ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA

MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Cátia Sofia Pereira Mendes

Estudo preliminar para o desenvolvimento de uma gama de extratos de subprodutos agroalimentares com potencial para uma linha de produtos cosméticos

Orientador: Marta Helena Fernandes Henriques

Coorientador: Ana Cristina Araújo Veloso

Coimbra, 2021

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA

MESTRADO EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Cátia Sofia Pereira Mendes

Estudo preliminar para o desenvolvimento de uma gama de extratos de subprodutos agroalimentares com potencial para uma linha de produtos cosméticos

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ENGENHARIA ALIMENTAR

Orientador: Marta Helena Fernandes Henriques

Coorientador: Ana Cristina Araújo Veloso

Coimbra, 2021

Agradecimentos

Chegou ao fim um capítulo de dois anos, em que olho para trás e consigo perceber que não estive sozinha durante o percurso, tendo ao meu lado pessoas que sempre me motivaram, ajudaram e nunca me deixaram desistir deste meu sonho e objetivo.

Gostaria primeiramente de agradecer aos meus tios (pais de alma e coração), às minhas primas e ao meu namorado, que sempre foram o meu grande pilar ao longo deste caminho. Foram eles a grande ajuda para ultrapassar mais uma etapa da minha vida académica, não me deixando desistir nos momentos mais difíceis, tendo sempre o seu apoio incondicional, amor e carinho.

Um muito obrigado às minhas colegas, Inês Almeida e Joana Costa, por todo o bom ambiente académico e sobretudo, toda a amizade que foi sendo criada e fortalecida ao longo deste percurso, que já completa cinco anos.

Um agradecimento especial à professora Marta Henriques, por me deixar pertencer a este projeto, por todo o apoio e disponibilidade prestados durante o estágio e elaboração do relatório, tendo sido incansável. Exprimo igualmente o meu agradecimento à Professora Ana Veloso e à minha colega Lara Campos, por toda a orientação e ajuda prestada ao longo do estágio.

Por fim, quero agradecer a todos os meus restantes amigos e família, que direta ou indiretamente acreditaram em mim e contribuíram para a concretização deste objetivo.

Resumo

O estágio cujo relatório que aqui se apresenta foi realizado nas instalações dos Laboratórios Valoren e SiSUS do Instituto de Investigação Aplicada do IPC, em coordenação com o Instituto Superior de Engenharia de Coimbra e a Escola Superior Agrária de Coimbra. Teve uma duração de mil horas entre 12 de outubro de 2020 a 12 de abril de 2021.

O principal objetivo deste trabalho passou pelo desenvolvimento de uma gama de extratos de subprodutos agroalimentares, com o intuito de serem incorporados numa linha de cosméticos, contribuindo para a sua valorização e aproveitamento dos compostos bioativos destes subprodutos.

Recorreu-se à utilização da cascarilha de café (subproduto da torra de café), e à utilização das ervas aromáticas hortelã e alecrim, que se mostraram e de interesse para a indústria dos cosméticos, muito devido às propriedades dos compostos de valor acrescentado que apresentam.

Na obtenção dos compostos bioativos e aromáticos foram aplicadas duas metodologias de extração sólido/liquido: a Extração convencional e Extração assistida por ultrassons. As duas metodologias usadas foram comparadas na sua eficácia de extração dos compostos de interesse, e ainda no uso das matérias-primas moídas como no estado intacto (sem sofrer alterações físicas). Os solventes utilizados para a extração dos compostos bioativos e aromáticos foram a água e misturas de o etanol:água (25%EtOH e 50%EtOH).

As análises realizadas incluíram a determinação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e a determinação da capacidade antioxidante dos extratos. Na generalidade, os melhores resultados foram obtidos utilizando o 50%EtOH como solvente. Verificou-se que o tipo e o estado da matéria-prima, inteira ou moída, influencia a extração dos compostos de interesse, e apesar de variações em relação aos melhores resultados, os produtos inteiros apresentaram maioritariamente melhores resultados.

Na análise de fenólicos utilizando o método de extração por ultrassons e a água como solvente, a hortelã moída apresentou os melhores resultados 5,14±0,41 mg AG/mL que se destacam claramente das restantes matérias-primas.

Apesar da hortelã ter sido o material vegetal com melhores resultados no que diz respeito ao teor de compostos fenólicos totais na extração com água, é importante realçar que na grande maioria o solvente 50%EtOH foi o que apresentou melhores resultados.

Relativamente ao tipo de solvente o 50%EtOH foi o que revelou os melhores resultados, existindo um grande desvio em relação aos valores encontrados aquando do uso dos outros solventes testados.

O teor de flavonoides foi mais elevado utilizando a hortelã inteira com recurso à extração convencional (4,02±0,40 mg CAT/mL). Este resultado destaca-se largamente dos restantes, sendo o segundo valor mais alto de 3,66±0,55 mg CAT/mL que também diz respeito à hortelã inteira mas com recurso à extração por ultrassom (50%EtOH).

Na quantificação da atividade antioxidante, na generalidade a água foi o solvente que obteve melhores resultados, tanto no caso do alecrim como da cascarilha. No que diz respeito ao alecrim, a matéria-prima inteira e o método de extração assistido por ultrassons levaram aos melhores resultados (0,0014±0,0002 IC50 mg/mL), enquanto que no caso da cascarilha e apesar da matéria-prima inteira também fosse a melhor, o método de extração convencional foi o mais eficaz (0,0018±0,0003 IC50 mg/mL). Dos três materiais vegetais estudados, a hortelã foi a que apresentou os melhores resultados com o uso do produto moído e o 25%EtOH como solvente (0,0011±0,0008 IC50 mg/mL).

Palavras-chave: valorização; subprodutos agroalimentares; extração solido-líquido; fenólicos; antioxidantes; cosmética

Financiamento

O Laboratório Valoren e SiSus, onde foi desenvolvido todo o trabalho experimental teve o apoio financeiro do Programa Operacional Regional do Centro.

mais CENTRO Programa Operacional Regional do Centro
QREN QUADRO DE REFERÊNCIA ESTRATÉGICO NACIONAL PORTUGAL 2007.2013
UNIÃO EUROPEIA Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional
Instituto de Investigação Aplicada Politécnico de Coimbra

Abstract

The internship, carried out between October and April 12, 2021, was held at the facilities of Valoren and SiSUS laboratories of the Applied Research Institute of the Polytechnic of Coimbra. Those laboratories were located at the Coimbra Engineering Institute and the Agriculture School.

The main objective of this work was the development of a range of extracts of agrifood by-products, in order to be incorporated into a line of cosmetics, contributing to the valorization of their bioactive compounds and use as ingredients in cosmetics.

Coffee silverskin (a by-product of coffee roasting) and the use of aromatic plants, mint and rosemary were used, which proved to be interesting for the cosmetics industry, largely because of the properties of the value-added compounds they present.

The bioactive and aromatic compounds with two solid/liquid extraction methodologies: conventional extraction and ultrasound-assisted extraction. The extraction efficiency of the tested methods was compared. The effect of the form of vegetal matrices was studied: intact state (without undergoing physical changes) or ground materials. The type of solvent used was also compared for the extraction of bioactive and aromatic compounds: water and ethanol:water mixtures (25%EtOH and 50%EtOH).

The obtained extracts were characterized for the content of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity. In general, the best results were obtained using 50%EtOH as a solvent. It was found that the form of the raw material (whole or grounded) influences the extraction of the bioactive compounds, and although there are some variations for the better results, most of the products tested whole show better results.

For the phenolics, using the ultrasound extraction method and water as solvent, the ground mint showed the best results (5,14 ± 0,41 mg AG/mL) which clearly stand out.

Although mint was the plant material with the best results in terms of total phenolic compounds in the extraction with water, it is important to highlight that, in most cases, 50%EtOH provides the best results.

Contrary to the results for the total phenolic content, with better results with the ground mint, the flavonoid content was higher with the whole mint in the conventional extraction (4,02 ± 0,40 mg CAT/mL). This value stands out from the rest, with the second highest value being 3,66±0,55 mg CAT/mL, found on the whole mint when using the ultrasound extraction, with 50%EtOH.

Regarding the antioxidant activity (AA) of the extracts, in general, water was the solvent with the best results, both for rosemary and for coffee silverskin. Whole raw material, in the case of rosemary, showed the best results in ultrasound-assisted extraction (0,0014 ± 0,02 IC50 mg/mL), while in the case of coffee silverskin, the conventional extraction was more effective using the whole byproduct (0,0018 ± 0,0003 IC50 mg/mL). Of the three studied plant materials, mint had the best AA with the use of the ground product and 25%EtOH as solvent (0,0011 ± 0,0008 IC50 mg/mL).

Keywords: valorisation; agro-food by-products; solid-liquid extraction; phenolics; antioxidants; cosmetics

Escola Superior Agrária
Politécnico de Coimbra

Índice

Agradecimentos ..... **iii**

Resumo ..... **iv**

Abstract ..... **vii**

1. Introdução **1**

1.1. Objetivos do estágio 2

1.2. Compostos bioativos e aromáticos 2

2. Produtos de origem vegetal para extração de compostos bioativos **5**

2.1. Subprodutos da indústria agroalimentar 5

2.1.1. Cascarilha de café 7

2.2. Plantas aromáticas e medicinais 8

2.2.1. Alecrim 9

2.2.2. Hortelã 10

3. Métodos de extração sólido/líquido **11**

4. Materiais e métodos **17**

4.1. Material vegetal 17

4.2. Extração S/L convencional e assistida por ultrassons 17

4.3. Caracterização dos extratos 20

4.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais 20

4.3.2. Determinação dos flavonoides 21

4.3.3. Determinação da atividade antioxidante 22

5. Apresentação de resultados e discussão **24**

5.1 Teor de compostos fenólicos totais 24

5.2. Teor de compostos flavonoides totais 28

5.3. Atividade antioxidante 31

6. Conclusões **35**

Bibliografia **37**

Anexos **43**

Anexo I 43

Anexo II 43

Anexo III 46

Índice de tabelas

Tabela 1- Condições de extração 18
Tabela 2- Teor de compostos fenólicos da hortelã 43
Tabela 3- Teor de compostos fenólicos do alecrim 43
Tabela 4-Teor de compostos fenólicos da cascarilha 43
Tabela 5- Teor de compostos flavonoides na hortelã 44
Tabela 6- Teor de compostos flavonoides no alecrim 44
Tabela 7- Teor de compostos flavonoides na cascarilha 45
Tabela 8-Atividade antioxidante na hortelã 46
Tabela 9- Atividade antioxidante no alecrim 46
Tabela 10- Atividade antioxidante na cascarilha 47

Índice de figuras

Figura 1- Teor de fenólicos totais na planta T. Erecta. HWE – hot water extraction (extração convencional); WBE – water bath sonication (sonicação de banho-maria); UUE – ultrafast ultrasonication extraction (extração por ultrassons) (Kazibwe et al., 2017)..... 15
Figura 2- Esquema das etapas do processo de extração. 19
Figura 3- Teor de fenólicos na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa. 25
Figura 4- Teor de fenólicos no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa. 26
Figura 5- Teor de fenólicos na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa. 27
Figura 6- Teor de flavonoides na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa. 29
Figura 7- Teor de flavonoides no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa. 30
Figura 8- Teor de flavonoides na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa..... 30
Figura 9- Atividade antioxidante na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa..... 32
Figura 10- Atividade antioxidante no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa..... 33
Figura 11- Atividade antioxidante na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa..... 34

1. Introdução

Atualmente, são produzidas milhões de toneladas de resíduos provenientes do processamento agroindustrial. Alguns deles são apenas aproveitados como ração animal ou usados como compostos para aplicação na agricultura. No entanto, a maior parte ainda é descartada sem tratamento, causando danos ao meio ambiente (Siqueira et al., 2011). A estratégia das empresas em obter melhorias de desempenho ambiental está inserida na sua função social, pois além de atender à vontade dos seus clientes, melhora os relacionamentos com organizações ambientais, com ONG's e com a sociedade em geral. Seguir apenas os padrões mínimos expressos na legislação ambiental não é considerado suficiente para manter vantagens competitivas, sobretudo no mercado externo (Casagrande et al., 2008).

Nos últimos anos, a busca por antioxidantes naturais e seguros, especialmente de origem vegetal, aumentou consideravelmente, principalmente porque os antioxidantes de base sintética são suspeitos, e nalguns casos foram confirmados, de estarem associados a potenciais perigos para a saúde.

Vários estudos epidemiológicos indicaram que a ingestão de produtos vegetais está associada a uma redução no risco de uma variedade de doenças crónicas como cardiovasculares e cancro. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (Silva et al., 2010).

O café, uma das bebidas mais populares a nível mundial, é consumido por milhões de pessoas todos os dias. Tradicionalmente, os efeitos benéficos do café são atribuídos maioritariamente ao seu ingrediente mais investigado, a cafeína, mas agora sabe-se que outros compostos também contribuem para as valiosas propriedades dessa bebida (Esquivel & Jiménez, 2012). Devido ao elevado consumo deste produto está associada uma grande produção de resíduos e subprodutos. Muitos destes resíduos são ainda extremamente ricos em compostos bioativos, sendo potenciais fontes naturais dessas substâncias.

Neste trabalho a cascarilha (subproduto do café) foi utilizado e estudado como fonte de potencial bioativo.

Os compostos bioativos de várias especiarias e plantas aromáticas, que são os principais ingredientes naturais de sabor e fragrância, desempenham um papel vital na saúde do consumidor (Nour et al., 2017). Por outro lado, muitas das propriedades funcionais apresentadas pelas plantas aromáticas estão associadas à presença, tipo e concentração de compostos fenólicos, embora a composição exata dos mesmos dependa de vários fatores, como a parte da planta utilizada, estado vegetativo, condições ambientais, técnica de colheita, etc (Juana et al., 2012). Diversas plantas aromáticas contêm certas vitaminas e outras substâncias naturais com capacidade antioxidante (Sueishi et al., 2018), antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras.

Neste trabalho as plantas aromáticas, estudadas como fontes de antioxidantes naturais foram a hortelã e o alecrim.

1.1. Objetivos do estágio

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição em compostos bioativos de um subproduto gerado pela indústria agroalimentar, a cascarilha de café, e duas plantas aromáticas (hortelã e alecrim), nomeadamente no teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, e atividade antioxidante, com o intuito da aplicação dos extratos obtidos numa gama de cosméticos.

Para além deste objetivo pretendeu-se também avaliar a eficácia do método de extração e como é que a forma do material vegetal pode influenciar o rendimento de extração destes compostos.

1.2. Compostos bioativos e aromáticos

A par do crescente interesse por produtos naturais para aplicações em saúde e cuidados pessoais, existe uma tendência para o uso de produtos considerados ecológicos, obtidos a partir de recursos sustentáveis.

A expectativa e qualidade de vida aumentou nos países desenvolvidos, surgindo novas preocupações no que diz respeito aos padrões de saúde, bem-estar e de beleza, o que tem impulsionado a investigação relacionada com a identificação de fontes de princípios ativos para cosméticos.

Uma nova tendência nas formulações cosméticas é a utilização de matérias-primas de subprodutos resultantes da agroindústria que normalmente são descartados como resíduos. A valorização de subprodutos é um conceito que tem ganho bastante relevo na área de gestão de resíduos industriais, promovendo o princípio do desenvolvimento sustentável (Rodrigues et al., 2015). De facto, levando em consideração a composição destes resíduos e as questões de sustentabilidade associadas, os compostos recuperados são aconselháveis para utilização e mostram benefícios quando aplicados, particularmente na industria cosmética (Rodrigues et al., 2017).

Os subprodutos agroindustriais são boas fontes de compostos fenólicos e também têm sido explorados como uma fonte de antioxidantes naturais. Estes têm tido um interesse crescente para aplicações não só alimentares, mas também em substâncias medicinais, para substituir os antioxidantes sintéticos, uma vez que estes podem constituir um perigo para a saúde devido à sua carcinogenicidade (Gholamipourfard et al., 2021).

Embora o uso de compostos fenólicos naturais como antioxidantes seja particularmente interessante, devem ser considerados os aspetos práticos tais como a eficiência da extração, a disponibilidade da matéria-prima, a segurança do produto obtido, entre outros (Rodrigues et al., 2015).

Estudos realizados com compostos fenólicos e, especialmente, com os flavonoides demonstram a sua capacidade antioxidante e a sua significativa contribuição quer na dieta alimentar, assim como o seu efeito na prevenção de diversas doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (Soares et al., 2008).

Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Estruturalmente, os flavonoides são compostos bioativos que constituem substâncias aromáticas com um alto poder antioxidante.

Estes compostos possuem uma série de propriedades que os fazem atuar sobre sistemas biológicos agindo diretamente em células, organismos ou tecidos vivos com poder farmacêutico, consequentemente, muitas dessas propriedades intervêm de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides (Lopes et al., 2017).

Nos últimos anos, uma ampla pesquisa sobre compostos fenólicos tem sido desenvolvida devido às suas propriedades terapêuticas, incluindo propriedades anticancerígenas, benefícios na prevenção de doenças inflamatórias e doenças cardiovasculares. Os compostos fenólicos são metabolitos secundários que estão naturalmente presentes em várias plantas, frutas e diferentes materiais vegetais (Deflaoui et al., 2021).

Atualmente é cada vez mais recorrente os consumidores demonstrarem preferência por produtos de origem natural como alternativa aos produtos sintéticos, e, como tal, o reaproveitamento de um subproduto do café demonstrou ser um estudo de grande interesse. A cascarilha do café, principal subproduto da torrefação do café, é atualmente usada como combustível ou na fertilização do solo. No entanto, existem vários estudos que relatam que pode constituir uma boa fonte de compostos bioativos que depois de extraídos poderão ser utilizados pela indústria cosmética (Bessada et al., n.d.).

As ervas aromáticas são há muito tempo a base da medicina tradicional em muitos países. Têm sido um objeto de estudo, principalmente pelas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentares, devido ao seu potencial para melhorar a saúde (Juana et al., 2012). Estas matérias-primas contêm na sua composição substâncias que atuam como antioxidantes, estimulantes digestivos e apresentam atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena. Os efeitos benéficos indicados também podem ter possíveis aplicações preventivas numa variedade de patologias (Juana et al., 2012).

2. Produtos de origem vegetal para extração de compostos bioativos

As indústrias agroalimentares geram uma grande quantidade de resíduos de frutas e vegetais. Esses resíduos são compostos por partes estruturais (folhas, cascas, polpas, sementes, raízes e caules) e são ricos em compostos bioativos como polifenóis, proteínas, carboidratos, fibras, lignina, lípidos e minerais. Portanto, esses resíduos constituem uma fonte de compostos bioativos e a sua valorização leva à aplicação do conceito de economia circular em que a indústria e a sociedade se beneficiam mutuamente (Mármol et al., 2021).

As plantas aromáticas são reconhecidas como fontes extremamente ricas de várias classes de antioxidantes naturais (Sueishi et al., 2018). Contêm também certas vitaminas e outras substâncias naturais com características bioativas.

2.1. Subprodutos da indústria agroalimentar

A demanda pela produção de alimentos tem promovido o aumento da quantidade de resíduos agroindustriais, e por isso é cada vez mais urgente a necessidade de valorizar e reutilizar estes subprodutos.

Uma das grandes limitações no desenvolvimento economicamente sustentado dos processos de valorização de subprodutos está na disponibilidade desses mesmos subprodutos. No entanto, tal não deve constituir uma limitação, mas sim, ser visto como uma oportunidade para as indústrias se associarem, e em conjunto conceberem soluções integradas usando subprodutos com composição semelhante ou complementar. Outro grande constrangimento, são as restrições impostas pela legislação, nomeadamente na valorização dos subprodutos para utilização em novos ingredientes (em particular funcionais) garantindo que o produto final seja facilmente valorizável no mercado com o retorno esperado.

Neste contexto, a valorização de subprodutos é uma questão da maior importância para o setor agroalimentar, pois são várias as oportunidades existentes para o desenvolvimento sustentado de novos produtos de valor acrescentado. Assim as

empresas agroalimentares devem estar conscientes deste desafio e, desde já, assumirem esta questão como determinante para o seu desenvolvimento e do setor.

Embora no passado esses resíduos fossem vistos principalmente como um grande problema, no cenário atual começam a ser vistos como a principal estratégia para o desenvolvimento de processos industriais sustentáveis (Freitas et al., 2021).

Atualmente cerca de 1/3 dos alimentos para consumo humano é perdida mundialmente como resíduo de processamento ou perda na cadeia de valor, correspondendo a uma produção mundial de resíduos alimentares de cerca de 1,3 mil milhões toneladas por ano (Pintado & Teixeira, 2015). Nesse sentido, a valorização de resíduos e subprodutos agroalimentares apresenta-se não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado e com grande impacto na economia das indústrias.

A mais-valia para as indústrias alimentares advém tanto da redução de custos de eliminação ou tratamento dos resíduos, como do ganho de transformação dos subprodutos em produtos de valor, entre os quais se podem incluir novos aditivos ou ingredientes alimentares, que podem vir a incorporar nos seus produtos, diversificando e aumentando o seu portfólio (Pintado & Teixeira, 2015).

Nesse contexto, diversas tecnologias imergentes menos agressivas para o ambiente, como extração assistida por micro-ondas e a extração assistida por ultrassom têm sido estudadas e aplicadas na obtenção de produtos de alto valor agregado a fim de abastecer as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentares (Freitas et al., 2021).

Com potencial para comercialização e aplicação em formulações cosméticas a exploração de subprodutos alimentares com valor acrescentado é cada vez mais investigada. A criação de novos produtos surgiu da constante evolução da indústria cosmética e da procura pelos consumidores de produtos naturais e inovadores, levando ao aparecimento de novos conceitos, cujas características permitem a incorporação de compostos bioativos, como por exemplo vitaminas e compostos fenólicos extraídos de subprodutos, e desta forma, contribuir para a sustentabilidade a nível mundial (Pilar & Gomes, 2020).

2.1.1. Cascarilha de café

As plantas de café pertencem à família botânica Rubiaceae, que inclui aproximadamente 80 espécies diferentes. As duas principais espécies de café mais cultivadas para consumo são o *Coffea arabica*, conhecido como café arábica, que representa aproximadamente 75% da produção global, e o *Coffea canephora,* conhecido como café robusta, correspondendo aproximadamente a 24% da produção (Narita & Inouye, 2014).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e a segunda maior mercadoria comercializada depois do petróleo. Devido à grande procura por este produto, são geradas grandes quantidades de resíduos na indústria do café, os quais podem ser tóxicos e representam sérios problemas ambientais (Mussatto et al., 2011).

O consumo global de café atinge os 9,66 milhões de toneladas por ano e como consequência, são produzidos milhões de toneladas de subprodutos, tais como as borras e as cascas de café. A cascarilha, que resulta como subproduto depois do processo de torrefação do café, é o tegumento fino que cobre o grão de café verde (Nzekoue et al., 2020). Esta é separada dos grãos por fluxo de ar durante o processo produtivo e por vezes é utilizada como combustível ou enviada para aterros (Costa et al., 2014). Apesar da quantidade de cascarilha de café constituir apenas 0,75% da quantidade de café torrado produzido, o elevado volume de café processado a nível mundial torna a quantidade de cascarilha também significativa (Nzekoue et al., 2020). No entanto, até ao presente não foram desenvolvidos métodos eficientes para a utilização efetiva de cascarilha, o seu reaproveitamento e valorização (Narita & Inouye, 2014) contribuindo positivamente para o meio ambiente e para a economia. Ao longo dos anos, a sua principal aplicação tem sido limitada à alimentação animal ou à produção de energia. A maior parte da cascarilha é descartada em aterros ou terrenos de cultivo ou prossegue para ser queimada, geralmente sem a preocupação com o destino final e com mudanças na fonte de poluição, especialmente nos países em desenvolvimento.

Apesar da cascarilha poder ser reutilizada de várias formas, é importante ter métodos ecológicos para transformá-la em material utilizável ou em material a ser reciclado na natureza, uma vez que tem na sua composição matéria orgânica, nutrientes e compostos secundários, estando-se desta forma a introduzir compostos orgânicos de alto valor no solo (Hoseini et al., 2021).

Os compostos bioativos da cascarilha podem responder a novos desafios e necessidades da indústria cosmética com o fornecimento de ingredientes ativos naturais que melhoram a aparência de uma pele saudável, neutralizam o envelhecimento da pele e doenças relacionadas, numa abordagem ecológica (Bessada et al., n.d.). Diferentes estudos têm mostrado o beneficio das propriedades da cascarilha de café, a sua capacidade antioxidante, atividade antibacteriana e anti-inflamatória (Borrelli et al., 2004).

2.2. Plantas aromáticas e medicinais

As plantas aromáticas e medicinais são ancestralmente usadas na confeção e preparação de alimentos, no tratamento e prevenção de doenças. É-lhes reconhecido o seu potencial bioativo, mesmo que inicialmente de uma forma meramente empírica. Atualmente, e apesar de estar amplamente provada a excelente composição bioativa destas plantas, o efetivo uso dos seus compostos ativos ainda não atingiu a sua total valorização. É por isso fundamental otimizar processos de extração que permitam a sua eficiente recuperação. Assim, a investigação sobre a utilização e eficácia das plantas aromáticas deve continuar por forma a identificar os potenciais benefícios para a saúde humana ou animal.

Hoje em dia, a utilização de extratos de plantas em aditivos alimentares, como fontes de compostos medicinais, continua a crescer, com o objetivo de satisfazer as exigências dos consumidores por produtos naturais, seguros e de alta qualidade. As plantas aromáticas parecem satisfazer os requisitos da procura atual e os desenvolvimentos futuros na nutrição. As plantas aromáticas são colocadas na

categoria de plantas medicinais e coletivamente são conhecidas como Plantas Medicinais e Aromáticas (Giannenas et al., 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 30% dos medicamentos vendidos em todo o mundo contêm compostos derivados de materiais vegetais que incluem mais de 21000 espécies diferentes (Pandey et al., 2020). Estas plantas são amplamente distribuídas a nível mundial, incluindo o Sul e Sudeste Asiático. Na Índia são utilizadas mais de 7500 espécies, que representa metade das espécies vegetais nativas do país. A China tem cerca de 6000 espécies em uso que têm propriedades medicinais. Em África, mais de 5000 espécies de plantas são utilizadas para fins medicinais. Na Europa são utilizadas pelo menos 2000 espécies sendo dois terços nativos da Europa. A maioria destas plantas ainda são recolhidas na natureza. Estas plantas aromáticas estão distribuídas por todo o mundo e podem ser classificadas de acordo com o seu cultivo em diferentes zonas climáticas do mundo, como a tropical, equatorial, temperada e fria. As propriedades químicas e ingredientes ativos da mesma espécie de uma planta diferem através de zonas climáticas diferentes (Pandey et al., 2020).

2.2.1. Alecrim

A *Salvia rosmarinus,* designada anteriormente também por *Rosmarinus officinalis* L., é popularmente conhecido como alecrim ou rosmaninho, é uma planta pertencente à família Lamiaceae, originaria da região do Mediterrâneo. No entanto, pode ser encontrada um pouco por toda a parte. É uma planta aromática, em forma de arbusto com ramos cheios de folhas verdes que exalam uma fragrância característica, e pode apresentar uma altura até aos dois metros (Oliveira et al., 2019). As folhas podem ser colhidas três a quatro vezes por ano (Aziz et al., 2021).

O alecrim é uma fonte muito rica em compostos fenólicos que são os principais responsáveis pela alta bioatividade da planta. O seu uso é reconhecido na medicina tradicional e na gastronomia desde há séculos (Bellumori et al., 2016). No entanto, no que diz respeito ao valor alimentar, o alecrim tem uma utilização restrita relativamente ao sabor, odor e cor, onde são utilizadas técnicas comerciais para remover o odor e a cor dos antioxidantes (Aziz et al., 2021).

Os extratos de alecrim são usados numa abrangente gama de produtos com diferentes aplicações, incluindo a produção de medicamentos, como conservantes de alimentos, fitofármacos e cosméticos. Uma das aplicações serve para tratar doenças como o Alzheimer devido às suas propriedades terapêutica, propriedades hepatoprotectoras e potencial anti-angiogénico. Os extratos das matrizes estudadas podem substituir os antioxidantes sintéticos uma vez que previnem a oxidação e a contaminação microbiana. A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) permite o uso de extratos de alecrim (400 mg/kg) com alimentos e bebidas (Nieto et al., 2012). O óleo essencial de alecrim é obtido a partir das folhas da planta, que também são usadas para preparar extratos fenólicos, que são produtos naturais para a prevenção de uma série de doenças comuns (Bellumori et al., 2016).

O uso terapêutico do alecrim tem sido explorado sobretudo para o tratamento de doenças inflamatórias. No entanto, outros potenciais usos têm sido estudados, como para o tratamento e cicatrização de feridas, cancro de pele e micoses. Além de usos terapêuticos, o alecrim tem potenciais aplicações na formulação de cosméticos e no tratamento de condições patológicas e não patológicas, como a celulite, alopecia, dano ultravioleta e envelhecimento (Macedo et al., 2020).

2.2.2. Hortelã

A hortelã é originária da Europa e do Médio Oriente, mas atualmente está um pouco difundida por todo o mundo sendo cultivada desde regiões frias a amenas como nos EUA, China, Índia, a ex-URSS, Hungria, França, Irão e Itália, entre outros. A atual produção mundial de hortelã é superior a 4000 toneladas por ano. Um bom crescimento esta planta requer dias longos e noites frescas, e solos profundos e ricos com elevada capacidade de retenção de água (Gholamipourfard et al., 2021).

O género *Mentha* reúne um grupo de plantas aromáticas e medicinais da família *Lamiaceae* como é o caso da hortelã. As plantas do género *Mentha* são uma fonte de óleos essenciais e de uma variedade de compostos fenólicos e flavonoides com elevado poder antioxidante, anti-inflamatório e analgésico (El Hassani, 2020).

Devido à vasta gama de bioatividade e atividade antioxidante, este é um tópico interessante de investigação devido à crescente utilização de antioxidantes naturais como aditivos em alimentos e cosméticos.

A *Mentha* (hortelã) é uma das ervas aromáticas mais comum conhecida por ter propriedades medicinais, aromáticas e terapêuticas, características que são exploradas desde os tempos antigos, tendo sido cada vez mais estudadas nas últimas décadas para amplificar o seu uso, nomeadamente estudar possíveis aplicações na indústria cosmética.

A qualidade terapêutica da hortelã advém do óleo essencial extraído da planta, das folhas secas, das flores frescas e da planta inteira (Al-Amri, 2021). As espécies pertencentes a este grupo estão entre as plantas mais importantes produtoras de óleos essenciais com propriedades farmacológicas, antimicrobianas e antifúngicas (El Hassani, 2020).

Os antigos egípcios, gregos e romanos conheciam a hortelã como agente aromatizante para alimentos e como medicamento, enquanto os óleos essenciais foram usados como perfumes, desodorizantes e produtos farmacêuticos. Até hoje, cerca de 80% da população mundial depende predominantemente de plantas e extratos de plantas para cuidados de saúde. Particularmente, nos últimos anos, os óleos essenciais e os seus componentes estão a ganhar interesse por serem relativamente seguros para o meio ambiente, bem como para a saúde humana, contando com uma ampla aceitação pelos consumidores, o que leva a uma exploração para o seu uso funcional (Kumar et al., 2011).

3. Métodos de extração sólido/líquido

A fim de se extraírem os compostos bioativos das plantas é necessário recorrer a métodos de extração para que se consiga perceber qual o mais eficaz relativamente ao objetivo pretendido (compostos a extrair) e o tipo de planta em estudo. As técnicas de

extração influenciam consideravelmente a composição, características e a capacidade de extração do(s) composto(s) alvo, portanto, há um esforço contínuo para entender os diversos processos de extração (Das & Arora, 2021).

No desenvolvendo de processos de extração mais eficientes pode-se atender aos requisitos de aceleração do processo e redução no consumo de energia, sendo que este tópico de investigação é cada vez mais importante. A segurança, sustentabilidade, os fatores ambientais e económicos estão a direcionar as indústrias para as tecnologias não convencionais e com protocolos mais amigos do ambiente.

A extração sólido/liquido é um importante processo de separação que envolve a transferência de solutos de uma matriz sólida para um solvente, sendo vastamente utilizado nas mais variadas aplicações na indústria química ou alimentar. A extração é uma operação unitária amplamente utilizada para recuperar componentes alimentares, sendo uma fase principal de transformação para a produção de certos produtos alimentares, ou para isolar os componentes desejados (antioxidantes, aromatizantes, etc). Também é utlizada na remoção de contaminantes e outros compostos indesejáveis das fontes alimentares (toxinas, alcalóides, colesterol) (Ninla Elmawati Falabiba, 2019).

A indústria farmacêutica em particular, mas também as indústrias de fabrico de perfumes ou pesticidas, têm que lidar com a recuperação dos princípios ativos das plantas. Os materiais vegetais geralmente contêm apenas uma pequena quantidade de soluto ativo, mas na maioria das vezes com alto valor agregado, o que justifica o desenvolvimento de processos de separação para os recuperar. Consequentemente, há a necessidade de novos métodos de extração para melhorar a performance dos processos, por exemplo, o uso de ultrassons (Romdhane & Gourdon, 2002).

Para obter os compostos bioativos, através da produção de extratos de plantas e/ou os óleos essenciais, os métodos de extração são aplicados às porções mais ativas da planta (folhas, raízes, caules ou flores), usando solventes adequados e procedimentos padrão (Andrade et al., 2016). Um dos métodos mais vulgares aplicados na extração de compostos bioativos é a extração convencional. É um dos métodos mais conhecidos na produção de extratos devido à sua simplicidade e de não necessitar de equipamentos

e técnicas muito sofisticadas. No entanto, apresenta como grande desvantagem o facto de ser um processo bastante demorado e cuja temperatura de extração pode comprometer a qualidade final dos compostos extraídos.

Por outro lado, com o objetivo de ultrapassar as desvantagens da extração convencional, têm sido estudados e desenvolvidos outros métodos, como é o caso da extração assistida por ultrassons. O método de extração assistida por ultrassons (EAS) pode ser considerado um processo ecológico e limpo, pois graças à baixa temperatura aplicada e rápida execução, ajuda a prevenir fenómenos de degradação térmica, geralmente não deixa resíduo no extrato e não usa peças mecânicas móveis. Isto também oferece vantagens de produtividade, rendimento e seletividade, uma vez que diminui o tempo de processamento e melhora a qualidade do produto obtido, enquanto reduz riscos físicos e químicos (Bellumori et al., 2016).

Os ultrassons podem ser utilizados para a extração de compostos bioativos, uma vez que a energia gerada produz cavitação, o que aumenta as taxas de transferência de massa no processo. Este fenómeno ocorre com a formação de bolhas que colapsam na superfície do material vegetal, conduzindo a uma pressão que quebra o tecido e liberta os compostos bioativos presentes na matéria vegetal (Meregalli et al., 2020).

A par da seleção do método é também importante definir o solvente a utilizar. A identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais (como ervas aromáticas, sementes e especiarias) implica a realização da extração com solventes de polaridades diferentes. As pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de comparar os seus resultados e encontrar a melhor alternativa em termos de solvente a utilizar para a aplicação em causa (Andreo & Jorge, 2006).

A seleção dos solventes utilizados para a extração de componentes úteis de material vegetal é altamente dependente da utilização final dos extratos (Vinatoru et al., 2017). Caso sejam para uso humano ou animal, será mais conveniente serem utilizados solventes de qualidade alimentar, como por exemplo o etanol (Schmid et al., 2016). Noutros casos, podem ser utilizados solventes não alimentares, como é o caso do diclorometano-metanol e hexano (Castro-Gómez et al., 2016).

Tendo em conta que neste trabalho os compostos extraídos têm como finalidade integrar uma linha de cosméticos, apenas solventes de qualidade alimentar por uma questão de segurança podem ser utilizados.

Na extração sólido-líquido, o solvente tem um grande impacto na selectividade dos compostos. A sua polaridade tem influência directa sobre os solutos extraídos, que por sua vez está relacionada com a estrutura química dos compostos. Modelar as interações soluto/solvente utilizando várias escalas de polaridade ou interacção é um grande desafio para favorecer a escolha do solvente mais adequado (Lefebvre et al., 2021).

As extrações dos compostos bioativos realizadas neste trabalho, utilizaram o etanol e água, e misturas dos solventes, com 25% e 50% de etanol.Em comparação com a utilização da água como solvente, as vantagens da utilização de solventes alcoólicos podem ser resumidas como se segue: melhor solubilidade para componentes fracamente polares ou não polares; menor risco de corrosão; e melhor qualidade da matéria extraída. Além disso, para utilizar os benefícios tanto da água como dos álcoois, os solventes mistos água/álcool ganharam popularidade nos últimos anos, e os efeitos sinergéticos positivos da água e dos álcoois nas matérias vegetais foram intensamente relatados por muitos investigadores. Trabalhos de investigação anteriores revelaram que o comportamento de decomposição das matérias-primas e as características dos produtos são profundamente afetados pelo meio de reação, o que tem um impacto significativo no subsequente processo de extração e separação dos componentes desejados. Tendo em conta o facto dos álcoois e as misturas alcoólicas serem também meios de reação comumente utilizados para a realização de processos de extração, é de grande importância investigar a influência dos solventes de extração na eficiência de recuperação dos compostos bioativos quando aplicados em percentagens diferentes (Zhao et al., 2022). Segundo (Kazibwe et al., 2017) foi demonstrado que a extração por ultrassons era vantajosa na extração de componentes fenólicos na planta *Tagetes erecta*, independentemente da parte do material vegetal utilizada.

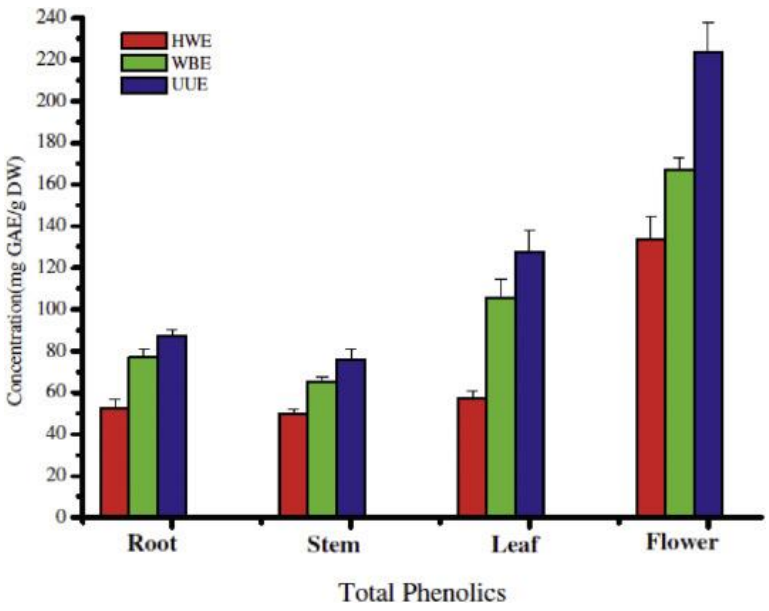

Figura 1- Teor de fenólicos totais na planta T. Erecta. HWE – hot water extraction (extração convencional); WBE – water bath sonication (sonicação de banho-maria); UUE – ultrafast ultrasonication extraction (extração por ultrassons) (Kazibwe et al., 2017)

Outro aspeto, não menos importante, que afeta o rendimento de extração é a forma como o material vegetal é utilizado, nomeadamente a sua dimensão e granulometria. Caso o material vegetal apresente uma granulometria mais reduzida a área de contacto para extração será maior o que à partida beneficiará o processo extrativo, daí que a análise granulometria do material seja imprescindível para tipo de processos (Cardoso et al., 2017).

Asep et al. (2008) e Soroush et al. (2010) apontaram a dimensão das partículas como um dos fatores que têm mais efeito na extração de fluidos supercríticos, tais como pressão, temperatura e taxa de fluxo. Em princípio, a redução da granulometria das partículas aumenta a eficácia da extração. Isto porque a diminuição do tamanho das partículas leva à redução da trajetória de difusão e a uma maior área de superfície de contacto como resultado, acelerando o processo de extração.

Um dos objetivos do presente estudo consistiu em avaliar qual o método de extração mais eficaz para a extração de compostos fenólicos, flavonoides e com elevada atividade antioxidante, de acordo com o solvente utilizado (água, etanol a 25% e 50%)

assim como o impacto do tamanho da matéria vegetal. Avaliou-se também o impacto da forma do material vegetal (inteiro ou moído) a ser utilizado na extração.

4. Materiais e métodos

4.1. Material vegetal

A cascarilha de café foi gentilmente fornecida pela empresa Cafés FEB, situada na Zona Industrial de Taveiro, Coimbra, Portugal. A hortelã e alecrim foram fornecidos frescos pela empresa Vitacress Portugal SA - Odemira, Portugal.

Enquanto, que a cascarilha de café não sofreu qualquer processo de secagem antes da sua utilização para as extrações, pois é um subproduto que já se encontra seco devido ao processo produtivo pelo qual é sujeito, a hortelã e o alecrim depois de recebidos nas instalações da Escola Superior Agrária de Coimbra, foram sujeitos à secagem em secador piloto (STI, Secador Piloto). A secagem ocorreu por convecção forçada de ar quente a 40 - 50 ^{o}C. O material vegetal foi distribuído pelos 6 tabuleiros perfurados do secador e seco durante 24 h.

Para estudar a influência da forma como o material vegetal pode influenciar a eficácia da extração, uma parte do material foi moída num moinho (Moulinex, Moulinette compact) até à obtenção de um pó.

4.2. Extração S/L convencional e assistida por ultrassons

As técnicas mais recentes e inovadoras apresentam grandes vantagens, pois são robustas e garantem uma análise assertiva e precisa. Contudo, muitas vezes o preço e o acesso a estes equipamentos tornam-nos pouco acessíveis. Nesse sentido, as técnicas clássicas, as quais podem ser executadas de maneira simples, não requerem um grande investimento e são uma maneira segura de realizar as análises apropriadas nas matérias primas, garantindo também resultados precisos e seguros para o desenvolvimento das mais diversas formulações (Marcucci et al., 2021).

Neste trabalho foram aplicados dois métodos de extração: a extração convencional (EC) e a extração assistida por ultrassons (EAS). A avaliação da eficiência de cada um destes métodos foi aferida para várias condições experimentais, tais como: o tipo de matriz vegetal (cascarilha, hortelã e alecrim); estado físico (inteira ou moída), temperatura aplicada durante a extrações (50 °C), tipo de solvente (água, 25%EtOH e 50%EtOH).

O método de **extração S/L convencional** consistiu na mistura de 2 g de material vegetal seco (inteiro ou moído) com 100 mL de solvente (água, 25%EtOH ou 50%EtOH), a sua colocação num frasco de vidro com tampa de metal e deixar em constante agitação magnética durante 4 h em banho-maria a cerca de 50 °C.

A **extração S/L assistida por ultrassons** consistui na preparação da mistura do material vegetal e do solvente, nas mesmas proporções referidas anteriormente para o método de extração convencional. Posteriormente, cada uma das misturas foi sujeita a ultrassons a 20 kHz, com a utilização de uma sonda (Sonicator, Qsonica Q700) durante 20 minutos (até atingir os 50 °C).

Após a primeira etapa, que é especifica para cada um dos métodos de extração, o procedimento adotado nas etapas seguintes foi comum a ambos os casos, e consistiu na filtração com um coador de metal, para separar a matéria sólida do solvente (fração líquida), seguida de uma centrifugação (4000 rpm, 30 minutos a 4 °C) na centrifuga (Hettich, Rotanta 460R). A temperatura de refrigeração aplicada durante a centrifugação irá ajudar a separar os resíduos sólidos ainda presentes na fração líquida e permitirá melhorar a estabilidade térmica das amostras e dos compostos extraídos. De seguida evaporaram-se as amostras a vácuo num evaporador rotativo (Rotavapor R-210 & Heating Bath B-491), até obter cerca de 20 mL de amostra.

A *Figura 2* representa o esquema com todas as etapas do processo de extração até ao momento da evaporação. A Tabela 1 resume as varáveis estudadas.

Tabela 1- Condições de extração

Variáveis estudadas	**Condições**
Método de extração	Extração S/L convencional Extração S/L assistida por ultrassons
Tipo de matriz vegetal	Cascarilha Hortelã Alecrim
Estado físico da matriz vegetal	Inteira Moída
Solvente de Extração	Água Etanol a 25% (25%EtOH) Etanol a 50% (50%EtOH)

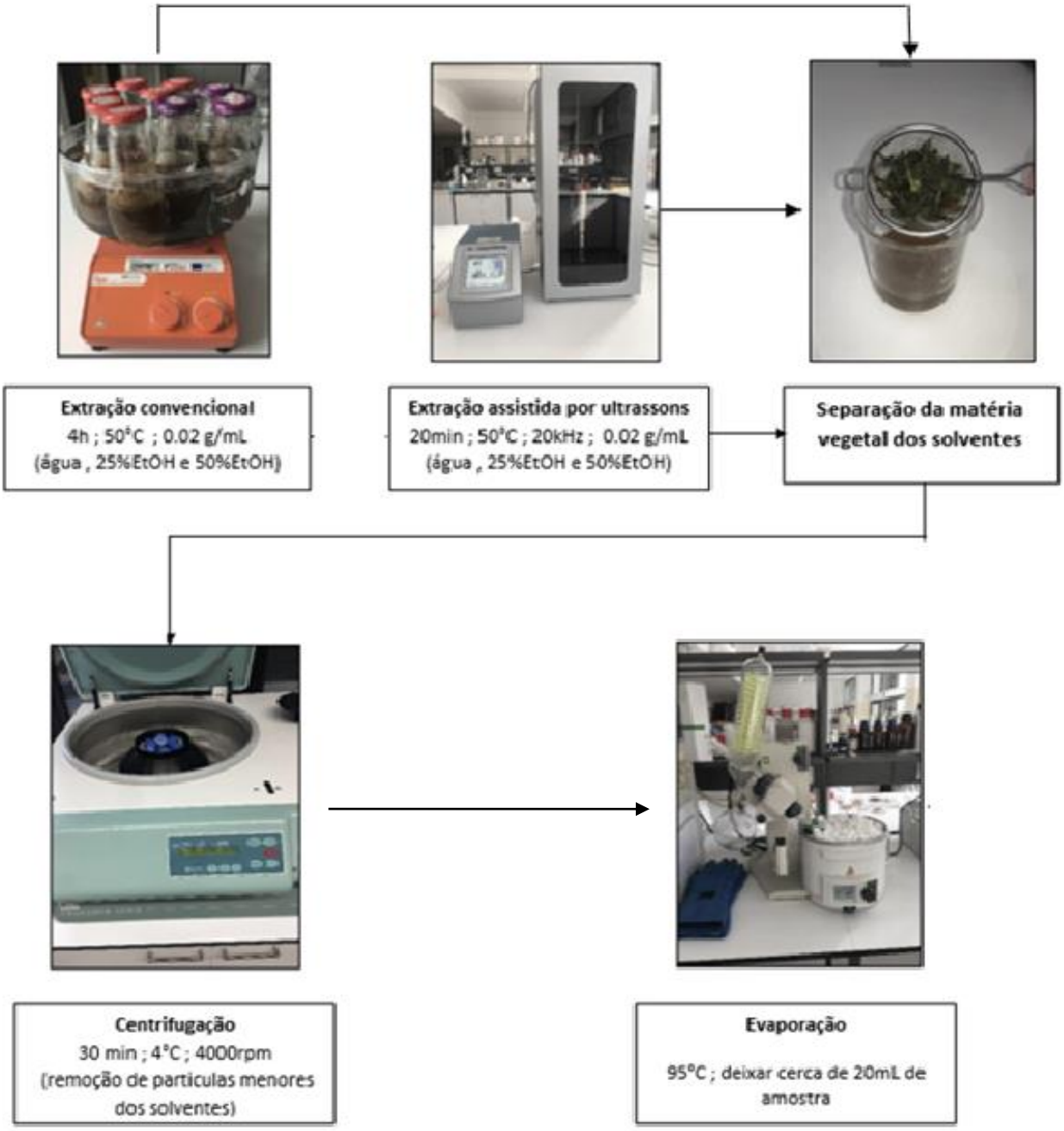

Figura 2- Esquema das etapas do processo de extração.

Afim de determinar o rendimento de extração foi aplicado do método de liofilização. Neste caso as amostras depois de concentradas por evaporação, eram divididas em copos de plástico de 50 mL, congelados durante 24 h e colocados no liofilizador. No entanto durante várias tentativas do processo de liofilização houve a perda parcial de massa dos extratos. Este fator impossibilitou obtenção da massa do extrato e a

consequente determinação dos rendimentos de extração. Por conseguinte não foi possível determinar exatamente a concentração dos extratos usados para cada parâmetro analisado (Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante).

Tendo em atenção que sem os resultados dos rendimentos de extração, os resultados dos restantes parâmetros não podem ser expressos em relação à quantidade do extrato para cada condição, optou-se por considerar que as condições operacionais de concentração dos extratos foram idênticas e que as diferentes concentrações obtidas para os fenólicos totais, flavonoides e AA são proporcionais aos próprios rendimentos de extração.

Neste caso, os resultados apresentados são considerados preliminares e permitem apenas a comparação entre si para todas as condições de extração testadas, não sendo possível estabelecer comparações os resultados prévios da literatura para os materiais vegetais analisados.

4.3. Caracterização dos extratos

Depois de produzidos, os extratos de cascarilha, alecrim e hortelã foram caracterizados em termos de conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.

4.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado através do método Folin-Ciocalteu proposto por Singleton e Rossi (1965) (Vieitez et al., 2018); (Cicco et al., 2009)). Este método é o mais amplamente utilizado para estimar o conteúdo em compostos fenólicos totais em alimentos, bebidas, ervas e outros extratos vegetais. Para a realização deste método a primeira etapa passou pela preparação dos reagentes e soluções, assim como do material a usar ao longo deste procedimento.

- Solução aquosa de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) a 5%
- Solução metanol:água (70:30, v/v)
- 0,7 mg/mL de solução padrão de ácido gálico em metanol:água (70:30, v/v)

Na primeira etapa do procedimento elaborou-se a curva de calibração com o padrão ácido gálico com concentrações entre 0,236 mg/mL e 0,831 mg/mL cuja equação foi Abs750nm=15,04.[ácido gálico]+0,0512 (R^2=0,979). Esta foi obtida de acordo com procedimento que será descrito para as amostras a analisar e permite a quantificação do conteúdo em fenólicos totais expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/mL de extrato.

Para proceder à análise dos fenólicos totais, a 100 µL da solução de extrato adicionou-se 200 µL de solução de Folin-Ciocalteu agitou-se o tubo de ensaio no vórtice (Vortex stirrer LBX V05 series) colocando-a em seguida num banho-maria a 40 °C. Procedeu-se do mesmo modo para os restantes tubos com um intervalo de tempo entre a adição dos reagentes de 30 em 30 segundos.

Após 4 minutos, adicionaram-se 1,6 mL da solução de Na_2CO_3 a cada tudo, que depois de agitado foi colocado no banho novamente. Ao fim de 20 minutos, mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 750 nm. O ensaio foi realizado em triplicado para cada uma das amostras analisadas.

4.3.2. Determinação dos flavonoides

Os extratos de alecrim, hortelã e cascarilha foram analisados relativamente ao teor de flavonoides totais pelo método proposto por (Kim et al., 2003) através de método espectrofotométrico, medindo as absorvâncias a 510 nm.

Para a determinação de flavonoides prepararam-se as seguintes soluções:

- Solução de $NaNO_2$ (nitrito de sódio a 5%, m/v)
- Solução de $AlCl_3$ (cloreto de alumínio a 10%, m/v)
- Solução de NaOH (hidróxido de sódio, 1 M)
- Solução padrão de catequina (2,0 mg de catequina em 5 mL de metanol:água, numa proporção 50:50, esta solução foi apenas usada para a elaboração da curva de calibração)

Na análise e quantificação de flavonoides totais foi elaborada uma curva de calibração com o padrão catequina, cuja equação foi a seguinte: Abs_{510nm} = 3,4975[CAT]+0,0145 com R^2= 0,9987, em que [CAT] é a concentração de catequina em mg/mL.

Para a determinação da curva de calibração procedeu-se do seguinte modo, em tubos de ensaio contendo 4 mL de água bidestilada adicionaram-se os volumes (0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL e 1 mL) da solução padrão de catequina juntamente com uma solução de metanol:água (50:50) até perfazer o volume total de 1 mL. A amostra para o autozero do equipamento consistiu em 1 mL da solução metanol:água (50:50).

Para a análise dos extratos obtidos procedeu-se do seguinte modo: no tempo zero, em cada tubo de ensaio contendo 4 mL de água bidestilada adicionaram-se 1 mL de solução de extrato e 300 µL de $NaNO_2$ (nitrito de sódio). Agitaram-se de seguida no Vortex (modelo stirrer LBX V05 series) e repetindo a mesma ação para os restantes tubos de ensaio num intervalo de 30 segundos.

Cerca de 5 minutos após se ter iniciado o procedimento adicionaram-se 300 µL de $AlCl_3$, voltando a agitar o tubo no vortex. Tal como na etapa anterior este procedimento é repetido para todos os tubos num intervalo de 30 segundos. Aos 6 minutos, adicionou-se 2 mL de NaOH (1 M), 2,4 mL de água bidestilada, agitando novamente e mantendo o intervalo de tempo de 30 s entre as adições nos restantes tubos. Por fim, as absorvâncias são medidas a 510 nm no espetrofotómetro (PG Intruments Limited, T80+). Para cada uma das amostras o ensaio foi realizado em triplicado.

4.3.3. Determinação da atividade antioxidante

Os extratos de alecrim, hortelã e cascarilha foram analisados relativamente à atividade antioxidante pelo método proposto por (Rodríguez-Rojo et al., 2012).

Este método espectrofotométrico prevê a preparação de amostras controlo e dos extratos em pelo menos 3 concentrações distintas que apresentem atividade antioxidante acima e abaixo de 50%.

Para a realização desta análise preparou-se a solução de DPPH em etanol a uma concentração de 0,3 mM.

Para o caso da preparação das amostras controlo adicionam-se 2,5 mL do solvente usado para preparar a diluição dos extratos, neste caso água, 25%EtOH e 50%EtOH. Para o caso das amostras são colocados 2,5 mL da solução de extrato. Os tubos de ensaio envolvem-se em papel de alumínio para evitarem a influência da luz.

No tempo zero, adicionou-se 1 mL de solução de DPPH no primeiro tubo do controlo, agitou-se e colocou-se num local abrigado da luz. Repetiu-se o procedimento para os outros dois tubos do controlo e para todas as soluções de extrato preparadas, usando intervalos de tempo de 30 segundos entre cada adição. Para cada solução de extrato foi feito um branco. Cada extrato foi preparadoadicionando a 2,5 mL de solução de extrato e 1 mL de etanol (o solvente usado para preparar a solução de DPPH).

Após 30 minutos, as absorvâncias dos brancos, dos controlos e das amostras foram lidas a 517 nm, usando o mesmo intervalo de tempo usado para adicionar o DPPH, 30 segundos. O autozero no espectrofotómetro foi feito com o solvente usado para diluir os respetivos extratos (água, 25%EtOH e 50%EtOH). Este ensaio foi realizado em triplicado para cada amostra.

O IC50 é a concentração efetiva para obter 50% de atividade antioxidante da planta frente ao radical DPPH, sendo que pelo menos uma das concentrações tem de corresponder a uma percentagem de antioxidantes superior a 50% e a outra inferior a 50%.

5. Apresentação de resultados e discussão

Os resultados serão apresentados agrupados por tipo de compostos analisados, nomeadamente compostos fenólicos e flavonoides, e pelos resultados obtidos para a atividade antioxidante.

5.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos englobam uma vasta gama de substâncias vegetais que têm em comum um anel aromático, sendo que estas substâncias tendem a ser solúveis em água. Os compostos fenólicos dos extratos de alecrim, hortelã e cascarilha de café foram caracterizados quantitativamente após o processo de extração e concentração por evaporação. Como já referido anteriormente para as matérias vegetais analisadas foi avaliada a influencia do método de extração, o solvente utilizado, e a forma do material estudado.

As figuras 3, 4 e 5 demonstram o teor de compostos fenólicos em cada umas das amostras analisadas na hortelã, alecrim e cascarilha, respetivamente. Os valores médios dos compostos fenólicos e respetivos desvio padrão para cada extrato podem também ser consultados nas tabelas que se encontram no Anexo I.

A hortelã destacou-se com os valores mais elevados de compostos fenólicos de entre todos os extratos, com concentrações de 5,14±0,41 mg/mL, 3,88±0,42 mg/mL e 3,84±0, 41 mg/mL para hortelã moída através da extração assistida por ultrassons, usando respetivamente a água, e o etanol a 25%EtOH e 50%EtOH como solventes.

Em contraste, o valor mais baixo para a hortelã foi obtido para o método de extração convencional, com o material inteiro e para o caso da água. Enquanto para o método convencional não há uma tendência clara se a forma do material influencia a concentração dos compostos fenólicos nos extratos, quando aplicado o método de extração assistido por ultrassons é claro que o material moído proporciona um aumento na extração. Inclusive, aplicando este método parece que o material inteiro penaliza a extração destes compostos, face aos resultados para o método convencional.

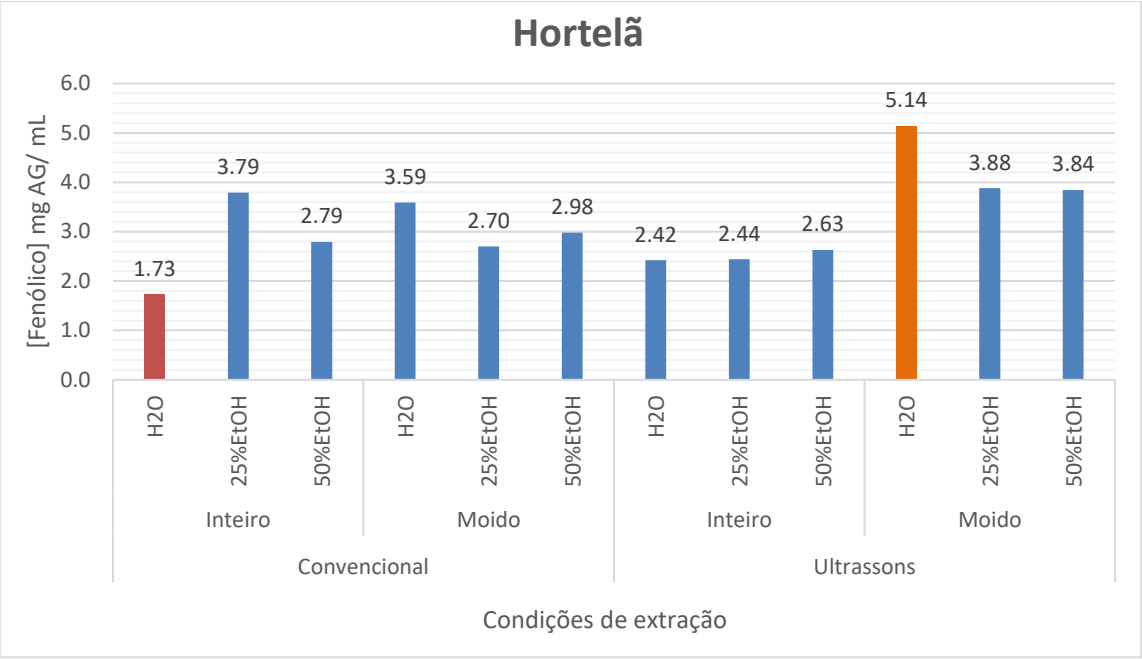

Figura 3- Teor de fenólicos na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

No caso do alecrim (Figura 4) os melhores resultados foram obtidos para o método de extração convencional, onde os resultados para cada solvente entre o material inteiro ou moído não diferem muito. A concentração mais elevada de compostos fenólicos encontrados no extrato verificou-se para a extração convencional utilizando o alecrim inteiro e o solvente 50%EtOH.

Pela análise da figura pode-se afirmar que extração convencional com solventes contendo etanol conduz aos melhores resultados comparativamente à extração assistida por ultrassons. Os valores mais baixos pertencem como já referido à extração assistida por ultrassons com o material inteiro. Mais uma vez o material inteiro não favorece a extração por ultrassons.

A água foi o solvente que levou aos menores valores de concentração de compostos fenólicos, pelo que não será recomendada para a recuperação destes compostos, apresentado para o caso do alecrim inteiro pela extração assistida por Ultrassons o menos valor de compostos fenólicos (1,04±0,03 mg/mL).

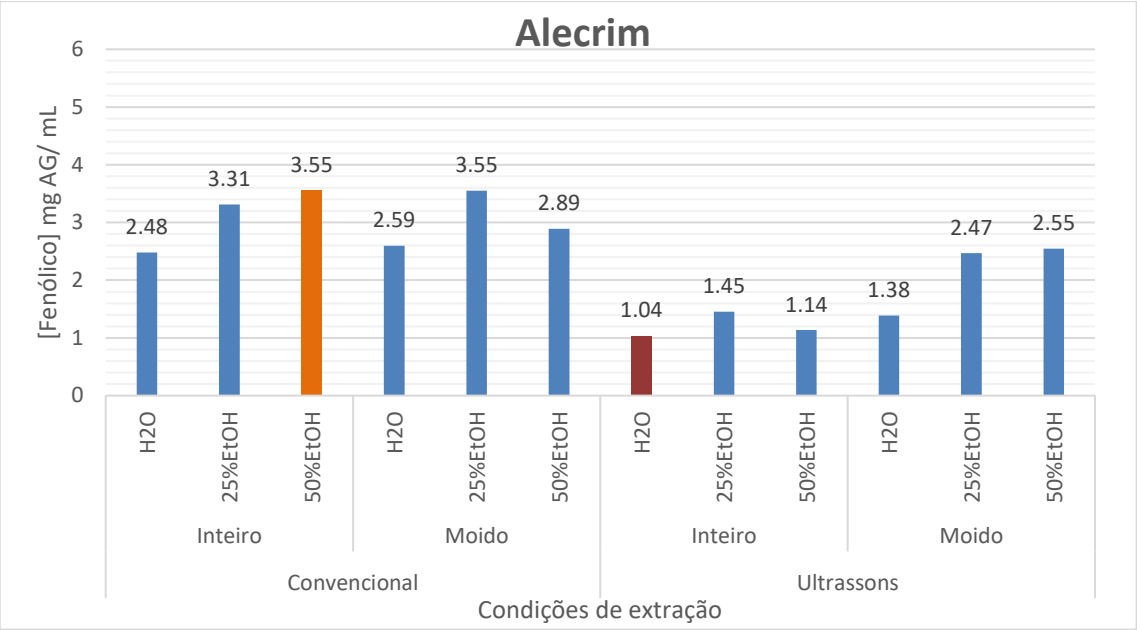

Figura 4- Teor de fenólicos no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Já no que diz respeito à cascarilha verificou-se o mesmo padrão que no alecrim relativamente ao método, sendo que a extração convencional foi a que obteve melhores resultados. Já relativamente ao solvente e forma de material, os melhores resultados foram obtidos com o uso do 50%EtOH em conjugação com o material vegetal inteiro, apresentando assim o valor de 3,77±0,42 mg/mL. Para cada um dos conjuntos de extrato analisado, comparando os três tipos de solventes aplicados a água revelou-se o menos eficaz, enquanto o 50%EtOH foi o mais eficiente.

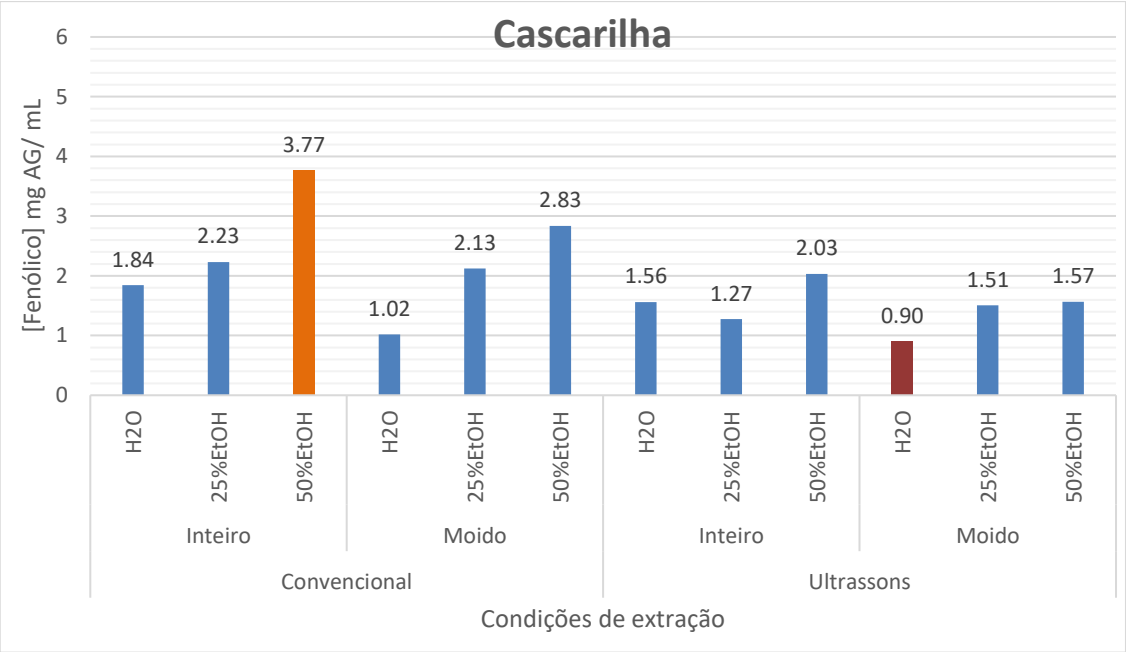

Figura 5- Teor de fenólicos na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Relativamente ao método de extração, apesar de na hortelã as concentrações de fenólicos mais elevadas terem sido alcançadas através do método assistido por ultrassons, para as restantes matrizes vegetais foi o método de extração convencional que permitiu atingir os melhores resultados.

O mesmo princípio se aplica para o solvente utilizado e a forma do material vegetal com a qual se procedeu às extrações, pois uma vez mais, com exceção da hortelã, tanto a cascarilha como o alecrim se destacaram com os resultados conseguidos pelo solvente 50%EtOH com recurso a material inteiro. Para a hortelã temos como melhor solvente a água e os valores mais elevados dizem respeito ao produto moído.

Para cada uma das extrações o solvente menos eficaz no rendimento de extração foi a água, obtendo sempre para cada matéria vegetal analisada o menor valor de concentração em compostos fenólicos.

Quanto à forma da matéria prima os melhores resultados foram a hortelã e o alecrim moído, enquanto que na cascarilha foi o material vegetal inteiro que teve os valores mais elevados de fenólicos (quando comparado com o pó nas mesmas condições de extração).

5.2. Teor de flavonoides totais

A caracterização quantitativa do teor de flavonoides dos extratos de alecrim, hortelã e cascarilha de café, à semelhança da determinação do teor de compostos fenólicos, foi realizada aos extratos resultantes do processo de concentração por evaporação. Esta caracterização foi feita com recurso a três réplicas, afim de assegurar a integridade e homogeneidade dos resultados.

Os gráficos apresentados nas figuras 6, 7 e 8, apresentam os resultados obtidos para o teor de flavonoides em cada umas das amostras analisadas. Os respetivos valores médios e desvio padrão para cada extratos podem ser consultados nas tabelas que se encontram no Anexo II.

Comparando os resultados provenientes desta análise para todas as matrizes analisadas, é possível afirmar que a hortelã inteira (Figura 6), sujeita à extração convencional combinada com o solvente 50%EtOH, apresentou um alto teor de flavonoides (4,02 ± 0,40 mg CAT/mL) quando comparado ao valor mais baixo registado para esta planta (extração com e água assistida por ultrassons, aplicada no produto moído (1,40 ± 0,16 mg CAT/mL). Das três matrizes analisadas, a hortelã detém os três resultados mais significativos, todos eles usando solvente 50%EtOH. Para todos os casos é claro que à medida que a quantidade de etanol aumenta no solvente a concentração de flavonoides extraídos é também mais significativa. Nos dois tipos de métodos de extração utilizados, os valores mais baixos obtidos para os flavonoides foram usando a água como solvente, tanto no material vegetal inteiro como material vegetal moído.

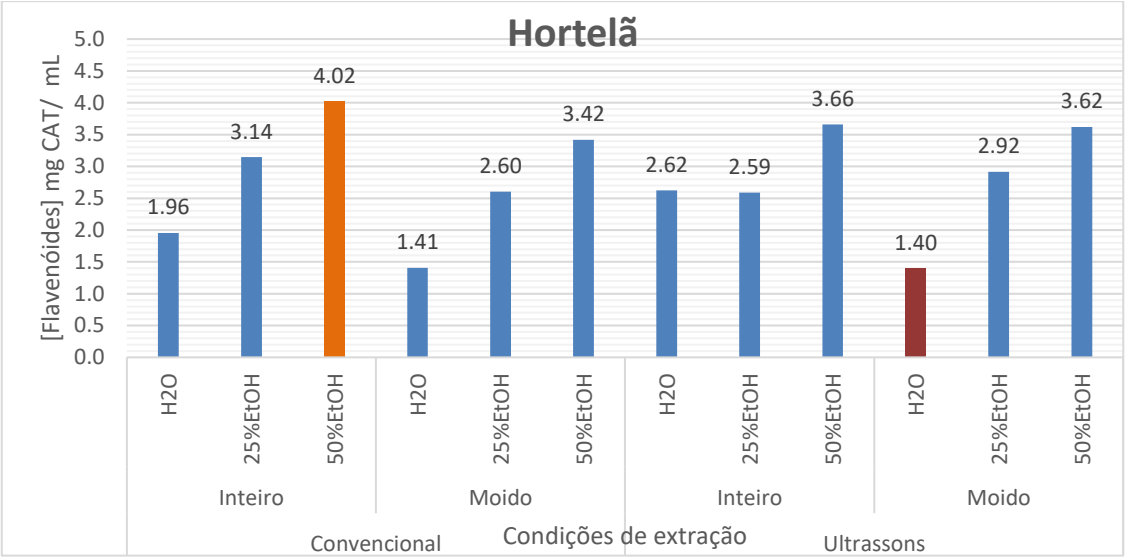

Figura 6- Teor de flavonoides na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Para os extratos de alecrim (Figura 7), os valores mais elevados (1,86 ± 0,04 mg CAT/mL) foram cerca de metade em comparação com os da hortelã. Nos extratos de alecrim destaca-se novamente o solvente 50%EtOH na matéria moída e usando a extração convencional.

Pela observação do gráfico da figura 7 é notária a diferença de resultados entre os dois tipos de extração utilizados, enquanto que na convencional o valor de concentração mais elevado foi 1,86 ± 0,04 mg CAT/mL, na extração assistida por ultrassons foi 1,53 ± 0,06 mg CAT/mL.

Para todos os resultados obtidos do alecrim o valor de concentração mais baixo é representado pela extração assistida por ultrassons com a água, sendo que na extração convencional o valor mais baixo também é dado pela água, quer para o material inteiro ou moído.

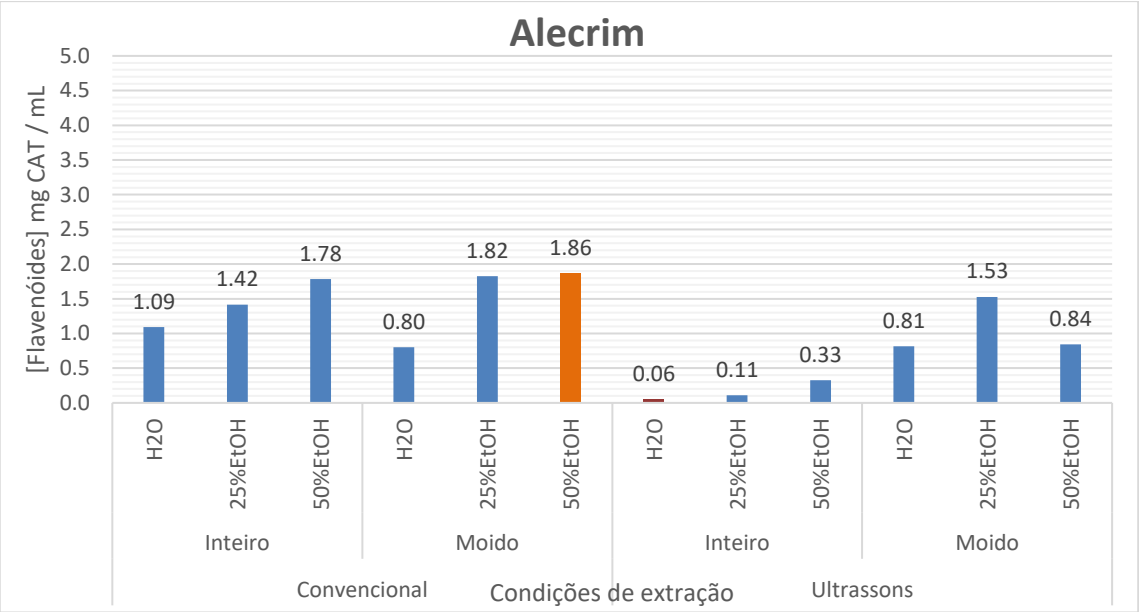

Figura 7- Teor de flavonoides no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Na análise dos extratos de cascarilha de café (Figura 8) encontraram-se resultados mais homogéneos, contudo percebesse o mesmo padrão encontrado anteriormente, ou seja independentemente da extração aplicada e da forma da matéria para extração, o solvente 50%EtOH é o mais aproximado para maximizar a extração de flavonoides.

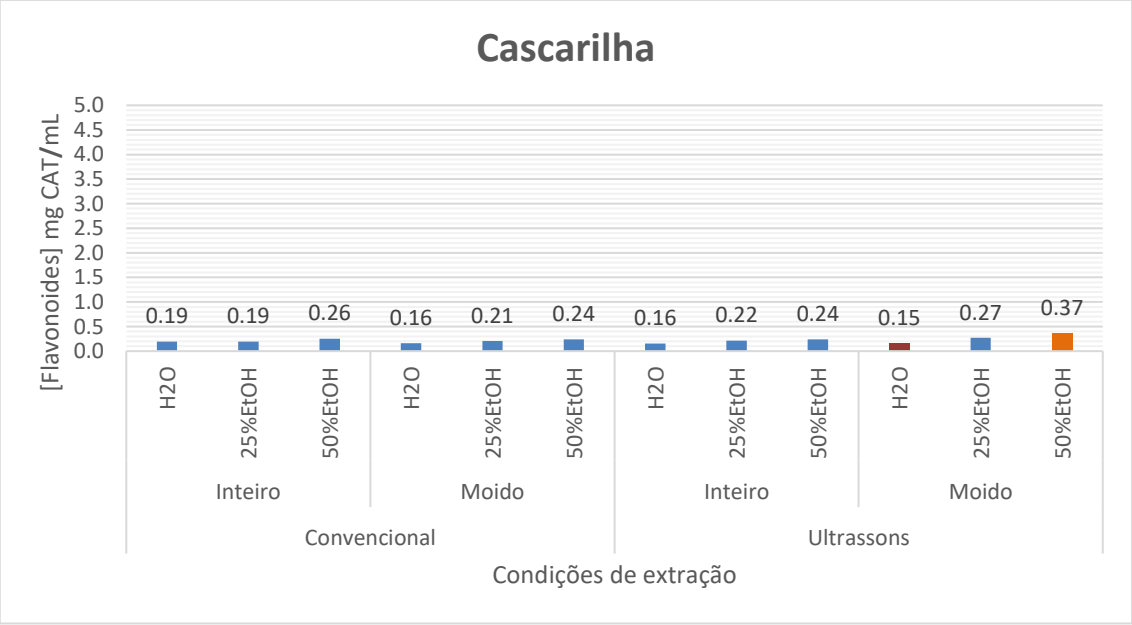

Figura 8- Teor de flavonoides na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Comparativamente com os outros extratos analisados, o valor mais alto para a cascarilha é significativamente mais baixo (0,37 ± 0,16 mg CAT/mL). Neste caso ao contrário do que foi previamente observado, não foi a extração convencional que se destacou, mas sim a extração assistida por ultrassons, apresentando globalmente as maiores concentrações.

Globalmente é possível concluir que para os três tipos de materiais, a água é o solvente menos eficaz na extração de flavonoides, enquanto na maioria dos resultados o solvente mais eficaz foi 50%EtOH, seguido do 25%EtOH.

No que à forma do material vegetal diz respeito, os melhores resultados variam consoante o extrato da planta analisado e o método de extração. Para a hortelã a planta inteira apresenta as maiores concentrações quando comparada com os valores do pó, quer seja na extração convencional que seja na ultrassom. Para o alecrim a conclusão segue no mesmo sentido, mudando apenas o facto de que aqui as maiores concentrações são resultantes da matéria em pó. Já para a cascarilha temos resultados opostos: para a extração convencional o teor de flavonoides é maior com a planta inteira, enquanto na extração ultrassom o teor é mais elevado com a forma de pó.

5.3. Atividade antioxidante

Após a etapa de evaporação dos extratos procedeu-se à análise que permitiu determinar a atividade antioxidante de cada amostra, que foi expressa em termos de IC50 (mg/mL). Relembrando que um IC50 baixo significa que o extrato apresenta uma atividade antioxidante elevada pois este valor traduz a concentração de extrato que inibe 50% do radical DPPH.

Analisados os resultados, a maior atividade antioxidante encontra-se na hortelã, comum valor ≈0,002 µg/mL de extrato. Este número surge de uma extração convencional aplicada ao material vegetal inteiro tendo água como solvente.

Cada um dos gráficos tem assinalado a laranja a concentração de valor mais elevado enquanto a vermelho se encontra destacado o menor valor de concentração.

Através do gráfico que se apresenta na figura abaixo, é claramente visível o destaque que este valor tem do mais baixo, com uma diferença dada por 3,95 µg/mL de extrato (uma diferença entre o valor mais elevado e o mais baixo).

No que diz respeito ao valor mais baixo temos a extração convencional, com a água na hortelã moída com o respetivo valor de 3,96±0,0022µg/mL.

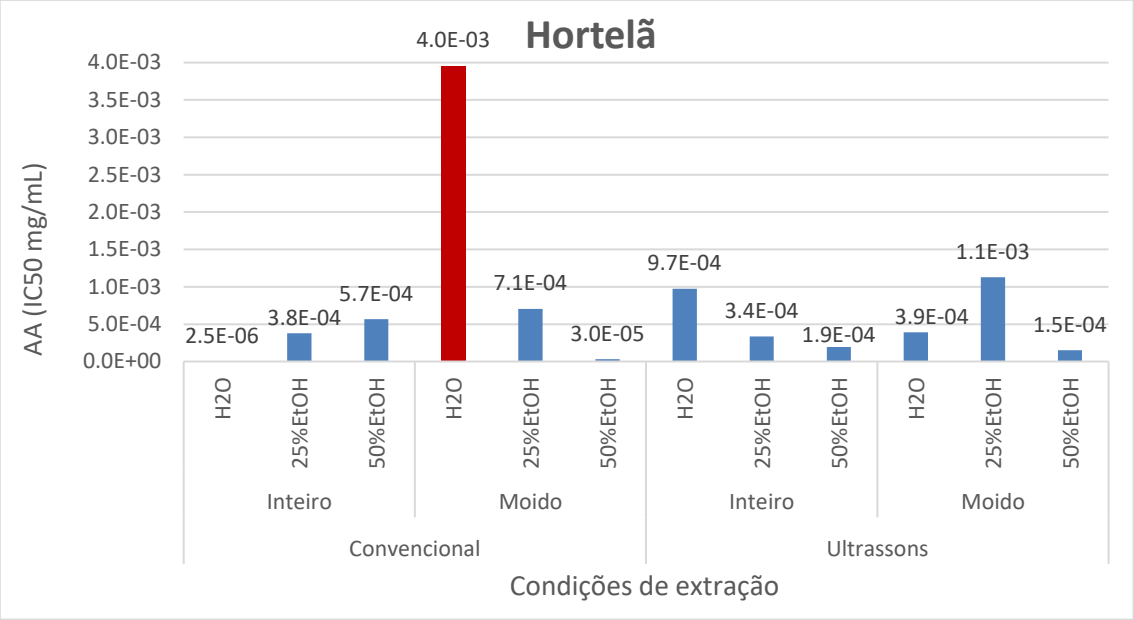

Figura 9- Atividade antioxidante na hortelã. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

No caso do alecrim não existem margens de dúvidas que o método convencional usando 50%EtOH destacou-se no teor de antioxidantes tanto no material vegetal inteiro como no material vegetal moído, com valores muito próximos entre si. Obteve-se assim respetivamente ≈ 0,02 µg/mL de extrato e ≈ 0,022 µg/mL de extrato para cada um destes extratos (inteiro e moído).

Tendo em conta que o teor mais alto é dado por 0,02±0,001 µg/mL e o mais baixo dado por ≈1,413µg/mL de extrato a diferença de valores entre este dois extremos é substancial.

Contudo, apesar do notório destaque que um método tem sobre os outros, é possível concluir que 50%EtOH foi o solvente de maior sucesso, alcançando em cada condição de extração o maior teor de antioxidantes.

Já aquele se que se revelou o menos eficiente foi a solvente água, apresentamos todos os valores mais baixos.

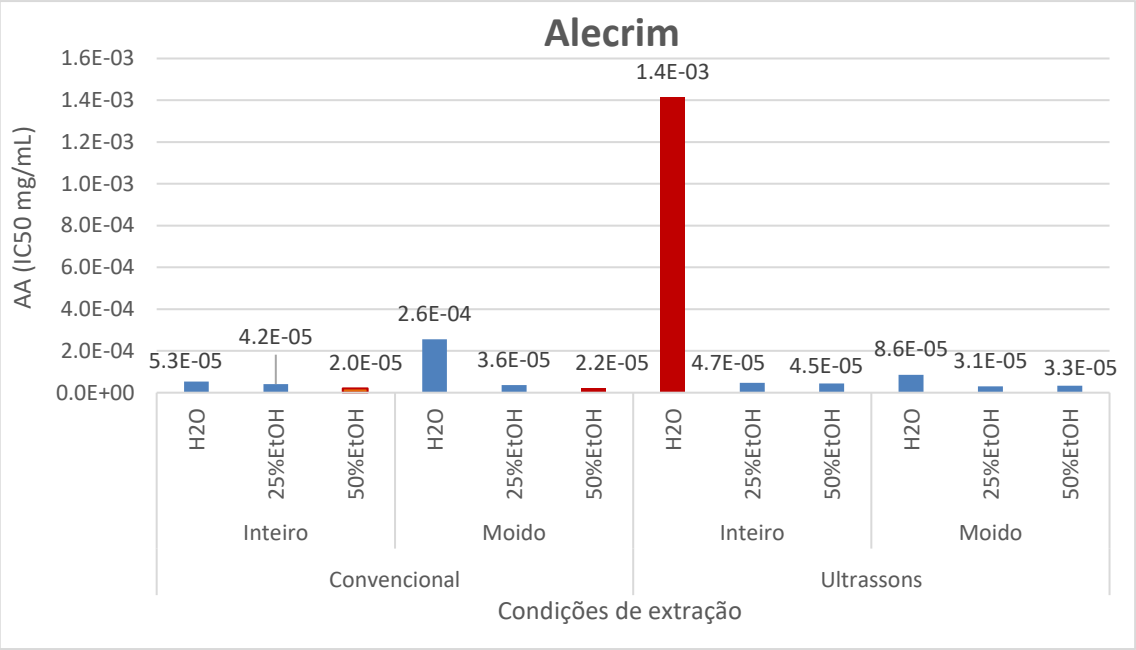

Figura 10- Atividade antioxidante no alecrim. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

Para a cascarilha esta possui o terceiro valor de antioxidantes mais elevados das três matérias analisadas, com 0,00025 ± 0,00002 mg/mL.

Para cada tipo de extração e forma da matéria vegetal (inteira ou em pó), é o solvente 50%etOH, seguido do solvente 25%EtOH, que conseguiu extrair o maior teor de antioxidantes, tendo valores que se destacam bastante dos outros solventes.

Relativamente à forma da cascarilha, foi a inteira que teve melhor rendimento de extração nas duas condições de extração.

Comparativamente à hortelã e ao alecrim não existe uma disparidade de resultados tão grande, sendo possível estabelecer algumas relações tais como: a água foi o pior solvente em conjugação com a forma inteira, seguida da forma moída.

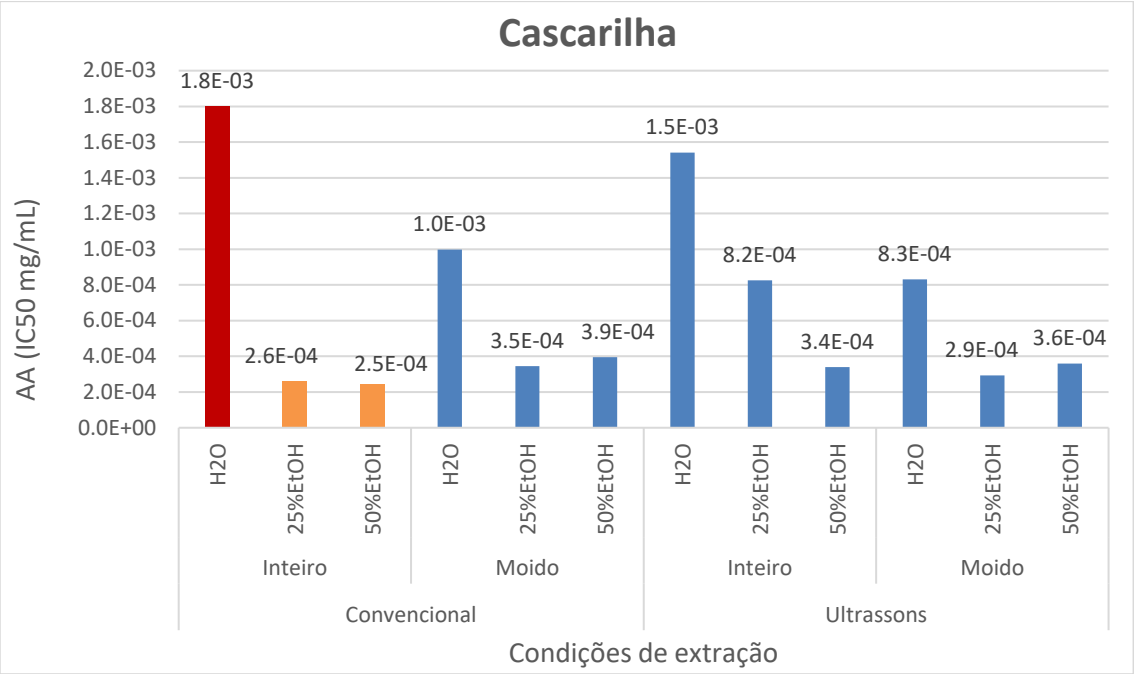

Figura 11- Atividade antioxidante na cascarilha. Barra laranja - concentração mais elevada; Barra vermelha – concentração mais baixa.

6. Conclusões

Os métodos de extração aplicados à obtenção de extratos bioativos evoluíram ao longo dos anos, impulsionados pela necessidade de eficácia e diminuição do tempo de resposta, mas que ao mesmo tempo sejam capazes de garantir a qualidade dos produtos obtidos.

Considerando-se as mais variadas aplicações de extratos na indústria cosmética, os métodos de extração e análise aplicados desempenham um papel importante, garantindo a qualidade dos produtos finais, pois são estes que permitem determinar e quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e antioxidantes, entre outros.

Das três matrizes vegetais estudadas (hortelã, alecrim e cascarilha de café) a que mais se destacou em termos de concentração em compostos fenólicos e flavonoides foi a hortelã. Apesar de haver variações entre as concentrações obtidas para o teor de compostos fenólicos entre as matrizes, os valores médios não são muito discrepantes. O mesmo já não acontece para o caso dos flavonoides, que são significativamente mais elevados para o caso das ervas aromáticas do que para o caso do subproduto estudado.

Na recuperação dos compostos fenólicos do alecrim e da cascarilha, o método de extração que se mostrou mais eficaz foi a extração convencional (banho-maria a 50 °C com agitação, durante 4h), com a exceção para o caso da hortelã em que a extração ultrassom se mostrou mais eficaz. Aquele que se revelou na generalidade o melhor solvente foi 50%EtOH. Relativamente à forma do material vegetal, quando aplicado o método de extração convencional parece que este parâmetro não tem influência nos resultados, no entanto, no caso no método de extração assistida por ultrassons o material moído contribuiu positivamente para a extração destes compostos.

Para a análise do teor de flavonoides o método de extração assistida por ultrassons foi globalmente o mais eficiente. No que diz respeito ao solvente na maioria dos resultados o mais eficaz foi o 50%EtOH, seguido do 25%EtOH, enquanto a água revelou ser o pior.

Relativamente à atividade antioxidante, temos a extração convencional com os melhores resultados, enquanto que como solvente temos o 50%EtOH seguido do 25%EtOH.

Podemos concluir que de entre os tipos de extração estudadas neste trabalho, a extração assistida por ultrassons revelou ser a mais promissora, não só pelos resultados obtidos, como também pelas vantagens operacionais que apresenta, sendo que a mais importante é a diminuição do tempo de extração. Esta diferença não só permite realizar mais extrações como também permite um aumento da extração de compostos bioativos. Convém realçar que para a aplicação deste tipo de extração é conveniente que a matriz vegetal esteja moída.

No que diz respeito aos solventes, a resposta seria igualmente clara, a utilização do solvente 50%EtOH revelou-se a opção mais viável para a extração de fenólicos e flavonoides, o que também se traduz numa maior atividade antioxidante.

Globalmente a melhor forma da matéria vegetal a utilizar foi o pó, isto pode estar relacionado com o facto de durante o processo de trituração da planta as células vegetais são mais expostas e, por conseguinte, quando aplicado o método assistido por ultrassons promove um aumento da extração para o caso da matéria moída. No entanto, para se comprovar esta possibilidade teriam que ser realizados mais estudos.

Bibliografia

Al-Amri, S. M. (2021). Response of growth, essential oil composition, endogenous hormones and microbial activity of Mentha piperita to some organic and biofertilizers agents. *Saudi Journal of Biological Sciences*. https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.06.094

Andrade, J. M., Faustino, C., García, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2016). R.O 15.pdf. *Future Science*, *4*.

Andreo, D., & Jorge, N. (2006). *Antioxidantes naturais: técnicas de extração denise andreo* neuza jorge***. 319–336.

Aziz, E., Batool, R., Akhtar, W., Shahzad, T., Malik, A., Shah, M. A., Iqbal, S., Rauf, A., Zengin, G., Bouyahya, A., Rebezov, M., Dutta, N., Khan, M. U., Khayrullin, M., Babaeva, M., Goncharov, A., Shariati, M. A., & Thiruvengadam, M. (2021). Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications. *South African Journal of Botany*. https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.09.026

Bellumori, M., Innocenti, M., Binello, A., Boffa, L., Mulinacci, N., & Cravotto, G. (2016). Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound-and microwave-assisted extraction procedures. *Comptes Rendus Chimie*, *19*(6), 699–706. https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.013

Bessada, S. M. F., Alves, R. C., Beatriz, M., & Oliveira, P. P. (n.d.). *cosmetics Coffee Silverskin: A Review on Potential Cosmetic Applications*. https://doi.org/10.3390/cosmetics5010005

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(5), 1338–1343. https://doi.org/10.1021/jf034974x

Cardoso, I. C., PEREIRA, H. M. G., TAPPIN, M. R. R., & BEHRENS, M. D. (2017). Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de Alpinia zerumbet. *Revista Fitos*, *11*, 62–68. https://doi.org/10.5935/2446-4775.20170016

Casagrande, M., Sartor, M., Gomes, V., Della, V., Hotza, D., & Oliveira, A. (2008). Reaproveitamento de Resíduos Sólidos Industriais: Processamento e Aplicações no Setor Cerâmico. *Cerâmica Industrial*, *13*(January), 34–42.

Castro-Gómez, P., Rodríguez-Alcalá, L. M., Monteiro, K. M., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E., & Fontecha, J. (2016). Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions isolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines. *Food Chemistry*, *212*, 695–702. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.06.030

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, *91*(1), 107–110. https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011

Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, *53*, 350–357. https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.01.006

Das, I., & Arora, A. (2021). Kinetics and mechanistic models of solid-liquid extraction of pectin using advance green techniques- a review. *Food Hydrocolloids*, *120*, 106931. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106931

Deflaoui, L., Setyaningsih, W., Palma, M., Mekhoukhe, A., & Tamendjari, A. (2021). Phenolic compounds in olive oil by solid phase extraction – Ultra performance liquid chromatography – Photodiode array detection for varietal characterization. *Arabian Journal of Chemistry*, *14*(4), 103102. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.103102

El Hassani, F. Z. (2020). Characterization, activities, and ethnobotanical uses of Mentha species in Morocco. *Heliyon*, *6*(11), e05480. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E05480

Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*(2), 488–495. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028

Freitas, L. C., Barbosa, J. R., da Costa, A. L. C., Bezerra, F. W. F., Pinto, R. H. H., & Carvalho Junior, R. N. de. (2021). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? *Resources, Conservation and Recycling*, *169*, 105466. https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2021.105466

Gholamipourfard, K., Salehi, M., & Banchio, E. (2021). Mentha piperita phytochemicals in agriculture, food industry and medicine: Features and applications. *South African Journal of Botany*, *141*(May), 183–195. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.014

Giannenas, I., Sidiropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2020). The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*, 1–18. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7

Hoseini, M., Cocco, S., Casucci, C., Cardelli, V., & Corti, G. (2021). Coffee by-products derived resources. A review. *Biomass and Bioenergy*, *148*, 106009. https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2021.106009

Juana, F. L., Angel, P. A. J., & Manuel, V. M. (2012). Beneficial health effects of bioactive compounds present in spices and aromatic herbs. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 37, pp. 115–134). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00004-3

Kazibwe, Z., Kim, D. H., Chun, S., & Gopal, J. (2017). Ultrasonication assisted ultrafast extraction of Tagetes erecta in water: cannonading antimicrobial, antioxidant components. *Journal of Molecular Liquids*, *229*, 453–458. https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2016.12.044

Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, *81*(3), 321–326. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of Mentha species: A review. *Industrial Crops and Products*, *34*(1), 802–817. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.019

Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, *1635*, 461770. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461770

Lopes, R. M., Toledo De Oliveira, T., & Nagem, T. J. (2017). Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 18–22.

Macedo, L. M. De, Mendes, É., Milit, L., Tundisi, L. L., Souto, E. B., & Mazzola, P. G. (2020). *plants Rosemary (Rosmarinus o ffi cinalis L ., syn Salvia A Review*. 1–12.

Marcucci, M. C., Salatino, A., De Magalhães Oliveira, L. F. A., & Gonçalves, C. P. (2021). Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis. *Revista Virtual de Quimica*, *13*(1), 61–73. https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200131

Mármol, I., Quero, J., Ibarz, R., Ferreira-Santos, P., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. R., Pérez-Fernández, M., García-Juiz, S., Osada, J., Martín-Belloso, O., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Valorization of agro-food by-products and their potential therapeutic applications. *Food and Bioproducts Processing*, *128*, 247–258. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.06.003

Meregalli, M. M., Puton, B. M. S., Camera, F. D. M., Amaral, A. U., Zeni, J., Cansian, R. L., Mignoni, M. L., & Backes, G. T. (2020). Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (Psidium cattleianum Sabine). *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(6), 5800–5809. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.04.017

Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(5), 661–672. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-

z

Narita, Y., & Inouye, K. (2014). Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*, *61*, 16–22. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.01.023

Nieto, G., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2012). Administration of distillate thyme leaves into the diet of Segureña ewes: effect on lamb meat quality. *Animal*, *6*(12), 2048–2056. https://doi.org/10.1017/S1751731112001012

Ninla Elmawati Falabiba. (2019). *済無No Title No Title No Title*.

Nour, V., Trandafir, I., & Cosmulescu, S. (2017). Bioactive compounds, antioxidant activity and nutritional quality of different culinary aromatic herbs. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *45*(1), 179–184. https://doi.org/10.15835/nbha45110678

Nzekoue, F. K., Angeloni, S., Navarini, L., Angeloni, C., Freschi, M., Hrelia, S., Vitali, L. A., Sagratini, G., Vittori, S., & Caprioli, G. (2020). Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Research International*, *133*(September 2019). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109128

Oliveira, J. R. De, Esteves, S., & Camargo, A. (2019). Rosmarinus officinalis L . (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, *8*, 1–22.

Pandey, A. K., Kumar, P., Saxena, M. J., & Maurya, P. (2020). Distribution of aromatic plants in the world and their properties. *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*, 89–114. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00006-6

Pilar, D., & Gomes, T. (2020). *Cosmecêuticos e Sustentabilidade : reaproveitamento de subprodutos alimentares*.

Pintado, & Teixeira. (2015). Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim de Biotecnologia*, 10–12.

Rodrigues, F., da Mota Nunes, M. A., & Pinto Oliveira, M. B. P. (2017). Applications of recovered bioactive compounds in cosmetics and health care products. In *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management* (pp. 255–274). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00012-1

Rodrigues, F., Palmeira-De-Oliveira, A., Das Neves, J., Sarmento, B., Amaral, M. H., Beatriz, M., & Oliveira, P. P. (2015). Coffee silverskin: A possible valuable cosmetic ingredient. *John M. Pezzuto Pharm Biol*, *53*(3), 386–394. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.922589

Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, *109*(1),

98–103. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.09.029

Schmid, M., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2016). Evaluation of food grade solvents for lipid extraction and impact of storage temperature on fatty acid composition of edible seaweeds Laminaria digitata (Phaeophyceae) and Palmaria palmata (Rhodophyta). *Food Chemistry*, *208*, 161–168. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.123

Siqueira, P., I1, M., Boone, K., Ana, B. I., Tiveron, P., Adna, I., Massarioli, P., Luiza, T., Oldoni, C., Mauro, I., Zanus, C., Giuliano, I., Pereira, E., Severino, I., & De Alencar, M. (2011). Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. *Ciência Rural*, *41*(6), 1088–1093. http://producao.usp.br/handle/BDPI/4619

Soares, M., Welter, L., Kuskoski, E. M., Gonzaga, L., & Fett, R. (2008). Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *30*(1), 59–64. https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000100013

Sueishi, Y., Sue, M., & Masamoto, H. (2018). Seasonal variations of oxygen radical scavenging ability in rosemary leaf extract. *Food Chemistry*, *245*(August 2017), 270–274. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.085

Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, *133*, 58–64. https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2017.09.025

Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 159–178. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.09.002

Zhao, B., Wang, H., Xu, S., Qian, L., Li, H., Gao, J., Zhao, G., Ray, M. B., & Xu, C. C. (2022). Influence of extraction solvents on the recovery yields and properties of bio-oils from woody biomass liquefaction in sub-critical water, ethanol or water–ethanol mixed solvent. *Fuel*, *307*(June 2021), 121930. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121930

Anexos

Anexo I

Tabelas do teor de compostos fenólicos no material vegetal pelo método de extração convencional e ultrassom

Tabela 2- Teor de compostos fenólicos da hortelã

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Fenólicos] mg AG / mL	
				Média	Desvio padrão
Hortelã	Convencional	Inteiro	H2O	1.73	0.15
			25%EtOH	3.79	0.17
			50%EtOH	2.79	0.15
		Moido	H2O	3.59	0.71
			25%EtOH	2.70	0.15
			50%EtOH	2.98	0.11
	Ultrassons	Inteiro	H2O	2.42	0.42
			25%EtOH	2.44	0.44
			50%EtOH	2.63	0.47
		Moido	H2O	5.14	0.41
			25%EtOH	3.88	0.42
			50%EtOH	3.84	0.41

Tabela 3- Teor de compostos fenólicos do alecrim

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Fenólicos] mg AG / mL	
				Média	Desvio padrão
Alecrim	Convencional	Inteiro	H2O	2.48	0.69
			25%EtOH	3.31	0.48
			50%EtOH	3.55	0.91
		Moido	H2O	2.59	0.14
			25%EtOH	3.55	1.08
			50%EtOH	2.89	0.54
	Ultrassons	Inteiro	H2O	1.04	0.03
			25%EtOH	1.45	0.29
			50%EtOH	1.14	0.02
		Moido	H2O	1.38	0.06
			25%EtOH	2.47	0.06
			50%EtOH	2.55	0.58

Tabela 4-Teor de compostos fenólicos da cascarilha

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Fenólicos] mg AG / mL	
				Média	Desvio padrão
Cascarilha	Convencional	Inteiro	H2O	1.84	0.02
			25%EtOH	2.23	0.54
			50%EtOH	3.77	0.42
		Moido	H2O	1.02	0.23
			25%EtOH	2.13	0.17
			50%EtOH	2.83	0.36
	Ultrassons	Inteiro	H2O	1.56	0.07
			25%EtOH	1.27	0.18
			50%EtOH	2.03	0.88
		Moido	H2O	0.90	0.15
			25%EtOH	1.51	0.40
			50%EtOH	1.57	0.27

Anexo II

Tabelas do teor de compostos flavonoides no material vegetal pelo método de extração convencional e ultrassom

Tabela 5- Teor de compostos flavonoides na hortelã

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Flavonoides] mg CAT / mL	
				Média	Desvio padrão
Hortelã	Convencional	Inteiro	H2O	1.96	0.03
			25%EtOH	3.14	0.29
			50%EtOH	4.02	0.40
		Moido	H2O	1.41	0.25
			25%EtOH	2.60	0.14
			50%EtOH	3.42	0.81
	Ultrassons	Inteiro	H2O	2.62	0.36
			25%EtOH	2.59	0.12
			50%EtOH	3.66	0.55
		Moido	H2O	1.40	0.16
			25%EtOH	2.92	0.24
			50%EtOH	3.62	0.81

Tabela 6- Teor de compostos flavonoides no alecrim

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Flavonoides] mg CAT / mL	
				Média	Desvio padrão
Alecrim	Convencional	Inteiro	H2O	1.09	0.07
			25%EtOH	1.42	0.04
			50%EtOH	1.78	0.15
		Moido	H2O	0.80	0.12
			25%EtOH	1.82	0.41
			50%EtOH	1.86	0.04
	Ultrassons	Inteiro	H2O	0.06	0.01
			25%EtOH	0.11	0.05
			50%EtOH	0.33	0.14
		Moido	H2O	0.81	0.06
			25%EtOH	1.53	0.06
			50%EtOH	0.84	0.10

Tabela 7- Teor de compostos flavonoides na cascarilha

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	[Flavonoides] mg CAT / mL	
				Média	Desvio padrão
Cascarilha	Convencional	Inteiro	H2O	0.19	0.02
			25%EtOH	0.19	0.02
			50%EtOH	0.26	0.02
		Moido	H2O	0.16	0.02
			25%EtOH	0.21	0.01
			50%EtOH	0.24	0.04
	Ultrassons	Inteiro	H2O	0.16	0.00
			25%EtOH	0.22	0.01
			50%EtOH	0.24	0.03
		Moido	H2O	0.15	0.01
			25%EtOH	0.27	0.03
			50%EtOH	0.37	0.16

Anexo III

Tabelas da atividade antioxidante do alecrim pelo método de extração convencional e ultrassom

Tabela 8-Atividade antioxidante na hortelã

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	AA (IC50 mg/mL)	
				Média	Desvio padrão
Hortelã	Convencional	Inteiro	H2O	0.000002	0.000008
			25%EtOH	0.000380	0.000635
			50%EtOH	0.000565	0.000931
		Moido	H2O	0.003957	0.002204
			25%EtOH	0.000706	0.001202
			50%EtOH	0.000030	0.000010
	Ultrassons	Inteiro	H2O	0.000974	0.001394
			25%EtOH	0.000336	0.000309
			50%EtOH	0.000193	0.000300
		Moido	H2O	0.000392	0.000315
			25%EtOH	0.001128	0.000765
			50%EtOH	0.000149	0.000106

Tabela 9- Atividade antioxidante no alecrim

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	AA (IC50 mg/mL)	
				Média	Desvio padrão
Alecrim	Convencional	Inteiro	H2O	0.000053	0.000015
			25%EtOH	0.000042	0.000003
			50%EtOH	0.000020	0.000001
		Moido	H2O	0.000255	0.000062
			25%EtOH	0.000036	0.000003
			50%EtOH	0.000022	0.000001
	Ultrassons	Inteiro	H2O	0.001413	0.002133
			25%EtOH	0.000047	0.000008
			50%EtOH	0.000045	0.000022
		Moido	H2O	0.000086	0.000002
			25%EtOH	0.000031	0.000007
			50%EtOH	0.000033	0.000019

Tabela 10- Atividade antioxidante na cascarilha

Material vegetal	Método de extração	Forma	Solventes	AA (IC50 mg/mL)	
				Média	Desvio padrão
Cascarilha	Convencional	Inteiro	H2O	0.00180	0.00035
			25%EtOH	0.00026	0.00003
			50%EtOH	0.00025	0.00002
		Moido	H2O	0.00100	0.00025
			25%EtOH	0.00035	0.00002
			50%EtOH	0.00039	0.00001
	Ultrassons	Inteiro	H2O	0.00154	0.00083
			25%EtOH	0.00082	0.00081
			50%EtOH	0.00034	0.00002
		Moido	H2O	0.00083	0.00064
			25%EtOH	0.00029	0.00002
			50%EtOH	0.00036	0.00006