



**DESENVOLVIMENTO DE UM INGREDIENTE NATURAL COM  
POTENCIAL CONSERVANTE E BIOATIVO A PARTIR DE  
*MELITTIS MELISSOPHYLLUM L.***

**GABRIELA NUNES SILVA**

*Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão para a obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia Química no âmbito do programa de dupla diplomação  
com a Universidade Federal de Tecnologia do Paraná*

Orientado por:

**Eliana Pereira**

**Cristina Caleja**

**Aline Baptista**

**Bragança**

**2024**

*Este trabalho foi realizado no âmbito da Agenda VIIAFOOD - Plataforma de Valorização, Industrialização e Inovação Comercial para o Agroalimentar (n.º C644929456-00000040), um projeto apoiado no âmbito do PRR ([www.recuperarportugal.gov.pt](http://www.recuperarportugal.gov.pt)) e financiado pela União Europeia/Next Generation EU.*



*“Tudo posso naquele que me fortalece.”*

***Filipenses 4:13***

## AGRADECIMENTOS

A finalização desta tese representa a concretização de uma promessa e a realização de um sonho. Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada.

Primeiramente, agradeço às minhas orientadoras, **Doutora Eliana Pereira**, **Doutora Cristina Caleja** e **Doutora Aline Baptista**, pelo tempo dedicado, conhecimento compartilhado, prontidão, confiança, suporte, excelência, aprendizado e paciência durante toda a dissertação.

Agradeço ao **Eleomar Junior**, à **Bruna Moreira**, à **Tatiane Oliveira**, à **Bárbara Menezes** e à **Elizandra Ardohain** pelos ensinamentos em laboratório, bem como pelas valiosas sugestões e apoio durante as execuções das análises.

À minha mãe, **Adriana Nunes**, e ao meu pai, **Geraldo Silva**, minha eterna gratidão pelas orações, conselhos, compreensão, paciência, confiança, sabedoria, motivação e apoio em momentos desafiadores. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Agradeço à minha irmã, **Aline Silva**, por todas as ligações de vídeo e conversas cheias de sintonia, à minha tia, **Eliana Nunes**, por todas as madrugadas em oração, pedindo a Deus para que iluminasse minha mente e me mantivesse firme no propósito, à minha melhor amiga, **Vitória Silva**, por ter acreditado em mim e ao meu tio avô, **Noé Nunes**, por ser uma fonte de amor e inspiração.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo da trajetória acadêmica, especialmente à **Lariane Gonsalves** e à **Leticia Ganacin** por serem inspiradoras em suas dedicações, e à **Geovanna Leite** e à **Fernanda Sacramento** pelos momentos especiais em Portugal. Em particular, à **Tais Rodrigues**, por ser a melhor companhia de estudos, mesmo à distância. Amiga, essa conquista também é sua.

Por fim, expresso meu agradecimento ao **Instituto Politécnico de Bragança** e à **Universidade Tecnológica Federal do Paraná** pela oportunidade proporcionada através do programa de Dupla Diplomação, bem como ao **Centro de Investigação de Montanha** pelo apoio e infraestrutura disponibilizados.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XII
ABSTRACT .....	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. As plantas aromáticas e medicinais (PAM): relevância e potencialidades .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Usos e costumes.....	4
2.1.2. Benefícios do seu uso na manutenção da saúde.....	5
2.1.3. O caso específico da família <i>Lamiaceae</i> .....	7
<b>2.2. Compostos fenólicos como ingredientes bioativos.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Classificação de compostos fenólicos.....	11
2.2.2. Técnicas de extração .....	13
2.2.3. Aplicação de compostos fenólicos como ingredientes naturais.....	15
<b>2.3. <i>Melittis melissophyllum</i> L.....</b>	<b>17</b>
2.3.1. Classificação botânica.....	17
2.3.2. Fonte de compostos com potencial bioativo .....	18
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Material Vegetal .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Padrões e reagentes .....</b>	<b>21</b>
4.2.1. Análise química .....	21

4.2.2. Estudo das propriedades bioativas.....	21
<b>4.3. Otimização do processo de extração para obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos a partir da amostra de <i>Melittis melissophyllum</i> L. ....</b>	<b>22</b>
4.3.1. Procedimento de extração por maceração .....	23
4.3.2. Determinação de compostos fenólicos .....	24
4.3.3. Determinação do teor de fenóis totais .....	25
<b>4.4. Dados experimentais para otimização da extração por RSM .....</b>	<b>26</b>
4.4.1. Desenho experimental RSM.....	26
4.4.2. Modelo matemático .....	26
4.4.3. Procedimento para otimização da extração por RSM .....	27
<b>4.5. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir das amostras de <i>Melittis melissophyllum</i> L.....</b>	<b>28</b>
4.5.1. Atividade antioxidante.....	28
4.5.1.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH.....	28
4.5.1.2. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	29
<b>4.6. Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>30</b>
4.6.1. Atividade antibacteriana .....	30
4.6.2. Atividade antifúngica .....	32
<b>4.7. Análise estatística.....</b>	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1. Otimização do processo de extração baseado no DCCC e modelos de superfície de resposta .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir da amostra de <i>Melittis melissophyllum</i> L.....</b>	<b>41</b>
5.2.1. Atividade Antioxidante e Fenóis Totais .....	41
5.2.2. Atividade antimicrobiana .....	42
<b>5.3. Perfil em compostos fenólicos.....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação dos compostos fenólicos e suas categorias. ....	11
<b>Figura 2.</b> Amostra de <i>Melittis melissophyllum</i> L. na forma liofilizada e triturada.....	21
<b>Figura 3.</b> Sobrenadante resultante da extração hidroetanólica de <i>Melittis melissophyllum</i> L., sendo filtrado por meio de papel de filtro. ....	23
<b>Figura 4.</b> Evaporação do extrato hidroetanólico de <i>Melittis melissophyllum</i> L. utilizando evaporador rotativo.....	24
<b>Figura 5.</b> Extratos liofilizados da fração aquosa de <i>Melittis melissophyllum</i> L., obtidos após evaporação e liofilização.....	24
<b>Figura 6.</b> Ensaio de avaliação do teor de fenóis totais. ....	26
<b>Figura 7.</b> Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: DPPH .....	29
<b>Figura 8.</b> Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: TBARS.....	30
<b>Figura 9.</b> Ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana .....	32
<b>Figura 10.</b> Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para o ensaio de Rendimento.....	37
<b>Figura 11.</b> Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de Rendimento.	37
<b>Figura 12.</b> Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para a atividade antioxidante DPPH. ....	38
<b>Figura 13.</b> Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para a atividade antioxidante TBARS.....	38
<b>Figura 14.</b> Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de DPPH.....	38
<b>Figura 15.</b> Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de TBARS.....	39
<b>Figura 16.</b> Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para o ensaio de Fenóis Totais. ....	39
<b>Figura 17.</b> Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de Fenóis Totais. ....	40
<b>Figura 18.</b> Cromatograma dos compostos fenólicos presentes nos extratos de <i>M. melissophyllum</i> , obtidos a 330 nm.....	49

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Equação polinomial de segunda ordem. ....	27
<b>Equação 2.</b> Equação para determinação da atividade captadora de radicais DPPH.....	28
<b>Equação 3.</b> Equação da determinação da percentagem de inibição em ensaio TBARS. .....	29

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de plantas e respectivas propriedades benéficas para a saúde humana. .....	6
<b>Tabela 2.</b> Exemplos mais comuns dos flavonoides naturais.....	10
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura básica. .....	12
<b>Tabela 4.</b> Aplicações de extratos ricos em compostos fenólicos em produtos alimentares. .....	16
<b>Tabela 5.</b> Valores codificados e naturais das variáveis independentes usadas nos processos de extração por maceração. ....	22
<b>Tabela 6.</b> Planeamento experimental de extração da espécie <i>Melittis melissophyllum</i> L. .....	27
<b>Tabela 7.</b> Resultados experimentais do processo de otimização das variáveis $X_1$ , $X_2$ e $X_3$ para a determinação das condições ótimas nos ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais.....	34
<b>Tabela 8.</b> Resultados dos parâmetros da equação polinomial em termos do comportamento da extração para rendimento (% , mg /mL), DPPH ( $EC_{50}$ -mg/mL), TBARS ( $EC_{50}$ -mg/mL) e Fenóis Totais (% , g E/ g A) seguindo o DCCC com 5 níveis de variação (Tabela 5). ....	35
<b>Tabela 9.</b> Modelos matemáticos e as condições ótimas de extração para os ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais. ....	35
<b>Tabela 10.</b> Resumo das condições ótimas e resultados correspondentes para os ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais. ....	40
<b>Tabela 11.</b> Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) dos extratos hidroetanólicos de <i>Melittis melissophyllum</i> L.....	44
<b>Tabela 12.</b> Atividade antifúngica (CMI e CMF mg/mL) dos extratos hidroetanólicos de <i>Melittis melissophyllum</i> L.....	45
<b>Tabela 13.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{max}$ ), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos hidroetanólicos de <i>Melittis melissophyllum</i> L. (média $\pm$ DP). ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ASE	Extração acelerada por solvente
AVC	Acidente vascular cerebral
CAA	Atividade antioxidante celular
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CFI	Concentração mínima inibitória
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detetor de díodos
DCCC	Desenho composto central circunscrito
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
ESI	Fonte de ionização electrospray
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
kV	Quilovolt
[M-H] <sup>-</sup>	Ião pseudomolecular
m/z	Razão massa/carga
MA	Malte agar
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MDA	Malondialdeído

ME	Extração por maceração
MHB	Mueller-Hinton agar
MS	Espectrometria de massa
MSn	Fragmentação do ião molecular
n-BuOH	<i>n</i> -butanol
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
ns	Não significativo
PAM	Plantas aromáticas e medicinais
pH	Potencial hidrogeniónico
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação;
R <sup>2</sup> adj	Coefficiente de determinação ajustado
rpm	Rotações por minuto
RSA	Atividade captadora de radicais livres
RSM	Metodologia de superfície de resposta
S	Solvente
SCFE	Extração com fluido supercrítico
SLE	Extração sólido-líquido
SWE	Extração subcrítica com água
T	Temperatura
t	Tempo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tr	Tempo de retenção
TSB	Caldo tríptico de soja
UAE	Extração assistida por ultrassom
UFC	Unidades formadoras de colónias
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível
V	Volt

v/v	Volume/volume
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## RESUMO

Desde os tempos ancestrais até à atualidade, as plantas sempre representaram uma grande importância para a história. Estas matrizes têm sido utilizadas como poderosos auxiliares no tratamento e prevenção de sintomatologias e doenças. No entanto, como cada planta possui a sua própria singularidade, são necessários estudos profundos que permitam perceber as potencialidades e perigos do seu uso.

Além da importância que têm na medicina tradicional, é importante salientar o potencial a nível alimentar e nutracêutico, nomeadamente na sua incorporação como ingredientes naturais promissores, para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

Nesse sentido, o presente estudo utilizou o desenho experimental e a metodologia de superfície de resposta para proceder à otimização de um processo de extração - extração assistida por calor, a fim de obter um ingrediente com potencial conservante e bioativo, a partir de folhas de *Melittis melissophyllum* L.

Através da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de diodos e espectrometria de massa contendo sistema de ionização por *electrospray* (UHPLC-DAD-ESI/MS) foi possível determinar o perfil fenólico individual da amostra, onde foram identificados nove compostos fenólicos, com destaque para a luteolina-*O*-rutinosídeo, apresentando valores de  $(24,6 \pm 0,2 \text{ mg/g})$ , seguido do ácido 5-cafeoilquínico  $(14,4 \pm 0,1 \text{ mg/g})$  para as condições ótimas de DPPH.

Para além disso, através dos ensaios de atividade biológica foi possível observar que os extratos possuem atividade antioxidante significativa, com uma maior eficácia nas condições ótimas obtidas para ensaio de inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), potencial antibacteriano e antifúngico. Em relação ao rendimento, houve diferenciação das previsões do modelo matemático, possivelmente devido à necessidade do uso de um solvente mais aquoso.

Considerando a possibilidade do desenvolvimento de um ingrediente natural capaz de ser utilizado na formulação de alimentos funcionais, este estudo demonstra o potencial conservante e bioativo dos extratos de *M. melissophyllum*, servindo de ponto de partida para futuros estudos de estabilidade e incorporação.

**Palavras-chave:** Bioatividade, compostos fenólicos, indústria alimentar, ingrediente natural, *Melittis melissophyllum* L.

## ABSTRACT

From ancestral times to the present, plants have always represented great importance for history. These sources have been used as powerful aids in the treatment and prevention of symptoms and diseases. However, as each plant possesses its own uniqueness, in-depth studies are required to understand the potential and risks of their use.

In addition to their significance in traditional medicine, it is crucial to emphasize their potential in the food and nutraceutical sectors, particularly in their incorporation as promising natural ingredients for the development of functional foods.

In this context, the present study employed experimental design and response surface methodology to optimize a heat-assisted extraction process, aiming to obtain an ingredient with preservative and bioactive potential from *Melittis melissophyllum* L. leaves.

Through high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and mass spectrometry containing an electrospray ionization system (UHPLC-DAD-ESI/MS), it was possible to determine the individual phenolic profile of the sample, identifying nine phenolic compounds, with luteolin-*O*-rutinoside presenting values of  $(24,6 \pm 0,2 \text{ mg/g})$ , followed by 5-caffeoylquinic acid  $(14,4 \pm 0,1 \text{ mg/g})$  under optimal DPPH conditions.

Furthermore, through biological activity assays, it was observed that the extracts exhibit significant antioxidant activity, with greater efficacy under optimal conditions obtained for the lipid peroxidation inhibition assay in the presence of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as well as antibacterial and antifungal potential. Regarding yield, there was a deviation from the predictions of the mathematical model, possibly due to the need for a more aqueous solvent.

Considering the potential for developing a natural ingredient capable of being used in the formulation of functional foods, this study demonstrates the preservative and bioactive potential of *M. melissophyllum* extracts, serving as a starting point for future studies on stability and incorporation.

**Keywords:** Bioactivity, phenolic compounds, food industry, natural ingredient, *Melittis melissophyllum* L.

## 1. INTRODUÇÃO

Os hábitos de consumo alimentares têm vindo a sofrer algumas mudanças ao longo do tempo, suscitando um crescente interesse por parte da indústria alimentar e da comunidade científica em encontrar novas formas de produção e, soluções capazes de atender às expectativas atuais dos consumidores. Nesse sentido, toda a problemática que engloba os aditivos alimentares sintéticos tem sido um dos exemplos de grande interesse por parte da ciência, no que concerne ao desenvolvimento de novos estudos, uma vez que é indispensável manter e incrementar a qualidade dos alimentos (Honorato & Nascimento, 2011).

São várias as funções relacionadas com os aditivos sintéticos que melhoram a qualidade dos produtos alimentares e permitem o seu transporte para os vários cantos do mundo, mantendo a sua qualidade inicial. Contudo, a literatura revela que o consumo excessivo destes compostos pode gerar efeitos adversos na saúde humana, nomeadamente problemas respiratórios, neurológicos, gastrointestinais e dermatológicos (Mwale, 2023). Considerando esta adversidade, o setor alimentar tem vindo a manifestar o seu interesse pela procura de soluções mais naturais e eficazes, ou seja, pela obtenção e aplicação de ingredientes de base natural que sejam capazes de desempenhar as mesmas funções que os seus análogos sintéticos (Carocho et al., 2014).

Para tal, os estudos levados a cabo no imenso reino das plantas têm sido de grande relevância, na medida em que estas matrizes são fontes ricas em compostos bioativos, que exibem não só ação corante e conservante, mas também servem como ingredientes no desenvolvimento de alimentos funcionais, proporcionando benefícios para a saúde dos consumidores (Serrano et al., 2022; Bezerra et al., 2021).

Considerando todos estes aspectos, o presente trabalho visa estudar a otimização das condições de extração para obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos com potencial conservante e bioativo, a partir da planta *Melittis melissophyllum* L.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. As plantas aromáticas e medicinais (PAM): relevância e potencialidades

Desde a antiguidade que se recorre ao uso de matrizes vegetais tanto para fins terapêuticos, como para outras aplicações em diversos setores industriais, nomeadamente alimentar e farmacêutico (Braga, 2011; Arruda, Souza & Lima, 2020). Isto porque, na natureza, existe uma infinidade de plantas que evidenciam uma grande importância do mundo vegetal com potencial para serem exploradas pelo ser humano (Bezerra, 2021).

As plantas fazem parte do reino *Plantae*, são seres eucariontes, ou seja, as suas células possuem núcleo definido e, anatomicamente, possuem caule, folhas, flores e, em alguns casos, frutos. A singularidade das plantas é um ponto importante de ressaltar, uma vez que muitas renovam o ar pela libertação de oxigénio, enquanto outras são consideradas parasitas, tóxicas e venenosas, mostrando que não se deve generalizar as suas utilizações (Braga, 2011; Figueiredo, 2007).

Assim, o estudo aprofundado desse tema é de grande relevância, pois, além de esclarecer as suas propriedades benéficas para a saúde humana, também proporciona conhecimento sobre os possíveis riscos associados ao seu uso e consumo (Heisler et al., 2015).

Antes da existência de estudos científicos que corroborassem a capacidade e as implicações das plantas, estas já evidenciavam as suas potencialidades e eram aplicadas no contexto medicinal por diferentes povos da antiguidade, tal como os chineses, egípcios, sumérios, entre outros (Rodrigues et al., 2020). No entanto, assegurar a eficácia e a segurança destas utilizações requer a devida identificação da espécie vegetal em questão, bem como a definição da parte da planta a utilizar, o método apropriado de extração, informações sobre as possíveis aplicações e o fundamento em evidências provenientes de estudos científicos (Colet et al., 2015; Pedroso, Andrade & Pires, 2021).

É importante salientar que para além das questões medicinais e da sua utilização como condimentos, atualmente as PAM possuem grande potencial na criação de alimentos funcionais com o objetivo de proporcionar benefícios para a manutenção ao nível da saúde do consumidor. Neste contexto, os alimentos funcionais podem ser definidos como produtos que, além de conterem os nutrientes essenciais, possuem

componentes específicos com propriedades bioativas superiores quando comparados aos alimentos tradicionais (Cañas & Braibante, 2019; Csapó, Albert & Szigeti, 2019).

Para além disso, é importante destacar que os alimentos funcionais não se restringem a uma categoria específica, podendo ser tanto de origem vegetal quanto animal, independentemente de terem ou não passado por algum tipo de processamento (Cañas & Braibante, 2019; Crowe & Francis, 2013). De acordo com a *Academy of Nutrition and Dietetics*, é possível classificar os alimentos funcionais em três classes: alimentos convencionais, alimentos modificados e alimentos sintetizados (Crowe & Francis, 2013).

Os alimentos convencionais possuem substâncias bioativas naturais com propriedades funcionais e, podem passar por processos de adição de conservantes para aumentar a sua durabilidade. Estes são amplamente encontrados em supermercados, representando a opção mais comum. Dentre esses alimentos, tem-se como exemplo frutas e vegetais (Crowe & Francis, 2013).

Por sua vez, os alimentos modificados são alimentos que sofreram alguma alteração como uma forma de procurar melhorar alguns aspetos, nomeadamente organolépticos e nutricionais, para além de incorporarem compostos bioativos graças aos processos de fortificação e enriquecimento. Um dos exemplos é a incorporação de ácidos gordos, como o omega-3, em ovos e margarinas (Serrano et al., 2022; Crowe & Francis, 2013).

Por último, os alimentos sintetizados são produzidos através de processos químicos em laboratório e em condições industriais, e apresentam capacidade de fornecerem benefícios prebióticos, como, por exemplo, os hidratos de carbono não digeríveis. Além disso, destacam-se como principais exemplos de alimentos sintéticos as carnes produzidas em laboratório, bem como as alternativas aos produtos lácteos e queijos (Kahurdu, 2022; Crowe & Francis, 2013).

Desta forma, a utilização das PAM, tanto *in natura* como o seu extrato, é importante na funcionalização de uma vasta gama de produtos alimentares. Os seus extratos têm sido atualmente utilizados na indústria alimentar como ingredientes naturais, visto serem considerados uma boa fonte de antioxidantes naturais capazes de prevenir a deterioração de alimentos, retardar a formação de produtos de oxidação, manter a qualidade nutricional e prolongar a vida útil dos produtos, revelando a relevância do

estudo e da utilização de plantas aromáticas e medicinais (Serrano et al., 2022; Maleš et al., 2022; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

### **2.1.1. Usos e costumes**

As plantas aromáticas e medicinais têm despertado grande interesse em vários setores industriais, nomeadamente para usos e aplicações tradicionais, na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. No decorrer da história, os seres humanos têm utilizado as plantas como fonte de alimentos, aromas, sabores e formas de tratar e prevenir doenças devido aos seus efeitos biológicos benéficos que se traduzem, em muitos casos, em propriedades terapêuticas (Maleš et al., 2022; Carović-Stanko et al., 2016).

Considerando os efeitos positivos destas matérias-primas, nomeadamente antioxidante, anti-inflamatório, antialérgico, antitrombótico e antibacteriano, associados ao seu consumo regular, são vários os estudos na literatura que destacam evidências de benefícios para a qualidade de vida e na prevenção de danos nos tecidos e problemas de qualidade de sono associados ao consumo de infusão de ervas (Etheridge & Derbyshire, 2020; Chandrasekara & Shahidi, 2018).

Outra aplicação está associada à utilização dos compostos bioativos na síntese de medicamentos farmacêuticos comerciais, visando promover tratamentos e a manutenção da saúde, a partir dos efeitos terapêuticos das plantas. Nos registos históricos de civilizações antigas, pode-se observar documentação acerca da ampla diversidade de usos medicinais, evidenciando o reconhecimento na cura de algumas doenças (Carović-Stanko et al., 2016; Fierascu et al., 2021).

Apesar dos desafios inerentes à produção de fármacos derivados de produtos naturais devido à complexidade das misturas moleculares, os avanços tecnológicos têm proporcionado oportunidades significativas e de relevância para a comunidade científica e para o setor farmacêutico na abordagem dos desafios associados ao combate de diversas doenças (Thomford et al., 2018).

Para além disso, as plantas aromáticas e medicinais são reconhecidas pela sua significativa concentração em compostos bioativos de tal forma que, a sua exploração na indústria alimentar tem vindo a ganhar grande destaque (Serrano et al., 2022). Hipócrates, considerado pai da medicina, atribuiu a seguinte frase: “*Que o alimento seja teu medicamento, e que o medicamento seja teu alimento*”. Na antiguidade já havia

descrições do uso de plantas medicinais como costume, no período contemporâneo as plantas ganham destaque no conceito de alimentos funcionais (Carović-Stanko et al., 2016).

Além de considerar os benefícios ao uso cotidiano, dado o sabor apreciado, as ervas também ganham espaço em pratos gastronômicos como temperos aplicados em aves, carnes, saladas e peixes (Novais et al., 2021). As plantas quotidianamente utilizadas como condimentos culinários e especiarias, têm sido destacadas na produção e no desenvolvimento de corantes e conservantes naturais, alimentos funcionais, rações, aditivos alimentares, aromatizantes, agentes terapêuticos e cosméticos. Essa evolução tem suscitado o interesse da comunidade científica para novos estudos e abordagens a fim de evidenciar o potencial das plantas (Fierascu et al., 2021; Saha & Basak, 2020; El-Sayed & Youseff, 2019; Faccio, 2020).

### **2.1.2. Benefícios do seu uso na manutenção da saúde**

A procura por manter um estilo de vida com hábitos saudáveis, assim como prevenir a ocorrência de doenças e complicações médicas graves, são pontos importantes para a manutenção da saúde. A medicina preventiva pode ser feita de diferentes modos, nomeadamente vacinação, detecção de doenças de forma precoce através da realização de exames de rotina, ou até mesmo através das mudanças de rotinas englobando exercício físico, qualidade de sono e uma boa alimentação (Hespanhol, Couto & Martins, 2008).

Desta forma, no que concerne aos bons hábitos alimentares, é possível manter o equilíbrio do organismo, assegurando o correto desempenho fisiológico corporal. Os benefícios englobam a prevenção de doenças, a melhoria do humor, aumento da disposição, diminuição e manutenção do peso, um bom sistema imunológico e até mesmo vantagens para o funcionamento cerebral (Oliveira, 2017; Dutra & Malagoli, 2019; Oliveira et al., 2021).

Atualmente, as PAM e preparações à base de plantas têm vindo a ganhar destaque devido à elevada presença de compostos bioativos, tornando-se uma estratégia para padrões alimentares contemporâneos e favorecendo o desenvolvimento de ingredientes naturais como aromatizantes, conservantes, corantes e antioxidantes (Serrano et al., 2022). Esses compostos possuem grande importância pois são capazes de desempenhar

papéis biológicos, tais como ações antioxidantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias (Dias et al., 2022).

Propriedades terapêuticas, como a capacidade de proteger o corpo contra o stress oxidativo, resultam da presença de antioxidantes nas plantas aromáticas e medicinais (Kisiriko et al., 2021).

Os radicais livres são considerados agentes oxidantes no organismo que quando em excesso, podem causar danos nas células, consequentemente acelerando o processo de envelhecimento do corpo ou dando origem a problemas como Parkinson, Alzheimer, acidente vascular cerebral (AVC), enfraquecimento do sistema imunológico e entre outras complicações capazes de debilitar a saúde (Saleem et al., 2020; Vasconcelos et al., 2014; Viana, 2023)

Assim, são vários os benefícios para a manutenção da saúde atribuídos ao consumo regular de PAM. A **Tabela 1** reúne alguns exemplos em que o consumo destas plantas tem sido associado a diversas propriedades benéficas para a saúde.

**Tabela 1.** Espécies de plantas e respectivas propriedades benéficas para a saúde humana.

Espécie	Nome(s) comum	Tipo de bioatividade	Aplicações	Referência
<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã-verde, hortelã-vulgar, hortelã	Antioxidante; antisséptica; anti-inflamatória; bactericida; calmante; fungicida.	Indústria alimentar; Indústria farmacêutica.	Bruno et al. (2022)
<i>Melissa officinalis</i> L.	Cidreira, erva-cidreira	Antioxidante; antidiabética; anti-inflamatória; antifúngica; antibacteriana.	Indústria farmacêutica.	Petrisor et al. (2022)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Gengibre	Antibacterianas; antivirais; analgésicas; antipiréticas; anti-inflamatórias; anticancerígenas.	Indústria alimentar.	Kieliszek et al. (2020)

Espécie	Nome(s) comum	Tipo de bioatividade	Aplicações	Referência
<i>Curcuma longa</i> L.	Açafrão-da-terra	Anti-inflamatórias; antioxidantes; anticancerígenas; antimaláricas; antidiabética; antimaláricas.	Indústria alimentar; Indústria cosmética; Indústria farmacêutica.	Kieliszek et al. (2020); Ibáñez & Blázquez (2021)
<i>Thymus capitatus</i> L.	Tomilho	Antibacteriana; antioxidante.	Indústria alimentar.	Jemaa et al. (2018)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Absinto	Antioxidante.	Indústria cosmética.	Harhaun et al. (2020)
<i>Calendula officinalis</i> L.	Calêndula	Antioxidante.	Indústria cosmética.	Harhaun et al. (2020)
<i>Lavandula vera</i> DC;	Alfazema	Antioxidante.	Indústria cosmética.	Harhaun et al. (2020)
<i>Syringa vulgaris</i> L.	Lilás	Antioxidante.	Indústria cosmética.	Harhaun et al. (2020)
<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl	Caneleira-verdadeira, caneleira-da-Índia	Antioxidante; antimicrobianas; anti- inflamatórias; antidiabética; anticolinérgica.	Indústria farmacêutica; Indústria alimentar.	Błaszczuk, Rosiak & Kałużna-Czaplińska (2021)
<i>Melittis melissophyllum</i> L.	Betónica, bretónica, cidreira-bastarda	Antibacteriana; antifúngica; relaxante muscular.	Indústria farmacêutica.	Гурина & Некрашевич (2022);

Portanto, os estudos de caracterização das atividades biológicas das PAM mostram que elas possuem diferentes tipos de bioatividade. Assim, podem ser utilizadas como matéria-prima no setor alimentar, não apenas para fins terapêuticos e medicinais, mas também na produção de alimentos funcionais.

### 2.1.3. O caso específico da família *Lamiaceae*

A família *Lamiaceae*, também designada como *Labiatae*, pertence à ordem Lamiales. É uma família de plantas com flores, composta por mais de seis mil espécies que pode ser encontrada espalhada pelo mundo. É considerada muito importante no

mundo das famílias herbáceas uma vez que possui uma significativa gama de plantas aromáticas e medicinais (Patrignani et al., 2021; Carović-Stanko et al., 2016). Dentro desta família destacam-se uma vasta variedade de especiarias aromáticas rotineiramente utilizadas, nomeadamente orégãos, hortelã, manjeriço, alecrim, erva-cidreira e tomilho. Estas plantas destacam-se, ainda, por apresentarem importantes propriedades tais como antioxidantes, tendo como destaque as espécies dos géneros *Rosmarinus*, *Salvia* e *Mentha* (Malaquias et al., 2014; Bakirel et al. 2008).

Em todas as plantas, em geral, é possível encontrar princípios ativos de relevância que dão origem a substâncias como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos e entre outras (Lima & Cardoso, 2007). A família *Lamiaceae* é destacada na literatura por apresentar evidências de propriedades bioativas o que poderá justificar o facto de esta família estar entre as plantas mais utilizadas como condimentos na culinária e como medicamento no mundo todo (Malaquias et al., 2014).

Dentre as PAM, a utilização das plantas da família *Lamiaceae* é referida por alguns autores tanto para a realização de controlo de pragas e parasitas quanto para controlar doenças humanas (Mulas, 2006; Britto, Sebastian & Sujin, 2012). De acordo com a literatura, diversos autores referem a utilização das plantas da família *Lamiaceae* para a resolução de diferentes problemas, nomeadamente no controlo de sintomas de diabetes *mellitus* (Urban et al., 2019), no tratamento do HIV/SIDA (Chaves & Lima, 2020), alívio nos sintomas de doenças no trato respiratório (Martinez et al., 2020), potencial para o tratamento de doenças urogenitais (Filho, 2023), tratamento de pedra nos rins (Orch et al., 2020) entre outros. Alguns géneros pertencentes a esta família têm sido destacados pela sua significativa relevância na indústria alimentar, nomeadamente *Rosmarinus* L., *Mentha* L., *Origanum* L., *Melissa* L., *Ocimum* L., *Hyptis* L., *Thymus* L., *Lavandula* L., *Plectranthus* L. (Xavier et al., 2022; Porte & Godoy, 2001; Martins et al., 2019). Desta forma, a utilização de plantas pertencentes a esta família como fonte de alimento ou como potencial aditivo alimentar pode ser considerada benéfica (Patrignani et al., 2021).

Neste sentido, é possível notar a importância e relevância desta família no estudo vegetal, uma vez que apresentam uma grande quantidade de espécies, com diferentes origens e grandes vantagens para diferentes finalidades e aplicações.

## 2.2. Compostos fenólicos como ingredientes bioativos

As reações oxidativas que ocorrem nas células aeróbicas e o processo respiratório levam à formação de radicais livres. Estes radicais, quando estão em excesso, causam danos nas células e problemas dentro do organismo, como é o caso das inflamações, doenças cardiovasculares, tumores malignos, cataratas, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, além de acelerar o processo de envelhecimento (Sikora et al., 2008).

Com o intuito de contrapor a ação desses radicais livres, é imprescindível que o organismo disponha de substâncias com propriedades antioxidantes capazes de induzir melhorias fisiológicas. Os compostos fenólicos são moléculas que, por sua vez, apresentam potenciais anti-inflamatórios e, sobretudo, propriedades antioxidantes que podem conferir benefícios substanciais à saúde humana (Vargas & Bellaver, 2022; Refosco et al., 2019).

Essas potencialidades podem atuar de diferentes formas. Além de inibir a formação de radicais livres, também desempenham um papel importante na prevenção da degradação de moléculas essenciais, como aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos, e na reparação de membranas celulares danificadas (Vasconcelos et al., 2014; Freitas et al., 2020).

Para além disso, é importante destacar que o processo de oxidação não acontece apenas no organismo humano, como também afeta os alimentos, resultando em possíveis alterações que podem torná-los impróprios para consumo. Na indústria alimentar, os compostos fenólicos adquirem uma relevância significativa como agentes preventivos da oxidação em alimentos (Viana & Arenari, 2019).

Essa relevância estende-se para a dieta humana graças às suas propriedades antioxidantes. As matrizes vegetais têm sido amplamente reconhecidas como as principais fontes desses compostos. Além disso, há vários autores que têm estudado o potencial uso de compostos bioativos em produtos alimentares de forma a funcionalizar alimentos já estabelecidos no mercado, como por exemplo o chocolate, produtos lácteos e de pastelaria (Belščak-Cvitanović et al., 2012; Pourzafar et al., 2023).

Os ingredientes bioativos tornam-se opção na medida em que a sua ingestão proporciona benefícios na saúde, interagindo com processos metabólicos do organismo e prevenindo o risco de várias doenças. Um dos exemplos de ingredientes bioativos incluem compostos fenólicos. A maioria dos compostos fenólicos são extraídos de

plantas, sendo possível de encontrá-los também em fontes vegetais como as leguminosas, frutas, cereais, oleaginosas, óleos vegetais, nozes, ervas e especiarias (Lu et al., 2021; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Esta classe de compostos inclui flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, sendo os flavonoides considerados o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. A **Tabela 2** apresenta alguns dos exemplos mais comuns de flavonoides encontrados naturalmente em alimentos do reino vegetal (Harborne, 1999; Martins et al., 2011).

Ao longo dos anos, tem sido grande o interesse da comunidade científica no estudo de compostos fenólicos, nomeadamente no que concerne às suas propriedades bioativas, com o propósito de explorar seu potencial terapêutico e aprofundar a compreensão dos seus mecanismos de ação. Alguns desses estudos revelaram a utilização de flavonoides no tratamento de doenças neurodegenerativas (Santos, 2015), e a utilização de derivados fenólicos como alternativa para a modulação da microbiota intestinal (Dias, 2022).

**Tabela 2.** Exemplos mais comuns dos flavonoides naturais.

Classe de flavonoides	Composto específico	Fórmula química
Antocianidinas	Cianidina	$C_{15}H_{11}O_6^+$
	Malvidina	$C_{17}H_{15}O_7^+$
Flavanóis	Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$
	Catequina galato	$C_{22}H_{18}O_{10}$
	Epigallocatequina	$C_{15}H_{14}O_7$
	Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$
	Epicatequina galato	$C_{22}H_{18}O_{10}$
	Epigallocatequina galato	$C_{22}H_{18}O_{11}$
Flavonas	Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$
	Crisina	$C_{15}H_{10}O_4$
	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$
	Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$
Flavonóis	Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$
	Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$
	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$
Flavanonas	Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$
	Naringina	$C_{27}H_{32}O_{14}$
	Taxifolina	$C_{15}H_{12}O_7$

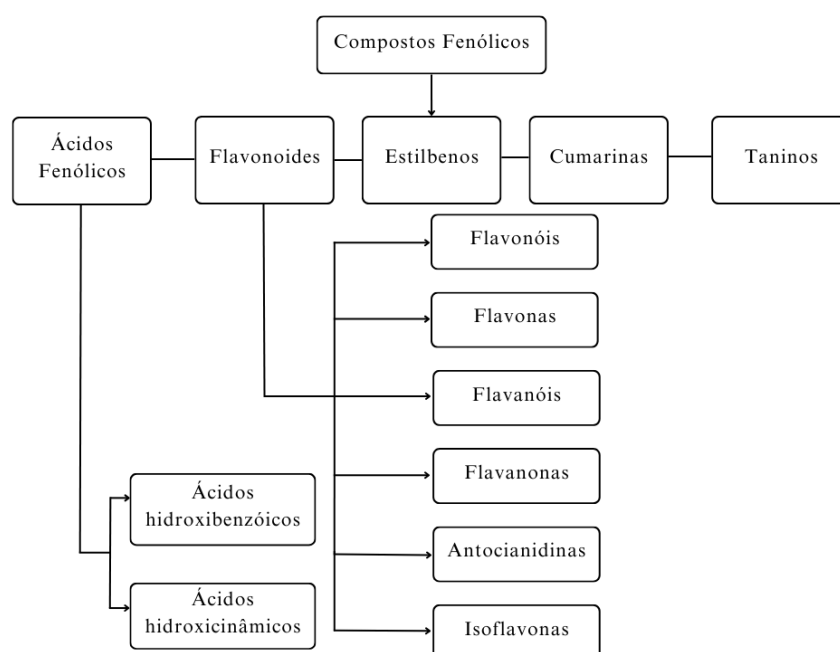
Classe de flavonoides	Composto específico	Fórmula química
Isoflavonas	Daidzeína	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
	Daidzina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>
	Gliciteína	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
	Glicitina	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
	Genisteína	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
	Genistina	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>

(fonte: Adaptado de Martins et al., 2011).

Para além disso, outro aspecto de grande relevância nesta classe de compostos é a sua aplicação como ingredientes naturais com função antioxidante, retardando a alteração da textura e da cor dos alimentos, assim como a geração de odores e sabores desagradáveis e consequente diminuição do valor nutricional (Alamed et al., 2009; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

### 2.2.1. Classificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos dividem-se em várias sub-classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (**Figura 1**) (Kumar et al., 2019; Hano & Tungmunnithum, 2020).



**Figura 1.** Classificação dos compostos fenólicos e suas categorias (fonte: Brito, 2016).

Além disso, outra forma de classificar estes compostos é por meio do tipo de estrutura química básica, representada na **Tabela 3**, tendo em consideração as seguintes representações: C6 – anel benzênico; CX – cadeia substituinte com X átomos de carbono.

**Tabela 3.** Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura básica.

<b>Estrutura básica</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanas
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonoides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

(fonte: Oldoni, 2007).

Os ácidos fenólicos conferem propriedades antioxidantes e consistem em dois grupos: ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico (Angelo & Jorge, 2007). A sua estrutura possui um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupo hidroxilo e/ou metoxilo (Ferreira, 2015).

As cumarinas possuem as suas atividades estendidas como antimicrobianas, anticoagulante e antitumoral, no entanto a sua presença em concentrações muito elevadas pode ser tóxica (Hroboňová et al., 2013; Rocha, 2022). São substâncias que estão presentes numa ampla variedade de plantas, microrganismos e algumas espécies animais,

sendo que já foram identificadas e extraídas mais de 1300 cumarinas de fontes naturais, destacando-se as plantas verdes (Neves & Vinha, 2015).

Os estilbenos são pequenos compostos que possuem ações protetoras, podendo agir contra os ataques de micróbios e vírus, exposição em excesso à luz ultravioleta e outras possíveis doenças em plantas. Estão presentes em diversas famílias de plantas, mas destacam-se as uvas e o vinho como as principais fontes dessas substâncias (Matias, 2012).

Por outro lado, os flavonoides possuem baixo peso molecular, possuindo estrutura química constituída por dois anéis aromáticos, denominados como anel A e B, unidos por três carbonos, formando um anel heterocíclico denominado como anel C (Angelo & Jorge, 2007). Representam a maior classe de compostos fenólicos, sendo que o que permite a classificação dos diferentes flavonoides em classes como flavanóis, flavonas, flavanonas, isoflavonoides e antocianidinas, são as diferenças estruturais no anel C (Pinela, 2012).

Já os taninos possuem peso molecular relativamente alto, podendo ser classificados em taninos condensáveis e taninos hidrolisáveis (Oszmianski et al., 2007). Os taninos condensáveis são oligômeros e polímeros de flava-3-ol (catequina) ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), já os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico glicosilados (Ferreira, 2015).

### **2.2.2. Técnicas de extração**

O procedimento de extração a partir de matrizes vegetais é um ponto crucial que define o rendimento e pureza do extrato obtido e que poderá ter influência direta dos diferentes parâmetros de extração, nomeadamente tempo, solvente, potência, temperatura, método de extração, entre outros. Adicionalmente, a solubilidade dos compostos é administrada pelo solvente utilizado e o grau de polimerização. Logo, diferentes solventes como o etanol, metanol, água, acetato de etilo ou até mesmo a combinação deles são frequentemente usados para a realização da extração desses compostos (Naczki & Shahidi, 2004). Devido à ausência de uma única técnica capaz de realizar a recuperação de compostos presentes em materiais vegetais, torna-se essencial o estabelecimento das condições ótimas de extração. Portanto, é de elevada importância levar em consideração o tipo de amostra e seus compostos alvos, o objeto da análise, as

técnicas disponíveis, bem como as escolhas das condições de extração que possam proporcionar um rendimento ótimo e máxima eficiência (Alara, Abdurahman & Ukaegbu, 2021; Peixoto, 2017)

Os métodos convencionais de extração referem-se a técnicas amplamente estabelecidas e empregadas ao longo do tempo, caracterizadas pelo uso de volumes significativos de solventes e pela execução manual dos procedimentos. Dentre esses métodos, destacam-se a extração sólido-líquido (SLE) ou soxhlet, a maceração e a extração líquido-líquido, que se encontram entre as abordagens mais comumente adotadas nessa categoria (Sagar et al., 2018; Alara, Abdurahman & Ukaegbu, 2021).

Devido às limitações dos métodos de extração convencionais, como o alto consumo de solventes e tempo de extração mais longo, foram desenvolvidos métodos de extração não convencionais para contornar esses desafios, nomeadamente extração assistida por micro-ondas (MAE), extração acelerada por solvente (ASE), extração com fluido supercrítico (SCFE), extração assistida por ultrassom (UAE) e extração subcrítica com água (SWE) (Shams et al., 2015). Entre as técnicas de extração, tanto as convencionais quanto as não convencionais, aquelas frequentemente aludidas incluem a extração assistida por micro-ondas (MAE), a extração assistida por ultrassons (UAE) e a extração por maceração (ME).

A MAE é uma técnica de extração que permite extrair compostos bioativos de forma rápida e eficiente (Sagar et al., 2018). É considerada uma técnica promissora uma vez que tem um custo reduzido e é uma técnica simples, utilizando solventes de baixo custo e não tóxicos, o que lhe permite ganhar relevância dentro das aplicações industriais (Alupului, Calinescu & Lavric, 2012). No entanto, uma das desvantagens associadas à técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE) reside nas restrições na seleção dos solventes, uma vez que alguns solventes, como o hexano e o diclorometano, não são adequados para serem aquecidos por radiação micro-ondas (Alara, Abdurahman & Ukaegbu, 2021).

A UAE, técnica que se baseia no processo de cavitação acústica, tem a vantagem por utilizar baixa temperatura, ou seja, torna-se relevante na obtenção de compostos bioativos que são sensíveis ao calor (Backes, 2018; Pasrija & Anandharamakrishnan, 2015). Além do mais, outras vantagens da extração assistida por ultrassons estão na redução no uso de solvente, no tempo de processamento que será curto e um menor

consumo de energia, entretanto suas limitações englobam a potência de entrada e a busca pela otimização ideal na frequência do aparelho a ser utilizado para conseguir ter um bom rendimento (Azmir et al., 2013; Sagar et al., 2018).

A ME é uma técnica amplamente reconhecida como uma abordagem clássica e estabelecida na extração, devido à sua simplicidade e baixo custo. Nesse método, a amostra vegetal é submetida a etapas que incluem a trituração em partículas pequenas, seguida da imersão no solvente por um período pré-definido, sob condições de temperatura específicas. Adicionalmente, a agitação pode ser empregada para facilitar e otimizar o processo de extração, aumentando a eficiência do método (Sagar et al., 2018; Backes, 2018).

### **2.2.3. Aplicação de compostos fenólicos como ingredientes naturais**

A produção de alimentos é de extrema importância para a economia, sendo que o mercado de alimentos funcionais tem tido um crescimento exponencial de acordo com os avanços tecnológicos (Gouveia, 2016). Aditivos sintéticos fazem parte das produções alimentares, sendo eles adicionados de forma a manter certas propriedades dos alimentos, gerando assim grande importância para a indústria. No entanto, estudos atuais têm vindo a demonstrar algumas sintomatologias aquando do seu consumo excessivo (Carocho et al., 2014; Caleja et al., 2016).

Uma alternativa para a substituição desses aditivos poderá passar pela utilização de compostos fenólicos como ingredientes naturais capazes de promover saúde através dos alimentos funcionais (Caleja et al., 2015; Carocho et al., 2014). Vários estudos da literatura têm despertado grande interesse por parte da comunidade científica devido à sua capacidade de combater os radicais livres, motivando a realização de novos estudos e pesquisas com o intuito de investigar sua relevância e possíveis benefícios para a saúde (Rasooli, 2007). A **Tabela 4** reúne alguns exemplos da incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos aplicados em produtos alimentares e respetivas funções.

**Tabela 4.** Aplicações de extratos ricos em compostos fenólicos em produtos alimentares.

Alimento	Ingrediente natural	Função	Referência
Biscoito	Extratos da casca de <i>Punica granatum</i> L. Purple Queen (romã)	Capacidade corante	Veloso (2019)
Iogurte	Extratos de semente de uva <i>Vitis vinifera</i> L. (videira)	Funcionalizar o iogurte aumentando a atividade antioxidante e anti-radical	Chouchouli et al. (2013)
Iogurte	Extratos de flores de <i>Rubus ulmifolius</i> Schott (amora-silvestre)	Funcionalizar o iogurte aumentando a atividade antioxidante	Martins et al. (2014)
Queijo Cottage	Extratos hidroalcoólicos de <i>Suillus luteus</i> L. e <i>Cropinopsis atramentaria</i> Bull. (cogumelos)	Melhorar a atividade antioxidante	Ribeiro et al. (2015)
Queijo Cottage	Extratos fenólicos da <i>Matricaria recutita</i> L. (camomila)	Melhorar a atividade antioxidante e aumento do tempo de prateleira	Caleja et al. (2015a)
Queijo Cottage	Extratos fenólicos de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (funcho)	Promover atividade antioxidante e aumento do tempo de prateleira	Caleja et al. (2015b)
Sorvete	Extratos fenólicos da casca de <i>Punica granatum</i> L. (romã)	Funcionalizar o gelado melhorando a atividade antioxidante e os inibidores de alfa-glucosidase	Çam, İçyer & Erdoğan (2014)

Para além disso, os compostos fenólicos apresentam diversas atividades bioativas. Dentro desse contexto, e principalmente devido à sua destacada capacidade antioxidante, uma das aplicações de compostos fenólicos como ingredientes naturais é feita na utilização como um possível suplemento alimentar (Romero, 2017).

Por fim, outra aplicação relevante está relacionada com a utilização de compostos fenólicos como ingrediente natural com potencial conservante, tendo a finalidade de prolongar a vida útil dos alimentos uma vez que previne o processo de deterioração. A forma como os compostos fenólicos intervêm como conservantes está relacionado com a sua capacidade de retardar as reações de oxidação, bem como com a sua eficácia na

inibição ou prevenção do crescimento de microrganismos patogénicos (Sposito, 2014; Carocho et al., 2014; Beya et al., 2021).

### **2.3. *Melittis melissophyllum* L.**

#### **2.3.1. Classificação botânica**

A *Melittis melissophyllum* L., também conhecida como cidreira-bastarda, é uma planta perene que cresce em várias regiões da Europa, principalmente em locais semi-sombreados (Szymborska-Sandhu et al., 2020). A literatura menciona a utilização popular desta planta como remédio para digestão, antiespasmódico, propriedades sedativas, tratamento de tosse, dores de garganta e aplicações para tratar ansiedade nervosa e insónias. Além disso, estudos recentes revelaram que os extratos da planta apresentam elevada atividade terapêutica no processo de cicatrização de feridas (Idolo, Motti & Mazzoleni, 2010; Jarić et al., 2007; Zakrzeska, 2018).

São escassas as informações disponíveis acerca da biologia da *M. melissophyllum*, no entanto, é amplamente reconhecida como uma planta utilizada na medicina tradicional na Sérvia e, principalmente, na Itália. A eficácia terapêutica atribuída a essa planta é associada à presença de metabolitos secundários, como a cumarina, que exhibe propriedades antioxidantes e um aroma doce (Jucá, 2018; Szymborska-Sandhu et al., 2020; Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek, 2014). Dessa forma, desperta grande interesse por parte das indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética. Para além disso, esta planta revela-se promissora no contexto terapêutico graças às suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, ampliando ainda mais as suas possibilidades de aplicação (Kowalska-Wochna & Tomulewicz, 2020).

De acordo com a literatura, a classificação botânica da espécie *Melittis melissophyllum* L. é a seguinte: reino: *Plantae*; classe: *Magnoliopsida*; ordem: *Lamiales*; família: *Lamiaceae*; gênero: *Melittis*; espécie: *Melittis melissophyllum* L.; nomenclatura binominal: *Melittis melissophyllum* L.; sinonímia botânica: *Melittis melissophyllum* L.; Quanto aos nomes populares, estes incluem: falsa-cidreira; melissa-bastarda; betónia-bastarda; betónica-bastarda; cideira-bastarda segundo informações disponibilizadas pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (n.d.).

### 2.3.2. Fonte de compostos com potencial bioativo

O interesse no estudo de plantas torna-se relevante graças a constituição de compostos bioativos como os antioxidantes, vitaminas, carotenoides, polifenóis, ácidos gordos insaturados e açúcares redutores, gerando diferentes aplicações para as indústrias farmacêutica, cosmética e principalmente alimentar (Bezerra et al., 2021).

Existe uma relação entre a eficácia dos extratos das plantas e o fornecimento de compostos bioativos. Alguns exemplos desses compostos são: compostos fenólicos, flavonoides, taninos e entre outros (Codevilla et al., 2015). A espécie *M. melissophyllum* apresenta na sua composição compostos fenólicos que conferem diferentes propriedades, dentre elas antioxidantes que possuem grande importância pela capacidade de mudança do estado oxidativo ao discurrir-se a respeito dos radicais livres (Kaurinovic et al., 2011).

Os compostos fenólicos formam classes de metabólitos secundários, sendo que, dentre eles, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, ligninas, fenóis simples e cumarinas acabam por se destacar (Angelo & Jorge, 2007). Dentre os estudos realizados para a espécie *M. melissophyllum*, existe pouca informação para a composição do perfil individual de compostos fenólicos, no entanto já foi possível identificar cumarina, alguns ácidos fenólicos e flavonoides como apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina e a miricetina (Maggi et al., 2011; Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek, 2012; Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek, 2014; Szymborska-Sandhu et al., 2020). Para além disso, também foram detectados o ácido 3-*O*-cafeoilquinico, hexosídeo de ácido *O*-cumárico, ácido 5-*O*-cafeoilquinico, cumarina e seus derivados (Pereira et al., 2018).

Os ácidos fenólicos ganham relevância como uma forma de substituir antioxidantes sintéticos uma vez que possuem propriedades bioativas relevantes, nomeadamente anti-inflamatórias, imunoestimulantes, antissépticas, coleréticas, antiespasmódicas, entre outras. (Nobre, 2019; Kowalska-Wochna & Tomulewicz, 2020).

Já os flavonoides, também possuem atividades relevantes para o metabolismo humano graças às suas ações terapêuticas, antimicrobianas, antiploriferativas e antioxidantes (Silva & Bieski, 2018). As plantas são capazes de auxiliar na redução do estresse oxidativo, sendo que os antioxidantes derivados delas têm importância para que as funções celulares se prolonguem e permaneçam saudáveis (Alegransi et al., 2021). A análise de extratos de flores e folhas de *M. melissophyllum* realizada por Skrzypczak-Pietraszek e Pietraszek (2014), utilizando o método HPLC-DAD (Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência com Detector de Diodo), permitiu a detecção de 8 flavonoides, nomeadamente cinarosídeo ( $\frac{1}{4}$  luteolina 7-*O*-glicosídeo), rutina, miricetina, quercitrina, luteolina, kaempferol e apigenina.

Não obstante, na pesquisa realizada por Szyborska-Sandhu et al. (2020), utilizando o mesmo método de análise HPLC-DAD, foram identificados os seguintes compostos na planta: verbascosídeo, apiina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, cumarina, 3,4-dihidroxycumarina, ácido *O*-cumárico 2-*O*-glicosídeo, bem como ácido *O*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido chicórico.

Desta forma, percebe-se que as folhas da *M. melissophyllum* são caracterizadas por um alto teor de glicosídeos de flavonoides. Os flavonoides presentes na planta revelaram ações capazes de diminuir o dano oxidativo, sendo que os efeitos antioxidantes da planta apresentaram aplicações protetoras em relação a peroxidação lipídica e geraram possibilidade de prevenir inflamações graças à presença da luteolina, esta que também tem a capacidade de ser moduladora do sistema imunológico (Kaurinovic et al., 2011).

Adicionalmente, a análise dos extratos das folhas de *M. melissophyllum*, tanto da subsp. *melissophyllum* quanto da subsp. *álbida*, realizada por Maggi et al. utilizando as técnicas HPLC-DAD e HPLC-MS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas), revelou a presença de cumarina na planta. A cumarina é utilizada pela indústria como um agente aromatizante em produtos alimentares e possui importância como composto bioativo uma vez que muitas substâncias naturais, tradicionalmente aplicadas em medicamentos populares, contêm essa porção. No entanto, é importante ressaltar que, em alimentos, a cumarina pode estar presente em níveis superiores aos máximos permitidos, representando um risco para a saúde. Portanto, recomenda-se a realização de estudos mais aprofundados sobre a planta, bem como prudência no consumo/uso das suas folhas (Maggi et al., 2011; Kowalska-Wochna & Tomulewicz, 2020; Stefanachi et al., 2018).

### 3. OBJETIVOS

Desde a antiguidade as plantas demonstram grande importância para a história, uma vez que possuem atividades biológicas com relevância significativa, devido à presença de compostos naturais na sua composição. A identificação de compostos bioativos de materiais vegetais torna-se um estudo promissor e com potencial a nível alimentar, nomeadamente através da funcionalização de alimentos já consagrados no mercado.

Este facto deve-se às exigências dos consumidores que procuram cada vez mais alimentos rotulados como mais saudáveis e naturais, evitando o consumo de aditivos químicos destacados pelo seu efeito prejudicial aquando do consumo em excesso e vai de encontro aos novos objetivos do setor industrial na aposta gradual pela rotulagem *clean label*.

Neste contexto, considerando o perfil fenólico individual anteriormente descrito da planta *M. melissophyllum*, o objetivo deste trabalho centra-se na otimização da extração destes compostos com potencial conservante e bioativo e a sua validação como ingrediente natural, com potencial de aplicação na indústria alimentar.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Otimização do processo de extração de compostos fenólicos, através da técnica de extração por maceração;
- Definição e validação das condições ótimas de extração, através da aplicação da metodologia de superfície de resposta (RSM);
- Determinação do potencial bioativo (antioxidante e antimicrobiana) dos extratos hidroetanólicos.
- Caracterização do perfil fenólico por UHPLC-DAD-ESI/MS.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material Vegetal

As folhas da *Melittis melissophyllum* L. foram colhidas no norte de Portugal (Caminho do Carvalho, Alfândega da Fé) pela empresa Touchflowers Lda. Após aquisição das mesmas, as amostras foram trituradas para um pó fino e homogêneo e, em seguida, conservadas em ambiente, seco e protegidas da luz para, posteriormente, efetuar a realização das análises laboratoriais conforme ilustrado na **Figura 2**.



**Figura 2.** Amostra de *Melittis melissophyllum* L. na forma liofilizada e triturada.

### 4.2. Padrões e reagentes

#### 4.2.1. Análise química

Os solventes acetonitrilo 99,9%, acetato de etilo 99,8% e n-hexano (95%), de grau HPLC, foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). O ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O etanol 99,8%, metanol 99,9% foram adquiridos na Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Os padrões de compostos fenólicos foram adquiridos na Extrasynthèse (Genay, França). A água foi tratada usando um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA). Todos os outros reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos de fontes comuns.

#### 4.2.2. Estudo das propriedades bioativas

*Atividade antimicrobiana:* O corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido na Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). O Mueller-Hinton ágar (MHB) foi obtido na empresa Biolab (Hungria).

*Atividade antioxidante:* O tampão Tris-HCl, FeSO<sub>4</sub>, ácido ascórbico, ácido tiobarbitúrico e o ácido tricloroacético foram obtidos na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi adquirido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA).

#### 4.3. Otimização do processo de extração para obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos a partir da amostra de *Melittis melissophyllum* L.

Com o objetivo de otimizar a extração de compostos fenólicos da amostra de *M. melissophyllum*, empregou-se a técnica de extração por maceração, utilizando um desenho experimental designado como desenho composto central (circunscrito) (DCCC), e aplicando a metodologia de superfície de resposta (RSM). Este procedimento visou identificar os parâmetros ótimos de extração, tais como a percentagem de solvente, temperatura e os tempos de extração.

As variáveis pré-estabelecidas foram analisadas através do DCCC, com a implementação de cinco níveis, conforme apresentado na **Tabela 5** (Heleno et al., 2016), resultando em 18 combinações de respostas. Estas foram realizadas com o intuito de alcançar uma capacidade preditiva aprimorada do modelo. Através da análise por RSM, torna-se viável otimizar simultaneamente diferentes parâmetros, permitindo, assim, a obtenção de modelos gráficos e equações polinomiais que descrevem as condições ideais para maximizar os critérios de resposta (Alaya, 2020; Roriz et al., 2017).

**Tabela 5.** Valores codificados e naturais das variáveis independentes usadas nos processos de extração por maceração.

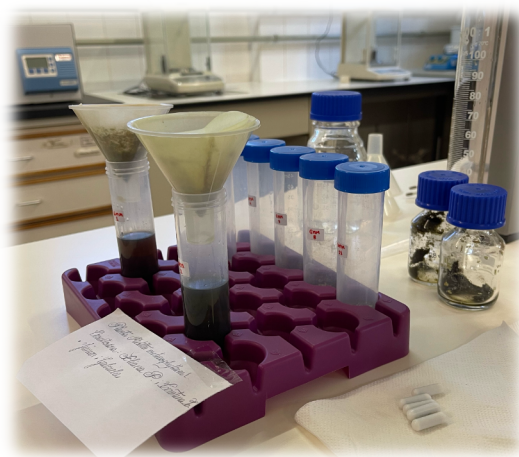
Valores codificados	Valores naturais		
	Extração por maceração		
	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (% v/v)
-1.68	20	25	0
-1	28	36	20
0	40	53	50
+1	52	69	80
+1.68	60	80	100

### 4.3.1. Procedimento de extração por maceração

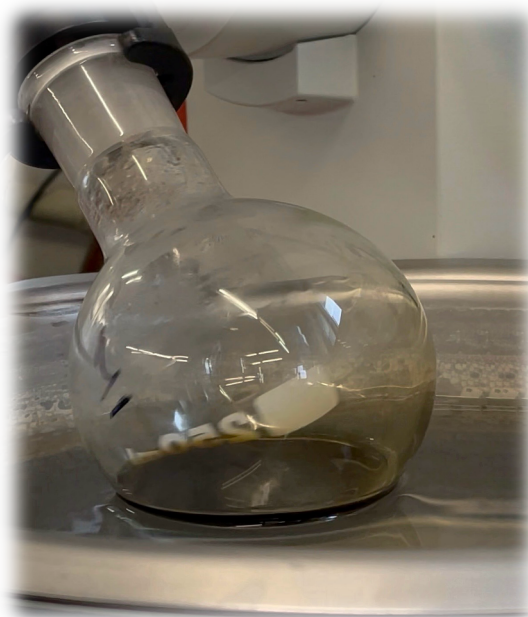
Porções de amostra (~900 mg) foram misturadas com 30 mL de solvente (EtOH/H<sub>2</sub>O), com a proporção  $S$  variando entre 0-100%. Posteriormente, foram submetidas ao processo de extração - extração assistida por maceração, com agitação magnética a 150 rpm, em diferentes níveis de  $t$  (28 – 60 min) e  $T$  (25 – 80 °C). De seguida, o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro (Whatman N°4) (**Figura 3**), sendo, posteriormente, a fração hidroetanólica evaporada no evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) (**Figura 4**) e a fração aquosa liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) (**Figura 5**).

Para a determinação da matéria seca, ou seja, do rendimento de extração, 5mL dos extratos obtidos foram colocados em cadinhos e levados à estufa (105 °C) durante 48 horas. Este parâmetro corresponde a uma das respostas que se pretende obter após análise por RSM.

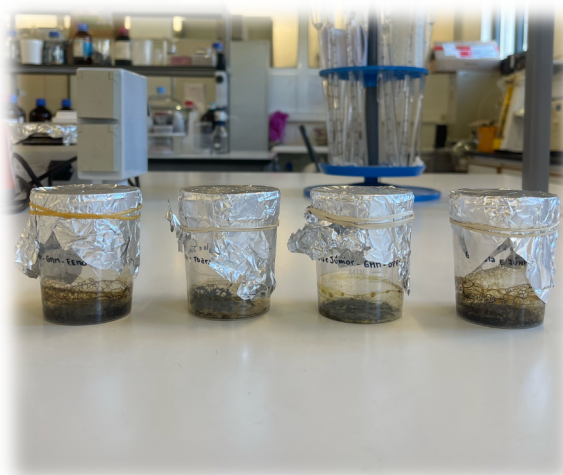
Para a análise do perfil individual de compostos fenólicos, 10 mg do extrato seco obtido anteriormente foram redissolvidos numa solução de etanol/água (20:80, v/v) e filtrados através de discos LC descartáveis de 0,22 µm.



**Figura 3.** Sobrenadante resultante da extração hidroetanólica de *Melittis melissophyllum* L., sendo filtrado por meio de papel de filtro.



**Figura 4.** Evaporação do extrato hidroetanólico de *Melittis melissophyllum* L. utilizando evaporador rotativo.



**Figura 5.** Extratos liofilizados da fração aquosa de *Melittis melissophyllum* L., obtidos após evaporação e liofilização.

#### **4.3.2. Determinação de compostos fenólicos**

A caracterização dos extratos foi realizada através de um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) (Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), seguindo a metodologia descrita por Bessada et al. (2016), utilizando um sistema equipado com uma bomba quaternária, um degaseificador,

um injetor automático a 5°C e um compartimento de coluna com termostato automatizado. A separação foi realizada em uma coluna C18 Waters Spherisorb S3 ODS-2C18 (3 µm, 4.6 mm × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA). A fase móvel consistiu de (A) solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e (B) acetonitrilo. A eluição em gradiente seguiu a programação: 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20–25% B (10 min), 25–35% B (10 min), 35–50% B (10 min), com um tempo de re-equilíbrio de 10 min. O fluxo foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção foi de 30 µL. A detecção foi efetuada por um detector de diodos (DAD) nos comprimentos de onda de 280, 330 e 370 nm.

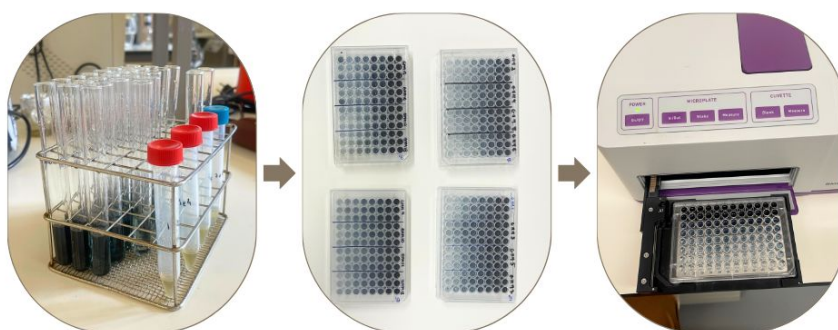
O UHPLC-DAD estava conectado a um espectrômetro de massa (MS) Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI) operando em modo negativo. O sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 5 kV, temperatura da fonte de 325 °C e uma tensão capilar de -20 V. Para o gás de nebulização, utilizou-se o azoto (50 psi). A tensão do deslocamento da lente do tubo foi mantida em -66 V. A amplitude de massa varreu de *m/z* 100 a 1800. A energia de colisão utilizada foi de 30 (unidades arbitrárias). Utilizou-se o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) para o tratamento dos dados.

A identificação dos componentes contidos nas amostras de *Melittis melissophyllum* L. foi alcançada por meio da análise dos tempos de reação, do seu espectro UV-Vis e de massa, estes comparados com os padrões de referência disponíveis no laboratório e com dados da literatura. Para realizar a quantificação, foram elaboradas curvas de calibração usando os padrões como base, considerando o sinal UV-Vis de cada um dos compostos. As seguintes curvas de calibração foram utilizadas: ácido clorogênico ( $y = 312503x - 199432$ ), *p*-cumárico ( $y = 504847x - 45869$ ), verbascosídeo ( $y = 124233x - 18873$ ) e luteolina-7-glicosídeo ( $y = 13848x - 10349$ ). Os compostos fenólicos identificados para os quais não havia um padrão comercial disponível, a quantificação foi realizada por meio da curva de calibração do padrão disponível mais semelhante. Os resultados foram apresentados em mg/g de extrato.

#### **4.3.3. Determinação do teor de fenóis totais**

A determinação de fenóis totais foi realizada em todos os extratos resultantes do DCCC, com o intuito de fazer parte de uma das respostas determinadas pelo RSM. Estes

compostos foram determinados utilizando o ensaio de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Wolfe, Wu & Liu (2003). Adicionaram-se os extratos (5 mg/mL) a 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v em água) e 2 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Posteriormente, os tubos foram agitados através de um vórtex e colocados em repouso a 40 °C durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 765 nm. Foi preparada uma curva padrão utilizando ácido gálico ( $9,4 \times 10^{-3}$  - 0,15 mg/mL), e os resultados foram apresentados em miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de extrato. O procedimento do ensaio pode ser visualizado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Ensaio de avaliação do teor de fenóis totais.

#### **4.4. Dados experimentais para otimização da extração por RSM**

##### **4.4.1. Desenho experimental RSM**

Para otimizar a extração da amostra de *M. melissophyllum* usando a técnica de maceração e a RSM, foi implementado um desenho experimental com três variáveis: tempo ( $t$ ) variando de 28-69 minutos, temperatura ( $T$ ) de 25-80°C e percentagem de solvente ( $S$ ) de 0-100%. O desenho experimental designado como desenho composto central (circunscrito) (DCCC), é uma técnica amplamente utilizada de RSM, empregada por diversos investigadores na otimização de métodos de processamento alimentar (BEZERRA et al., 2008).

##### **4.4.2. Modelo matemático**

Quanto aos dados de RSM, o modelo matemático para a análise das respostas foi proveniente do cálculo dos mínimos quadrados utilizando a **Equação 1**:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2$$

**Equação 1.** Equação polinomial de segunda ordem.

Onde  $Y$  é a variável dependente (variável de resposta) para ser modelada,  $b_0$  atua como o coeficiente constante,  $b_i$  é o coeficiente de efeito linear,  $X_i$  e  $X_j$  acabam por definir as variáveis independentes,  $b_{ij}$  é o coeficiente de efeito de interação,  $b_{ii}$  é o coeficiente de efeito quadrático e  $n$  é o número de variáveis.

#### 4.4.3. Procedimento para otimização da extração por RSM

O DCCC foi aplicado para a extração utilizando etanol como solvente, resultando em 18 combinações de resposta. Essas combinações foram detalhadamente analisadas e registradas na **Tabela 6**, juntamente com os valores codificados e as variáveis correspondentes. O DCCC com as informações estatísticas ( $\alpha = 1,68$ ) foi composto por um fatorial de  $2^3$ , seis pontos axiais e quatro pontos centrais, proporcionando uma gama de condições experimentais para a otimização da extração.

**Tabela 6.** Planejamento experimental de extração da espécie *Melittis melissophyllum* L.

P.T.	Valores Codificados			Valores Naturais		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	t (min)	T (°C)	S (% v/v)
1	-1	-1	-1	28	36	20
2	-1	-1	1	28	36	80
3	-1	1	-1	28	69	20
4	-1	1	1	28	69	80
5	1	-1	-1	52	36	20
6	1	-1	1	52	36	80
7	1	1	-1	52	69	20
8	1	1	1	52	69	80
9	-1.68	0	0	<b>20</b>	53	50
10	1.68	0	0	<b>60</b>	53	50
11	0	-1.68	0	40	<b>25</b>	50
12	0	1.68	0	40	<b>80</b>	50
13	0	0	-1.68	40	53	<b>0</b>

14	0	0	1.68	40	53	<b>100</b>
15	0	0	0	40	53	50
16	0	0	0	40	53	50
17	0	0	0	40	53	50
18	0	0	0	40	53	50

P.T.: Pontos experimentais.

Com base no tratamento dos dados relativos às percentagens de fenóis totais, rendimento e atividade antioxidante, foi utilizado o *software* Design-Expert 11 para gerar as superfícies de resposta, obter os modelos matemáticos e determinar as condições ótimas para o processo de extração.

#### **4.5. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir das amostras de *Melittis melissophyllum* L.**

##### **4.5.1. Atividade antioxidante**

A análise do potencial antioxidante foi conduzida nos extratos previamente preparados e liofilizados conforme descrito anteriormente na **secção 4.3.1.** utilizando dois ensaios *in vitro*: atividade captadora de radicais livres DPPH e o ensaio de inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

##### **4.5.1.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH**

Avaliou-se a atividade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) seguindo a metodologia descrita por Barros et al. (2008). Para isso, as soluções dos extratos em diferentes concentrações (0,3 mL) foram combinadas com uma solução metanólica contendo radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L; 270 uL). Posteriormente, a mistura foi deixada em repouso durante 60 minutos, em ambiente escuro, para a estabilização dos valores de absorbância, seguido da medição da absorbância a 515 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800). A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi então calculada com base na percentagem de descoloração da solução de DPPH, utilizando a **Equação 2**:

$$\% RSA = [(A_{DPPH} - A_s) / A_{DPPH}] \times 100$$

**Equação 2.** Equação para determinação da atividade captadora de radicais DPPH.

Onde,  $A_S$  é a absorbância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{DPPH}$  é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato capaz de inibir 50% de radicais DPPH ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem de RSA em função da concentração do extrato. A **Figura 7** ilustra o procedimento do ensaio.



**Figura 7.** Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: DPPH.

#### 4.5.1.2. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

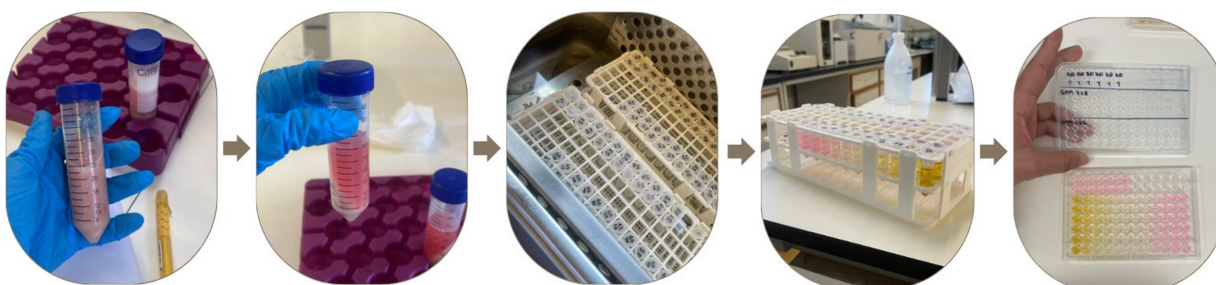
Para realizar o ensaio de TBARS, foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*) adquirido num matadouro local. O tecido foi homogeneizado numa solução tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) em tubo de Falcon, na proporção de 1:2 (*m/v*), e centrifugado a 3500 g durante 10 minutos. Em tubos de Eppendorf de 2 mL, uma alíquota de 100  $\mu$ L do sobrenadante foi combinada com os extratos (200  $\mu$ L), 100  $\mu$ L de  $FeSO_4$  (10 mmol/L) e 100  $\mu$ L de ácido ascórbico (0.1 mmol/L), e incubada a 37,5 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (500  $\mu$ L, 28% *m/v*), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *m/v*, 380  $\mu$ L). Posteriormente, a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 minutos e centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos para remover a proteína precipitada. A absorbância do complexo MDA-TBA no sobrenadante foi medida a 532 nm, e a taxa de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a **Equação 3**:

$$\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

**Equação 3.** Equação da determinação da percentagem de inibição em ensaio TBARS.

Onde A e B correspondem a absorbância do controlo e da solução com a amostra, respetivamente (Sarmiento et al., 2014).

O cálculo da concentração de extrato correspondente a 50% da inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$ ) ocorreu mediante ao gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração da amostra. Na **Figura 8** são apresentados cinco momentos distintos do procedimento: o tecido cerebral de porco homogeneizado numa solução de Tris-HCl, antes e depois da centrifugação; os tubos de eppendorf no banho térmico; as amostras nos mesmos tubos antes da centrifugação; e, por fim, a microplaca preparada para a leitura de absorbância, respetivamente.



**Figura 8.** Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: TBARS.

#### 4.6. Atividade antimicrobiana

Os microrganismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana foram obtidos na empresa FRILABO (Porto, Portugal).

As bactérias e os fungos foram cultivados em laboratório, incubados a 37°C em meio fresco apropriado, durante 24 horas antes da análise para manter a fase de crescimento exponencial.

##### 4.6.1. Atividade antibacteriana

Avaliou-se a atividade antibacteriana seguindo a metodologia descrita por Pires et al. (2018). Foram utilizadas bactérias Gram-negativas, nomeadamente *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), e Gram-positivas, sendo elas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus*

(ATCC 11778) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111). Através do método de microdiluição, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB). As culturas bacterianas foram ajustadas através do densitômetro (padronizado em  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL).

As amostras foram primeiramente dissolvidas em 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de água destilada autoclavada para obter uma concentração final de 20 mg/mL da solução stock. 100  $\mu$ L desta concentração foram adicionados no primeiro poço (microplaca de 96 poços) em duplicado com 90  $\mu$ L de *Tryptic Soy Broth* (TSB). Nos poços restantes foram adicionados 90  $\mu$ L de meio TSB. Em seguida, as amostras foram diluídas sucessivamente para obtenção das diferentes concentrações (10 a 0,03125 mg/mL). Para finalizar, 10  $\mu$ L de inóculo (padronizado em  $1,5 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL) foram adicionados em todos os poços (**Figura 9**). Foram preparados dois controlos negativos, um com TSB e outro com o extrato. Foram preparados dois controlos positivos com TSB e cada inóculo e outro com meio, antibióticos e bactérias. A Ampicilina e a Estreptomicina foram utilizadas para todas as bactérias testadas e a Metecilina também foi utilizada para *S. aureus*. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. A CMI das amostras foi detetada após adição (40  $\mu$ L) de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) 0,2 mg/mL e incubação a 37°C durante 30 min. A CMI foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano visível, determinada pela mudança da coloração de amarelo para rosa se os microrganismos forem viáveis. Para a determinação do CMB, 10  $\mu$ L do conteúdo de cada poço que não apresentou alteração de cor foi plaqueado em meio sólido, ágar sangue (7% sangue de ovelha) e incubado a 37°C durante 24 h. A concentração mais baixa que não produziu crescimento determina a CMB. A CMB foi definida como a concentração mais baixa necessária para matar as bactérias.



**Figura 9.** Ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana.

#### **4.6.2. Atividade antifúngica**

Para a avaliação da atividade antifúngica, foi seguido o procedimento anteriormente descrito por Caroch, Morales & Ferreira (2015). Os extratos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de dois tipos de fungos, nomeadamente: *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305). Os fungos foram mantidos em ágar malte (MA), armazenados a 4 °C e subcultivados antes de cada ensaio. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi calibrada utilizando uma solução salina estéril, alcançando uma concentração aproximada de  $1,0 \times 10^5$  em um volume de 100  $\mu$ L por poço, e depois foi inoculada em ágar malte (MA) com o objetivo de confirmar a validade e verificar a ausência de contaminação. A CMI foi estabelecida utilizando-se o método de diluição sucessiva em microplacas de 96 poços, onde o extrato hidroetanólico foi combinado com caldo de extrato de malte e o inóculo fúngico. Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 25 °C por um período de 72 horas. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2  $\mu$ L de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100  $\mu$ L de caldo de malte por poço, seguido de incubação durante 72 horas a 25°C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte

do inóculo original. O cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico.

#### **4.7. Análise estatística**

Os ensaios do presente estudo foram realizados em triplicado e os resultados obtidos expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Frente ao processo de otimização a utilizar um desenho experimental e a RSM, fez-se a obtenção dos dados através do *software* Design-Expert 11 (StatEase, Minneapolis, MN, USA). Através do *software* estatístico SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0; IBM Corp., Armonk, NY, EUA), o nível de significância para os testes estatísticos foi de 5%. Já as diferenças significativas entre as amostras foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Otimização do processo de extração baseado no DCCC e modelos de superfície de resposta**

Os resultados dos ensaios para a otimização foram obtidos a partir do tratamento de dados referentes à percentagem dos fenóis totais, rendimento e à atividade antioxidante, nomeadamente os valores de EC<sub>50</sub> para os ensaios DPPH e TBARS, conforme apresentado na **Tabela 7**. A partir da obtenção dos dados, empregou-se o *software* *Design-Expert* com o objetivo de gerar as superfícies de resposta, os modelos matemáticos e determinar as condições ótimas para a extração.

A importância de realizar a otimização do processo de extração traduz-se numa estratégia para identificar as condições ideais que garantam um alto rendimento ou a obtenção de um extrato que garanta uma composição rica em compostos com ação conservante e bioativa. Isso possibilitará uma compreensão mais precisa da quantidade necessária de material vegetal, bem como do solvente, temperatura e tempo de extração adequados, para transpor o processo para aplicação no setor alimentar.

**Tabela 7.** Resultados experimentais do processo de otimização das variáveis X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> para a determinação das condições ótimas nos ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais.

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Rendimento (%, mg /mL)	DPPH (EC <sub>50</sub> -mg /mL)	TBARS (EC <sub>50</sub> - mg/mL)	Fenóis Totais (%, g E/ g A)
28	36	20	25,2	0,22 ± 0,02	0,034 ± 0,001	27,4 ± 0,1
28	36	80	15,9	0,2 ± 0,1	0,046 ± 0,002	36,2 ± 0,1
28	69	20	29,6	0,35 ± 0,03	0,079 ± 0,003	50,79 ± 0,01
28	69	80	29,6	0,15 ± 0,01	0,046 ± 0,001	26,0 ± 0,1
52	36	20	31,9	0,217 ± 0,003	0,048 ± 0,001	42,4 ± 0,1
52	36	80	22,5	0,17 ± 0,01	0,042 ± 0,001	30,4 ± 0,2
52	69	20	31,0	0,23 ± 0,01	0,026 ± 0,001	39,8 ± 0,2
52	69	80	25,9	0,16 ± 0,01	0,039 ± 0,001	36,9 ± 0,1
<b>20</b>	53	50	29,9	0,193 ± 0,004	0,024 ± 0,001	26,4 ± 0,1
<b>60</b>	53	50	29,3	0,26 ± 0,02	0,043 ± 0,001	25,1 ± 0,1
40	<b>25</b>	50	28,7	0,20 ± 0,02	0,029 ± 0,003	25,9 ± 0,1
40	<b>80</b>	50	31,7	0,168 ± 0,002	0,0242 ± 0,0004	38,2 ± 0,1
40	53	<b>0</b>	28,4	0,41 ± 0,01	0,09 ± 0,01	27,3 ± 0,1
40	53	<b>100</b>	4,5	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,01	44,6 ± 0,1
40	53	50	27,7	0,229 ± 0,002	0,047 ± 0,004	37,5 ± 0,1
40	53	50	28,2	0,24 ± 0,01	0,048 ± 0,001	34,62 ± 0,04
40	53	50	32,7	0,25 ± 0,01	0,055 ± 0,002	37,80 ± 0,01
40	53	50	28,8	0,22 ± 0,02	0,050 ± 0,002	41,1 ± 0,2

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> são os valores codificados de tempo (min), temperatura (°C) e solvente (%/%), respectivamente. Os resultados do tratamento de dados experimentais estão expressos em média ± desvio padrão. DPPH: atividade de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. TBARS: Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.

Após a análise realizada com o auxílio do *software* Design-Expert 11, foi possível obter dados sobre as superfícies de resposta, bem como estabelecer um modelo matemático e identificar as condições ideais de extração, tanto em relação ao rendimento quanto aos ensaios de DPPH, TBARS e fenóis totais. Na **Tabela 8** estão representados os coeficientes dos modelos teóricos em relação as variáveis de resposta. Já na **Tabela 9** estão presentes os modelos matemáticos e as condições ótimas de extração.

**Tabela 8.** Resultados dos parâmetros da equação polinomial em termos do comportamento da extração para rendimento (%), mg /mL), DPPH (EC<sub>50</sub>-mg/mL), TBARS (EC<sub>50</sub>-mg/mL) e Fenóis Totais (%), g E/ g A) seguindo o DCCC com 5 níveis de variação (Tabela 5).

Coefficientes		Rendimento	DPPH	TBARS	Fenóis totais
Intercepção	$b_0$	29,4 ± 0,7	0,20 ± 0,01	0,04 ± 0,01	36,4 ± 1,5
	$b_1$	0,9 ± 0,7	0,006 ± 0,004	ns	4,3 ± 1,3
	$b_2$	0,7 ± 0,7	-0,010 ± 0,004	0,001 ± 0,004	-0,01 ± 1,08
Linear	$b_3$	-5,9 ± 0,7	-0,02 ± 0,01	-0,001 ± 0,004	2,7 ± 1,1
	$b_{11}$	ns	0,001 ± 0,003	ns	-1,5 ± 1,3
Quadrático	$b_{22}$	ns	-0,019 ± 0,003	-0,007 ± 0,003	-2,9 ± 1,0
	$b_{33}$	-4,8 ± 0,6	-0,02 ± 0,01	0,017 ± 0,003	ns
	$b_{12}$	1,7 ± 0,9	0,01 ± 0,01	ns	3,6 ± 1,5
Interação	$b_{13}$	ns	-0,01 ± 0,01	ns	-3,3 ± 1,5
	$b_{23}$	ns	-0,01 ± 0,01	ns	ns
<b>Modelo</b>					
F-Valor		31,37	14,44	9,11	4,12
p-Valor		< 0,0001	0,002	0,0017	0,0326
Falta de ajuste		0,6081	0,4614	0,7523	0,0553
R <sup>2</sup>		0,9401	0,9556	0,7681	0,7827
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>		0,9101	0,8897	0,6837	0,5925
R <sup>2</sup> predicto		0,7870	0,5904	0,4687	-0,3237
Precisão adequada		20,020	11,147	10,524	6,0734
CV (%)		8,11	5,61	25,20	11,00

Os parâmetros indicados pelos subscritos 1, 2 e 3 correspondem às variáveis independentes, nomeadamente tempo, temperatura e proporção de solvente, respetivamente. ns: não significativo; CV: coeficiente de variação (%); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; R<sup>2</sup><sub>adj</sub>: coeficiente de determinação ajustado; DPPH: atividade de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. TBARS: Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.

**Tabela 9.** Modelos matemáticos e as condições ótimas de extração para os ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais.

Ensaio	Modelo Matemático	Ponto Ótimo de Extração			R.P.
		t (min)	T (°C)	S (% v/v)	
Rendimento	$y = 29,42 + 0,90A + 0,65B - 5,91C - 1,70AB - 4,75C^2$	51	37	28	32%
DPPH	$y = 0,2336 + 0,0064A - 0,0098B - 0,0201C + 0,0108AB - 0,0066AC -$	52	69	80	0,16 mg/mL

	$0,0057BC+0,0006A^2-0,0194B^2-0,0196C^2$				
TBARS	$y = 0,0389+0,0005B-0,0008C-0,0066B^2+0,0167C^2$	28	36	50	0,03 mg/mL
Fenóis Totais	$y = 36,42+4,25A-0,0106B+2,65C+3,58AB-3,27AC-1,51A^2-2,92B^2$	52	62	40	41,70 mg GAE/ mg A

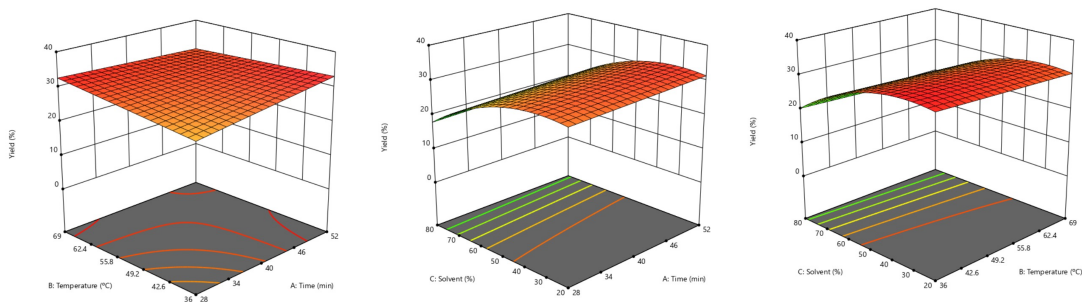
R.P.: resultado previsto. DPPH: atividade de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. TBARS: Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.

Conforme os dados apresentados na **Tabela 8**, foi possível selecionar as variáveis  $t$ ,  $T$  e  $S$  de acordo com as soluções geradas e conseqüentemente os pontos ótimos para cada ensaio isolado, uma vez que todos os modelos apresentaram efeitos significativos. Quanto aos coeficientes de determinação, os valores que mais se aproximam de 1 denotam-se com uma maior significância. Para os ensaios de Rendimento e DPPH, os valores de  $R^2$  e  $R^2_{adj}$  foram maiores do que 0,9401 e 0,8897, respetivamente, apenas com exceção dos Fenóis Totais e TBARS que apresentaram coeficientes menores. Apesar disso, todos os valores foram superiores a 0,6000 indicando que as variáveis independentes envolvidas no processo de extração explicam a variabilidade de cada resposta. Estes factos denotam que, nestes casos, os modelos são eficazes para descrever o efeito das variáveis em relação aos resultados.

Para além disso, os resultados de  $p$ -valor dos modelos para cada ensaio foram inferiores a 0,05, o que demonstra que os modelos são estatisticamente significativos. Quando um termo possui o menor  $p$ -valor, denota-se uma grande importância dentro da análise. Para o ensaio de Rendimento, o  $p$ -valor da variável  $S$  apresentou valores inferiores a 0,0001, tanto em relação ao coeficiente linear quanto quadrático. Já para os ensaios de DPPH e TBARS, os menores  $p$ -valor foram identificados em relação aos coeficientes quadráticos das variáveis  $T$  e  $S$  (0,0011; 0,0059 e 0,0640; 0,0003, respetivamente). Por fim, no ensaio de Fenóis Totais, o menor  $p$ -valor foi para o coeficiente linear da variável  $t$  (0,0119).

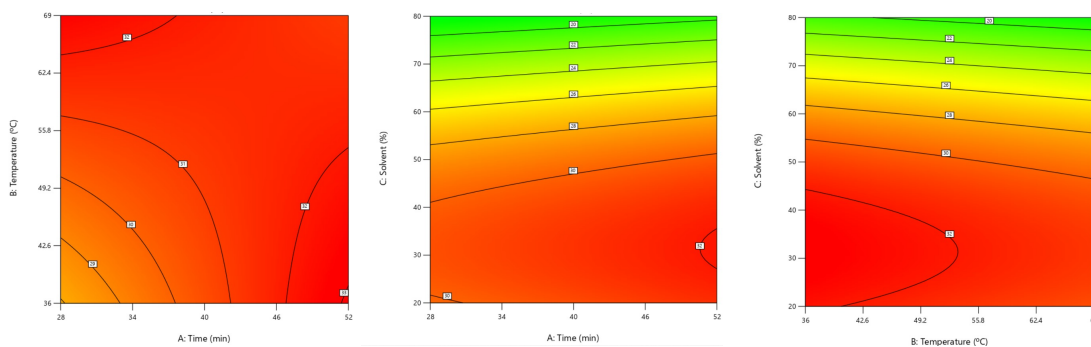
A previsão do modelo para o ponto ótimo de Rendimento resultou em 28% de etanol, 37°C e 51 minutos. Nestas condições, o rendimento de extração previsto seria de 32%. Na **Figura 10** estão representados os gráficos 3D com o esquema de cores que

apresentam zonas de rendimento mais baixo (verde), médio (amarelo), alto (vermelho) e os efeitos das variáveis independentes.



**Figura 10.** Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para o ensaio de Rendimento.

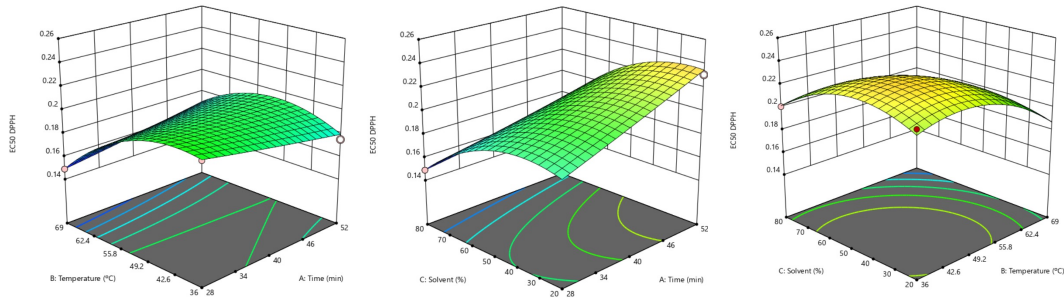
Por meio dos gráficos é possível notar que tanto a temperatura quanto o tempo não geram tanta influência na obtenção de um rendimento elevado. Já a percentagem de solvente apresenta-se como o fator mais importante para este ensaio, uma vez que é possível analisar através da imagem B e C que a utilização de um solvente mais aquoso acaba por apresentar um aumento no rendimento. Outra forma de interpretar os resultados é feita através dos gráficos em 2D expressos na **Figura 11**, o qual reforçam que a utilização de uma percentagem menor de etanol tem maior efeito no aumento do rendimento.



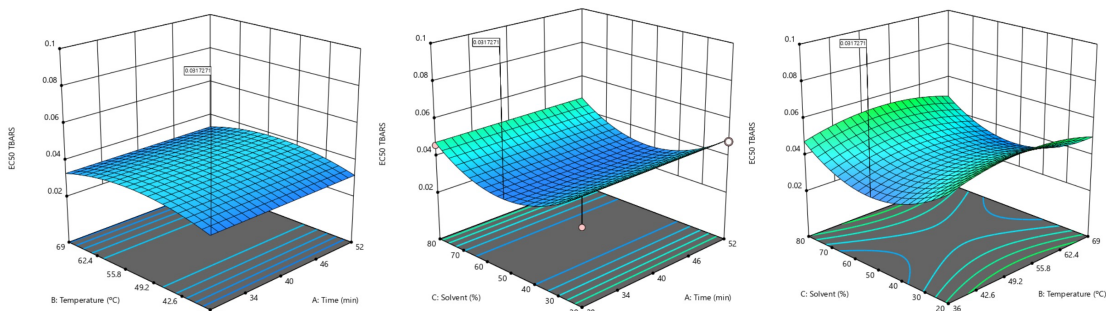
**Figura 11.** Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de Rendimento.

A previsão do modelo para o ponto ótimo no ensaio de DPPH resultou em 80% de etanol, 69°C e 52 minutos e para o ensaio de TBARS 50%, 36°C e 28 minutos. Nestas

condições, o modelo previu um  $EC_{50}$  de 0,16 e 0,03, respectivamente. Na **Figura 12** estão representados os gráficos em 3D para o ensaio de DPPH e na **Figura 13** para TBARS.

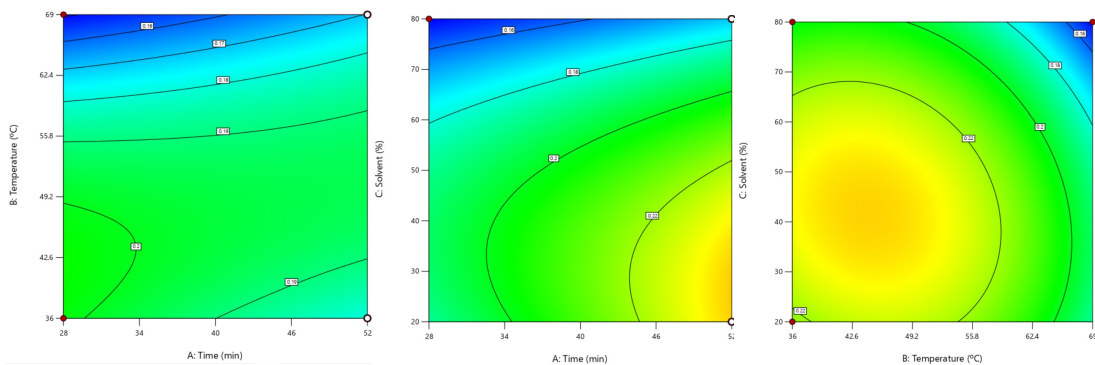


**Figura 12.** Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para a atividade antioxidante DPPH.

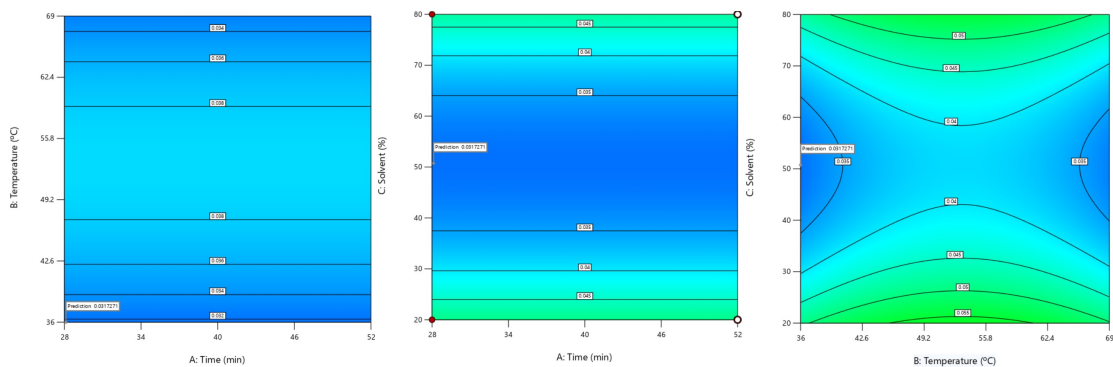


**Figura 13.** Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para a atividade antioxidante TBARS.

O esquema de cores para as superfícies de resposta de DPPH e TBARS apresentaram, respectivamente, zonas com maior capacidade antioxidante (azul e azul escuro) e zonas com menor capacidade antioxidante (amarelo e verde). Os gráficos em 2D para o ensaio de DPPH estão na **Figura 14**, enquanto os do ensaio de TBARS estão na **Figura 15**.



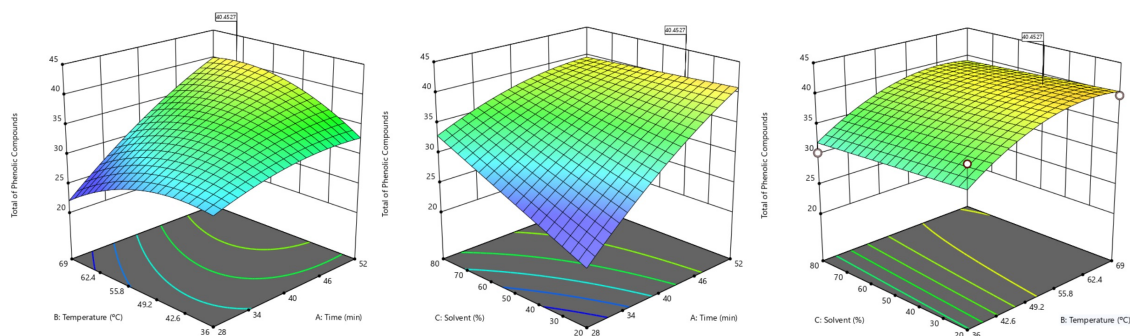
**Figura 14.** Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de DPPH.



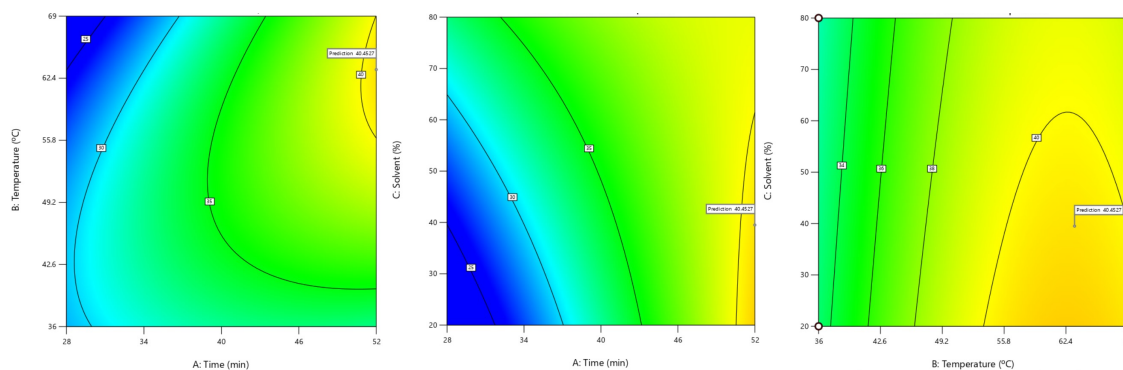
**Figura 15.** Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de TBARS.

Através dos resultados obtidos, nota-se que para o ensaio de DPPH, o factor mais influente deu-se através dos efeitos quadráticos de temperatura e seguidamente da percentagem de solvente. Neste caso, uma temperatura menor e um solvente aquoso acabam por impactar em um valor de  $EC_{50}$  maior e consequentemente uma atividade antioxidante reduzida. O mesmo é observado para o ensaio de TBARS, no qual o tempo não apresenta tanta relevância quando comparado com as outras variáveis. Através do gráfico 3D é possível concluir que o efeito quadrático de percentagem de solvente exerce a maior influência. A menor capacidade antioxidante é constatada tanto para uma alta percentagem de solvente, quanto para um solvente mais aquoso. Para além disso, a variável  $T$  mostrou-se flexível, uma vez que um  $EC_{50}$  mais favorável pode ser obtido tanto para baixas e altas temperaturas.

Por fim, na **Figura 16** e **Figura 17** tem-se os gráficos em 3D e em 2D, respetivamente, para o ensaio de Fenóis Totais, o qual a previsão do modelo para o ponto ótimo resultou em 40% de etanol, 62°C e 52 minutos e um total de fenólicos de 41,70 mg GAE/ g A.



**Figura 16.** Gráficos de superfície de resposta tridimensionais para o ensaio de Fenóis Totais.



**Figura 17.** Gráficos de contorno para as regiões de condições ótimas de Fenóis Totais.

Para o esquema de cores neste caso, estão representadas as zonas com uma maior percentagem de fenóis totais (amarelo), média (verde) e baixa (azul). O factor com mais influência foi o coeficiente linear da variável de tempo, uma vez que nas condições de extração para o ensaio de Fenóis Totais, um baixo tempo impactaria negativamente.

Posterior à obtenção dos modelos matemáticos, das superfícies de resposta e dos pontos ótimos de extração, procedeu-se à revisão das análises a fim de comparar os resultados obtidos com os resultados previstos pelos modelos. Na **Tabela 10** estão apresentados, de forma resumida, as condições ótimas adquiridas durante o processo de otimização, os resultados de % e  $EC_{50}$ . Apesar da obtenção das condições ótimas para o Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais de forma isolada, procedeu-se à repetição dos restantes ensaios a fim de estabelecer comparações entre as análises.

**Tabela 10.** Resumo das condições ótimas e resultados correspondentes para os ensaios de Rendimento, DPPH, TBARS e Fenóis Totais.

Condições ótimas			Rendimento	DPPH	TBARS	Fenóis totais
<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (% v/v)	(%, mg /mL)	( $EC_{50}$ - mg /mL)	( $EC_{50}$ - mg/mL)	(mg GAE/ g A)
51	37	28	20,2	0,26 ± 0,04	0,0100 ± 0,0001	21,1 ± 0,2
52	62	40	20,8	0,22 ± 0,04	0,026 ± 0,003	20,7 ± 0,1
28	36	50	8,9	0,3 ± 0,1	0,024 ± 0,001	17,05 ± 0,02
52	69	80	17,5	0,16 ± 0,01	0,028 ± 0,001	18,21 ± 0,04

Os resultados do tratamento de dados experimentais estão expressos em média ± desvio padrão. DPPH: atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo. TBARS: Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.

## 5.2. Propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir da amostra de *Melittis melissophyllum* L.

### 5.2.1. Atividade Antioxidante e Fenóis Totais

A atividade antioxidante de extratos vegetais pode ser identificada através de diferentes métodos. Para a análise do extrato obtido a partir da amostra de *M. melissophyllum* fez-se a utilização de dois ensaios *in vitro*, nomeadamente TBARS, com o propósito de avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico e a atividade captadora de radicais DPPH. Os resultados foram expressos em valores de EC<sub>50</sub> em relação à atividade antioxidante e em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g A) para os Fenóis Totais. Ambos os resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

No ensaio de TBARS, observou-se a variação da bioatividade em função da percentagem de solvente utilizada. Uma menor quantidade de solvente resultou em valores elevados de EC<sub>50</sub>, refletindo numa menor atividade antioxidante. Por outro lado, trabalhar com o solvente em sua totalidade resultou em rendimentos reduzidos. Apesar disso, as amostras que exibiram maior bioatividade também apresentaram bom rendimento. Após a finalização das análises de TBARS, o resultado obtido superou as expectativas, visto que o valor previsto pelo modelo era de 0,03, enquanto no ensaio realizado obteve-se um valor de 0,024 ± 0,001 mg/mL. Em relação ao método de DPPH, o valor previsto pelo modelo era de 0,16. Ao final das análises, obteve-se um valor de 0,16 ± 0,01 mg/mL, o que está em conformidade com as expectativas visto que os resultados demonstraram consistência com a previsão inicial.

Num estudo prévio, o potencial antioxidante foi avaliado por Kaurinovic et al. (2011) utilizando diferentes solventes, sendo um dos métodos de análise o ensaio de DPPH. Os valores de EC<sub>50</sub> para os solventes H<sub>2</sub>O, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, n-BuOH e Et<sub>2</sub>O foram de 9,21 µg/mL, 11,34 µg/mL, 11,92 µg/mL, 17,21 µg/mL e 18,09 µg/mL, respetivamente. Para além disso, verificou-se que os diferentes métodos de avaliação demonstraram uma elevada capacidade antioxidante.

Já no estudo conduzido por Grujić et al. (2014), obtiveram-se resultados de Fenóis Totais e da determinação da atividade antioxidante através do ensaio de DPPH. Neste caso, foram testadas diferentes concentrações dos solventes metanol e etanol. Os valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL) obtidos para os extratos (1 mg/mL) de metanol e de 10%, 30%, 50% e

96% de etanol foram: 0,116; 0,664; 0,142; 0,109 e 0,177, respectivamente. Já os resultados de Fenóis Totais expressos em GAE/g para os solventes mencionados anteriormente e suas respectivas percentagens foram:  $90,1 \pm 0,003$ ;  $63,5 \pm 0,004$ ;  $83,2 \pm 0,005$ ;  $99,1 \pm 0,001$  e  $111,7 \pm 0,004$ . Em comparação ao presente estudo, é reforçada a constatação de que os extratos de *M. melissophyllum* possuem potencial antioxidante, sobretudo por ambos os estudos terem em comum o mesmo solvente para a realização do ensaio, ainda que em percentagens distintas, mas obtendo resultados semelhantes. Ademais, a técnica de extração empregue foi mais simples e de baixo custo, conferindo resultados mais acessíveis e replicáveis, em contraposição a métodos de extração mais complexos. Todavia, em relação aos Fenóis Totais, o presente estudo obteve um valor menor quando comparado a todos os resultados do estudo.

Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek (2012) realizou a identificação da presença de ácido *p*-cumárico através das análises conduzidas por HPLC-DAD. Este composto é conhecido por suas atividades antioxidantes, sendo, portanto, possivelmente a fração de ácido fenólico responsável pela propriedade analisada.

O presente estudo reforça a significativa atividade antioxidante observada nas amostras de *M. melissophyllum*, conforme já visto por estudos anteriores na literatura, evidenciando também seu potencial quanto conservante natural.

### 5.2.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana, compreendendo microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos para a atividade antibacteriana e duas estirpes de fungos para a atividade antifúngica, dos extratos de *M. melissophyllum* encontram-se na **Tabela 11 e 12**, respectivamente. Nelas são possíveis encontrar os dados referentes às respostas de Rendimento, TBARS, DPPH e Fenóis totais expressos em Concentração Mínima Bactericida (CMB), Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Fungicida (CMF).

Para isso fez-se o teste contra um painel de oito bactérias, sendo três Gram-positivas (*B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*) e cinco Gram-negativas (*E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* e *Y. enterocolitica*) em relação à atividade antibacteriana.

Nota-se que, no geral, os quatro extratos otimizados apresentaram comportamentos semelhantes frente às diferentes bactérias, com exceção das seguintes estirpes: *S. enterica*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Essas bactérias demonstraram maior sensibilidade tanto em relação aos restantes ensaios realizados para as mesmas estirpes, quando comparadas às estirpes diferentes. Ou seja, a inibição do crescimento microbiano ocorreu em concentrações menores.

Dentre as estirpes estudadas, a *Y. enterocolitica* foi a mais suscetível em todos os ensaios e suas respectivas condições ótimas, entretanto o melhor resultado foi em relação ao ponto ótimo de DPPH uma vez que a inibição de crescimento da bactéria ocorreu em uma concentração menor (CMI: 0,15 mg/mL) quando comparado ao restante dos ensaios. Para além disso, a *S. enterica* também demonstrou suscetibilidade em todos os ensaios. A concentração mínima necessária para a inibição do crescimento microbiano foi minimamente maior apenas na condição ótima de Rendimento em comparação aos outros três ensaios. Já a concentração mínima necessária para eliminar as células bacterianas permaneceu semelhante, tanto para as diferentes estirpes quanto para os diferentes ensaios realizados.

Dos restantes resultados, as concentrações mínimas inibitórias e bactericidas para os microrganismos testados nos ensaios apresentaram variações: *E. coli* e *E. cloacae* apresentaram uma CMI de 10 mg/mL e uma CMB acima de 10 mg/mL nas condições ótimas de Rendimento e Fenóis Totais. Todavia, para os ensaios de DPPH e TBARS, a estirpe *E. cloacae* possuiu uma CMI superior a 10 mg/mL. As estirpes de *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* também demonstraram uma CMI acima de 10 mg/mL no ensaio de Rendimento. Adicionalmente, para o ensaio de Fenóis Totais, *B. cereus* e *L. monocytogenes* apresentaram uma CMI de 10 mg/mL.

Aćimović-Djoković et al. (2002) avaliou a atividade antibacteriana do extrato de *M. melissophyllum*, utilizando dois solventes diferentes, nomeadamente éter de petróleo e acetato de etilo, através do método de disco-difusão. As seguintes estirpes foram estudadas: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus hemoliznia*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albican*. O extrato de acetato de etilo apresentou uma ampla gama de atividade antibacteriana enquanto o extrato de éter de petróleo não exibiu nenhum resultado. Os resultados foram

representados pelo diâmetro da zona de inibição, onde a maior atividade antimicrobiana foi observada contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis* (16 mm).

Nos estudos existentes sobre a *M. melissophyllum*, não foram encontrados dados de CMI e CMB que permitam comparações diretas. Dessa forma, o presente trabalho torna-se relevante e oferece uma nova referência e contributo inovador para o tema em estudo.

Já os resultados dos controlos positivos Estreptomicina, Metecilina e Ampicilina revelaram variabilidade nas suas atividades antimicrobianas, contrastando com os resultados obtidos nos ensaios de Rendimento, TBARS, DPPH e Fenóis Totais. A Metecilina demonstrou atividade apenas em relação à bactéria Gram-positiva *S. aureus*, a Ampicilina em relação a todas as estirpes, apenas com exceção a bactéria Gram-positiva *B. cereus* e a Estreptomicina exibiu atividade contra todas as estirpes bacterianas.

**Tabela 11.** Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) dos extratos hidroetanólicos de *Melittis melissophyllum* L.

Atividade Antibacteriana		Bactérias Gram-negativo					Bactérias Gram-positivo		
		<i>En.cl.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>S.e.</i>	<i>Y.e.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>	<i>S.a.</i>
Rendimento	<i>CMI</i>	10	10	>10	2,5	1,25	>10	>10	2,5
	<i>CMB</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
TBARS	<i>CMI</i>	>10	10	>10	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
	<i>CMB</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
DPPH	<i>CMI</i>	>10	10	>10	1,25	0,15	1,25	5	5
	<i>CMB</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Fenóis Totais	<i>CMI</i>	10	10	>10	1,25	1,25	10	10	2,5
	<i>CMB</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
<b>Controlo positivo</b>									
Estreptomicina (1mg/mL)	<i>CMI</i>	0,007	0,01	0,06	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
	<i>CMB</i>	0,007	0,01	0,06	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
Metecilina (1mg/mL)	<i>CMI</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,007
	<i>CMB</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,007
Ampicilina (20mg/mL)	<i>CMI</i>	0,15	0,15	0,63	0,15	0,15	n.t.	0,15	0,15
	<i>CMB</i>	0,15	0,15	0,63	0,15	0,15	n.t.	0,15	0,15

*En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S.e.*: *Salmonella enterica*; *Y.e.*: *Yersinia enterocolitica*; *B.c.*: *Bacillus cereus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; CMB: Concentração Mínima Bactericida; CMI: Concentração Mínima Inibitória.

Quanto à atividade antifúngica, verificou-se que os valores de CMI foram de 2,5 mg/mL para as condições ótimas dos ensaios de TBARS e DPPH em relação à estirpe *Aspergillus brasiliensis*. Sugere-se, portanto, uma maior suscetibilidade desta estirpe em comparação com a estirpe *Aspergillus fumigatus* e com os restantes ensaios, onde os valores de CMI foram de 5 mg/mL. Por outro lado, a CMF foi de 10 mg/mL para todos os ensaios e para ambas as estirpes.

**Tabela 12.** Atividade antifúngica (CMI e CMF mg/mL) dos extratos hidroetanólicos de *Melittis melissophyllum* L.

Atividade Antifúngica		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Rendimento	CMI	5	5
	CMF	10	10
TBARS	CMI	2,5	5
	CMF	10	10
DPPH	CMI	2,5	5
	CMF	10	10
Fenóis Totais	CMI	5	5
	CMF	10	10
<b>Controlo positivo</b>			
Cetoconazol	CMI	0,06	0,5
	CMF	0,125	1

CMF: Concentração Mínima fungicida; CMI: Concentração Mínima Inibitória.

### 5.3. Perfil em compostos fenólicos

Foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à deteção de arranjo de diodos e espectrometria de massa contendo sistema de ionização por *electrospray* (HPLC-DAD-ESI/MS) para a avaliação da composição fenólica presente nos extratos de *M. melissophyllum*. Na análise do perfil individual de compostos fenólicos foi tido em conta o tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\max}$ ), ião pseudomolecular ( $[M-H]^-$ ), a fragmentação do ião molecular (MSn) e a tentativa de identificação (**Tabela 13**).

Desta forma, foram detetados 9 compostos fenólicos (**Figura 18**), nos quais quatro foram identificados como ácidos fenólicos (derivados do ácido clorogénico e *p*-cumárico), dois flavonoides (derivados da luteolina), um glicosídeo feniletanoide de cafeoil (derivado do verbascosídeo), um iridoide e um derivado da cumarina.

O pico 1 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  353) com um tempo de retenção de 8,4 minutos foi tentativamente identificado como ácido 5-cafeoilquínico. A fragmentação a  $m/z$  191 indica a perda de uma unidade de cafeoil. O mesmo composto foi previamente avaliado por Nobela (2018) em diferentes tecidos de *Sonchus oleraceus*. Para além disso, o ácido clorogénico foi detetado por Szyborska-Sandhu et al. (2020) nos extratos de *Melittis melissophyllum* L.

O pico 2 apresentou um ião dimérico  $[2M-H]^-$  a  $m/z$  651, com um tempo de retenção de 11,64 minutos, resultando em fragmentos a  $m/z$  325 e 163. Este pico foi tentativamente identificado como hexosídeo de ácido *O*-cumárico, também detetado nas análises das infusões de *M. melissophyllum* realizadas por Pereira et al. (2018).

O pico 3 mostrou um ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  623, com um tempo de retenção de 16,68 minutos, e foi tentativamente identificado como verbascosídeo. Este glicosídeo feniletanoide já foi previamente relatado por Szyborska-Sandhu et al. (2020) em relação aos extratos de *M. melissophyllum* e seguiu as características da deteção realizada por Czerwinska et al. (2020) em extratos das flores de *Lamium album* L.

O pico 4 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  593), com um tempo de retenção de 18,79 minutos, foi proposto como luteolina-*O*-rutinosídeo, uma vez que o pico em  $m/z$  a 285 corresponde a perda neutra da porção de rutina, indicando a luteolina. Este flavonoide glicosilado já foi identificado por Corrêa et al. (2014) nas folhas de *Justicia acuminatissima*.

Por outro lado, o pico 5 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  405), com um tempo de retenção de 21,28 minutos, foi tentativamente identificado como 8-*O*-acetil-harpagídeo, previamente analisado por Skrzypczak-Pietraszek et al. (2018) em culturas de tecidos vegetais de *M. melissophyllum*.

O pico 6 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  163), com um tempo de retenção de 21,28 minutos, foi tentativamente identificado como ácido *O*-cumárico. Previamente, no estudo realizado por Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek (2012), este ácido fenólico foi reportado para amostras, com e sem hidrólise, de *M. melissophyllum*.

O pico 7, com um tempo de retenção de 23,1 minutos, mostrou um ião desprotonado  $[M-H]^-$  a  $m/z$  431 e um pico em  $m/z$  a 269 devido à perda de uma unidade de hexose. Os íons fragmentados são característicos da apigenina, sendo tentativamente identificado como apigenina-*O*-hexosídeo. Este flavonoide já foi anteriormente identificado por Ibrahim et al. (2022) em folhas de *Salvadora persica* L. (Sp).

O pico 8 apresentou um tempo de retenção de 24,98 minutos, um ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  515 e, posteriormente a perda de uma unidade de cafeoil, obteve-se um pico a  $m/z$  353. Através do padrão de fragmentação seguidamente a  $m/z$  179 e 135, o composto foi tentativamente identificado como ácido 3,4-dicafeoilquínico.

Por fim, o pico 9 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  701) com um tempo de retenção de 26,13 minutos foi tentativamente identificado como um derivado da cumarina.

Considerando os compostos identificados, os predominantes foram a luteolina-*O*-rutinosídeo, apresentando valores de  $(24,6 \pm 0,2 \text{ mg/g})$ , seguido do ácido 5-cafeoilquínico  $(14,4 \pm 0,1 \text{ mg/g})$  para as condições ótimas de DPPH, todavia os outros extratos com as condições ótimas para rendimento, fenóis totais e TBARS apresentaram resultados semelhantes.

O luteolina-*O*-rutinosídeo é um derivado glicosídico da luteolina, um composto amplamente reconhecido pelos seus efeitos biológicos benéficos. Tanto a luteolina quanto o ácido 5-cafeoilquínico, o segundo composto majoritário identificado, têm demonstrado propriedades que oferecem potenciais benefícios para a saúde humana. A luteolina e os seus derivados exibem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antialérgicas e anticancerígenas. A literatura científica evidencia o seu papel desde a proteção cardiovascular até a eficácia no tratamento e prevenção de câncer de pele. Por outro lado, os ácidos cafeoilquínicos são conhecidos pelas suas propriedades antibacterianas, antioxidantes, antivirais, neuroprotetoras e anti-Alzheimer. Adicionalmente, a luteolina revela um potencial como conservante natural na indústria alimentar, devido à sua atividade antibacteriana (Manzoor et al., 2019; Juszczak et al., 2022; Qian et al., 2021; Pereira & Cardoso, 2013; Alcázar Magaña et al., 2021).

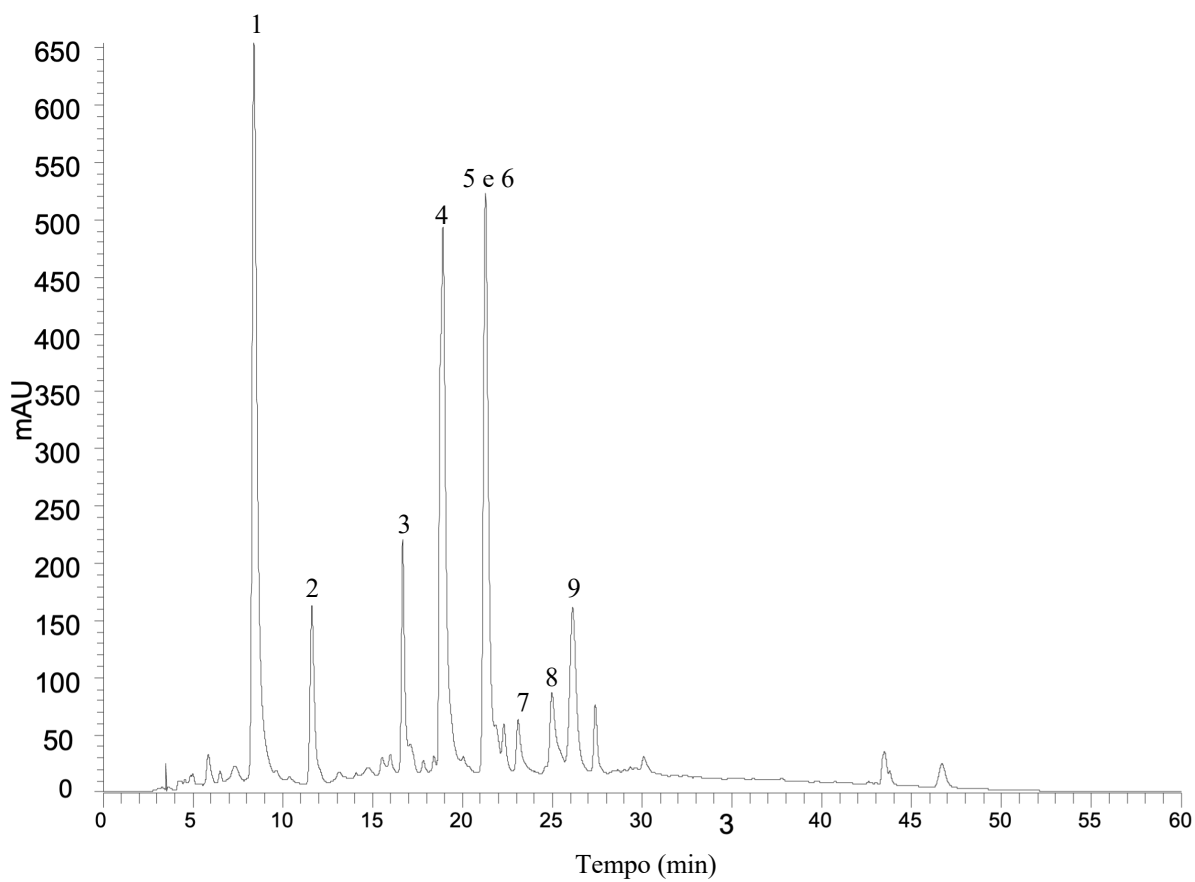
Dentre os compostos tentativamente identificados, alguns já haviam sido reportados anteriormente em estudos a respeito da *M. melissophyllum*, como o ácido 5-cafeoilquínico (Szymborska-Sandhu et al. 2020; Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek, 2012), hexosídeo de ácido *O*-cumárico e derivados da cumarina (Pereira et al. 2018), verbascosídeo (Szymborska-Sandhu et al., 2020), 8-*O*-acetil-harpagídeo (Skrzypczak-Pietraszek et al., 2018) e ácido *O*-cumárico (Skrzypczak-Pietraszek & Pietraszek, 2012).

Tendo em conta a os dados disponíveis na literatura, apresentamos pela primeira vez os resultados da análise quantitativa de apigenina-*O*-hexosídeo, luteolina-*O*-rutinosídeo e ácido 3,4-dicafeoilquínico.

**Tabela 13.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{max}$ ), tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos nos extratos hidroetanólicos de *Melittis melissophyllum* L. (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M-H]-	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)			
						Rendimento	Fenóis Totais	TBARS	DPPH
1	8,4	326	353	191, 173	ácido 5-cafeoilquínico	13,5 $\pm$ 0,1	13,74 $\pm$ 0,04	13,8 $\pm$ 0,1	14,4 $\pm$ 0,1
2	11,64	277,315	651 [2M-H]	325, 163	hexosídeo de ácido <i>O</i> -cumárico	6,31 $\pm$ 0,02	6,13 $\pm$ 0,03	6,5 $\pm$ 0,1	7,43 $\pm$ 0,02
3	16,68	329	623	461, 135, 315	verbascosídeo	4,45 $\pm$ 0,04	5,90 $\pm$ 0,04	5,21 $\pm$ 0,03	7,08 $\pm$ 0,04
4	18,79	255, 266, 348	593	285, 447, 241, 217	luteolina- <i>O</i> -rutinosídeo	18,0 $\pm$ 0,1	20,9 $\pm$ 0,1	21,6 $\pm$ 0,2	24,6 $\pm$ 0,2
5	21,28	277, 325	405	345, 161	8- <i>O</i> -acetil-harpagídeo	12,1 $\pm$ 0,2	11,4 $\pm$ 0,2	12,4 $\pm$ 0,1	13,38 $\pm$ 0,03
6	21,28	277, 325	163	119	ácido <i>O</i> -cumárico	12,1 $\pm$ 0,2	11,4 $\pm$ 0,2	12,4 $\pm$ 0,1	13,38 $\pm$ 0,03
7	23,1	334, 267, 231	431	269, 227, 159, 117, 197	apigenina- <i>O</i> -hexosídeo	0,61 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,02
8	24,98	326	515	353, 179, 135	ácido 3,4-dicafeoilquínico	1,2 $\pm$ 0,1	1,20 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,02
9	26,13	277, 310	701	335, 509, 263, 253, 191	derivado da cumarina	7,24 $\pm$ 0,02	7,4 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,1	9,8 $\pm$ 0,1
					CFT	75,7 $\pm$ 0,6	78,7 $\pm$ 0,7	80,6 $\pm$ 0,6	91,8 $\pm$ 0,5

CFT: Compostos Fenólicos Totais. Padrão de curvas de calibração utilizadas para quantificação: ácido clorogénico ( $y = 312503x - 199432$ ), *p*-cumárico ( $y = 504847x - 45869$ ), verbascosídeo ( $y = 124233x - 18873$ ) e luteolina-7-glicosídeo ( $y = 13848x - 10349$ ). Através da comparação com compostos padrão e referências na literatura, procedeu-se à tentativa de identificação dos compostos, utilizando como critérios o comportamento cromatográfico, os espectros UV-vis e a massa dos fragmentos.



**Figura 18.** Cromatograma dos compostos fenólicos presentes nos extratos de *M. melissophyllum*, obtidos a 330 nm.

## 6. CONCLUSÃO

Através da utilização do desenho experimental e da metodologia de superfície de resposta, foram obtidos modelos matemáticos estatisticamente significativos, permitindo a otimização do processo de extração utilizando a técnica MAE para determinar as condições ótimas que permitem maior rendimento, melhor potencial bioativos e maior concentração de fenóis. Os parâmetros ótimos de extração para DPPH (52 min, 69°C e 80% de etanol) e TBARS (28 min, 36°C e 50% de etanol) resultaram em valores de EC<sub>50</sub> próximos aos previstos no modelo matemático. Embora as condições ótimas para o rendimento tenham sido estabelecidas, os resultados obtidos diferiram das previsões, possivelmente devido à necessidade de um solvente mais aquoso para um rendimento maior.

No presente estudo, por meio da análise do perfil fenólico, foram tentativamente identificados nove compostos, com destaque para a luteolina-*O*-rutinosídeo e o ácido 5-cafeoilquínico como os mais predominantes. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides pode justificar o potencial bioativo dos extratos que demonstraram atividade antioxidante, especialmente nas condições ótimas para o ensaio de TBARS uma vez que o valor de EC<sub>50</sub> foi inferior ao previsto pelo modelo. Em relação à atividade antimicrobiana, embora as CMI e CMB tenham sido maiores do que as dos controles, todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana, tendo sido as estirpes *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* as que demonstraram maior sensibilidade. No que se refere ao potencial antifúngico, os extratos obtidos nas condições ótimas dos ensaios de DPPH e TBARS apresentaram as menores concentrações mínimas inibitórias contra a estirpe *Aspergillus brasiliensis*.

Este estudo fornece suporte científico ao demonstrar os resultados dos extratos de *M. melissophyllum*, revelando o seu potencial conservante, bioativo e contribuindo, assim, para o desenvolvimento de um ingrediente natural capaz de ser utilizado para a formulação de alimentos funcionais.

Relativamente às perspectivas futuras, é necessário realizar mais estudos para aumentar o rendimento dos extratos, investigar o potencial bioativo em outras áreas, como a atividade anti-diabética e prebiótica, e explorar a incorporação em produtos alimentares e nutracêuticos visando a aplicabilidade na indústria alimentar.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aćamović-Djoković, G., D. Djukić, L. Mandić, S. Kalinić, and T. Bošković (2002). Antimicrobial activity of petrol ether and ethyl acetate extracts of plant species *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Melilotus albus* medic., and *Melittis mellissophyllum* L. Serbia. *Medicinal raw materials*. 22: 59-63.
- Alamed, J., et al. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Alaya, I. B. (2020). Development of a Natural Preservative Obtained From Chestnut Flowers Through the Optimization of an Ultrasonic Assisted Extraction Technique (Master's thesis, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal))
- Alcázar Magaña, A., Kamimura, N., Soumyanath, A., Stevens, J. F., & Maier, C. S. (2021). Caffeoylquinic acids: Chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *The Plant Journal*, 107(5), 1299-1319.
- Alegransi, C., Arruda, A. C., Heringer, T. A., Vincensi, T. M., Dias, T. O., dos Santos Goulart, J., ... & Cattaneo, R. (2021). Avaliação do efeito antioxidante de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham.) em eritrócitos de pacientes com doenças neurodegenerativas. *Research, Society and Development*, 10(5), e58710514903-e58710514903.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74(2), 129-142.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), São Paulo.
- Arruda, D. A., Souza, B. S., & Lima, L. A. A. (2020). O uso de plantas medicinais utilizadas em rituais religiosos na cidade de Puxinanã - PB. *Cadernos de Agroecologia*, Recife. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Agroecologia*, São Cristóvão, Sergipe, 15(2).
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013).

- Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Backes, E. (2018). Valorização da casca de ficus carica L. como fonte de pigmentos naturais: Estudos de extração, caracterização química e biológica e incorporação em alimentos. [Doctoral thesis, Instituto Politecnico de Braganca].
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O.U., Ulgen, S.G. and Yardibi, H. (2008) In Vivo Assessment of Antidiabetic and Antioxidant Activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Alloxan-Diabetic Rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 64-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.039>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.107>
- Barros, L., Falcão, Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R., (2008). Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111, 61-66.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., & Bauman, I. (2012). Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International*, 48(2), 820-830. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.023>
- Bessada, S. M., Barreira, J. C., Barros, L., Ferreira, I. C., & Oliveira, M. B. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb. f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Beya, M. M., Netzel, M. E., Sultanbawa, Y., Smyth, H., & Hoffman, L. C. (2021). Plant-based phenolic molecules as natural preservatives in comminuted meats: A review. *Antioxidants*, 10(2), 263. Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10020263>
- Bezerra, A. S., Stankiewicz, S. A., Kaufmann, A. I., Machado, A. A. R., & Uczay, J. (2021). Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias não

- convencionais da região sul do Brasil. *Arquivos Brasileiros De Alimentação*, 2(3), 182–188. <https://doi.org/10.53928/aba.v2i3.1479>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, E. A., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Błaszczuk, N., Rosiak, A., & Kałużna-Czaplińska, J. (2021). The Potential Role of Cinnamon in Human Health. *Forests*, 12(5), 648. <https://doi.org/10.3390/f12050648>
- Braga, C. M. (2011). Histórico da utilização de plantas medicinais (Monografia de Licenciatura em Biologia). Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás.
- Brito, R. F. (2016). Valorização integrada de resíduos e subprodutos da extração do azeite: Extração e caracterização de compostos bioativos do bagaço de azeitona (Doctoral dissertation).
- Britto, A., Sebastian, S., & Sujin, R. (2012). Antibacterial activity of selected species of Lamiaceae against human pathogens. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3, 334-342.
- Carocho, M., Morales, P. & Ferreira, I. C. (2015). Aditivos alimentares naturais: Quo vadis?. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 284-295.
- Bruno, D.B.; Cusentini, M.I.Z.; Ferreira, R.R. ; Ribeiro, N.B. ; Rozalino, B.C.S. ; Santana, D.M.O. ; Santos, F.S. ; Santos, L.O. ; Santos, V.F. ; Souza, C.P. ; Souza M.M. (2022). Planta medicinal Hortelã. Projeto integrado - Farmácia Viva.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Ciric, A., Barreira, J.C.M., Soković, M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). Development of a functional dairy food: exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of functional foods*, 16, 114–124.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Ciric, A., Soković, M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2015b). *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of functional foods*, 12, 428–438.

- Caleja, C., Barros, L., Oliveira, B. B., & Ferreira, I. C. (2016). Foeniculum vulgare MILL. utilizado como antioxidante em iogurtes: comparação entre o ingrediente natural e um aditivo sintético. Livro de Atas do XIII Encontro de Química dos Alimentos.
- Çam, M., İçyer, N.C. & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 117–123.
- Cañas, G. J., & Braibante, M. E. (2019). A química dos alimentos funcionais. *Química Nova na Escola*, 41(3), 216-223.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D. A. L. I. B. O. R., & Satovic, Z. (2016). Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—a review. *Czech journal of food sciences*, 34(5), 377-390. doi: <https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS>
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction-A review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(4), 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>
- Chaves, R. C., & Lima, R. A. (2020). Um estudo bibliográfico sobre plantas medicinais utilizadas no tratamento hiv/aids. *Educamazônia-Educação, Sociedade e Meio Ambiente*, 24(1, jan-jun), 91-112.
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P. & Karathanos, V. T. (2013). Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 522-529.
- Codevilla, C. F., Bazana, M. T., da Silva, C. D. B., Barin, J. S., & de Menezes, C. R. (2015). Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. *Ciência e Natura*, 37(5), 142-151.
- Corrêa, G. M., Abreu, V. G., Silva, T. M., Martins, D. A., Fontoura, H. S., Cara, D. C., ... & Alcântara, A. F. D. C. (2014). Glycosylated luteolin derivatives isolates from leaves of *Justicia acuminatissima*—structural elucidation and anti-inflammatory

- activity investigated by experimental and theoretical methods. *Int. J. Pharm. Phytochem*, 29, 1256-1265.
- Colet, C. F., Dal Molin, G. T., Cavinatto, A. W., Baiotto, C. S., & Oliveira, K. R. (2015). Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17, 331-339. doi: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_027](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_027)
- Crowe, K. M., & Francis, C. (2013). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(8), 1096-1103. doi: 10.1016/j.jand.2013.05.022
- Csapó, J., Albert, C., & Szigeti, T. J. (2019). Functional foods. *Elelmiszervizsgalati Kozlemenyek*, 65(1).
- Czerwinska, M. E., Kalinowska, E., Popowski, D., & Bazylko, A. (2020). Lamalbid, chlorogenic acid, and verbascoside as tools for standardization of *Lamium album* flowers-development and validation of HPLC-DAD method. *Molecules*, 25(7), 1721.
- Dias, L. K. M. (2022). Efeitos dos polifenóis na saúde intestinal de modelos pré-clínicos com obesidade induzida por dieta: revisão sistemática (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- Dias, M. E. (2019). Aproveitamento de compostos fenólicos de bio resíduos de diferentes variedades de casca de kiwi (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).
- Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Cámara, M., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P., ... & Ferreira, I. C. (2016). Wild *Fragaria vesca* L. fruits: a rich source of bioactive phytochemicals. *Food & Function*, 7(11), 4523-4532. <https://doi.org/10.1039/C6FO01042C>
- Dias, R., Oliveira, H., Fernandes, I., Simal-Gandara, J., & Perez-Gregorio, R. (2020). Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754162>
- Dias, S. D. D. F., Pinto-de-Andrade, L., Rolo, J., Gaspar, C., Gomes-Ruivo, P., Oliveira, A. S., ... & Palmeira-de-Oliveira, A. (2022). Effect of plant extracts in sperm

- viability. In III Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais (pp. 134). Universidade do Algarve.
- Dutra, G., & Malagoli, L. (2019). A construção de um hábito alimentar saudável desde a educação infantil. *Revista Gepesvida*, 5(10).
- El-Sayed, S. M., & Youssef, A. M. (2019). Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon*, 5(6), e01989. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01989>
- Etheridge, C. J., & Derbyshire, E. (2020). Herbal infusions and health: A review of findings from human studies, mechanisms and future research directions. *Nutrition & Food Science*, 50(5), 969-985. <https://doi.org/10.1108/NFS-08-2019-0263>
- Faccio, G. (2020). Plant complexity and cosmetic innovation. *IScience*, 23(8), 101358. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101358>
- Ferreira, M.S.G. (2015). Extração e valorização de compostos fenólicos na indústria corticeira [Dissertação de doutorado, Universidade da Beira Interior].
- Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M., & Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1521. <https://doi.org/10.3390/ijms22041521>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, *Centro de Biotecnologia Vegetal C*, 2, 1749-016.
- Filho, J. A. L. (2023). Uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades do sistema urogenital na Paraíba.
- Freitas, L. M. A., Gomes, B. C. R., Nascimento, C. F., Lage, I. L., Caricati, J. M. M. P., de Sena Silva, L. A., ... & de Souza Almeida, V. L. (2020). Antioxidantes como forma de prevenção contra a ação dos radicais livres no processo de envelhecimento cutâneo. *ÚNICA Cadernos Acadêmicos*, 3(1).
- Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C., Barros, L., Haminiuk, C. W., Peralta, R. M., ... & Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408-418. doi: 10.1016/j.jff.2017.04.009

- Gouveia, F. (2006). Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Inovação*, 2(5), 32-37.
- Grujić, S. M., Stojanović, G. S., Mitić, V. D., Stankov-Jovanović, V., Džamić, A. M., Alimpić, A. Z., & Marin, P. D. (2014). Evaluation of antioxidant activity of *Melittis melissophyllum* L. extracts. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1401-1410.
- Гурина, Н. С., & Некрашевич, Я. В. (2022). Кадило мелиссолистное—перспективный вид лекарственного растительного сырья.
- Hano, C., & Tungmunnithum, D. (2020). Plant polyphenols, more than just simple natural antioxidants: Oxidative stress, aging and age-related diseases. *Medicines*, 7(5), 26.
- Harborne, P. D. (1999). *Handbook of Bioactive Compounds from Plants 2nd (Edn.)* Taylor and Francis.
- Harhaun, R., Kunik, O., Saribekova, D., & Lazzara, G. (2020). Biologically active properties of plant extracts in cosmetic emulsions. *Microchemical Journal*, 154, 104543. doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104543>
- Heisler, E. V., Budó, M. D. L. D., Schimith, M. D., Badke, M. R., Ceolin, S., & Heck, R. M. (2015). Use of medicinal plants in health care: scientific production of theses and dissertation Brazilian nursing. *Enfermería Global*, 14(3), 390.
- Heleno, S.A., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A.A., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food Bioprod. Process.* 100, Part, 25–35
- Hespanhol, A. P., Couto, L., & Martins, C. (2008). A medicina preventiva. *Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar*, 24(1), 49–64. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v24i1.10462>
- Honorato, T. C., & Nascimento, K. (2011). Conhecimento do consumidor em relação aos aditivos utilizados na produção e conservação dos alimentos. *Nutrição Brasil*, 10(1), 44-48.
- Hroboňová, K., Kekselová, L., Šedivá, M., & Kačániová, M. (2013). Comparison HPLC and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(4), 486-503. doi: <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.660724>

- Ibáñez, M.D., & Blázquez, M.A. (2021). Curcuma longa L. Rhizome Essential Oil from Extraction to Its Agri-Food Applications. A Review. *Plants*, 10, 44. <https://doi.org/10.3390/plants10010044>
- Ibrahim, I. I., Moussa, A. A., Chen, Z., Zhang, J., Cao, W. G., & Yu, C. (2022). Bioactive phenolic components and antioxidant activities of water-based extracts and flavonoid-rich fractions from *Salvadora persica* L. leaves. *Natural Product Research*, 36(10), 2591-2594.
- Idolo, M., Motti, R., & Mazzoleni, S. (2010). Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 379-395. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.027>
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., ... & Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 160-175. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.007>
- Jemaa, M. B., Falleh, H., Serairi, R., Neves, M. A., Snoussi, M., Isoda, H., ... & Ksouri, R. (2018). Nanoencapsulated *Thymus capitatus* essential oil as natural preservative. *Innovative food science & emerging technologies*, 45, 92-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.017>
- Jucá, M. M. (2018). Efeitos antidepressivos da cumarina no modelo de depressão induzido por corticosterona: envolvimento noradrenérgico, serotoninérgico, neuroinflamatório e antioxidante.
- Juszczak, A. M., Wöelfle, U., Končić, M. Z., & Tomczyk, M. (2022). Skin cancer, including related pathways and therapy and the role of luteolin derivatives as potential therapeutics. *Medicinal research reviews*, 42(4), 1423-1462.
- Kahusrdu. (2022). Synthetic food: the silent conqueror of natural grown items. Karpagam Academy of Higher Education. <https://kahedu.edu.in/synthetic-food-the-silent-conqueror-of-natural-grown-items/>
- Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlajsavljevic, S., & Raseta, M. (2011). Antioxidant activities of *Melittis melissophyllum* L.(Lamiaceae). *Molecules*, 16(4), 3152-3167.

- Kieliszek, M., Edris, A., Kot, A. M., & Piwowarek, K. (2020). Biological activity of some aromatic plants and their metabolites, with an emphasis on health-promoting properties. *Molecules*, 25(11), 2478.
- Kisiriko, M., Anastasiadi, M., Terry, L. A., Yasri, A., Beale, M. H., & Ward, J. L. (2021). Phenolics from medicinal and aromatic plants: Characterisation and potential as biostimulants and bioprotectants. *Molecules*, 26(21), 6343.
- Kumar, V.; Sharma, A.; Kohli, S.K.; Bali, S.; Sharma, M.; Kumar, R. & Thukral, A.K. (2019). Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.03.001>
- Kowalska-Wochna, E., & Tomulewicz, M. (2020). Miodownik melisowaty (*Melittis melissophyllum* L.)—mało znana roślina lecznicza.
- Lima, R. K., Cardoso, M. G. (2007). Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante.
- Lu, W., Chen, X., Chen, Z., & Wang, J. (2021). Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technology*, 394, 562-574. doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.082>
- Maggi, F., Barboni, L., Caprioli, G., Papa, F., Ricciutelli, M., Sagratini, G., & Vittori, S. (2011). HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). *Fitoterapia*, 82, 1215-1221. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.08.011>
- Malaquias, G., Gomes, M., Simeoni, L., & Scherer, R. (2014). Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(2), 438-447. <https://doi.org/10.22280/revintervol7ed3.183>
- Maleš, I., Pedisić, S., Zorić, Z., Elez-Garofulić, I., Repajić, M., You, L., ... & Dragović-Uzelac, V. (2022). The medicinal and aromatic plants as ingredients in functional beverage production. *Journal of Functional Foods*, 96, 105210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105210>

- Manzoor, M. F., Ahmad, N., Ahmed, Z., Siddique, R., Zeng, X. A., Rahaman, A., ... & Wahab, A. (2019). Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. *Journal of Food Biochemistry*, 43(9), e12974.
- Martinez, L. do N., Rodrigues, da S. L., Silva, N. B. da S., dos Santos, E. V., Costa, J. D. N., Rodrigues, F. L., & Santos, E. V. (2020). Avaliação etnobotânica das espécies das famílias Asteraceae e Lamiaceae utilizadas com potencial medicinal na região de Porto Velho–Rondônia. *Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente*.
- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro. F. & Ferreira, I.C.F.R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function*, 5, 1091-1100
- Martins, S., Mussatto, S. I., & Aguilar, C. N. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365-373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
- Martins, S. R., Galizoni, F. M., Santos, H. J. S., & Ribeiro, A. E. M. (2019). Migrantes rurais, quintais urbanos e soberania alimentar. In Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural-SOBER. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Matias, M. L. (2012). Modificações estruturais de compostos polifenólicos glicosilados e modulação das suas actividades antioxidantes [Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa].
- Mulas, M. (2006). Traditional uses of Labiatae in the mediterranean area. *Acta Horticulturae*, 723, 25-32. 10.17660/ActaHortic.2006.723.1
- Mwale, Mary. (2023). Health Risk of Food Additives: Recent Developments and Trends in the Food Sector. 10.5772/intechopen.109484.
- Naczki, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8)
- Neves, O.P.D. & Vinha A.C. (2015). Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde. Monografia para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa.

- Nobela, O. (2018). Phytochemical characterization of an underutilized green leafy vegetable, *Sonchus oleraceus* with the aid of liquid chromatography-ion trap-time of flight-mass spectrometry (LCIT-TOF-MS) (Doctoral dissertation, University of Johannesburg (South Africa)).
- Nobre, T. S. (2019). Perfil antioxidante de ácidos fenólicos naturais com potencial aplicação em emulsões cosméticas.
- Novais, C., Pereira, C., Molina, A. K., Liberal, Â., Dias, M. I., Añibarro-Ortega, M., ... & Barros, L. (2021). Bioactive and nutritional potential of medicinal and aromatic plant (MAP) seasoning mixtures. *Molecules*, *26*(6), 1587.
- Oldoni, T. L. C. (2007). Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. *Universidade de São Paulo*.
- Oliveira, B. S. (2017). Influência da alimentação no desempenho escolar de crianças e adolescentes. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição). União Metropolitana de Educação e Cultura- (UNIME).
- Oliveira, D. H. D. S., da Silva, M. I. D. O., da Fonseca, R. G., & de Sales Ferreira, J. C. (2021). A importância de uma alimentação saudável como forma de aumento da imunidade através das vitaminas e minerais. *Research, Society and Development*, *10*(12), e103101220305-e103101220305.
- Orch, H., Benkhiguel, O., Zidane, L., & Douira, A. (2020). Treatment of Urinary Treatment of Urolithiasis: Ethnobotanical Study of Plants Used by the Population Bordering the Forest of Izarène. *Lithiasis: Ethnobotanical Study of Plants Used by the Population Bordering the Forest of Izarène. Ethnobotany Research and Applications*, *19*, 1-15. doi: <http://dx.doi.org/10.32859/era.19.33.1-15>
- Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., & Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, *100*(2), 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.086>
- Pasrija, D. & Anandharamakrishnan, C. (2015). Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *8*, 935–950.
- Patrignani, F., Prasad, S., Novakovic, M., Marin, P. D., & Bukvicki, D. (2021). Lamiaceae in the treatment of cardiovascular diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *26*(4), 612-643. <https://doi.org/10.2741/4909>

- Pedroso, R. D. S., Andrade, G., & Pires, R. H. (2021). Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, 31. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>
- Peixoto, C.M. (2017). Extração e Quantificação de Compostos Fenólicos presentes no Bagaço da *Vitis vinifera* L. e Avaliação das suas Bioatividades. Tese de Mestrado. Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politecnico de Bragança.
- Pereira, E., Antonio, A., Barreira, J. C., Santos-Buelga, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). How gamma and electron-beam irradiations modulate phenolic profile expression in *Melissa officinalis* L. and *Melittis melissophyllum* L. *Food chemistry*, 240, 253-258. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.113>
- Pereira, O. R., & Cardoso, S. M. (2013). Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, 9(3), 382-396.
- Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022). *Melissa officinalis*: Composition, pharmacological effects and derived release systems—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3591. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>
- Pinela, J. V. S. (2012). Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de plantas medicinais da família Fabaceae (Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Bragança).
- Plantas e extratos vegetais na indústria alimentícia. (s.d.). Aditivos Ingredientes. <https://aditivosingredientes.com/artigos/todos/plantas-e-extratos-vegetais-na-industria-alimenticia>
- Porte, A., & Godoy, R. L. O. (2001). Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. *Revista CEPBP AC*, 129, 193-210.
- Pourzafar, Z., Elhamirad, A. H., Zenoozian, M. S., & Armin, M. (2023). Optimization of producing functional sponge cake using a combination extract of green tea, white tea, and ginger. *Italian Journal of Food Science*, 35(2), 33-43.
- Qian, W., Fu, Y., Liu, M., Zhang, J., Wang, W., Li, J., ... & Li, Y. (2021). Mechanisms of action of luteolin against single-and dual-species of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and its antibiofilm activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 1397-1414.
- Rasooli, I. (2007). Food preservation—a biopreservative approach. *Food*, 1(2), 111-136.

- Refosco, E. K., Chochuk, M. M., Gasparetto, N. R., & Mazur, C. E. (2019). Compostos fenólicos na alimentação e seus benefícios para a saúde: uma revisão de literatura. *Ciência Atual–Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário São José*, 13(1).
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J.C., Dias, M.M., Barros, L., Barreiro, F. & Ferreira, I.C.F.R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612–618.
- Rocha, V. M. (2022). Determinação de compostos fenólicos, cumarinas e atividade antimicrobiana de própolis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia, Brasil.
- Rodrigues, T. A., Leandro Neto, j., Carvalho, t. a. r., Barbosa, m. e., Guedes, j. c., & Carvalho, a. v. (2020). A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, 11(1), 411-428. <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.001.0037>
- Romero, N. G. (2017). Extração de compostos fenólicos a partir de café e sua caracterização química e funcional (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- Roriz, C.L., Barros, L., Prieto, M.A., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2017b. Floral parts of *Gomphrena globosa* L. as a novel alternative source of betacyanins: Optimization of the extraction using response surface methodology. *Food Chem.* 229, 223–234.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Saha, A., & Basak, B. B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 145, 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>
- Saleem, U., Sabir, S., Niazi, S. G., Naeem, M., & Ahmad, B. (2020). Role of oxidative stress and antioxidant defense biomarkers in neurodegenerative diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 30(4).
- Santos, C. C. D. (2015). Estudo do efeito neuroprotetor e imunomodulador de flavonoides em modelos in vitro da doença de Parkinson.

- Serrano, C., Sapata, M. M., Soares, A., Lopes, V., & Barata, A. M. (2022). Plantas medicinais e o seu uso na alimentação saudável. *INIAV. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária*.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Shams, K. A., Abdel-Azim, N. S., Saleh, I. A., Hegazy, M. F., El-Missiry, M. M., Hammouda, F. M., ... & Tahrir, E. (2015). Green technology: economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J. Chem. Pharm. Res*, 7(5), 1050-1074.
- Sikora, E., Cieslik, E., Leszczynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., & Pisulewski, P. M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107(1), 50-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.023>
- Silva, S. G. D., & Bieski, I. G. C. (2018). A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES, 1(1). <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.002>
- Skrzypczak-Pietraszek, E., & Pietraszek, J. (2012). Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 66, 154-161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.037>
- Skrzypczak-Pietraszek, E., & Pietraszek, J. (2014). Seasonal changes of flavonoid content in *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Chemistry & biodiversity*, 11(4), 562-570. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300148>
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Reiss, K., Żmudzki, P., & Pietraszek, J. (2018). Enhanced accumulation of harpagide and 8-O-acetyl-harpagide in *Melittis melissophyllum* L. agitated shoot cultures analyzed by UPLC-MS/MS. *Plos one*, 13(8), e0202556.
- Sposito, C. M. D. (2014). Aplicação de acerola (*Malpighia emarginata* DC) em pó em carne mecanicamente separada de frango: avaliação da ação conservante (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

- Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., & Carotti, A. (2018). Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*, 23(2), 250.
- Szymborska-Sandhu, I., Przybył, J. L., Kosakowska, O., Bączek, K., & Węglarz, Z. (2020). Chemical Diversity of Bastard Balm (*Melittis melisophyllum* L.) as *Affected by Plant Development*. *Molecules*, 25(10), 2421. doi: 10.3390/molecules25102421
- Taofiq, O., Calhella, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., ... & Ferreira, I. C. (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821-827. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.044>
- Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., & Dzobo, K. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1578. <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>
- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. (n.d.). *Melittis melissophyllum*. Flora Digital de Portugal. <http://jb.utad.pt/flora>
- Urban, A. M., Swiech, J. N. D., & Miguel, M. D. (2019). Família Lamiaceae e a sua influência no diabetes melitus: breve revisão. *Visão Acadêmica*, 20(3).
- Vara, A. L. C. (2020). Framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L.): composição química e nutricional e propriedades bioativas (Masters dissertation, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal)).
- Vargas, G.C., & Bellaver, E.H. (2022). Estudo da atividade antioxidante dos compostos fenólicos na medicina preventiva: Revisão de literatura. *Visão Acadêmica*, 23, 55-64.
- Vasconcelos, T. B., Cardoso, A. R. N. R., Josino, J. B., Macena, R. H. M., & Bastos, V. P. D. (2014). Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo?. *Journal of Health Sciences*, 16(3).
- Veloso, F. S., (2019). Biorresíduos *Punica granatum* L. como potencial fonte de compostos fenólicos com aplicação alimentar (Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Braganca (Portugal)).

- Viana, M. V., & Arenari, V. S. (2019). Antioxidantes sintéticos utilizados em indústrias alimentícias e a possível substituição por antioxidantes naturais. *Revista de trabalhos acadêmicos-universo campos dos goytacazes*, 1(12).
- Viana, R. (2023). Investigação experimental da relação entre a sepse pós-acidente vascular cerebral isquêmico e o estresse oxidativo periférico: um panorama entre machos e fêmeas.
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, 107, 341-352.
- Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896-8907. <https://doi.org/10.1021/jf0715166>
- Xavier, R. A. T., Lima, R. A., de Araújo Pantoja, T. M., de Moraes Batista, D., de Souza, D. B., da Silva Lima, E., & da Silva Braga, M. D. N. (2022). Levantamento de plantas medicinais da família Lamiaceae na comunidade Cristolândia, humaitá-am. *Biodiversidade*, 21(2).
- Zakrzaska, A. (2018). The therapeutic benefits of *Melittis melissophyllum* extracts in wound healing. *Clin Pediatr Dermatol*, 4, 59.