm 1
Flavan-3-óis					2,42 \pm 0,07
Flavonas					5,18 \pm 0,07
Compostos Fenólicos Totais					78 \pm 1

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C7. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Populus nigra*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média±desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^L	5.61	281	577	Dímero de Procianidina	5,04±0,08
2 ^L	6.12	280	289	(+)-Catequina	8,6±0,3
3 ^N	7.29	311	337	Ácido <i>cis p</i> -Cumaroilquínico	1,41±0,07
4 ^A	8.82	321	179	Ácido Cafeico	0,106±0,004
5 ^N	10.15	336	337	Ácido <i>trans p</i> -Cumaroilquínico	0,196±0,002
6 ^O	13.23	349	465	Taxifolina- <i>O</i> -hexosídeo	0,296±0,003
7 ^O	15.87	321	303	Taxifolina	0,311±0,004
8 ^F	17.09	331	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,608±0,002
9 ^F	19.34	349	477	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,691±0,006
10 ^B	20.21	330	449	Eriodictiol-hexosídeo	0,329±0,008
11 ^F	21.02	335	447	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	0,599±0,002
12 ^F	22.04	353	639	Isorhamnetina dihexosídeo	0,634±0,006
13 ^P	23.42	339	479	Miricetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	2,744±0,003
14 ^P	24.94	332	479	Miricetina-3- <i>O</i> -hexosídeo	2,704±0,006
15 ^E	27.24	331	593	Apigenina-6- <i>C</i> -glucose-8- <i>C</i> -glucose	0,47±0,01
16 ^F	28.79	331	477	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	0,649±0,001
17 ^I	29.66	289	635	Digaloil-HHDP-hexose	0,295±0,006
18 ^P	31.29	333	657	Metil diidromiricetina dihexosídeo	2,790±0,004
19 ^F	32.27	347	491	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glicuronídeo	0,740±0,004
Ácidos Fenólicos					1,711±0,006
Flavonóis					12,16±0,04
Flavonas					0,47±0,01
Flavan-3-óis					13,7±0,4
Flavanonóis					0,607±0,007
Flavanonas					0,329±0,008
Elagitaninos					0,295±0,006
Compostos Fenólicos Totais					29,3±0,6

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C8. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Rubus fruticosus*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	4.77	324	353	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	15,5 \pm 0,6
2 ^G	6.53	323	353	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	12,9 \pm 0,5
3 ^G	7.97	323	311	Ácido Caftárico	8,8 \pm 0,4
4 ^G	10.21	287	337	Ácido <i>p</i> -Cumaroilquínico	6,9 \pm 0,4
5 ^H	12.09	281	1401	Lambertianina C	4,44 \pm 0,06
6 ^I	12.75	285	935	Galoil-bis-HHDP-glucosídeo	13,6 \pm 0,2
7 ^J	14.59	351	609	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	4,2 \pm 0,2
8 ^H	16.61	357	433	Ácido Elágico pentosídeo	2,42 \pm 0,05
9 ^F	17.21	353	477	Quercetina- <i>O</i> -glicuronídeo	7,2 \pm 0,4
10 ^F	19.16	354	607	Canferol glucuronil-ramnosídeo	2,03 \pm 0,01
11 ^F	19.91	347	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	2,49 \pm 0,06
12 ^F	21.81	343	591	Canferol glucosil-glucosídeo	1,29 \pm 0,02
Ácidos Fenólicos					46 \pm 2
Flavonóis					17,2 \pm 0,6
Elagitaninos					18,0 \pm 0,3
Compostos Fenólicos Totais					82 \pm 3

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C9. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Rubus idaeus*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	4.34	324	353	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	7,8 \pm 0,1
2 ^K	5.15	323	417	Diácido Hidroxibenzoico- <i>O</i> -dipentosídeo	6,9 \pm 0,4
3 ^A	5.66	321	341	Ácido Cafeico hexosídeo	3,4 \pm 0,1
4 ^L	8.28	280	577	Dímero de Procianidina	10,13 \pm 0,05
5 ^C	9.62	322	401	Apigenina- <i>O</i> -pentosídeo	1,337 \pm 0,001
6 ^H	12.21	280	1401	Lambertianina C	11,7 \pm 0,2
7 ^I	12.82	280	935	Galoil-bis-HHDP-glucosídeo	36,8 \pm 0,4
8 ^H	16.54	364	433	Ácido Elágico pentosídeo	1,78 \pm 0,02
9 ^F	17.21	352	477	Quercetina- <i>O</i> -glicuronídeo	4,5 \pm 0,2
10 ^F	19.01	324	607	Canferol glucuronil-ramnosídeo	1,11 \pm 0,03
11 ^F	19.84	325	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	0,97 \pm 0,02
12 ^M	20.74	342	461	Luteolina-glicuronídeo	11,65 \pm 0,05
13 ^F	22.47	330	461	Canferol- <i>O</i> -glicuronídeo	1,24 \pm 0,03
14 ^F	22.82	326	447	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	0,95 \pm 0,02
Ácidos Fenólicos					19,9 \pm 0,7
Flavonóis					8,8 \pm 0,3
Flavonas					12,99 \pm 0,05
Flavan-3-óis					10,13 \pm 0,05
Elagitaninos					48,6 \pm 0,6
Compostos Fenólicos Totais					100 \pm 2

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C10. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Sambucus nigra*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^G	4.17	322	353	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	5,01 \pm 0,03
2 ^G	6.18	336	353	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	52,0 \pm 0,3
3 ^A	8.76	323	179	Ácido Cafeico	1,19 \pm 0,03
4 ^N	10.09	312	337	Ácido <i>p</i> -Cumaroilquínico	2,17 \pm 0,03
5 ^Q	12.23	318	367	Ácido Feruloil-quínico	0,45 \pm 0,01
6 ^F	13.01	331	625	Quercetina-diglucosídeo	0,680 \pm 0,003
7 ^F	13.97	325	755	Canferol- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -rutinosídeo	0,554 \pm 0,003
8 ^F	15.69	324	639	Isorhamnetina dihexosídeo	0,72 \pm 0,03
9 ^F	16.53	356	609	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	24,9 \pm 0,4
10 ^F	17.74	353	609	Quercetina-desoxihexosil-hexosídeo	3,9 \pm 0,2
11 ^F	18.94	343	549	Quercetina-7- <i>O</i> -malonil-hexosídeo	3,8 \pm 0,2
12 ^F	19.85	341	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	2,00 \pm 0,02
13 ^F	20.88	354	623	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	5,5 \pm 0,3
14 ^F	21.94	346	477	Canferol-3- <i>O</i> -glucosídeo	2,495 \pm 0,008
15 ^F	24.59	349	519	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -acetil-glucosídeo	1,08 \pm 0,02
Ácidos Fenólicos					60,8 \pm 0,4
Flavonóis					46 \pm 1
Compostos Fenólicos Totais					106 \pm 2

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

Tabela C11. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato da *Vitis vinifera*. O tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}) e dados espectrais de massa são apresentados. Resultados expressos em mg/g de extrato seco, média \pm desvio padrão. ($n = 2$)

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Tentativa de Identificação	Quantificação (mg/g)
1 ^A	4.55	328	311	Ácido Caftárico	4,03 \pm 0,02
2 ^A	5.92	311	295	Ácido <i>cis</i> -Coutárico	1,522 \pm 0,009
3 ^A	6.53	315	295	Ácido <i>trans</i> -Coutárico	1,52 \pm 0,01
4 ^F	17.28	354	477	Quercetina-glicuronídeo	3,29 \pm 0,02
5 ^A	17.73	354	463	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	3,72 \pm 0,09
6 ^F	19.91	346	593	Canferol- <i>O</i> -rutinosídeo	0,89 \pm 0,02
7 ^F	21.07	346	447	Canferol-7- <i>O</i> -hexosídeo	1,062 \pm 0,006
Ácidos Fenólicos					7,1 \pm 0,1
Flavonóis					8,97 \pm 0,05
Compostos Fenólicos Totais					16,0 \pm 0,2

Os códigos sobrescritos ao número do pico apresentam a identificação da curva de calibração utilizada no cálculo de quantificação, conforme estabelecido na **Tabela B1** (ver **Anexo B**).

ANEXO D

Calendula officinalis

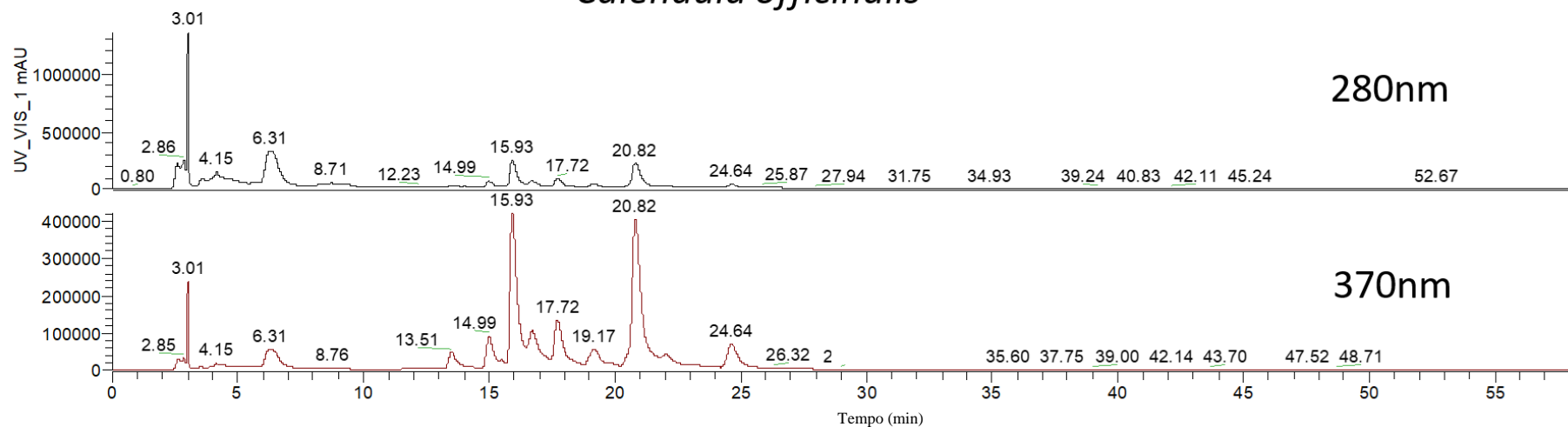


Figura D1. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Calendula officinalis* em 280 e 370 nm.

Calluna vulgaris

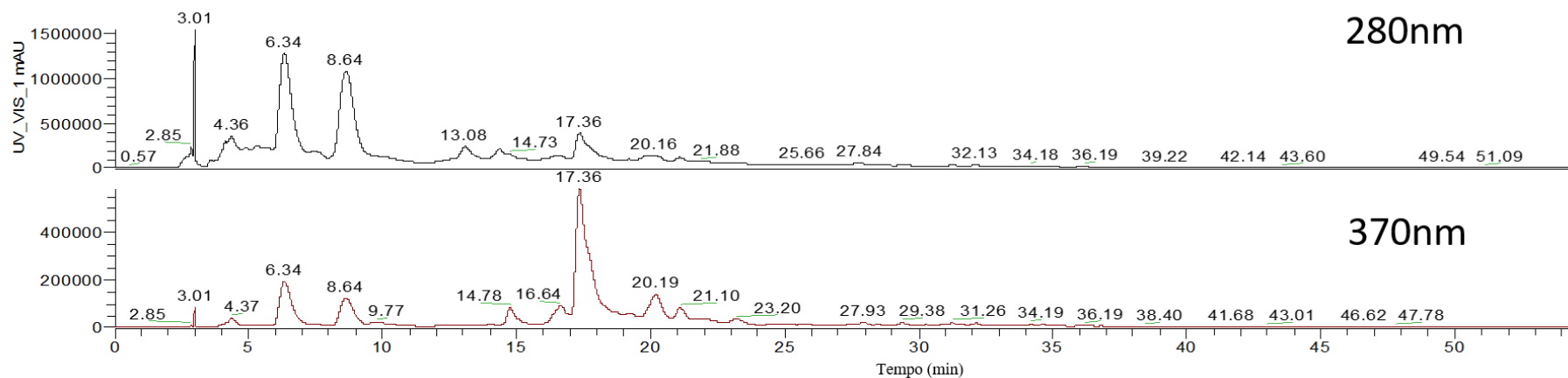


Figura D2. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Calluna vulgaris* em 280 e 370 nm.

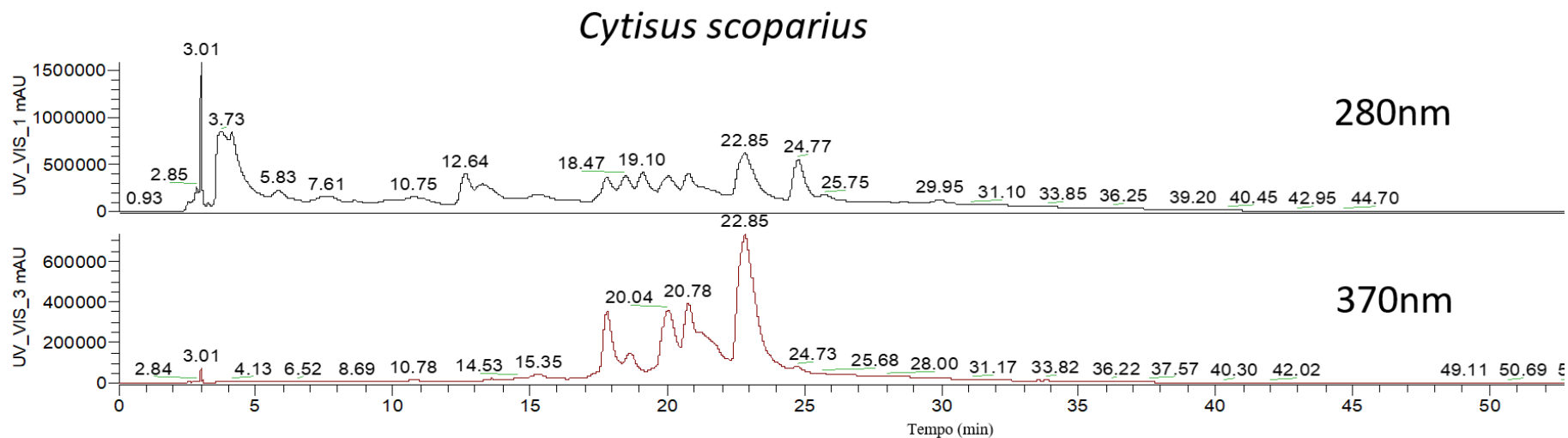


Figura D3. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Cytisus scoparius* em 280 e 370 nm.

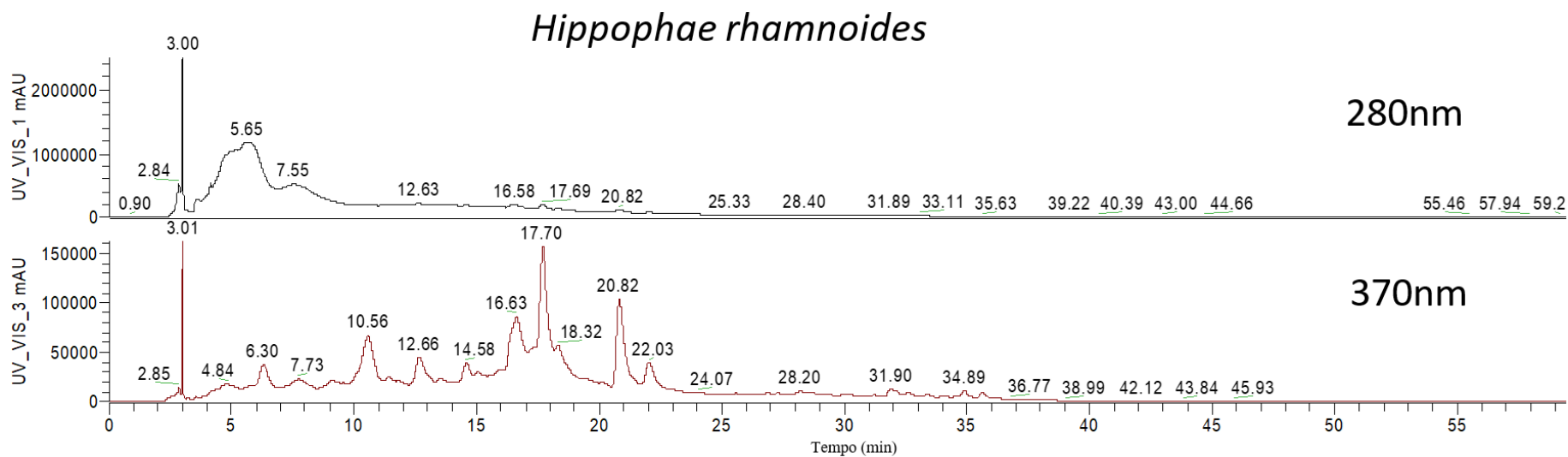


Figura D4. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Hippophae rhamnoides* em 280 e 370 nm.

Juglans regia

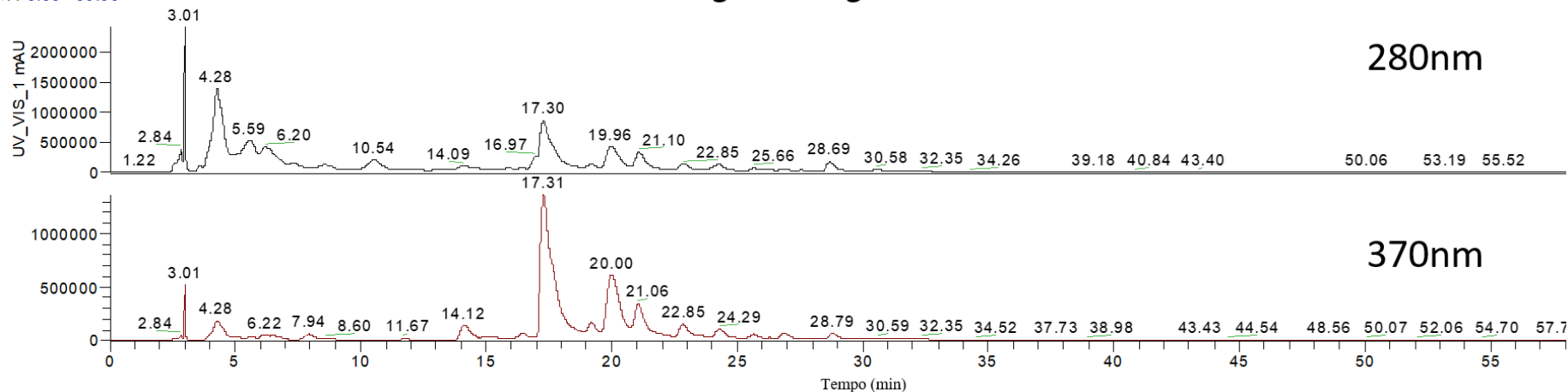


Figura D5. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Juglans regia* em 280 e 370 nm.

Mentha cervina

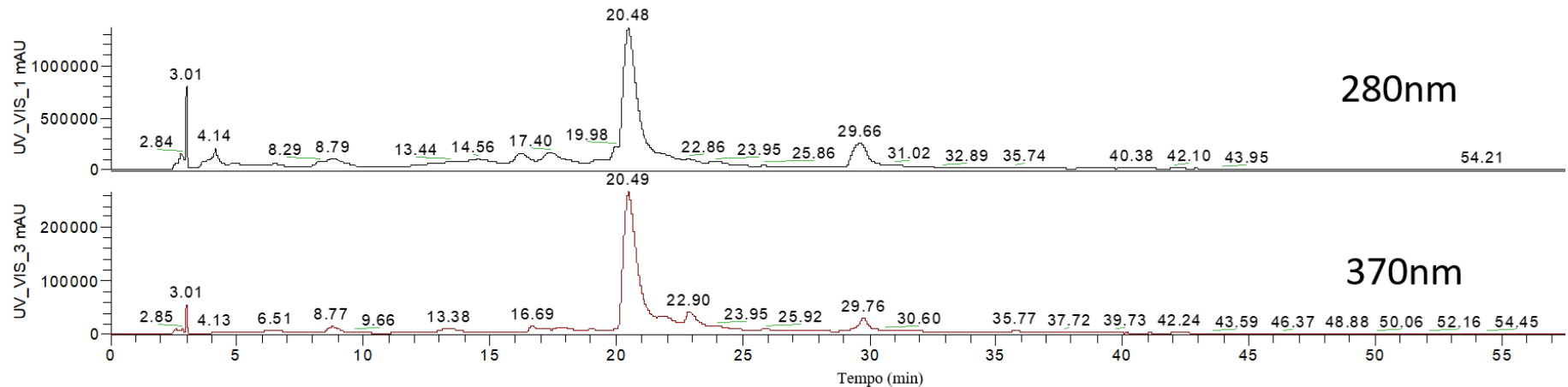


Figura D6. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *M. cervina* em 280 e 370 nm.

Populus nigra

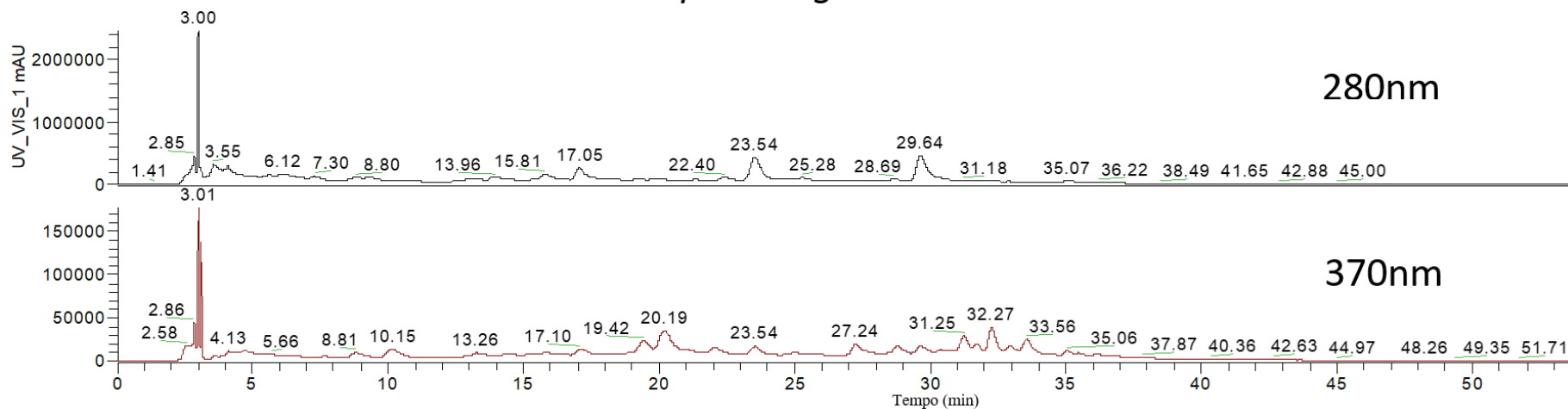


Figura D7. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Populus nigra* em 280 e 370 nm.

Rubus fruticosus

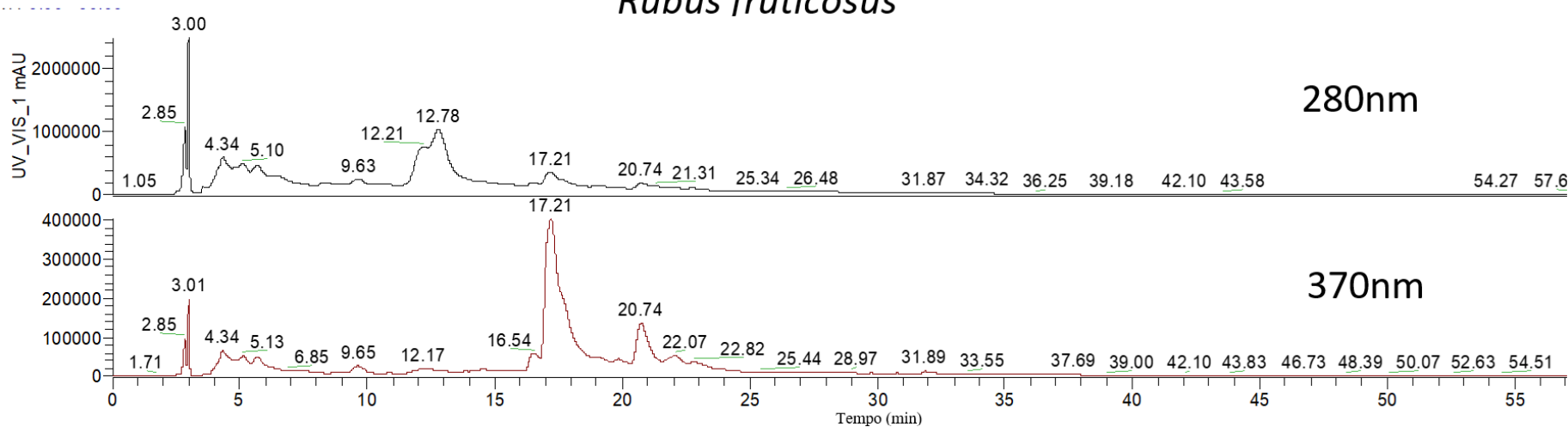


Figura D8. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Rubus fruticosus* em 280 e 370 nm.

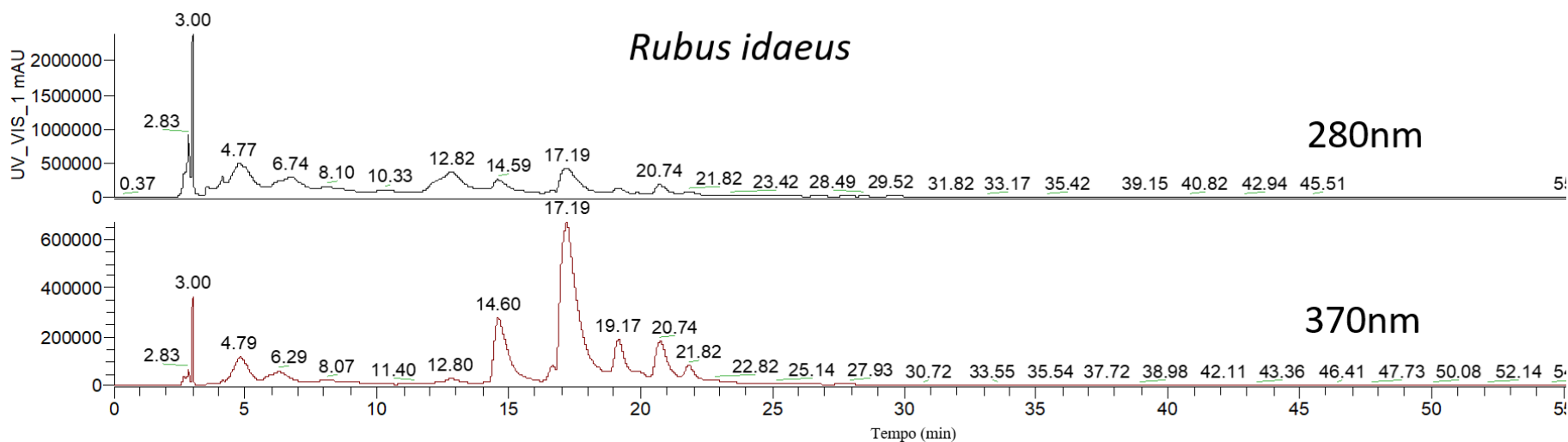


Figura D9. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Rubus idaeus* em 280 e 370 nm.

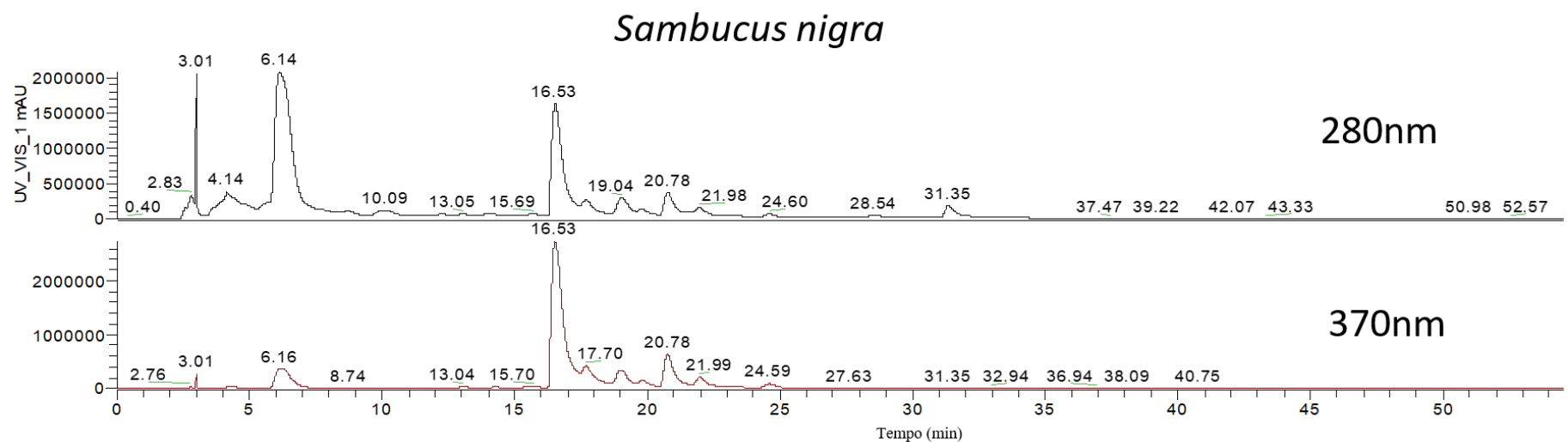


Figura D10. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Sambucus nigra* em 280 e 370 nm.

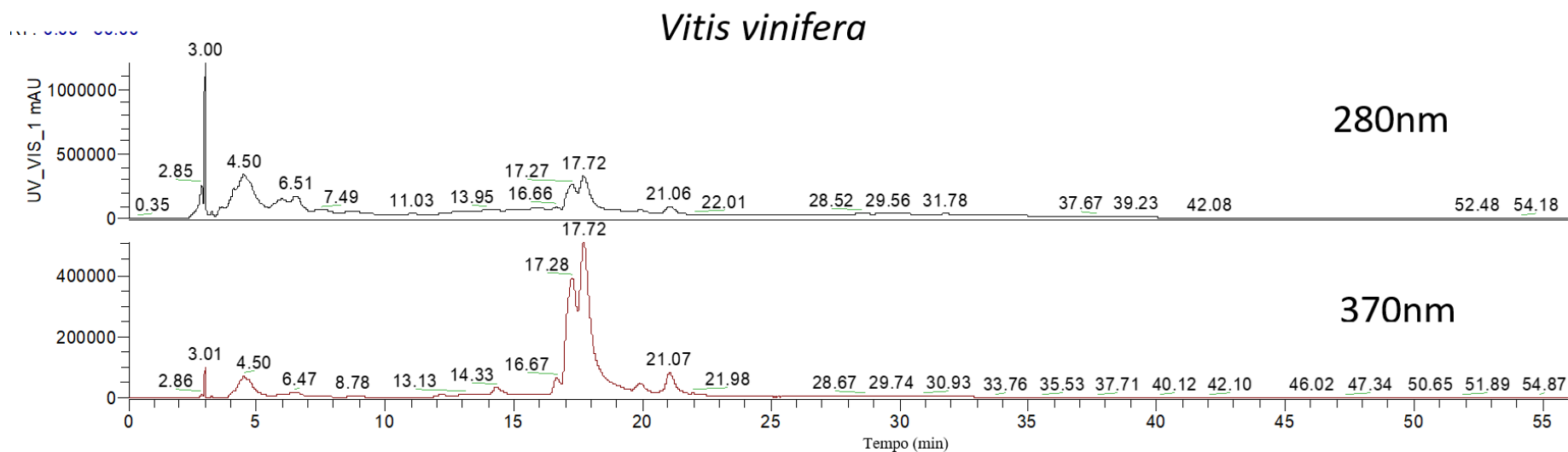


Figura D11. Perfil de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico da *Vitis vinifera* em 280 e 370 nm.