



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA BEATRIZ DOS SANTOS VIEIRA NOVAES INFANTE

Otimização da extração assistida por ultrassom das substâncias bioativas de
***Passiflora cincinnata* utilizando metodologias de superfícies de resposta**

JEQUIÉ – BAHIA
NOVEMBRO DE 2024

ANA BEATRIZ DOS SANTOS VIEIRA NOVAES INFANTE

**Otimização da extração assistida por ultrassom das substâncias bioativas de
Passiflora cincinnata utilizando metodologias de superfícies de resposta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Burno Oliveira Moreira

**JEQUIÉ – BAHIA
NOVEMBRO DE 2024**

I43o Infante, Ana Beatriz dos Santos Vieira Novaes.
Otimização da extração assistida por ultrassom das substâncias
bioativas de *Passiflora cincinnata* utilizando metodologias de superfícies
de resposta / Ana Beatriz dos Santos Vieira Novaes Infante.- Jequié, 2024.
93f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob orientação da Prof.
Dr. Burno Oliveira Moreira)

1.Maracujá do mato 2.Flavonoides 3.Planejamento de misturas
4.Planejamento PlackettBurman 5.Matriz de Doehlert 6.Atividade
antioxidante 7.Atividade antimicrobiana I.Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 634 425

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA BEATRIZ DOS SANTOS VIEIRA NOVAES

“Otimização de Extração Assistida por Ultrassom das Substâncias Bioativas de *Passiflora Cincinnata* Utilizando Metodologias de Superfície de Resposta”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO OLIVEIRA MOREIRA**
Data: 25/11/2024 10:04:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (UFBA, Salvador –
BA, 2014) (Orientador)**

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS DE ALMEIDA BEZERRA**
Data: 24/11/2024 15:11:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra (UFBA, Salvador –
BA, 2006)**

Documento assinado digitalmente
 **ANAILDES LAGO DE CARVALHO**
Data: 23/11/2024 10:50:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profª. Drª. Anaildes Lago Carvalho (UFBA,
Salvador – BA, 2014)**

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em ____/____/____

Para Gabriela Gomes, *in memoriam*. “Disse-lhe Jesus: ‘Eu sou a ressurreição e a vida. Aquele que crê em mim, ainda que morra, viverá; e quem vive e crê em mim, não morrerá eternamente.’”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas suas misericórdias que se renovam toda manhã. Pelo seu amor tão terno e tão profundo. Agradeço ao meu marido por ser meu porto seguro, minha certeza de todos os dias, meu ombro amigo, minha alegria e minha paz. Aos meus pais, Anísio e Elisabete que, sob muito sol, me fizeram chegar até aqui, na sombra. Eles são minha base, minha formação, minha fundação. Agradeço a minha avó Elita, tão querida, cheia de bravura, de coragem e, ao mesmo tempo, cheia de amor. Com ela aprendi a servir de verdade. Aos meus irmãos, Gabriel, Felipe, Flávia, Rafael e Marco Antônio. Como é bom poder compartilhar a vida com vocês. Aos meus sogros, Lineu e Priscilla, por terem me recebido com tanto amor em sua família e também a Eduardo, que me tolera e me ama. Agradeço também as minhas tias e primas, tão essenciais para fazer minha vida mais alegre e mais leve, em especial a Ângela (Bel), tia Nilde, tia Toi, tia Dui, tia Gal, Raissa e Geovana.

Aos meus amigos tão chegados quanto irmãos, Rute, Andressa, Inanda, Arthur, Paulinha, Denysson, Beatriz Maia, Samuel, Lucas, ora perto, ora longe, mas sempre presentes em minha vida e meu coração. Vocês são a doçura e o tempero da minha vida.

Ao meu querido orientador, Bruno Moreira. Existem muitos doutores pelo Brasil, cheios de conhecimento, mas ele possui uma característica que poucos têm (além, é claro, da inteligência extraordinária): humanidade. Em todo esse período ele me ensinou mais do que química e práticas laboratoriais. Me ensinou a ser paciente, ao ter paciência comigo; me ensinou a ensinar, ao parar sua rotina para me ensinar coisas pequenas; me ensinou que competência e inteligência são sim importantes, mas se tornam banais quando não há empatia e compreensão. A jornada para obter o título de mestre não é fácil, mas com certeza, se torna menos difícil quando temos pessoas bondosas para nos ajudar na jornada.

Agradeço aos meus queridos colegas e amigos de laboratório. Lucas Duque, Cindy, Luise, Geovana, Carlos, Ícaro Tuyá, Fernanda, Rafael, Louise, Nilma, Flávio, Ícaro Assunção, e tantos outros que me ajudaram em diversos momentos. Não se anda só, e eu com certeza tive muita sorte ao ser tão bem acompanhada. Vocês fizeram a UFBA se tornar um local especial na minha vida. Agradeço também a Iran, que me acompanha desde a graduação, e que eu adotei como irmão mais novo.

Não poderia deixar de reservar um parágrafo apenas para ela, que foi minha primeira “professora” de laboratório, e em pouco tempo se tornou uma amiga querida. Sinto que não pude demonstrar a Gabi todo o amor e carinho que ela merecia enquanto estava entre nós. Nunca vou me esquecer dos nossos momentos de almoço, das conversas inapropriadas no laboratório, das confissões de duas cristãs que ainda estavam aprendendo, mesmo depois de anos de conversão, a servir a Deus. Meu coração repousa em saber que ela se encontra nesse momento nos braços do Criador dos céus e da terra. Minha gratidão estará para sempre com você, Gabriela Gomes.

Agradeço a todos os técnicos da UFBA, em especial, Robson e Cláudio. Aos professores da UESB, especialmente Profª Vanda e Profº Cléber, e aos professores que aceitaram o desafio de compor a minha banca, Profª Anaildes e Profº Marcos Bezerra. Meus mestres possuem um espaço especial no meu coração, e cada passo que eu dei foi sob a proteção e orientação deles.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram com essa jornada, de forma direta ou indireta. Will e João, que me recebiam todos os dias na UFBA; Paulinne, Catarina, Jayne, Laryana, “vizinhas” queridas. A todos os estudantes do estágio supervisionado, que fizeram de mim uma profissional melhor. A todos os meus alunos do CIEB, que me estressam e me enchem de amor, simultaneamente.

“No final do caminho me dirão: ‘E tu, viveste? Amaste?’ E eu, sem dizer nada, abrirei o coração cheio de nomes”.

“No princípio, criou Deus os céus e a terra. E disse Deus: Produza a terra relva, ervas que deem semente e árvores frutíferas que deem fruto segundo a sua espécie, cuja semente esteja nele, sobre a terra. E assim se fez. E viu que isso era bom.”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Flor e folhas de <i>Passiflora cincinnata</i>	14
Figura 2 – Casca e polpa de <i>Passiflora cincinnata</i>	31
Figura 3 – Cromatograma do extrato com as substâncias identificadas por CLAE-DAD.....	39
Figura 4 – Estrutura das substâncias identificadas. (A) Ácido Cafeico; (B) Ácido Clorogênico; (C) Ácido Cumárico; (D) Ácido Gálico; (E) Rutina; e (F) Vitexina.....	39
Figura 5 – Gráfico do estudo do solvente utilizado no preparo da amostra para injeção no CLAE..	42
Figura 6 – Avaliação do tempo de sonicação na solubilização da amostra para injeção no CLAE..	43
Figura 7 – Gráfico da avaliação do tempo de centrifugação na solubilização da amostra para injeção no CLAE.....	44
Figura 8 – Superfície de resposta para o planejamento de mistura.....	47
Figura 9 – Contorno de superfície para o planejamento de mistura.....	48
Figura 10 – Coeficientes obtidos para o planejamento de mistura.....	48
Figura 11 – Gráficos de efeito de um fator para o planejamento Plackett-Burman.....	55
Figura 12 – Relação dos valores preditos <i>versus</i> experimentais.....	61
Figura 13 – Gráfico de Box-Cox.....	62
Figura 14 – Gráficos de contorno para a resposta múltipla (RM) da EAU das folhas de <i>P. cincinnata</i> , em função de (A) potência e temperatura do banho, (B) potência e tempo de EAH, (C) temperatura do banho e tamanho da partícula, (D) temperatura do banho e tempo de EAH, (E) tempo de EAH e tamanho da partícula e (F) potência e tamanho da partícula.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação do solvente utilizado no preparo da solução.....	24
Tabela 2 – Avaliação do tempo de sonicação.....	24
Tabela 3 – Avaliação do tempo de centrifugação.....	24
Tabela 4 – Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide.....	25
Tabela 5 – Fatores avaliados no planejamento Plackett-Burman (PPB) para otimização multivariada do processo de extração.....	26
Tabela 6 – Matriz experimental do Planejamento Plackett-Burman (PPB).....	28
Tabela 7 – Variáveis e níveis codificados e valores reais utilizados na Matriz de Doehlert (MD)....	29
Tabela 8 – Matrizes Doehlert codificada para as quatro variáveis independentes estudadas.....	30
Tabela 9 – Equação de regressão, coeficientes de determinação, faixas de linearidade, LOD e LOQ das substâncias bioativas investigadas.....	41
Tabela 10 – Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide e resultados obtidos como resposta múltipla.....	46
Tabela 11 – Análise dos modelos avaliados.....	49
Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento de misturas simplex-centroide..	49
Tabela 13 – Resultados obtidos como resposta múltipla para o planejamento Plackett-Burman (PPB).....	52
Tabela 14 – Tabela ANOVA para o planejamento Plackett-Burman (PPB).....	53
Tabela 15 – Níveis fixados para variáveis não significativas de acordo os resultados do PPB.....	57
Tabela 16 – Fatores otimizados por meio da Matriz de Doehlert (MD).....	57
Tabela 17 – Matriz experimental e respostas múltiplas da Matriz de Doehlert (MD).....	58
Tabela 18 – Análise de Variância (ANOVA) para a Matriz de Doehlert (MD).....	60
Tabela 19 – Valores codificados e reais do ponto ótimo da Matriz de Doehlert.....	66
Tabela 20 – Concentrações das substâncias identificadas.....	67
Tabela 21 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste do DPPH com os extratos de <i>P. cinnamomum</i> obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.....	70
Tabela 22 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste do β -caroteno com os extratos de <i>P. cinnamomum</i> obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.....	71
Tabela 23 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste da capacidade antioxidante total (CAT) - complexação do fosfomolibdênio no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.....	72
Tabela 24 – Teor de fenólicos totais (TPC) expresso em $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ dos extratos de <i>P. cinnamomum</i> obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.....	73
Tabela 25 – Teor de flavonoides totais (TFT) expresso em $\text{mg EQ} \cdot \text{g}^{-1}$ dos extratos de <i>P. cinnamomum</i> obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.....	75
Tabela 26 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de diferentes partes de <i>Passiflora cinnamomum</i> para <i>S. mutans</i> ATCC 700610 e ATCC 25175 e <i>S. sobrinus</i> 6715...	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CA	Capacidade Antioxidante
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CE₅₀	Concentração Efetiva Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variância
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EAH	Extração Assistida por Homogeneização
EAM	Extração Assistida por Microondas
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
EFS	Extração com Fluido Supercrítico
EQ	Equivalentes de Quercetina
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
FrPO	Extrato das Flores no Ponto Ótimo
FPO	Extrato das Folhas no Ponto Ótimo
FPOA	Extrato das Folhas no Ponto Ótimo sem Ultrassom com Aquecimento
FPOS	Extrato das Folhas no Ponto Ótimo sem Ultrassom sem Aquecimento
GL	Graus de Liberdade
GPO	Extrato dos Galhos no Ponto Ótimo
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
L/S	Razão Líquido/Sólido
MD	Matriz de Doehlert
MeOH	Metanol
MPFC	Extrato Metanólico das Folhas de <i>Passiflora cincinnata</i>

MRS – Metodologia de Superfície de Resposta

PBB – Planejamento Box-Behnken

PC – Ponto Central

PM – Planejamento de Mistura

PO – Ponto Ótimo

PPB – Planejamento Plackett-Burman

PPO – Extrato da Polpa no Ponto Ótimo

RM – Resposta Múltipla

RPM – Rotações por Minuto

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TFT – Teor de Flavonoides Totais

TPT – Teor de Fenólicos Totais

Tr – Tempo de Retenção

UV – Ultravioleta

Otimização da extração assistida por ultrassom das substâncias bioativas de *Passiflora cincinnata* por meio de metodologias de superfícies de resposta

Autor: Ana Beatriz dos Santos Vieira Novaes Infante

Orientador: Bruno Oliveira Moreira

Resumo:

Passiflora cincinnata, espécie nativa do Brasil, é utilizada na medicina popular para o tratamento de hipertensão, ansiedade e insônia, propriedades atribuídas à sua rica composição em substâncias fenólicas e flavonoides. Neste estudo, foi desenvolvido um método para identificar e quantificar seis substâncias bioativas, incluindo ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, vitexina e rutina, nas folhas dessa espécie por meio de CLAE-DAD. Para isso, a extração assistida por ultrassom (EAU) dessas substâncias foi otimizada utilizando metodologias de superfícies de resposta (MSR). Nesse processo de otimização, a proporção ideal de solventes foi encontrada por meio de planejamento de mistura, utilizando acetona, água e etanol. A combinação de solventes que maximizou a extração foi 41%, 23% e 36%, respectivamente. Também, foi realizado um planejamento Plackett-Burman (PPB) para identificar as variáveis significativas do processo de extração, seguido pela execução de uma Matriz de Doehlert para otimizar essas variáveis. As variáveis estudadas incluíram o tempo de Extração Assistida por Homogeneização (EAH), a rotação (RPM) da EAH, o tempo de EAU, a temperatura do banho ultrassônico, potência e frequência do ultrassom, razão sólido/líquido e tamanho da partícula. O extrato das folhas obtido nas condições ótimas apresentou concentrações das substâncias avaliadas superiores às relatadas na literatura, com destaque para vitexina e rutina. Além disso, os extratos das folhas, flores, casca, galho e polpa de *P. cincinnata* obtidos nas condições otimizadas foram avaliados quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais, bem como para avaliação de atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. Os extratos testados apresentaram altos teores de fenólicos e flavonoides totais em comparação com dados reportados na literatura. A polpa e as folhas exibiram as atividades antioxidante e antimicrobiana mais pronunciadas. O extrato da polpa apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *Streptococcus mutans*, representando o primeiro relato da atividade antimicrobiana de *P. cincinnata* frente a essa cepa. Esses resultados destacam a eficácia do processo extrativo otimizado e o potencial biotecnológico de *P. cincinnata* como fonte de substâncias bioativas.

Palavras-chave: Maracujá do mato, flavonoides, planejamento de misturas, planejamento Plackett-Burman, Matriz de Doehlert, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Passiflora cincinnata* Using Response Surface Methodologies

Author: Ana Beatriz dos Santos Vieira Novaes Infante

Advisor: Bruno Oliveira Moreira

Abstract:

Passiflora cincinnata, a native species of Brazil, is used in traditional medicine to treat hypertension, anxiety, and insomnia, with properties attributed to its rich composition of phenolic compounds and flavonoids. In this study, a method was developed to identify and quantify six bioactive compounds, including gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, cumaric acid, vitexin, and rutin, from the leaves of this species using High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD). Additionally, these compounds' ultrasound-assisted extraction (UAE) was optimized using response surface methodologies (RSM). A mixture design was conducted to determine the ideal solvent proportions for extraction, using acetone, water, and ethanol. The solvent combination that maximized the extraction was 41%, 23%, and 36%, respectively. A Plackett-Burman design (PBD) was also employed to identify significant variables in the extraction process, followed by implementing a Doehlert matrix to optimize these variables. The studied variables included homogenization-assisted extraction (HAE) time, HAE rotational speed (RPM), UAE time, ultrasonic bath temperature, power and frequency of ultrasound, solid/liquid ratio, and particle size. The leaf extract obtained under optimal conditions showed concentrations of the evaluated compounds that were higher than those reported in the literature, with particular emphasis on vitexin and rutin. Furthermore, the extracts from the leaves, flowers, bark, branches, and pulp of *P. cincinnata*, obtained under optimized conditions, were evaluated for total phenolic and flavonoid contents, as well as antioxidant and antimicrobial activities in vitro. The tested extracts exhibited high levels of phenolics and flavonoids compared to literature data. The pulp and leaves exhibited the most pronounced antioxidant and antimicrobial activities. The pulp extract demonstrated moderate antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, marking the first report of *P. cincinnata*'s antimicrobial activity against this strain. These results highlight the effectiveness of the optimized extraction process and the biotechnological potential of *P. cincinnata* as a source of bioactive compounds.

Keywords: passion fruit, flavonoids, mixture design, Plackett-Burman design, Doehlert matrix, antioxidant activity, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	20
3.2. COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	20
3.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	21
3.4. CURVA ANALÍTICA E QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	22
3.5. RESPOSTA MÚLTIPLA.....	22
3.6. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	23
3.7. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA INJEÇÃO CLAE-DAD.....	24
3.8. PLANEJAMENTO DE MISTURA CENTROIDE SIMPLEX.....	25
3.9. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	26
3.10. PLANEJAMENTO MATRIZ DE DOEHLRET.....	29
3.11. EXTRAÇÃO NO PONTO CRÍTICO.....	31
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
3.13. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
3.13.1. Sequestro de radical livre DPPH.....	33
3.13.2. Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico.....	34
3.13.3. Método fosfomolibdato – Capacidade antioxidante total.....	35
3.14. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TPT).....	35
3.15. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (TFT).....	36
3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
3.16.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37
3.16.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	38
4.2. QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	40
4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA.....	42
4.4. PLANEJAMENTO DE MISTURA CENTROIDE-SIMPLEX.....	45
4.5. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	51
4.7. VERIFICAÇÃO DO MODELO PREVISTO.....	66
4.8. QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS NO PONTO ÓTIMO.....	66
4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	69
4.9.1. Sequestro do radical livre DPPH.....	69
4.9.2. Sistema β -caroteno/ácido linolênico.....	71
4.9.3. Método fosfomolibdato – capacidade antioxidante total.....	72
4.10. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TPT).....	73
4.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (TFT).....	74
4.12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	75
5. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE A.....	86

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L., pertencente à família Passifloraceae, possui mais de 580 espécies identificadas, distribuídas por diversos países de clima tropical, tendo maior destaque na América Latina. No Brasil, é possível encontrar 142 espécies, dentre as quais 82 são endêmicas, localizadas principalmente no Cerrado e na Caatinga; na Bahia, são encontradas 31 espécies (GOMES *et al*, 2017). O nome *Passiflora* advém de “Flor da Paixão”, dado pelos primeiros exploradores europeus, devido a semelhança entre o formato de suas flores e a coroa da paixão de Cristo. Além de flores características, geralmente de cores chamativas, as espécies também são caracterizadas pela disposição da planta, encontrada na forma de trepadeira e arbustos, pela presença de gravinha e pelo seu fruto, que pode ser encontrado em diversas cores, como amarelo, verde, laranja, vermelho e roxo (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Figura 1 – Flor e folhas de *Passiflora cincinnata*.



Fonte: Autoria própria.

Devido ao ambiente, essas plantas se tornaram resistentes à situações de estresse climático, como a falta de água e de nutrientes no solo, e desenvolveram uma grande quantidade de metabólitos secundários, com rica atividade antioxidante. Em virtude das suas propriedades terapêuticas, o gênero é amplamente empregado na medicina tradicional, tanto em comunidades urbanas, quanto rurais e indígenas para o tratamento de condições como ansiedade, insônia e hipertensão (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Além da medicina popular, a *Passiflora* também é utilizada na indústria farmacêutica, tanto na produção de fitoterápicos, quanto na composição de diversos cosméticos, devido a sua rica atividade biológica, que se deve à presença de nutrientes e metabólitos secundários, presentes em

diversas partes da planta, como Ferro, Potássio, Cálcio, fibras, alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos, saponinas, Vitaminas A, C e do complexo B (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Estudos recentes têm demonstrado que os extratos de espécies de *Passiflora* apresentam alta atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2024) e alta concentração de compostos fenólicos totais (SANTANA *et al.*, 2017). Resultados similares foram encontrados por Vo e colaboradores (2023) e Jebli e colaboradores (2024).

Silva e colaboradores (2024) estudaram o efeito citotóxico do extrato de *P. edulis* em células cancerígenas, e encontraram alta eficácia na redução da proliferação dessas células, sem agredir células normais. Em estudos feitos com ratos, os extratos da folha do maracujá amarelo apresentaram atividade antidepressiva, com efeito similar a medicamentos consagrados, como Fluoxetina e Nortriptilina (AYRES *et al.*, 2017).

A espécie de maracujá mais popular e comercializada no Brasil e no mundo é a *Passiflora edulis*, conhecida como maracujá amarelo e utilizada principalmente no preparo de sucos e sobremesas. O maracujá amarelo, também chamado de maracujá azedo, apresenta um maior potencial de comercialização, enquanto o maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) é consumido principalmente na região semiárida do Nordeste, no bioma da Caatinga, de onde ele é nativo (LAVOR *et al.*, 2018). Apesar de ser menos popular no resto do Brasil, o maracujá do mato é mais resistente a perturbações relativas à água e é amplamente utilizado pela população local de forma *in natura*, para o preparo de sucos, geleias, sobremesas e, mais recentemente, na produção de cerveja (ALMEIDA *et al.*, 2024). Além disso, é utilizado pela medicina popular no tratamento de insônia, ansiedade (LEAL *et al.*, 2020) e de inflamações (ALMEIDA *et al.*, 2024).

Dentre os principais compostos químicos dessa espécie, pode-se citar flavonoides, compostos fenólicos e ácidos graxos, tendo sido identificadas substâncias como vitexina, orientina, ácido cafeico (LEAL *et al.*, 2020). Santos *et al.* (2021), identificaram que a *P. cincinnata* apresenta maior concentração de rutina, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido cumárico em comparação com *P. edulis*. Em estudos recentes, têm sido demonstradas as atividades antioxidante (RIBERIRO *et al.*, 2020; GOMES *et al.*, 2022), antimicrobiana (SIEBRA *et al.*, 2018), antinociceptiva e anti-inflamatória (LAVOR *et al.*, 2018).

Autores como Santos *et al.* (2021) reportaram a polpa e a pectina da casca de *Passiflora cincinnata* podem ser utilizadas como fonte de probióticos, fermentados ou não. Gomes *et al.* (2017) investigaram sua atividade antiglicante e inibitória de collagenase e elastase, tendo encontrado resultado similar a padrões de referência para a atividade antiglicante, e efeito protetor contra estresse oxidativo.

A extração de compostos bioativos de plantas é feita, usualmente, por meio de maceração, agitação, aquecimento, refluxo e extração com soxhlet (FANG *et al.*, 2016). Esse tipo de extração, chamada de convencional, além de gastar uma grande quantidade de solventes orgânicos e de tempo, também apresenta como desvantagem a baixa eficiência da extração e alto nível de poluição (MOREIRA *et al.*, 2020). Extrações não-convencionais de substâncias orgânicas têm sido desenvolvidas com o intuito de tornar o processo extrativo mais eficiente e ecológico, tais como extração assistida por ultrassom (EAU), extração assistida por micro-ondas (EAM) e extração com fluido supercrítico (EFS). Dentre elas, a EAU merece destaque por ser uma técnica de fácil reprodução, alta eficiência de extração, baixo consumo de solvente, de energia e de tempo, destacando-se como a mais econômica dentre as técnicas citadas (FANG *et al.*, 2016).

O principal mecanismo de extração por ultrassom é cavitação, processo pelo qual a parede celular é quebrada por meio das ondas sonoras propagadas no meio. Essas ondas geram bolhas de cavitação que, quando rompidas, empregam sobre a célula energia mecânica e térmica, que propiciam o rompimento da parede celular e aumentam a superfície de contato sólido-líquido, resultando em uma extração mais eficiente (FANG *et al.*, 2016).

A fim de se obter o melhor rendimento possível na extração, podem ser empregadas diferentes técnicas de otimização, utilizando ferramentas quimiométricas. Tradicionalmente, os processos de otimização são feitos de forma univariada, isto é, avaliando uma variável por vez, enquanto as outras permanecem constantes. Esse tipo de análise possui como desvantagem o alto número de experimentos, bem como a dificuldade de avaliar a interação entre os fatores. A fim de superar essas limitações, têm sido utilizadas as análises multivariadas, que avaliam múltiplas variáveis ao mesmo tempo por meio de ferramentas matemáticas, fazendo com que o processo de otimização seja mais econômico, ecológico e que o método tenha maior significância estatística (CANDIOTI *et al.*, 2014).

Dentre os processos de otimização, merece destaque a metodologia de superfície de resposta (MRS), aplicada por meio de diversos planejamentos experimentais. A MSR é uma técnica de otimização multivariada com alta eficiência e alto poder de modelagem. Essa técnica combina planejamentos experimentais, análise de regressão matemática e métodos de otimização, tendo em vista descrever de maneira satisfatória o comportamento observado por meio de um modelo matemático (BEZERRA *et al.*, 2008). Na MSR existem dois tipos de variáveis: as dependentes, que são as respostas obtidas, e as variáveis independentes, que são os fatores avaliados. As variáveis independentes podem ser analisadas em diversos níveis, ou seja, em diversos valores experimentais distintos. As variáveis dependentes, ou as respostas, podem ser obtidas de diversas formas, como

concentração de uma substância bioativa, teor de fenólicos ou flavonoides totais, absorvância, sinal analítico etc. (NOVAES *et al.*, 2017).

É possível classificar as variáveis independentes como variáveis de método, que avaliam diferentes fatores relacionados ao método de extração (exemplo: concentração de reagentes, tempo de extração, potência ou frequência empregadas etc.) ou variáveis de mistura, que avaliam a composição da mistura ideal. As variáveis de método podem ser avaliadas por diferentes planejamentos experimentais, como planejamentos de triagem e de otimização, enquanto as variáveis de mistura são avaliadas por meio do planejamento de mistura (NOVAES *et al.*, 2017).

Dentre os planejamentos que analisam variáveis de método, pode-se citar os planejamentos fatoriais completo e fracionário, planejamentos Plackett-Burman, composto central, Box-Behnken e matriz de Doehlert, sendo os três primeiros utilizados com o objetivo de investigar a influência das variáveis no processo de extração e suas interações, e os demais utilizados para verificar os pontos ótimos do domínio experimental estudado (TARLEY *et al.*, 2009). Os planejamentos de triagem são feitos, normalmente, em dois níveis, tendo em vista que seu objetivo não é desenvolver exaustivamente um modelo, apenas identificar os fatores principais, quando existem muitas variáveis independentes sendo avaliadas (SPADI *et al.*, 2021).

O planejamento Plackett-Burman (PPB) foi desenvolvido por R. L. Plackett and J. P. Burman em 1946 na Inglaterra, com o objetivo de reduzir o número de experimentos para planejamentos de dois níveis (PLACKETT; BURMAN, 1946). Em um planejamento fatorial completo de dois níveis e 11 fatores seriam necessários 2.048 experimentos para analisar os 11 efeitos principais e 55 interações de segunda ordem, já em um planejamento Plackett-Burman é possível realizar a mesma análise com apenas 12 experimentos; ele possui uma quantidade total de experimentos múltipla de 4 (AHUJA *et al.*, 2017; PLACKETT, BURMAN, 1946). Por possuir uma menor quantidade de experimentos, o PPB avalia apenas os efeitos principais, isto é, os efeitos diretos de cada fator, sem avaliar os efeitos das interações de segunda ordem entre os fatores (TARLEY *et al.*, 2009).

Após a identificação dos fatores significativos por meio dos planejamentos de triagem, como o planejamento Plackett-Burman, é feita a otimização desses fatores. No processo de triagem são avaliados apenas dois níveis de cada fator e o ponto central, contudo no processo de otimização é possível avaliar mais de dois níveis. Para avaliar cada fator em diferentes níveis, é possível utilizar uma metodologia de superfície de resposta, como a Matriz de Doehlert (MD). Essa metodologia é uma alternativa mais prática e mais econômica em relação aos planejamentos composto central, fatorial completo e Box-Behnken, sem perder a qualidade necessária para o seu uso efetivo. O número de experimentos realizados é dado pela equação $N = k^2 + k + PC$, onde k é o número de variáveis independentes e PC representa as replicatas do ponto central (NOVAES *et al.*, 2017). A

principal vantagem da MD consiste na possibilidade de estudar cada fator em diferentes níveis, ou seja, enquanto um fator X pode ser avaliado em três níveis, o fator Y pode ser avaliado em cinco ou sete níveis (TARLEY *et al.*, 2009).

A utilização de extração assistida por ultrassom (EAU) combinada com MSR tem sido descrita como uma eficiente estratégia para extração e análise de substâncias bioativas de matrizes vegetais (MOREIRA *et al.*, 2020). A otimização do processo extrativo já foi empregada para espécies de *Passiflora* em outros estudos. Santana *et al.* (2017) otimizaram a extração etanólica de *P. edulis*, com os fatores tempo e temperatura de extração e concentração de etanol. A EAU foi otimizada para a polpa (Vo *et al.*, 2024) e casca (Vo *et al.*, 2023) de *P. edulis*, sendo otimizados os fatores razão sólido/líquido, temperatura de extração e potência ultrassônica. A MSR foi empregada na otimização das condições de extração dos compostos fenólicos das sementes de *P. edulis* por Sai-Ut *et al.* (2023), com os fatores razão sólido/líquido e tempo e temperatura de extração.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo geral otimizar a extração assistida por ultrassom das substâncias bioativas de *Passiflora cincinnata* por meio de metodologias de superfícies de resposta, e desenvolver uma metodologia de identificação e quantificação das principais substâncias bioativas por meio de CLAE-DAD. Os objetivos específicos são quantificar o teor de fenólicos totais (TPT), teor de flavonoides totais (TFT) e determinar sua atividade biológica *in vitro*, por meio dos ensaios de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a otimização da EAU por meio de MSR de *P. cincinnata*, de modo que este é o primeiro relato.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a extração assistida por ultrassom das substâncias bioativas de *Passiflora cincinnata* por meio de metodologia de superfície de resposta e determinar sua atividade biológica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico, utilizando CLAE-DAD, visando a caracterização química e quantificação dos flavonoides presentes no extrato obtido através das condições ótimas de extração;
- Otimizar os processos de extração assistida por ultrassom e extração assistida por homogeneização dos flavonoides presentes na *Passiflora cincinnata* usando MSR;
- Avaliar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais nos extratos obtidos através das condições ótimas de extração através da MSR e correlacionar com a atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* nos extratos obtidos através das condições ótimas de extração via a MSR;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* nos extratos obtidos através das condições ótimas de extração obtidas.

3. METODOLOGIA

3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes utilizados no preparo de todos os extratos e nas eluições cromatográficas eram de padrão analítico das marcas Quimex, Synth e Impex. Todas as análises cromatográficas foram operadas por meio do Sistema Shimadzu Prominence (Osaka, Japão) equipado com uma bomba de mistura quaternária de baixa pressão (LC-20AT) e um desgaseificador a vácuo em linha de quatro canais (DGU-20A5) controlado por um módulo de interface CBM20A e detector de arranjo de diodos (DAD, SPD-M20A). Foi utilizada uma coluna Vertical VertiSep GES C18 (4,5x150mm, 5 µm).

A água ultrapura utilizada na extração foi obtida por meio do sistema Milli-Q[®] (Merk Group, Darmstadt, Alemanha). O reagente Folin-Coicalteu utilizado foi obtido da empresa Dinâmica (São Paulo, Brasil). O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) empregado nos ensaios foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), bem como os padrões ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, rutina e vitexina utilizados na identificação cromatográfica.

A extração assistida por ultrassom (EAU) e a homogeneização das amostras foram realizadas usando banho ultrassônico (Elmasonic P, Elma, EUA). Para injeção no CLAE, as amostras foram centrifugadas (Rotofix 32A, Hettich, Alemanha).

3.2. COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (folhas, flores, caule e frutos) de *Passiflora cincinnata* foi coletado no dia 22 de novembro de 2022, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista (14°55'53,00"S e 40°48'32,20"O). A região apresenta uma média de temperatura anual de 21,3 °C e uma pluviosidade média anual de 682,5 mm. Devido à sua altitude

de aproximadamente 900 m, o local possui um microclima classificado como Tropical de Altitude (Lima *et al.*, 2006).

A exsicata foi identificada e depositada no Herbário da Universidade Estadual da Bahia (HUESBVC) sob o número de registro 9957 e o material foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A813A64. Após a coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa a 50 °C por 72 horas. Após a secagem, as diferentes partes da planta (folhas, flores, caule e frutos) foram trituradas individualmente em um liquidificador até a obtenção de pós homogêneos, os quais foram acondicionados em frascos hermeticamente fechados e armazenados em local seco até a realização das análises.

3.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico para identificar e quantificar as substâncias bioativas foi desenvolvido com a Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE), por meio do Sistema Shimadzu Prominence (Osaka, Japão) equipado com uma bomba de mistura quaternária de baixa pressão (LC-20AT) e um desgaseificador a vácuo em linha de quatro canais (DGU-20A5) controlado por um módulo de interface CBM20A e detector de arranjo de diodos (DAD, SPD-M20A). A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna Vertical VertiSep GES C18 (4,5x150mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta por Ácido Fórmico 0,9% para a fase aquosa A, e Acetonitrila para a fase orgânica B.

A metodologia analítica foi desenvolvida com base nas necessidades do estudo, visando à separação eficiente das substâncias de interesse. Utilizou-se uma vazão de 0,9 mL min⁻¹, com o seguinte perfil de eluição em gradiente: 0-20 minutos: 0 a 15% do solvente B; 20-40 minutos: 15 a 19% de B; 40-45 minutos: 19 a 100% de B; e 45-52 minutos: 100% de B. Após o término do gradiente, foi incluído um período de condicionamento da coluna, reduzindo gradativamente a concentração do solvente B para o ponto inicial, a fim de restaurar as condições ideais de equilíbrio para as próximas injeções. A injeção das amostras foi realizada manualmente, com volume de 20 µL por injeção. Os espectros no UV-visível foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 400 nm e os perfis cromatográficos foram monitorados em $\lambda = 270, 320, 327, 310, 335$ e 350 nm, para permitir a quantificação das substâncias bioativas de interesse: ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, vitexina e rutina, respectivamente.- Esses comprimentos de onda foram escolhidos com base nos máximos de absorção característicos de cada composto, permitindo uma análise quantitativa eficiente e precisa.

O método foi otimizado após várias tentativas experimentais, sendo esta a condição que proporcionou a melhor resolução dos picos correspondentes às substâncias de interesse, assegurando a eficiência do processo analítico.

3.4. CURVA ANALÍTICA E QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

A quantificação das substâncias identificadas foi feita por meio a integração dos picos de padrões comerciais. A concentração de cada substâncias foi expressa em miligramas por grama. As curvas analíticas foram construídas com cinco pontos, no entanto, os valores utilizados para cada curva foram distintos, visto que a concentração de cada uma das substâncias varia consideravelmente nas amostras. Essa estratégia foi adotada para garantir a calibração adequada para quantificar cada substância.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e as injeções foram feitas no mesmo dia, para garantir a precisão dos resultados obtidos e reduzir o número de erros.

3.5. RESPOSTA MÚLTIPLA

A otimização realizada nesta pesquisa envolveu diversas substâncias químicas em cada amostra, resultando em múltiplas respostas. Esse tipo de abordagem é chamado de otimização multivariada, pois várias variáveis são otimizadas simultaneamente (NOVAES et al., 2016). Para conduzir as análises de maneira eficiente, foi necessário estabelecer uma Resposta Múltipla (RM) que estivesse em conformidade com os objetivos da otimização.

A RM utilizada foi proposta por um grupo de pesquisa brasileiro e tem sido amplamente aplicada em diversos estudos de otimização multielementar (PORTUGAL et al., 2007). A RM foi calculada com base na razão entre a concentração de cada substância presente nas amostras em um experimento e a maior concentração obtida para essa substância em toda a série de ensaios experimentais. O valor da normalização varia entre 0 (resposta indesejável) e 1 (resposta desejável ou ideal), sendo que a resposta múltipla corresponde à soma dos valores normalizados de cada substância para uma amostra específica.

A equação utilizada para o cálculo da RM foi:

$$RM = \frac{[Substância A]}{[Máx. Substância A]} + \frac{[Substância B]}{[Máx. Substância B]} + \dots + \frac{[Substância n]}{[Máx. Substância n]} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde [Substância A] e [Substância B] representam as concentrações das substâncias de interesse obtidas nos vários experimentos executados, e [Máx. Substância A] e [Máx. Substância B] correspondem às maiores concentrações obtidas para cada substância durante todas as análises multivariadas realizadas.

De acordo com Novaes *et al.* (2016), a resposta múltipla tem sido extensivamente utilizada em pesquisas de quimiometria, especialmente em estudos que empregam ferramentas de otimização como planejamentos fatorial completo e fracionado, Box-Behnken, composto central, planejamento de mistura e matrizes de Doehlert.

3.6. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

As folhas trituradas de *P. cinnamomum*, obtidas conforme descrito no item 2.2, foram utilizadas para a extração. 1,8000 g do material vegetal foi submetido ao processo de maceração com metanol em temperatura ambiente, sob agitação esporádica. O procedimento foi realizado em ciclos de 48 horas, e ao final de cada ciclo, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo. O extrato concentrado foi seco em estufa a 40 °C, resultando no extrato metanólico das folhas de *P. cinnamomum* (MFPC), com um rendimento final de 0,2771 g.

Para o preparo da amostra destinada à análise por CLAE-DAD, foram pesados com precisão 0,0030 g do MFPC em microtubos do tipo Eppendorf, aos quais foi adicionado 1,0 mL de metanol grau HPLC. A solução foi submetida à sonicação por 15 minutos em banho ultrassônico aos 30 °C, utilizando uma frequência de 37 Hz e potência de 80 W. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado com algodão e injetado no CLAE.

A identificação dos compostos presentes no MFPC foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e espectros UV-vis com os padrões analíticos dos flavonoides e ácidos fenólicos previamente selecionados. O procedimento foi realizado em três etapas: (i) injeção da amostra de MFPC; (ii) injeção dos padrões, preparados de acordo com as mesmas condições da amostra; e (iii) co-injeção de uma mistura composta por 70% da amostra e 30% do padrão. Portanto, a identificação foi adicionalmente confirmada pela dopagem da amostra com os padrões, resultando no aumento significativo da área dos picos correspondentes.

As substâncias bioativas identificadas e posteriormente quantificadas incluíram ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, rutina e vitexina, substâncias conhecidas por suas atividades farmacológicas. Esses compostos são amplamente reconhecidos por suas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva (BÚFALO, et

al., 2013; GIRSANG et al., 2021; KARIMI-KHOUSANI et al., 2017; HE et al., 2016; ZHU et al., 2018; KOVAL'SKII et al., 2014).

3.7. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA PARA INJEÇÃO CLAE-DAD

A fim de maximizar as áreas dos picos das substâncias bioativas analisadas na amostra, foi realizada a otimização das condições de preparo da amostra para injeção no CLAE. Os parâmetros otimizados incluíram: tempo de sonicação, tempo de centrifugação e o solvente utilizado para o preparo da solução (Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente). Todas as análises foram realizadas em triplicata e de forma randomizada. A resposta analisada foi RM das substâncias de interesse.

Tabela 1 - Avaliação do solvente utilizado no preparo da solução.

Ordem padrão	Ordem de execução	Solvente
1	2	ACN ¹
2	6	MeOH ²
3	1	MeOH:H ₂ O 8:2
4	4	MeOH:H ₂ O 1:1
5	3	MeOH:H ₂ O 2:8
6	5	H ₂ O

Fonte: elaboração própria. ¹Acetonitrila. ²Metanol.

Tabela 2 – Avaliação do tempo de sonicação.

Ordem padrão	Ordem de execução	Tempo (min)
1	6	2
2	5	5
3	2	10
4	3	15
5	4	20
6	1	30

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3 – Avaliação do tempo de centrifugação.

Ordem padrão	Ordem de execução	Tempo (min)
1	6	5
2	2	10

3	1	15
4	5	20
5	3	30

Fonte: elaboração própria.

3.8. PLANEJAMENTO DE MISTURA CENTROIDE SIMPLEX

Com o objetivo de identificar a melhor combinação de solventes para o processo de extração, foi feito um planejamento de mistura ternária, utilizando água ultrapura, etanol e acetona como solventes. Para isso, foi utilizado um planejamento de mistura simplex-centroide para três fatores, no qual a soma das proporções de cada componente da mistura é igual a 1. Todos os ensaios foram executados em triplicata, exceto o ponto central (PC), que foi repetido cinco vezes.

Como pode ser visto na Tabela 4, os experimentos 1, 5 e 9 representam os componentes individuais, enquanto os experimentos 2, 3 e 8 representam as misturas binárias. O experimento 7 é o PC, e os experimentos 4, 6 e 10 correspondem às misturas ternárias.

Tabela 4 – Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide.

Ordem padrão	Ordem de execução	Água	Etanol	Acetona
1	3	0,000	0,000	1,000
2	4	0,500	0,500	0,000
3	5	0,500	0,000	0,500
4	7 (PC)	0,333	0,333	0,333
5	2	0,000	1,000	0,000
6	10	0,167	0,167	0,667
7	9	0,167	0,667	0,167
8	6	0,000	0,500	0,500
9	1	1,000	0,000	0,000
10	8	0,667	0,167	0,167

Para cada experimento, foram pesados cerca de 0,5000 g ($\pm 0,0005$ g) de folhas secas e trituradas de *P. cinnata*, com tamanho de partícula de 1,18 mm. A cada amostra foram adicionados 17,5 mL da mistura solvente de acordo com o delineamento experimental, mantendo uma razão sólido-líquido (L/S) de 35:1. O processo de extração foi realizado utilizando extração assistida por ultrassom (EAU) por 30 minutos, com potência de 50 W, frequência de 37 Hz e temperatura do banho de 50 °C.

Após a extração, as amostras foram imediatamente filtradas e o filtrado foi transferido para uma estufa a 40 °C até completa evaporação dos solventes. Os extratos secos foram então armazenados adequadamente para posterior preparo e análise por CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.3. Todas as extrações foram conduzidas em ordem randomizada para minimizar erros aleatórios.

3.9. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

O planejamento Plackett-Burman (PPB) foi realizado com o objetivo de identificar as variáveis significativas do processo de extração, sendo analisadas em dois níveis (-1 e +1), além da análise do ponto central (Tabela 5). As variáveis analisadas foram:

- a) Agitação durante a extração assistida por homogeneização (EAH);
- b) Tempo de EAH;
- c) Tempo de EAU;
- d) Temperatura do banho no ultrassônico;
- e) Potência do ultrassom;
- f) Relação líquido-sólido (L/S);
- g) Tamanho da partícula;
- h) Frequência do ultrassom.

Tabela 5 – Fatores avaliados no planejamento Plackett-Burman (PPB) para otimização multivariada do processo de extração.

Código	Fatores	Níveis		Ponto Central
		Baixo (-)	Alto (+)	
A	Agitação (RPM)	50	200	125

B	Tempo EAH	10	30	20
C	Tempo EAU (min.)	20	50	35
D	Temperatura do banho (°C)	30	60	45
E	Potência (W)	40	100	70
F	Relação L/S (mL/g)	20:1	40:1	30:1
G	Tamanho da partícula (mm)	1,0	1,18	50% de cada granulometria
H	Frequência (Hz)	37	80	5 min em cada Hz

O PPB é amplamente utilizado como ferramenta de triagem, por permitir a identificação dos fatores mais significativos em um processo com um número reduzido de experimentos. Por ser um planejamento de resolução III, ele é indicado para avaliar os efeitos principais, embora exista a possibilidade de confundimento entre esses efeitos e interações de segunda ordem (interações entre dois fatores). Nesse tipo de planejamento, é possível analisar N-1 variáveis com N experimentos. Para ajustar o número de variáveis avaliadas, podem ser adicionados fatores fictícios (dummy factors), os quais não possuem influência no processo, mas são utilizados para completar a matriz experimental.

Com base nas variáveis selecionadas e seus respectivos níveis, foi gerada uma matriz experimental do PBB utilizando o software Design-Expert 13 (Tabela 6). A matriz experimental resultou em 15 experimentos, sendo os três últimos experimentos replicatas do PC. Os demais experimentos foram realizados em duplicata para estimar o erro experimental dos resultados obtidos.

Para cada experimento, foram pesados aproximadamente 0,500 g ($\pm 0,005$ g) da amostra de folhas pulverizadas, com o tamanho de partícula definido pela matriz do planejamento (**G**) (Tabela 5). A extração foi realizada utilizando a mistura de solventes otimizada, determinada no PM (item 3.8) e definida pela razão L/S (**F**) correspondente ao volume da mistura de solvente utilizado a cada experimento. Após cinco minutos de contato do material vegetal com a mistura de solventes, a EAH foi iniciada, seguindo as condições de rotação (**A**) e tempo (**B**) definidas na matriz experimental. Após a EAH, o sistema permaneceu em repouso por oito minutos antes de ser submetido à EAU,

com as condições de tempo (C), temperatura do banho (D), potência (E) e frequência do ultrassom (H) definidas pela matriz experimental.

Tabela 6 – Matriz experimental do Planejamento Plackett-Burman (PPB).

Ordem	Ordem	A	B	C	D	E	F	G	H	I:	J:	K:
Padrão	execução									Dummy1	Dummy2	Dummy3
1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	12	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	9	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
6	7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	15	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	14	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	8	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	13	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após a conclusão de cada processo completo de extração, as amostras foram filtradas e o filtrado foi transferido para uma estufa a 40 °C até a evaporação completa do solvente. As amostras secas foram posteriormente armazenadas para análise.

3.10. PLANEJAMENTO MATRIZ DE DOEHLERT

Com base nos resultados do PPB, foram identificadas as variáveis significativas para o processo de extração, as quais foram estudadas na etapa subsequente de otimização. Para as variáveis que não apresentaram efeito significativo, foram fixados valores apropriados com base nos resultados do PPB. Esses valores foram fornecidos de forma codificada, sendo convertidos para valores reais (experimentais) utilizando a fórmula:

$$x_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \cdot \beta_0 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: x_i é o valor codificado para o nível do fator i , Z_i é o valor real, Z_i^0 é o valor real no ponto central, ΔZ_i é a diferença entre o valor real no ponto central e o maior ou mais valor para uma dada variável, e β_0 é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator.

A otimização das variáveis significativas foi realizada por meio de uma Matriz de Doehlert (MD), que permitiu a utilização de níveis diferentes para cada variável, conforme a demanda experimental e a disponibilidade de recursos. O número de níveis variou entre três e sete, dependendo da variável. A matriz de Doehlert foi elaborada utilizando o software Design-Expert 13, conforme os níveis e variáveis apresentados na Tabela 7. A matriz experimental resultante consistiu em 21 experimentos, realizados em duplicata, exceto o PC, que foi executado em triplicata para estimar a variabilidade dos dados obtidos, por meio dos erros aleatórios.

Tabela 7 – Variáveis e níveis codificados e valores reais utilizados na Matriz de Doehlert (MD).

Variáveis		Níveis (codificados e reais)						
A = Potência (W): 5 níveis	codificado	-1,0	-0,5	0	0,5	1,0		
	experimental	30	40	50	60	70		
B = Temperatura do banho (7 níveis)	codificado	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
	experimental	22	26	31	35	39	44	48
C = Tempo de EAH (7 níveis)	codificado	-0,817	-0,613	-0,204	0	0,204	0,613	0,817
	experimental	10	15	25	30	35	45	50
D = Tamanho da partícula mm (3 níveis)	codificado	-0,791			0	0,791		
	experimental	0,710			0,855*	1,00		

* Média das partículas de tamanhos de 0,710 e 1,00 mm.

Para cada experimento, foram pesados aproximadamente 0,5000 g ($\pm 0,0005$ g) da amostra pulverizada, com o tamanho de partícula estabelecido (**D**), e foi adicionado um volume de 17,5 mL da mistura de solventes de extração otimizada (item 3.8), conforme a relação sólido/líquido indicada no PPB. Após cinco minutos de contato entre o material vegetal e o solvente, o sistema foi submetido à Extração Assistida por Homogeneização (EAH), com a rotação fixada em 182 rpm e o tempo de extração determinado pela MD (**C**). Após a EAH, foi realizada a extração assistida por ultrassom (EAU) por 31 minutos, utilizando uma frequência de 37 Hz, potência (**A**) e temperatura do banho ultrassônico (**B**) conforme definido pela MD, tabela 8.

Ao término de cada processo de extração, as amostras foram filtradas e o solvente extrator foi evaporado em estufa a 40 °C, até a secagem completa, visando a obtenção do extrato seco para posterior análise.

Tabela 8 – Matrizes Doehlert codificada para as quatro variáveis independentes estudadas.

Exp	X ₁ = Potência	X ₂ = Temperatura do banho	X ₃ = Tempo de EAH	X ₄ = Tamanho da partícula
1A - PC	0	0	0	0
1B – PC	0	0	0	0
1C - PC	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	0,5	0,866	0	0
4	0,5	0,289	0,817	0
5	0,5	0,289	0,204	0,791
6	-1	0	0	0
7	-0,5	-0,866	0	0
8	-0,5	-0,289	-0,817	0
9	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791
10	0,5	-0,866	0	0
11	0,5	-0,289	-0,817	0
12	0,5	-0,289	-0,204	-0,791
13	-0,5	0,866	0	0
14	0	0,577	-0,817	0
15	0	0,577	-0,204	-0,791
16	-0,5	0,289	0,817	0
17	0	-0,577	0,817	0
18	0	0	0,613	-0,791

19	-0,5	0,289	0,204	0,791
20	0	-0,577	0,204	0,791
21	0	0	-0,613	0,791

3.11. EXTRAÇÃO NO PONTO CRÍTICO

Com os resultados da MD, foram identificadas as condições ótimas de extração. Para validar a precisão do modelo matemático gerado, os valores estimados pelo software para a resposta dependente no PO foram comparados com os valores experimentais obtidos após a execução dos experimentos, onde todas as variáveis independentes foram fixadas nos valores ótimos indicados pela MD. Este procedimento foi realizado com amostras de diferentes partes da planta, incluindo folhas (FPO), flores (FrPO), galhos (GPO), casca da fruta (CPO) e polpa (composta pelo fruto e pelas sementes) (PPO). As extrações no ponto crítico foram feitas em triplicata.

Figura 2 – Casca e polpa de *Passiflora cincinnata*



Fonte: Autoria própria.

Para cada extração, pesou-se 0,500 g ($\pm 0,005$ g) da amostra pulverizada, com tamanho de partícula de 1,00 mm, à qual foi adicionado um volume de 17,5 mL da mistura de solventes de extração. Após cinco minutos de contato inicial, o sistema foi submetido à EAH com agitação a 182 RPM durante 13 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida à EAU por 31 minutos, a uma temperatura de 39 °C, com frequência de 37 Hz e potência de 40 W.

Ao término de cada processo de extração, as amostras foram filtradas e o solvente extrator foi evaporado em estufa a 40 °C, até a secagem completa, visando a obtenção do extrato seco para posterior análise.

Além disso, foram realizadas duas extrações com as folhas de *P. cinnata* para avaliar a influência das ondas ultrassônicas e do aquecimento no processo extrativo. A primeira extração (FPOA) seguiu o mesmo procedimento do ponto ótimo, com exceção do banho ultrassônico, que foi substituído por banho maria durante o mesmo período e com a mesma temperatura. A segunda extração (FPOS) ocorreu da mesma maneira, mas no período em que a amostra estaria no banho ultrassônico, ela ficou em descanso em temperatura ambiente, sem nenhuma forma de aquecimento.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação das condições de preparo de amostra foi feita de forma univariada, sendo avaliados os fatores tempo de sonicação, tempo de centrifugação e composição da mistura de solubilização.

Para avaliação da mistura utilizada como solvente extrator, foi feito um planejamento de mistura centroide simplex. Para a avaliação dos fatores significativos e seus respectivos valores, foram realizados dois planejamentos experimentais: planejamento Plackett-Burman para triagem e matriz de Doehlert para otimização, sendo avaliadas as seguintes variáveis independentes: tempo de extração assistida por homogeneização (EAH), velocidade de agitação de EAH, tempo de extração assistida por ultrassom (EAU), temperatura, potência e frequência do banho ultrassônico, razão sólido/líquido e tamanho da partícula.

As variáveis foram codificadas de acordo com a fórmula:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta_x} \quad \text{Eq. (3)}$$

onde x_i é o valor codificado da variável independente, X_i é o valor real da variável independente, X_0 é o valor real da variável independente no ponto central e Δ_x é a diferença entre o maior o menor valor real dessa variável. Uma equação polinomial de segunda ordem foi utilizada para prever os resultados obtidos. O modelo pode ser aplicado para os resultados obtidos em todos os planejamentos realizados. A equação geral que prevê as condições ótimas é dada pela fórmula:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde k é o número de variáveis, β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são as estimativas dos coeficientes de regressão para as interações lineares, quadráticas e de interação, respectivamente. X_i e X_j são os níveis das variáveis independentes nos valores codificados.

A análise estatística dos resultados a fim de determinar as condições ótimas de extração foi feita por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste Bonferroni post hoc para comparação múltipla, utilizando os programas Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA),

DesignExpert v10 Trial software (State-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) e ModelGraphs. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes, com a probabilidade de hipótese nula ocorrendo em menos de 5% ($p < 0,05$), com o nível de confiança de 95%. Os dados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão das triplicatas.

A análise estatística da MSR foi feita por meio dos programas DesignExpert v10 Trial software (State-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) e ModelGraphs, sendo utilizadas ANOVA e análise de superfície de resposta para determinar a significância estatística do modelo. O teste F e valores de probabilidade ($p < 0,05$) foram utilizados para analisar a estatística de todos os termos. A adequação e ajuste do modelo foram determinados pelo coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}) e coeficiente de variância (CV%) para cada modelo.

A fim de confirmar os resultados obtidos, foram realizados experimentos nos pontos ótimos obtidos, e os valores estimados e experimentais foram comparados para avaliar a acurácia do modelo matemático.

3.13. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante foi feita por meio dos testes de sequestro do radical livre DPPH, Sistema β -caroteno/ácido linolênico e método fosfomolibdato – capacidade antioxidante total. Para isso, foram utilizadas as amostras folhas (FPO), flores (FrPO), galhos (GPO), casca (CPO) e polpa (PPO), extraídas no ponto ótimo, e amostras de folhas extraídas no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert sem a presença de ultrassom e com aquecimento (FPOA) e sem aquecimento (FPOS).

3.13.1. Sequestro de radical livre DPPH

O teste de sequestro do DPPH se baseia na capacidade que a amostra testada tem de sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e está baseado na descoloração composta pelo radical estável, de cor violeta, após a adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Os ensaios foram realizados com os extratos das amostras FPO, FrPO, GPO, CPO, PPO, FPOA e FPOS nas concentrações de 150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A solução de DPPH foi preparada com concentração de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foram adicionados nos tubos de ensaio 200 μL de cada amostra e 1800 μL da solução reagente. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 515 nm após 30 minutos de incubação da reação ao abrigo da luz.

Para o preparo do branco, foram utilizados 2000 µL de metanol, enquanto, para o controle, foram utilizados 200 µL de metanol e 1800 µL de DPPH. Além disso, foram preparadas curvas de calibração de quercetina e ácido ascórbico, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg·mL⁻¹. Os resultados foram expressos como CE₅₀, que representa a quantidade de antioxidante necessário para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%.

A porcentagem de redução do radical livre (% redução DPPH) foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ redução DPPH} = \frac{AC - AA}{AC} (\times 100 \%) \quad \text{Eq. (5)}$$

onde AC é a absorbância final do controle e AA é a absorbância final da amostra.

Os resultados foram expressos como CE₅₀, que representa a quantidade de antioxidante necessário para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%. CE₅₀ foi calculada com base na regressão linear, onde o eixo das abcissas representa a concentração da amostra ou do controle em µg mL⁻¹ e o eixo das ordenadas representa a porcentagem de redução de DPPH.

3.13.2. Sistema β-Caroteno/Ácido Linoleico

Para a avaliação da atividade antioxidante por meio do sistema β-caroteno/ácido linolênico, foi preparada uma solução de 20 mg de β-caroteno em 1 mL de clorofórmio. Essa solução foi transferida para um balão contendo 85,6 mg de ácido linolênico e 403 mg de emulsificador Twen 80. O CH₃Cl foi eliminado da mistura por rota evaporação e, em seguida, foram adicionados 200 mL de água destilada ao balão, que foi agitado vigorosamente por 2 minutos.

As amostras FPO, GPO, CPO, PPO, FPOA e FPOS bem como os padrões ácido ascórbico e quercetina foram analisados nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg·mL⁻¹; a amostra FrPO foi analisada nas concentrações de 200, 200, 400, 500 e 600 µg·mL⁻¹.

Para a realização do teste, foram adicionados 300 µL de cada amostra ou padrão e 2700 µL da solução reagente. O branco foi preparado com 3000 µL de metanol e, o controle, com 300 µL de metanol e 2700 µL da solução reagente. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, imediatamente após a mistura das soluções e após 30 e 60 minutos de incubação da reação em banho maria e ao abrigo da luz.

A atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA = \left(\frac{TD_C - TD_A}{TD_C} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

onde TD_C é a taxa de degradação do controle ($TD_C = \ln(a/b)/60$) e TD_A é a taxa de degradação da amostra ($TD_A = \ln(a/b)/60$), a é a absorbância no tempo 0, e b é a absorbância no tempo de 30 ou 60 minutos. A CE_{50} foi calculada com base na regressão linear, onde a abcissa representa a concentração da amostra ou do controle em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a ordenada representa a porcentagem de atividade antioxidante (AHN *et al.*, 2007).

3.13.3. Método fosfomolibdato – Capacidade antioxidante total

A solução reagente foi preparada com H_2SO_4 na concentração de $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, fosfato de sódio $28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e molibdato de amônio $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As amostras FPO, FrPO, GPO, CPO, PPO, FPOA e FPOS foram analisadas nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e o padrão quercetina foi analisado nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Foram adicionados aos tubos de ensaio $250 \mu\text{L}$ de cada amostra ou padrão e $2500 \mu\text{L}$ da solução reagente. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 765 nm , após 90 minutos de incubação em banho maria a 95° C .

A capacidade antioxidante total (CA%) foi calculada de acordo com a equação:

$$CA \% = \frac{Ab_{\text{controle}} - Ab_{\text{amostra}}}{Ab_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

onde CA é a capacidade antioxidante total, Ab_{controle} é a absorbância do controle e Ab_{amostra} é a absorbância da amostra (JAN *et al.*, 2013).

3.14. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TPT)

A determinação de fenólicos totais nos extratos foi feita por meio do método de Folin-Ciocalteu com algumas alterações (SOUZA *et al.*, 2017). Para isso, adicionou-se em um tubo de ensaio $100 \mu\text{L}$ dos extratos metanólicos das amostras FPO, FPOA, FPOS, PPO, FPO, GPO e CPO, $500 \mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu 10% e 5 mL de água ultrapura. O tubo foi agitado por 1 minuto e, após isso, adicionou-se 2 mL de Na_2CO_3 15%. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL , que foi completado com água ultrapura. Após 60 minutos de incubação ao abrigo da luz, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 760 nm .

O TPT foi calculado a partir de uma curva de calibração feita com ácido gálico nas concentrações de 50, 75, 100, 125 e $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.15. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (TFT)

O teor de flavonoides nos extratos FPO, FPOA, FPOS, PPO, FPO, GPO e CPO foi determinado por ensaio colorimétrico de alumínio (PHUYAL *et al.*, 2020). Para isso, adicionou-se 4 mL de água destilada em um tubo Falcon, 1 mL de cada amostra analisada na concentração de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 300 μL de NaNO_2 5% (m/v). A mistura foi submetida ao vórtex por 2 minutos e, após isso, adicionou-se 300 μL de AlCl_3 , sendo novamente submetida ao vórtex por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de NaOH 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e o tubo foi agitado por 1 minuto no vórtex. Por fim, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e avolumada com água destilada. A leitura foi realizada à 510 nm.

O TFT foi calculado a partir de uma curva de calibração feita com quercetina nas concentrações de 150, 300, 450, 600 e 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em equivalentes de quercetina usando a equação linear da curva de calibração.

3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para determinação da atividade antimicrobiana, foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) com diferentes partes de *P. cinnamata*, incluindo folhas (FPO), flores (FrPO), galhos (GPO), casca (CPO) e polpa (PPO), todos extraídos no ponto ótimo, e amostras de folhas extraídas no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert sem a presença de ultrassom e com aquecimento (FPOA) e sem aquecimento (FPOS).

Os micro-organismos utilizados no estudo foram as cepas padrão resistente *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (resistente à oxacilina) e isolados clínicos de *S. aureus* 16A, 112, 92 e 29, coletadas de dois hospitais públicos da cidade de Vitória da Conquista – Bahia e cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 e *Streptococcus sobrinus* 6715, provenientes do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia, da Universidade de Campinas, Piracicaba, São Paulo (UNICAMP) e cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, concedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) – Rio de Janeiro.

As cepas *S. aureus* foram descongeladas (-80°C), incubadas durante 24 horas a 37°C em caldo BHI, enquanto que as cepas *S. mutans* e *S. sobrinus* foram descongeladas (-80°C), incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 em caldo BHI com 1% glicose (CAMPOS *et al.*, 2012).

3.16.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. Os inóculos de *S. mutans* ATCC 700610, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* 6715 foram realizados com uma concentração bacteriana final em torno de $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio caldo de infusão de coração-cérebro (BHI) (Kasvi®) na proporção de 1:1000. Foram adicionados em cada poço das microplacas 190 µL do meio com inóculo (concentração final $1-2 \times 10^5$ CFU/mL) e 10 µL de cada amostra analisada, com as concentrações finais variando de 1000 a 31,25 µg/mL com diluição seriada em razão de 2. Os extratos foram preparados a partir da diluição de 0,08 g do extrato em 4 mL de etanol P.A. As placas contendo *S. mutans* ATCC 700610, *S. mutans* ATCC 25175 e *S. sobrinus* 6715 foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas; já as placas com *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 e isolados clínicos de *S. aureus* 16A, 112, 92 e 29 foram encubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas, sem a presença de CO₂ (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Após o período de incubação, a avaliação do crescimento bacteriano foi feita visualmente, por meio da observação da turvação do meio e/ou da presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços onde não foi observado crescimento visual, adicionou-se 20µL do corante resazurina (Sigma®). A resazurina a 0,01%, é um indicador de oxirredução, de coloração azul e sofre oxidação na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração róseo-avermelhada. Após 20 minutos de incubação com resazurina a presença de cor azul indica ausência de crescimento e, a cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO *et al.*, 2002). Foi determinada a CIM a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano visível e confirmado com a resazurina.

3.16.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi feita com os poços que apresentaram crescimento bacteriano visível no ensaio de CIM. Uma alíquota de 8 µL foi inoculada em placas com BHI ágar. Em seguida, as placas foram incubadas conforme descrito no item 3.16.1. A CBM foi determinada por meio da menor concentração testada que causou 99,9% de morte celular, ou seja, com ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar (YATSUDA *et al.* 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Devido à complexidade da composição química da amostra de *Passiflora cincinnata*, diferentes fases estacionárias, fases móveis e modificadores ácidos foram avaliados para identificar a melhor condição cromatográfica. Inicialmente, duas colunas cromatográficas foram testadas: uma coluna NST C₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 µm) e uma coluna Vertical C₁₈ (150 × 4,6 mm, 3 µm), ambas amplamente utilizadas em separações de substâncias bioativas de origem vegetal. A avaliação da eficiência de separação revelou que a coluna Vertical C₁₈ apresentou melhor desempenho, resultando em maior resolução e definição dos picos.

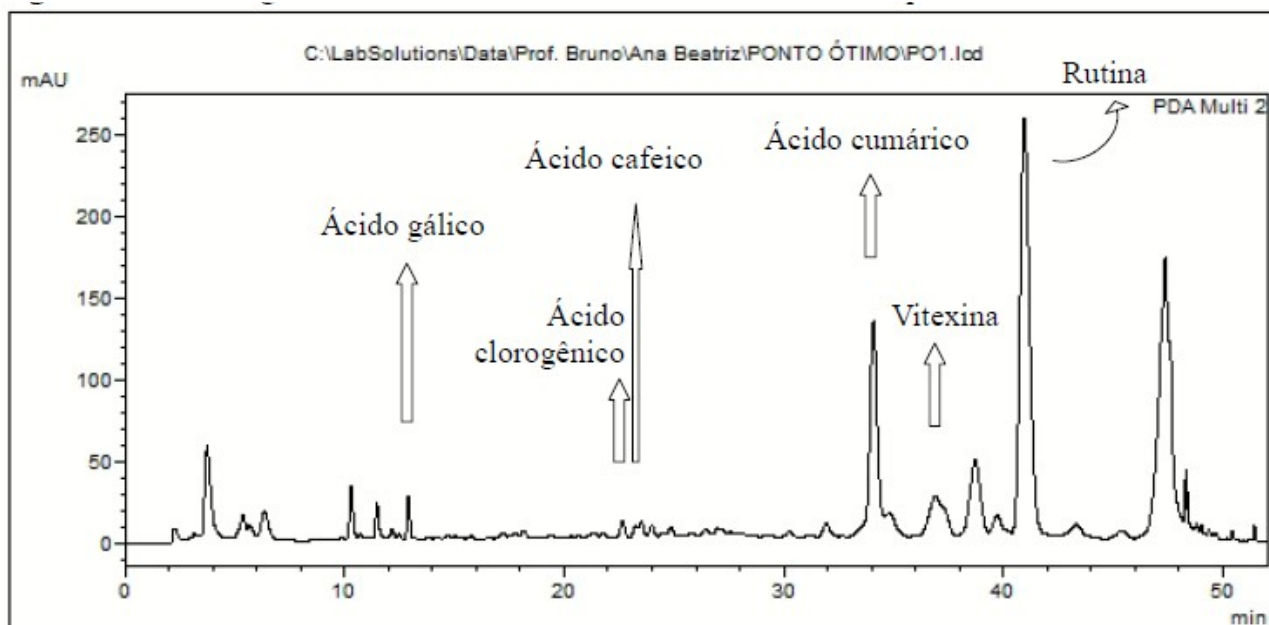
Além disso, diversas combinações de fase móvel à base de metanol e água foram testadas, porém, nenhuma delas forneceu uma separação adequada das substâncias presentes no extrato metanólico (MFPC). Observou-se uma melhora significativa na resolução quando a fase móvel MeOH – H₂O foi substituída por ACN – H₂O, evidenciando a superioridade da acetonitrila como eluente em sistemas cromatográficos para este tipo de matriz vegetal.

A adição de modificadores ácidos à fase móvel também teve um papel crucial na otimização da separação, uma vez que contribuiu para a supressão do efeito de cauda dos picos cromatográficos. Entre os ácidos avaliados, a utilização de ácido fórmico a 0,9% se mostrou mais eficiente do que o ácido acético, promovendo uma melhor resolução das substâncias de interesse. O fluxo de 0,9 mL min⁻¹ foi identificado como o ideal para otimizar a separação dos picos cromatográficos, garantindo um compromisso entre tempo de análise e eficiência cromatográfica.

Um cromatograma representativo do MFPC é apresentado na Figura 3, de acordo com as condições cromatográficas otimizadas descritas no item 4.3. Esses resultados demonstram a importância da escolha correta de parâmetros cromatográficos, como fase estacionária, fase móvel e modificadores ácidos, para garantir uma separação eficiente e reprodutível das substâncias bioativas presentes em extratos vegetais. Foi possível observar a separação de diferentes substâncias, que

apresentavam espectros de absorção no UV na região típica de flavonoides e ácidos fenólicos, com máximos de absorção entre 270 e 350 nm (JUSTINO, 2017; KHODDAMI *et al.* 2013).

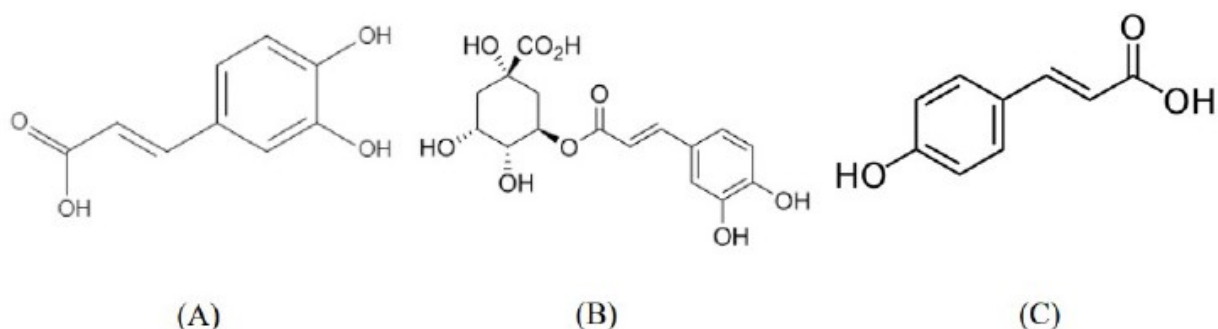
Figura 3 – Cromatograma do extrato com as substâncias identificadas por CLAE-DAD.

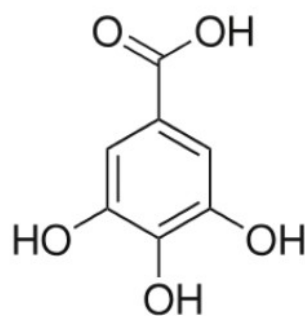


Para identificar as substâncias bioativas presentes no extrato MFPC, foram utilizados padrões de referência obtidos comercialmente, sendo eles: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, catequina, isoorientina, isovitexina, orientina, rutina e vitexina. Todos os padrões foram injetados no CLAE-DAD, seguindo a seguinte ordem de execução: injeção do extrato puro, injeção do padrão e co-injeção do extrato (50 μ L) com o padrão (10 μ L).

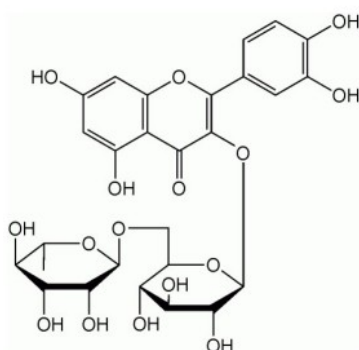
Por meio da co-injeção, foi possível identificar as seguintes substâncias: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, rutina e vitexina. Os cromatogramas dos padrões e das co-injeções podem ser encontrados no apêndice A.

Figura 4 – Estrutura das substâncias identificadas. (A) Ácido Cafeico; (B) Ácido Clorogênico; (C) Ácido Cumárico; (D) Ácido Gálico; (E) Rutina; e (F) Vitexina.

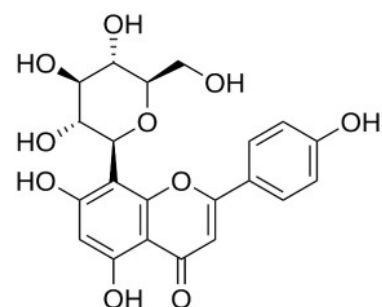




(D)



(E)



(F)

4.2. QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A quantificação das substâncias bioativas presentes nos extratos de *P. cincinnata* foi feita por meio de curvas analíticas para as substâncias de interesse. Após a identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, rutina e vitexina), soluções dos padrões dessas substâncias foram injetadas em cinco diferentes concentrações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A construção das curvas analíticas permitiu obter equações de regressão lineares para cada substância, as quais foram utilizadas para calcular as concentrações das substâncias bioativas nos de *P. cincinnata*. Os parâmetros analíticos, incluindo os coeficientes de determinação (R^2), limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), estão apresentados na Tabela 9. Os valores de R^2 superiores a 0,99, demonstram a forte correlação linear entre a concentração das substâncias analisadas e as áreas dos picos cromatográficos. Desta forma, o método cromatográfico é adequado para a quantificação dos analitos na faixa de concentração avaliada.

Tabela 9 – Equação de regressão, coeficientes de determinação, faixas de linearidade, LOD e LOQ das substâncias bioativas investigadas.

Substância	T _R (min)	λ _{max} (nm)	Equação de Regressão	R ²	Faixa de trabalho (µg.mL ⁻¹)	LOD (µg.mL ⁻¹)	LOQ (µg.mL ⁻¹)
Ácido cafeico	24,03	213 e 323	$y = 6,6 \times 10^5 X + 3,1 \times 10^3$	0,9993	0,016 – 2,0	$6,4 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$
Ácido clorogênico	21,92	216 e 326	$y = 1,4 \times 10^5 X - 1,6 \times 10^3$	0,9993	0,06 – 4,0	$2,7 \times 10^{-2}$	$8,1 \times 10^{-2}$
Ácido cumárico	30,16	215 e 309	$y = 2,0 \times 10^5 X - 1,0 \times 10^4$	0,9996	0,25 – 8,0	$1,4 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^{-1}$
Ácido gálico	11,33	217 e 270	$y = 8,2 \times 10^4 X + 5,3 \times 10^3$	0,9993	0,125 – 4,0	$1,0 \times 10^{-1}$	$3,1 \times 10^{-1}$
Rutina	36,44	216 e 255	$y = 1,3 \times 10^5 X + 1,5 \times 10^4$	0,9989	0,25 – 4,0	$1,3 \times 10^{-1}$	$4,0 \times 10^{-1}$
Vitexina	34,46	217 e 336	$y = 4,3 \times 10^4 X - 5,3 \times 10^3$	0,9987	0,5 – 8,0	0,2819	0,8543

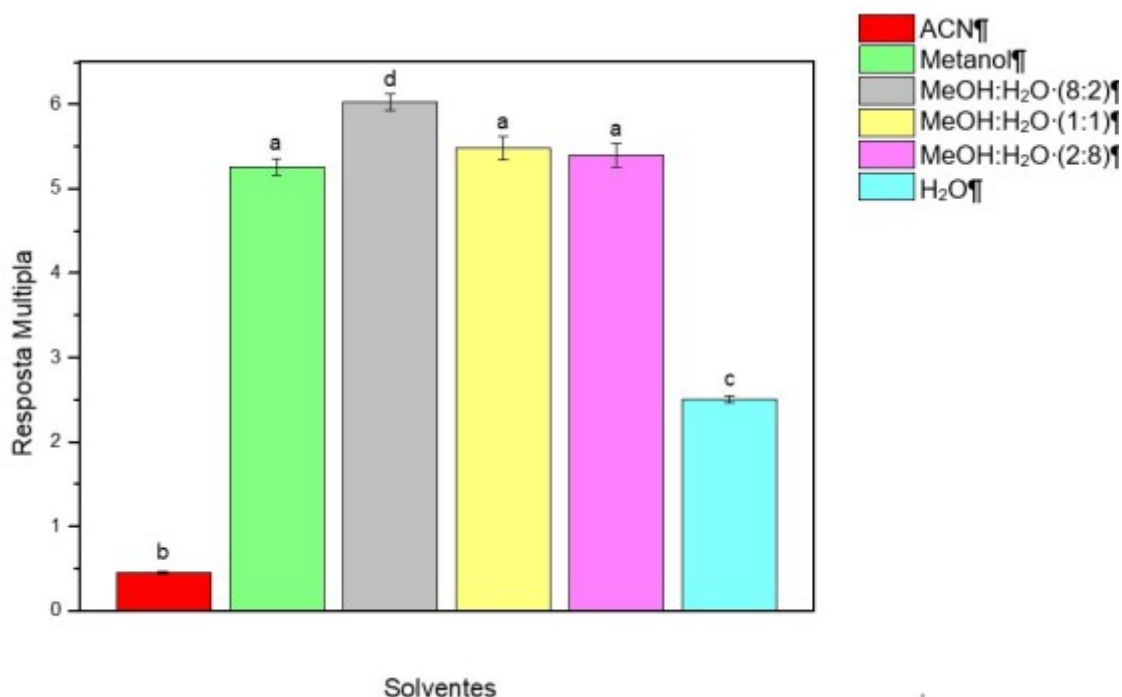
4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA

A otimização das condições de preparo da amostra para injeção no CLAE foi realizada em três etapas, de forma univariada:

1. Seleção do solvente de preparo da amostra;
2. Determinação do tempo de sonicação;
3. Definição do tempo de centrifugação.

O objetivo principal foi maximizar a solubilização das substâncias bioativas presentes no extrato MFPC. As sete substâncias de interesse tiveram suas áreas cromatográficas analisadas conforme os parâmetros descritos no item x. O resultado dessa análise é apresentado na figura 5. O gráfico 1 ilustra o efeito de diferentes solventes ou mistura de solventes utilizados na solubilização do extrato para injeção no CLAE.

Figura 5 – Estudo do solvente utilizado no preparo da amostra para injeção no CLAE-DAD.



¹ ACN: Acetonitrila; MeOH: Metanol.

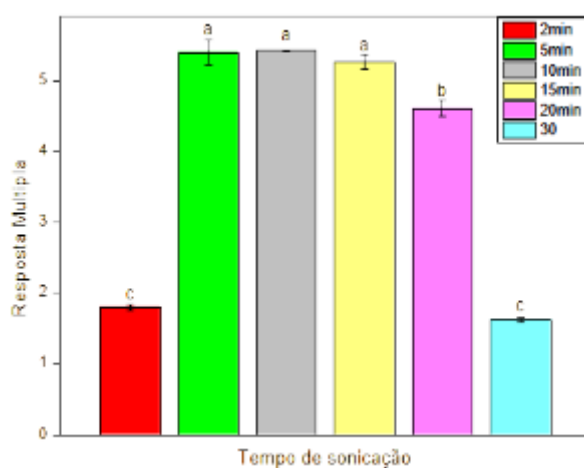
Fonte: Autoria própria.

Os resultados indicaram que a mistura de MeOH-H₂O na proporção de 8:2 foi a mais eficiente na solubilização das substâncias de interesse presentes no extrato, proporcionando as maiores áreas cromatográficas para as substâncias avaliadas. Em contraste, a acetonitrila pura resultou em uma solubilidade significativamente inferior.

Solventes polares, como metanol e água, são amplamente reconhecidos por sua eficácia na solubilização de substâncias polares, como os fenólicos e flavonoides, presentes no MFPC (MARTINS, *et al.*, 2013). Nehring *et al.* (2016) também reportaram maior eficiência do metanol para solubilizar substâncias polares presentes em frutas e sementes de pitaiá. Truong e colaboradores (2019) observaram resultados semelhantes na solubilização dos bioativos de *Severinia buxifolia*, sendo o metanol o solvente mais eficiente, seguido pela água. Nossos resultados sugerem que a combinação de metanol e água é particularmente vantajosa para matrizes químicas complexas, como as folhas de *P. cincinnata*. Enquanto algumas substâncias, como ácidos fenólicos, dissolvem-se melhor em metanol, outros componentes bioativos podem apresentar maior solubilidade em água, justificando o uso de uma mistura apropriada de solventes como estratégia para melhorar a solubilização das diversas substâncias presentes em espécies vegetais (Felix *et al.*, 2018).

O ultrassom promove cavitação, um processo que intensifica a interação entre o soluto e o solvente, melhorando a eficiência de extração e solubilização (PEREIRA *et al.*, 2016). Esse efeito é particularmente importante para matrizes vegetais complexas, que possuem uma ampla gama de substâncias com diferentes polaridades. Os resultados da análise dos tempos de sonicação usados no preparo da amostra são apresentados na Figura 6.

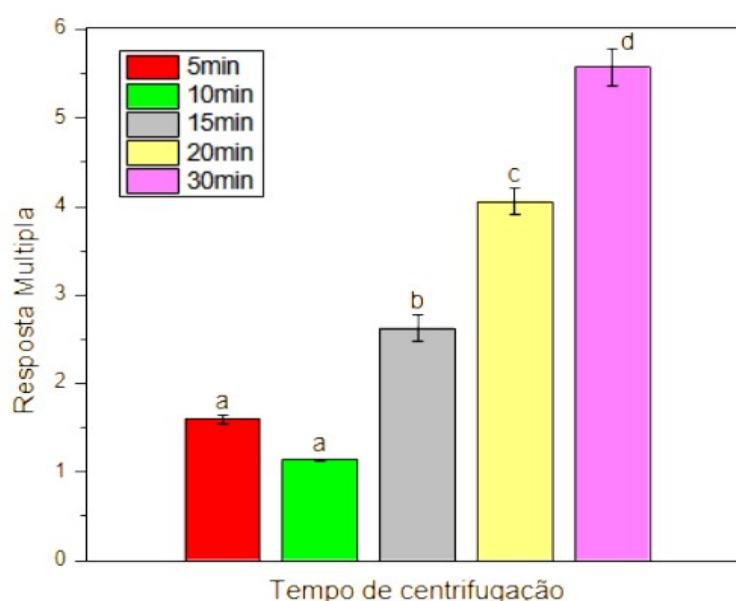
Figura 6 – Estudo no tempo de sonicação na solubilidade da amostra para injeção no CLAE-DAD.



Observou-se que os tempos extremos de sonicação, de 2 e 30 minutos, resultaram em concentrações significativamente inferiores das substâncias bioativas, provavelmente devido a uma sonicação insuficiente ou à degradação de alguns compostos sensíveis em tempos mais prolongados. Entre os tempos intermediários (5 a 20 minutos), as diferenças de concentração foram pequenas, com o melhor desempenho observado aos 10 minutos de banho ultrassônico. Esse tempo parece proporcionar o equilíbrio ideal entre a solubilização e a preservação da integridade das substâncias bioativas. Os resultados obtidos são consistentes com o estudo de Pereira *et al.* (2016), que também observaram que 10 minutos de sonicação foram suficientes para maximizar a solubilização das substâncias estudadas. Assim, o uso do ultrassom em tempos adequados pode ser considerado uma etapa fundamental para melhorar a eficiência do preparo de amostras para análises cromatográficas.

Por fim, o efeito do tempo de centrifugação no preparo das amostras foi avaliado por meio de cinco experimentos conduzidos em diferentes tempos. A análise estatística dos resultados indicou que a concentração das substâncias de interesse aumentou proporcionalmente com o aumento do tempo de centrifugação (Figura 7). A centrifugação é uma etapa crucial no preparo de amostras, pois promove uma separação mais eficiente e rápida de partículas insolúveis (LIU *et al.*, 2020), protegendo o sistema cromatográfico contra obstruções. Liu e colaboradores (2020) observaram que o aumento do tempo de centrifugação reduzia a concentração de substâncias hidrofóbicas. No entanto, no presente trabalho, analisaram-se substâncias hidrofílicas, como flavonoides e ácidos fenólicos, cuja solubilização foi favorecida por um maior tempo de centrifugação.

Figura 7 – Estudo do tempo de centrifugação na solubilização da amostra para injeção CLAE-DAD.



Dessa forma, foi estabelecido que as condições ideais para o preparo das amostras a serem injetadas no CLAE-DAD são: solvente utilizado MeOH:H₂O (8:2); sonicação por 10 minutos; e centrifugação por 30 minutos. Após a centrifugação, a amostra deve ser filtrada e transferida para o recipiente adequado até o momento da injeção no equipamento.

4.4. PLANEJAMENTO DE MISTURA CENTROIDE-SIMPLEX

Para iniciar o processo de otimização da EAU foi realizado um planejamento experimental de misturas do tipo centroide-simplex, visando à definição da composição ideal da solução extratora. Esse tipo de planejamento é caracterizado pela dependência proporcional entre os níveis de suas variáveis, o que significa que os fatores não podem ser avaliados isoladamente em diferentes níveis, uma vez que seus valores variam de forma simultânea e proporcional (NOVAES *et al.*, 2017). Em um planejamento de mistura, a soma das proporções dos componentes deve totalizar 1 (ou 100%), conforme demonstrado na Equação 8.

$$\sum_{i=1}^k x_i = 100\% \quad \text{Eq. (8)}$$

Solventes polares e de baixa toxicidade, como acetona, água e etanol, são especialmente eficazes na extração de substâncias polares, como ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico e outras substâncias identificadas no MFPC, todos contendo grupos hidroxila (- OH) em suas estruturas que possibilitam a formação de ligações de hidrogênio com esses solventes (Luo *et al.*, 2023). Entretanto, a solubilidade de muitas substâncias fenólicas e polifenólicas pode ser limitada em solventes exclusivamente aquosos devido à presença de cadeias carbônicas extensas, como observado em vários metabólitos especiais de plantas (MARTINS *et al.*, 2013). Dessa forma, além da água, foram incluídos no planejamento a acetona e o etanol para potencializar a extração das substâncias bioativas das folhas de *P. cinnamomum*.

O planejamento experimental foi estruturado para otimizar a combinação entre os solventes extratores (água, etanol e acetona) enquanto variáveis como tempo de sonicação, temperatura do banho ultrassônico, volume do solvente (razão L/S), frequência e potência do ultrassom foram mantidas fixas em 30 minutos, 35 °C, 17,5 mL, 37 Hz e 80 W, respectivamente. Os resultados foram

analisados como resposta múltipla, conforme a Equação 1 (seção 3.5), e podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 – Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide e resultados obtidos como resposta múltipla

Experimento	Execução	Água	Etanol	Acetona	Resposta Múltipla
1	9	1,000	0,000	0,000	1,019 / 1,061 / 1,015
2	5	0,000	1,000	0,000	2,112 / 2,111 / 2,023
3	1	0,000	0,000	1,000	0,644 / 0,609 / 0,602
4	2	0,500	0,500	0,000	5,793 / 5,861 / 5,856
5	3	0,500	0,000	0,500	5,081 / 5,156 / 4,939
6	8	0,000	0,500	0,500	1,323 / 1,366 / 1,388
7 (PC) ¹	4	0,333	0,333	0,333	6,918 / 7,224 / 6,969 / 7,268 / 7,36
8	10	0,667	0,167	0,167	4,372 / 4,497 / 4,635
9	7	0,167	0,667	0,167	6,006 / 6,14 / 5,75
10	6	0,167	0,167	0,667	7,701 / 7,971 / 7,64

Fonte: Elaboração própria.

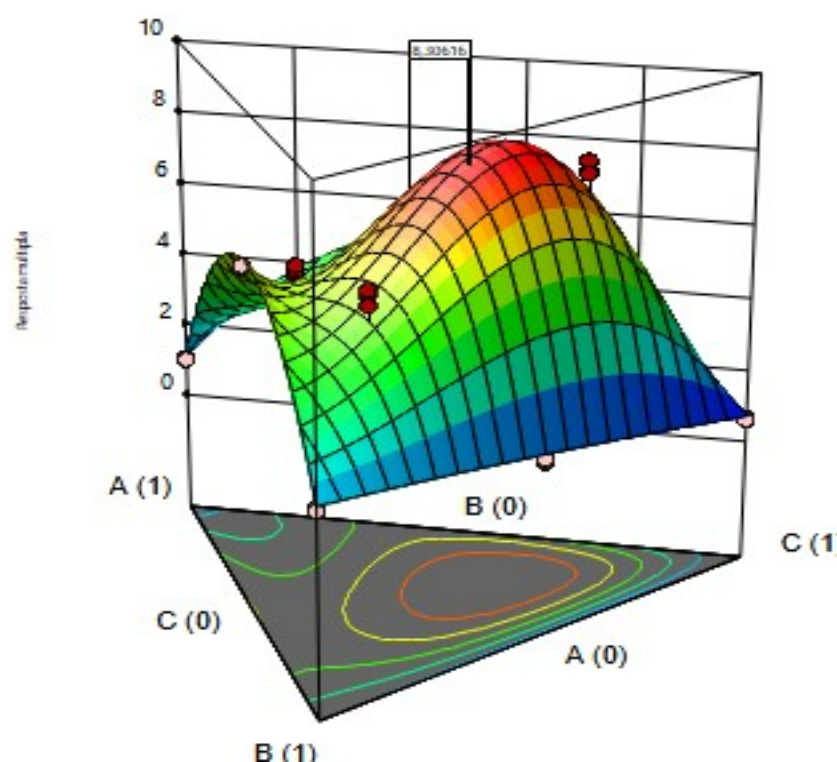
¹ Ponto central

A superfície de resposta apresentou um ponto crítico máximo, como evidenciado nas Figuras 8 e 9, indicando a combinação ideal dos solventes para maximizar a extração das substâncias bioativas. As coordenadas do ponto ótimo da superfície de resposta representam a proporção entre os solventes, revelando que a mistura ideal é composta por 23% de água, 36% de etanol e 41% de acetona, conforme mostrado na Figura 10. Para o volume de extração de 17,5 mL, necessário para manter a razão líquido-sólido, esses percentuais correspondem a 4,0 mL de água, 6,3 mL de etanol e 7,2 mL de acetona.

Por outro lado, as menores RM foram observadas nas extrações realizadas com 100% de acetona, 100% de água e uma mistura de 50% etanol/50% acetona. Esses resultados refletem a polaridade das substâncias fenólicas estudadas, que apresentam solubilidade variável entre água e

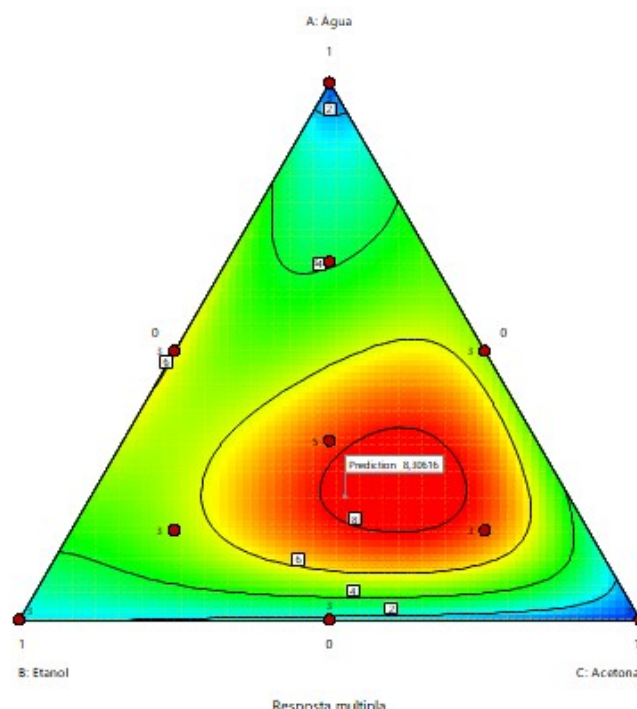
solventes orgânicos. Muitos compostos fenólicos se dissolvem preferencialmente em água, enquanto outros mostram maior solubilidade em solventes orgânicos. Desta forma, uma combinação equilibrada entre esses tipos de solventes favorece a extração dessas moléculas (FELIX *et al.*, 2018). Em um estudo conduzido por Šaponjac e colaboradores (2021) para a otimização da extração de carotenoides e polifenóis da cenoura, foi obtido o maior rendimento dessas substâncias com a mistura composta por 34% de acetona, 46% de etanol e 20% de água. Alcântara e colaboradores (2018) estudaram o efeito da composição da mistura de água, acetona e etanol na extração de compostos fenólicos das sementes de chia, sendo obtido o melhor resultado com a mistura ternária água – etanol – acetona na proporção de 1/6, 1/6 e 2/3, respectivamente. Esses resultados estão em consonância com os obtidos no presente estudo, pois as extrações mais eficientes foram alcançadas com misturas que combinavam diferentes percentuais dos três solventes, promovendo a otimização da extração das substâncias presentes nas folhas de *P. cincinnata*.

Figura 8 – Superfície de resposta para o planejamento de mistura.



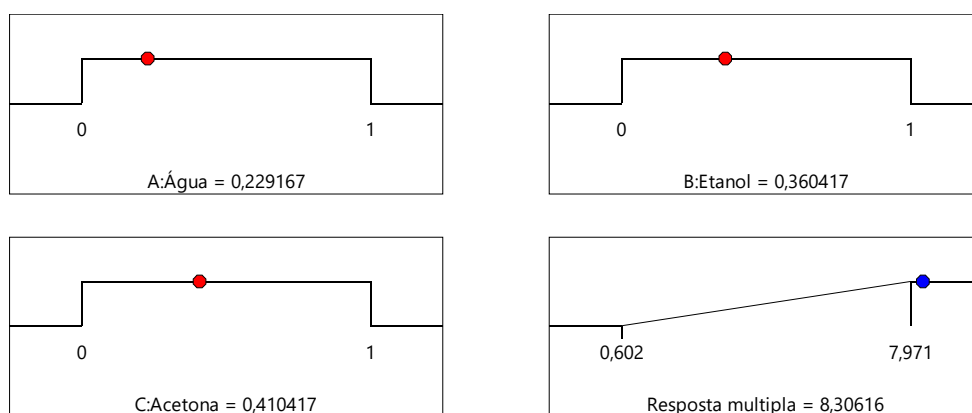
Fonte: Elaboração própria (2024)

Figura 9 – Contorno de superfície para o planejamento de mistura.



Fonte: Elaboração própria (2024).

Figura 10 – Coeficientes obtidos para o planejamento de mistura.



Fonte: Elaboração própria (2024).

Para determinar o modelo que melhor explica os resultados obtidos, foram testados os modelos linear, quadrático, cúbico, especial cúbico, especial quadrático e quártico, sendo que os melhores resultados foram alcançados com o modelo quadrático especial, conforme demonstrado na Tabela 11. Nessa análise, foi selecionado o polinômio de maior ordem em que os termos adicionais se mostraram estatisticamente significativos e o modelo não apresentou sobreposição ou confusão entre os efeitos dos fatores. A seleção focou na maximização do R^2_{Ajustado} e do R^2_{Previsto} , indicadores que avaliam tanto o ajuste do modelo aos dados observados quanto sua capacidade preditiva.

A qualidade do modelo obtido é avaliada pela análise de variância (ANOVA), mostrada na Tabela 11, com um nível de confiança superior a 95% (p -valor $< 0,05$). O p -valor demonstra a significância do modelo, e quanto menor o valor, maior é essa significância, indicando a robustez estatística do ajuste. Segundo Moreira *et al.* (2020), um p -valor inferior a 0,05 indica que o modelo é significativo. Assim, o modelo obtido pode ser considerado altamente significativo, uma vez que apresentou um p -valor $< 0,0001$, indicando uma excelente adequação para a interpretação dos resultados.

Para avaliar a significância do modelo, é importante também avaliar o valor de F, que representa a razão entre a média quadrática do modelo e a média quadrática residual. Esse valor é comparado com o valor de F tabelado, considerando os graus de liberdade e um nível de confiança de 95%. O valor de F obtido ($F_{(8,23)} = 109,21$) é significativamente maior que o valor de F tabelado ($F_{(8,23)} = 2,37$) para o intervalo de confiança de 95%, indicando que o modelo é altamente significativo para a explicação dos dados.

Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) para o planejamento de misturas simplex-centroide.

Fonte	Soma Quadrática	GL ¹	Média quadrática	F-valor	p -valor
Modelo	202,37	8	25,30	109,21	$< 0,0001$
⁽¹⁾ Mistura Linear	1,29	2	0,6475	2,80	0,0819
AB	38,48	1	38,48	166,14	$< 0,0001$
AC	37,68	1	37,68	162,65	$< 0,0001$
BC	0,0230	1	0,0230	0,0993	0,7555
A ² BC	11,08	1	11,08	47,84	$< 0,0001$
AB ² C	0,9697	1	0,9697	4,19	0,0523
ABC ²	32,21	1	32,21	139,07	$< 0,0001$
Residual	5,33	23	0,2316		
Falta de ajuste	4,97	1	4,97	301,65	$< 0,0001$

Erro puro	0,3621	22	0,0165
Cor Total	207,70	31	
Desvio padrão			0,4813
R^2			0,9743
R^2_{ajustado}			0,9654
R^2_{previsto}			0,9555
Precisão adequada			27,2746

¹Graus de liberdade

O modelo também foi avaliado pelos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}). O valor de R^2 representa a proporção da variação total da variável dependente explicada pelo modelo de regressão (MOREIRA *et al.*, 2020). Neste caso, o R^2 obtido foi de 0,9743, indicando que o modelo explica aproximadamente 97,43% das variações observadas nos resultados experimentais. A proximidade entre o R^2_{ajustado} e o R^2_{previsto} (com uma diferença dentro do limite de 0,20) indica uma excelente concordância, sugerindo que a variação explicada é consistente com o modelo, o que reforça sua adequação.

Um modelo é considerado bem ajustado aos dados experimentais quando apresenta uma regressão significativa e ausência de falta de ajuste. Contudo, embora o modelo em questão apresente falta de ajuste, essa imperfeição não inviabiliza necessariamente seu uso. Em análises experimentais, a falta de ajuste pode surgir devido à variabilidade inerente dos dados, pois as variações residuais associadas ao erro puro são decorrentes de flutuações aleatórias nas medições. Ainda assim, a elevada significância estatística evidenciada pelo valor de F do modelo, juntamente com a proximidade dos valores obtidos para R^2_{ajustado} e o R^2_{previsto} , reforça que o modelo quadrático especial é adequado para interpretar os resultados gerados e explorar o espaço do PM com confiança.

Além disso, a precisão adequada do modelo, que mede a relação sinal-ruído, foi de 27,3, valor muito superior ao mínimo desejável de 4 (Miller e Miller, 2010). Esse valor indica uma excelente discriminação do modelo, reforçando sua utilidade para a exploração do espaço experimental. O desvio padrão obtido de 0,48 também reflete uma baixa dispersão dos dados, sugerindo uma excelente precisão nas medições.

Portanto, apesar da observada falta de ajuste, o modelo é estatisticamente significativo e mostra boa capacidade de explicação da variabilidade dos dados. Assim, ele foi considerado adequado.

A Equação 9 descreve o modelo matemático obtido, correlacionando os valores das três variáveis com a resposta analítica (RM) observada. Nesta equação, os termos que não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) foram omitidos.

$$RM = 1,13 A + 2,18 B + 0,72 C + 17,51 AB + 17,33 AC - 195,62 A^2BC + 333,55 ABC^2 \quad \text{Eq. (9)}$$

Onde RM = Resposta Múltipla; A = água; B = etanol; e C = acetona.

A RM prevista pelo software, ao utilizar a proporção ideal de 23% de água, 36% de etanol e 41% de acetona, foi de 8,31, com um intervalo de confiança (IC) de 6,29 a 8,75, a 95% de confiança. Para validar a precisão do modelo matemático, foram realizados experimentos de verificação (em triplicata) nessas condições otimizadas. A RM obtida experimentalmente foi de $8,30 \pm 0,41$, mostrando-se plenamente consistente com o valor previsto pelo modelo. Assim, o modelo estatístico foi validado experimentalmente, e essa proporção ideal dos solventes foi utilizada nos estudos subsequentes.

4.5. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

O planejamento Plackett-Burman (PPB) é uma técnica de triagem amplamente utilizada para avaliar fatores significativos em processos que envolvem um grande número de variáveis independentes (LARABI *et al.*, 2024). O PPB foi escolhido devido à sua capacidade de reduzir o número de experimentos necessários, sendo adequado para identificar os efeitos principais com eficiência (TARLEY *et al.*, 2009).

A modelagem matemática foi realizada por meio de uma equação de primeiro grau:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad \text{Eq. (10)}$$

Onde Y representa a resposta predita, β_0 é constante do modelo de regressão (termo independente), β_i corresponde ao coeficiente angular e X_i representa os níveis das variáveis independente (LARABI *et al.*, 2024).

O PPB foi utilizado para determinar quais das variáveis estudadas são significativas no sistema, ou seja, quais influenciam de forma relevante a resposta analítica (RM). Os resultados experimentais, obtidos a partir da matriz de triagem, foram analisados no software Design Expert 13.

Os fatores avaliados foram apresentados no item 3.9, e as respostas múltiplas obtidas após a execução da matriz experimental podem ser observadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos como resposta múltipla para o planejamento Plackett-Burman (PPB).

Experimento	Resposta Múltipla
1	4,95262 / 5,212
2	7,60822 / 7,69487
3	4,30429 / 4,43357
4	5,09749 / 4,82664
5	5,12375 / 4,823
6	4,76122 / 5,07273
7	4,85824 / 5,12305
8	8,16962 / 7,73377
9	6,41397 / 6,53107
10	4,93019 / 5,14169
11	6,28236 / 5,96007
12	7,15452 / 7,526
13	5,46371
14	5,62126
15	5,46166

A Tabela ANOVA (Tabela 13) indica que o modelo é altamente significativo, com um p -valor inferior a 0,0001 para um nível de confiança de 95%. A análise do valor de F também foi realizada para avaliar a significância do modelo. Este valor, que representa a razão entre a média quadrática do modelo e a média quadrática residual, deve ser superior ao valor de F tabelado para os mesmos graus de liberdade, a fim de demonstrar significância estatística. Para um intervalo de confiança de 95%, o valor obtido ($F_{(11,14)} = 91,17$) é consideravelmente superior ao valor tabelado ($F_{(11,14)} = 2,57$), reforçando a adequação do modelo.

Tabela 13 – Tabela ANOVA para o planejamento Plackett-Burman (PPB).

Fonte	Soma Quadrática GL ¹		Média quadrática	F-valor	p -valor
Model	33,89	11	3,08	91,17	< 0,0001
A-RPM	0,0019	1	0,0019	0,0566	0,8154
B-Tempo de EAH	3,29	1	3,29	97,42	< 0,0001
C-Tempo de EAU	0,0642	1	0,0642	1,90	0,1899
D-Temperatura do banho	13,18	1	13,18	389,98	< 0,0001
E-potência	0,8856	1	0,8856	26,21	0,0002
F-Relação L/S	0,0001	1	0,0001	0,0024	0,9614
G-Tamanho de partícula	1,65	1	1,65	48,69	< 0,0001
H-Frequência	4,69	1	4,69	138,64	< 0,0001
Erro puro	0,4731	14	0,0338		
Cor Total	34,62	26			
Desvio padrão			0,1838		

R^2	0,9862
R^2_{ajustado}	0,9754
R^2_{previsto}	0,9458
Precisão adequada	28,0865

¹Graus de liberdade.

O R^2 de 0,9743 indica que o modelo explica aproximadamente 97,43% da variação observada nos resultados experimentais. A alta concordância entre o R^2_{ajustado} e o R^2_{previsto} demonstra que o modelo captura de forma consistente a variabilidade dos dados. A precisão adequada de 28,1 foi bem superior ao mínimo recomendado. Além disso, o desvio padrão obtido de 0,18 também reflete uma baixa dispersão dos dados, sugerindo uma excelente precisão nas medições.

Por meio da tabela ANOVA (Tabela 14) também foi possível identificar as variáveis significativas ($p < 0,05$), sendo elas: temperatura do banho ultrassônico (**D**), frequência (**H**), tempo de EAH (**B**), tamanho da partícula (**G**) e potência (**E**).

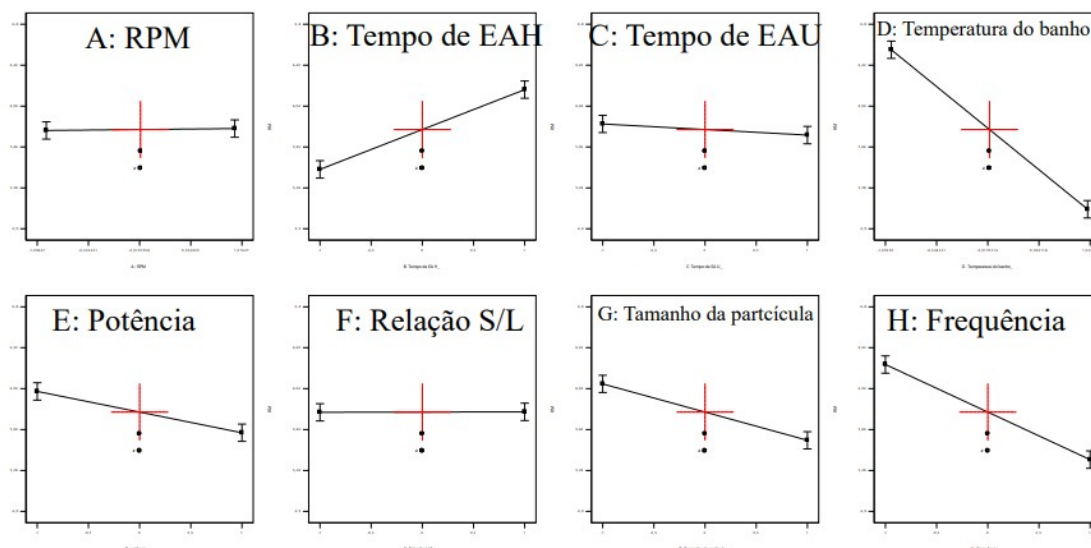
A Equação 11 descreve o modelo matemático obtido, correlacionando as variáveis independentes com a variável dependente (RM). Nesta equação, os termos que não apresentaram significância estatística ($P > 0,05$) estão indicados em vermelho.

$$RM = 5,82 + \mathbf{0,009 A} + 0,370 B - \mathbf{0,052 C} - 0,741 D - 0,192 E + \mathbf{0,002 F} - 0,262 G - 0,4418 H$$

Eq. (11)

A equação em termos de fatores codificados permite realizar previsões sobre a RM para valores específicos de cada fator, com os níveis altos codificados como **+1** e os níveis baixos como **-1**. Esse formato codificado da equação facilita a identificação do impacto relativo de cada fator, através de uma comparação direta dos coeficientes de cada um. Para complementar essa análise, o gráfico de Efeitos de Um Fator (Figura 11) fornece uma visualização clara das informações extraídas da Equação 11. Esse gráfico ilustra o efeito linear da alteração no nível de cada fator isoladamente, mostrando as previsões da resposta para os níveis baixo (**-1**) e alto (**+1**) de cada fator. Assim, ele permite uma interpretação mais intuitiva sobre como a variação de um único fator pode influenciar a resposta.

Figura 11 – Efeito de um fator para o planejamento Plackett-Burman.



A análise da Equação 11 e da Figura 11 revela que o tempo de EAH (variável **B**) exerce uma influência significativa na RM quando utilizado em seu nível mais alto (+1). Esse resultado indica que a extração dos compostos bioativos se torna mais eficiente com o aumento do tempo em que a matriz vegetal permanece em contato com o solvente durante a EAH. Resultados semelhantes foram obtidos por Santana et al. (2017) na otimização da extração de compostos fenólicos das sementes de *Passiflora edulis*, com os melhores resultados sendo obtidos com 30 minutos de extração. Sai-Ut e colaboradores (2023) avaliaram o efeito do tempo na otimização da extração de compostos fenólicos e antioxidantes das sementes de *P. edulis*, obtendo os melhores resultados para níveis mais altos (+1). Dessa forma, a prolongamento do tempo de EAH pode ser considerada um fator decisivo para otimizar a extração.

Dando continuidade à análise, observa-se que a temperatura do banho ultrassônico (**D**) apresentou um coeficiente negativo na Equação 11, indicando que o próximo planejamento de otimização deve exigir ajustes para testar novas temperaturas próximas ao nível inferior (-1). Embora seja amplamente reconhecido que temperaturas mais elevadas podem favorecer a extração de princípios ativos, temperaturas excessivas podem levar à degradação de certas substâncias, reduzindo a concentração final do metabólito especial de interesse (CARRERA *et al.*, 2012). Carrera e colaboradores (2012) também relataram que o aumento da temperatura durante a EAU reduziu o rendimento de compostos orgânicos, corroborando os resultados observados neste estudo e sugerindo que o controle da temperatura é uma etapa crucial do processo para maximizar a eficiência da extração sem comprometer a integridade das substâncias bioativas.

De maneira semelhante, observou-se que a potência do ultrassom mostrou melhores resultados em níveis mais baixos. Embora o aumento da potência facilite a ruptura da parede

celular, promovendo maior liberação dos metabólitos especiais e elevando a concentração final das substâncias extraídas, níveis excessivamente altos de potência podem resultar na degradação de compostos sensíveis presentes na matriz vegetal (MOREIRA, 2020). Assim, o controle cuidadoso da potência ultrassônica é essencial para maximizar a eficiência da extração sem comprometer a integridade dos compostos.

O tamanho das partículas também influenciou positivamente a extração nos níveis mais baixos, indicando que partículas menores aumentam significativamente a quantidade de substâncias extraídas. Isso ocorre porque a redução do tamanho das partículas amplia a superfície de contato disponível para interação com o solvente, facilitando a liberação das substâncias bioativas após o rompimento das paredes celulares (SPIGNO *et al.*, 2007). Esse comportamento está em concordância com resultados relatados anteriormente por Rajha e colaboradores (2014), que também observaram um aumento na eficiência de extração ao reduzir o tamanho das partículas.

Para as variáveis que não apresentaram significância estatística em relação à RM, optou-se por fixá-las em níveis adequados, seguindo as soluções matemáticas fornecidas pelo software para otimização dessas variáveis. Esse procedimento garante que os fatores não significativos permaneçam estáveis em seus níveis adequados, evitando interferências nos resultados de extração.

Para o cálculo dos valores experimentais de cada variável não significativa, utilizou-se a Equação 2 (item 3.10), que permite converter os valores codificados, obtidos pelo PPB, em valores reais, facilitando a implementação prática do experimento. A Tabela 14 apresenta os valores fixados para as variáveis não significativas, conforme os cálculos realizados.

Tabela 14 – Níveis fixados para variáveis não significativas de acordo os resultados do PPB.

Variável	Valor Codificado	Valor real
Agitação	0,767	182 RPM
Tempo EAU	-0,239	31 minutos
Relação líquido/sólido	0,413	34 mL g ⁻¹

Com base nos resultados obtidos pelo PPB, os níveis dos fatores significativos foram otimizados utilizando a Matriz de Doehlert, com exceção da frequência ultrassônica (**H**). A frequência, que apresentou melhor desempenho em níveis mais baixos, foi fixada em 37 Hz, devido

às configurações do equipamento utilizado nos experimentos, que possibilita o ajuste apenas entre 37 Hz e 80 Hz.

Os demais fatores significativos foram explorados e otimizados por meio de uma Matriz de Doehlert, visando alcançar as melhores condições de extração para maximizar a RM. Essa otimização, que permitiu o ajuste detalhado dos níveis de cada fator, representa uma etapa fundamental no processo, contribuindo para maximizar a eficiência de extração das substâncias bioativas de *P. cinnata*.

4.6. MATRIZ DE DOEHLERT

A Matriz de Doehlert (MD) foi utilizada para otimizar as variáveis identificadas como significativas no PPB. Os experimentos foram conduzidos com base na MD desenvolvida conforme as variáveis e níveis listados na Tabela 15. Esse planejamento resultou em uma matriz com 21 experimentos realizados em duplicata, exceto o ponto central, executado em triplicata.

Tabela 15 – Fatores otimizados por meio da Matriz de Doehlert (MD).

Variáveis		Níveis (codificados e reais)						
X_1 = Potência (W): 5 níveis	codificado	-1,0	-0,5	0	0,5	1,0		
	experimental	30	40	50	60	70		
X_2 = Temperatura do banho (7 níveis)	codificado	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
	experimental	22	26	31	35	39	44	48
X_3 = Tempo de EAH (7 níveis)	codificado	-0,817	-0,613	-0,204	0	0,204	0,613	0,817
	experimental	10	15	25	30	35	45	50
X_4 = #tamanho da partícula mm (3 níveis)	codificado	-0,791		0		0,791		
	experimental		0,710		0,855*		1,00	

* 0,85 mm corresponde à média do tamanho das partículas retidas nas peneiras de 0,710 mm e 1,00 mm.

A quantidade de experimentos necessários é dada pela fórmula

$$N = k^2 + k + C_o, \quad \text{Eq. (12)}$$

onde k representa o número de variáveis e C_o é o número de replicatas do ponto central (FELIX *et al.*, 2018). A Tabela 16 apresenta a matriz experimental da MD, com as médias das RM obtidas para

cada ensaio, exceto para o ponto central. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software Design Expert 13.

Tabela 16 – Matriz experimental e respostas múltiplas da Matriz de Doehlert (MD).

Ordem padrão	Ordem aleatória	X₁ = Potência	X₂ = Temperatura do banho	X₃ = Tempo de EAH	X₄ = Tamanho da partícula	Resposta Múltipla
1	16	0	0	0	0	6,376
2	2	0	0	0	0	6,64
3	7	0	0	0	0	6,782
4	18	1	0	0	0	6,423
5	4	0,5	0,866	0	0	5,286
6	14	0,5	0,289	0,817	0	5,541
7	6	0,5	0,289	0,204	0,791	3,792
8	13	-1	0	0	0	6,053
9	23	-0,5	-0,866	0	0	4,826
10	1	-0,5	-0,289	-0,817	0	6,548
11	12	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	4,448
12	21	0,5	-0,866	0	0	5,407
13	3	0,5	-0,289	-0,817	0	6,939
14	5	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	6,547
15	19	-0,5	0,866	0	0	5,788
16	9	0	0,577	-0,817	0	7,942
17	17	0	0,577	-0,204	-0,791	6,077
18	10	-0,5	0,289	0,817	0	5,731
19	8	0	-0,577	0,817	0	7,02
20	20	0	0	0,613	-0,791	6,98
21	22	-0,5	0,289	0,204	0,791	5,591
22	11	0	-0,577	0,204	0,791	4,193
23	15	0	0	-0,613	0,791	6,357

A análise estatística dos efeitos principais e das interações entre os fatores foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) (Tabela 19). Os valores de significância estatística foram determinados pelo p -valor, em que valores mais baixos correspondem a maior confiabilidade do modelo (MOREIRA et al., 2020). Para o modelo estudado, o p -valor de $< 0,0001$ indica uma elevada significância estatística, validando a adequação do modelo para representar os dados.

Além do p -valor, o modelo foi avaliado por meio da distribuição F, que expressa a relação entre a Média Quadrática do Modelo / Média Quadrática dos Resíduos, permitindo uma avaliação da variabilidade dos dados em torno da média. Para os graus de liberdade selecionados, o valor calculado ($F_{(14,8)} = 27,81$) superou o valor tabelado ($F_{(14,8)} = 3,24$), reforçando a significância do modelo. A falta de ajuste não foi significativa, com um valor calculado de F ($F_{(6,2)} = 1,40$) bem inferior ao valor tabelado ($F_{(6,2)} = 19,33$). Essa ausência de significância na falta de ajuste indica uma elevada capacidade preditiva e confiabilidade do modelo.

Também foram considerados para avaliação da qualidade do modelo R^2 , o R^2_{ajustado} e o coeficiente de variação (CV). O valor obtido para R^2 , de 97,99%, reforça que o modelo explica de forma satisfatória a variação dos resultados experimentais, demonstrando linearidade consistente. O CV (3,94%) reflete a precisão dos experimentos realizados, garantindo confiabilidade nas previsões e na interpretação dos dados experimentais (ABOULGHAZU *et al.*, 2024).

Além disso, a precisão adequada do modelo, medida pela relação sinal-ruído, foi de 23,54, um valor bem acima do mínimo recomendado de 4. Esse resultado indica que o modelo matemático proposto é confiável para explorar o espaço experimental da MD. A qualidade do ajuste também foi confirmada pelo gráfico de valores preditos *versus* valores experimentais (Figura 12), que apresentou uma boa correlação entre os dados, com distribuição normal e ausência de valores anômalos, reforçando a adequação das ferramentas estatísticas para descrever a relação entre as variáveis independentes e a RM.

Para avaliar a necessidade de transformações adicionais nos dados, foi utilizado o gráfico de Box-Cox (Figura 13). Nesse gráfico, o valor de lambda (λ), que indica a melhor transformação de potência, foi localizado no ponto mínimo do gráfico, demonstrando que os resíduos possuem distribuição normal. Como o intervalo de confiança para λ incluiu o valor ideal de 1, concluiu-se que não foram necessárias transformações adicionais nos dados.

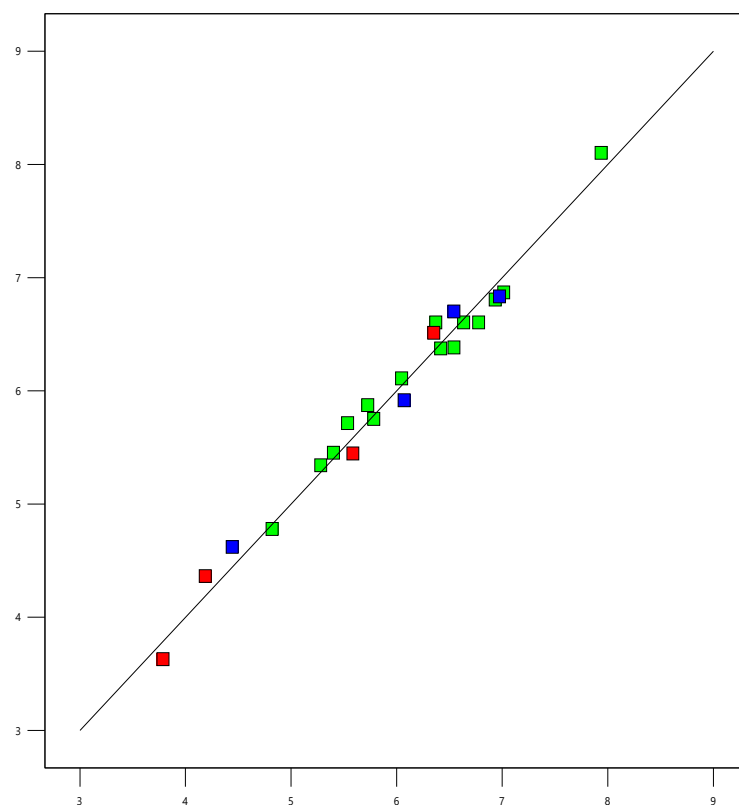
Tabela 17 – Análise de Variância (ANOVA) para a Matriz de Doehlert (MD).

Fonte	Soma quadrática	gl ¹	Média quadrática	F-valor	p-valor
Modelo	21,55	14	1,54	27,81	< 0,0001 significativo
X ₁ - Potência (W)	0,0871	1	0,0871	1,57	0,2450
X ₂ - Temperatura do banho	0,3093	1	0,3093	5,59	0,0457
X ₃ - Tempo de EAH	1,68	1	1,68	30,27	0,0006
X ₄ - Tamanho	2,12	1	2,12	38,35	0,0003

da partícula					
X_1X_2	0,2932	1	0,2932	5,30	0,0503
X_1X_3	0,0108	1	0,0108	0,1960	0,6697
X_1X_4	2,69	1	2,69	48,68	0,0001
X_2X_3	3,05	1	3,05	55,11	< 0,0001
X_2X_4	0,0035	1	0,0035	0,0641	0,8065
X_3X_4	1,51	1	1,51	27,32	0,0008
X_1^2	0,1567	1	0,1567	2,83	0,1310
X_2^2	2,98	1	2,98	53,88	< 0,0001
X_3^2	0,3558	1	0,3558	6,43	0,0349
X_4^2	3,20	1	3,20	57,77	< 0,0001
Residual	0,4427	8	0,0553		
Falta de ajuste	0,3578	6	0,0596	1,40	0,4720
Puro Erro	0,0849	2	0,0424		
Correção Total	21,99	22			
Desvio padrão			0,2352		
R^2			0,9799		
$R^2_{ajustado}$			0,9446		
Precisão adequada			23,5410		
Coeficiente de variação (%)			3,94		

¹Graus de liberdade.

Figura 12 – Relação dos valores preditos *versus* experimentais.

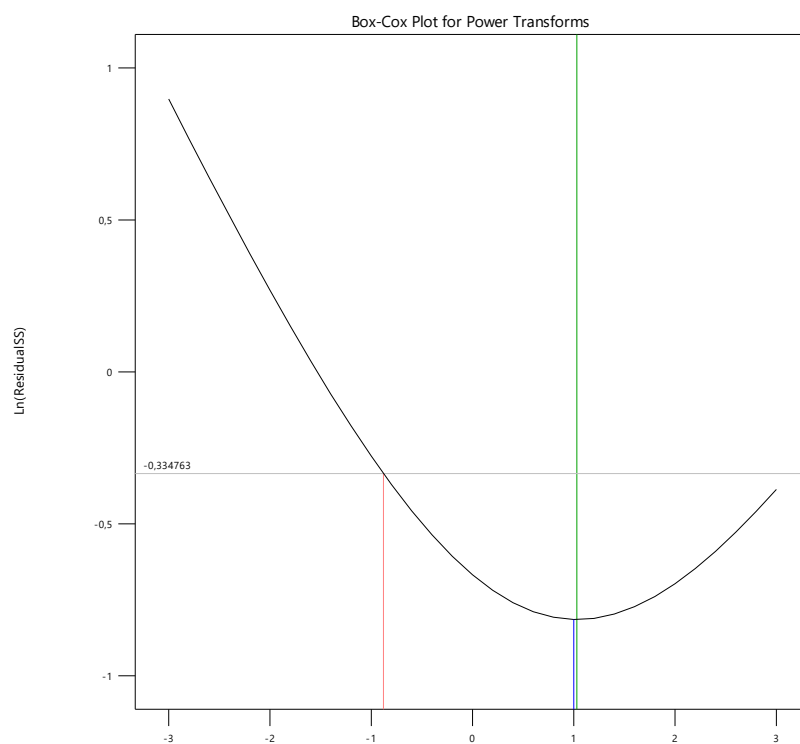


Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 13 – Gráfico de Box-Cox.

Current Lambda = 1

Recommended transform:
None



Fonte: Autoria própria (2024).

A função que relaciona os fatores potência (X_1), temperatura do banho ultrassônico (X_2), tempo de EAH (X_3) e tamanho de partícula (X_4) com a RM é expressa pela Equação 12. Os termos em negrito são significativos em um nível de confiança de 95%.

$$RM = 0,1320 X_1 + \mathbf{0,2154 X_2} - \mathbf{0,4726 X_3} - \mathbf{0,5151 X_4} - 0,5415 X_1 X_2 - 0,1098 X_1 X_3 - \mathbf{1,74 X_1 X_4} - \mathbf{1,59 X_2 X_3} + 0,0574 X_2 X_4 - \mathbf{1,07 X_3 X_4} - \mathbf{0,3613 X_1^2} - \mathbf{1,18 X_2^2} + \mathbf{0,3444 X_3^2} - \mathbf{0,9238 X_4^2} + 6,60$$

Eq. (13)

Essa função pode ser representada graficamente por meio de superfícies de resposta (3D) e gráficos de contorno (2D). Os gráficos de contorno, apresentados na Figura 9, permitem observar como duas variáveis contínuas se relacionam com a resposta ajustada pelo modelo matemático. O uso da MSR facilita a visualização dos valores ótimos para cada fator, de modo que uma análise detalhada das curvas de nível apresentadas na Figura 10 revele os níveis ideais que as variáveis devem assumir para maximizar a extração das substâncias bioativas das folhas de *P. cinnamomum*. Para cada gráfico de contorno, dois fatores foram ajustados, enquanto os demais foram mantidos constantes.

A Figura 14A apresenta a interação entre a potência ultrassônica (X_1) e a temperatura do banho (X_2), indicando que os melhores resultados para a RM foram obtidos com a elevação da temperatura do banho entre 39 e 44 °C e a diminuição da potência ultrassônica entre 30 e 40 W. Embora tanto o aumento de temperatura quanto o de potência favoreçam a extração de substâncias bioativas, valores elevados simultâneos desses fatores podem degradar compostos sensíveis (CARRERA *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2020). Esse comportamento explica por que a combinação entre uma menor potência e uma temperatura de banho elevada resultou nos melhores valores de RM.

A Figura 14B mostra a interação entre a potência (X_1) e o tempo de EAH (X_3), onde os maiores valores para a RM foram obtidos para menores valores de X_1 e X_3 . A análise dessa figura indica que o tempo ótimo de EAH foi observado entre 10 e 15 minutos, o qual se mostrou adequado para extrair as substâncias bioativas preservando sua integridade.

A interação entre o tamanho da partícula (X_4) e temperatura do banho (X_2) é mostrada na Figura 14C. Observa-se que a RM foi favorecida pelo aumento de ambos os fatores, desde que dentro de intervalos seguros, evitando valores extremos. A redução no tamanho das partículas aumenta a área de contato, facilitando a extração (SPIGNO *et al.* 2007). No entanto, foi observado que partículas com os maiores tamanhos testados foram eficazes para promover o contato entre o

solvente e a matriz vegetal, sugerindo que a combinação de um tamanho de partícula moderado com uma temperatura do banho ultrassônico elevada é suficiente para otimizar a extração

A Figura 14D apresenta o gráfico de contornos para os fatores X_2 e X_3 . Os melhores resultados foram obtidos para temperaturas entre 39 e 44 °C e tempos de EAH entre 10 e 15 minutos, corroborando com as tendências observadas nas curvas de nível anteriores.

A relação entre o tempo de EAH (X_3) e tamanho da partícula (X_4) é apresentada na Figura 14E, onde é possível observar que os melhores resultados foram obtidos para tempos de EAH entre 10 e 15 minutos e tamanho da partícula de 1,00 mm. A Figura 14F apresenta a relação entre a potência e o tamanho de partícula, sendo obtidos os melhores resultados para a RM para valores de potência entre 30 e 40 W e tamanho de partícula de 1,00 mm. Essas duas figuras corroboram com as tendências observadas nas curvas de nível anteriores.

Finalmente, o ponto ótimo para maximizar a RM foi determinado por critérios gráficos e matemáticos, nas condições de 40 W de potência, banho ultrassônico com a temperatura de 39 °C, tempo de EAH de 13 minutos e tamanho da partícula de 1,0 mm. A Tabela 20 apresenta os valores codificados e reais (experimentais) para as variáveis independentes no ponto crítico.

Em uma pesquisa por Jebli *et al.* (2024), com o objetivo de otimizar a extração de compostos fenólicos da casca de *Passiflora edulis*, foram obtidos melhores resultados com a temperatura de 49,64 °C, um valor relativamente próximo do que foi encontrado por meio da MD nesse estudo com as folhas de *P. cincinnata*, de 39 °C. Além disso, no trabalho de Jebli e colaboradores (2024), não foi utilizada a EAU, fator que pode ter contribuído para que fosse necessário o emprego de temperaturas um pouco mais elevadas.

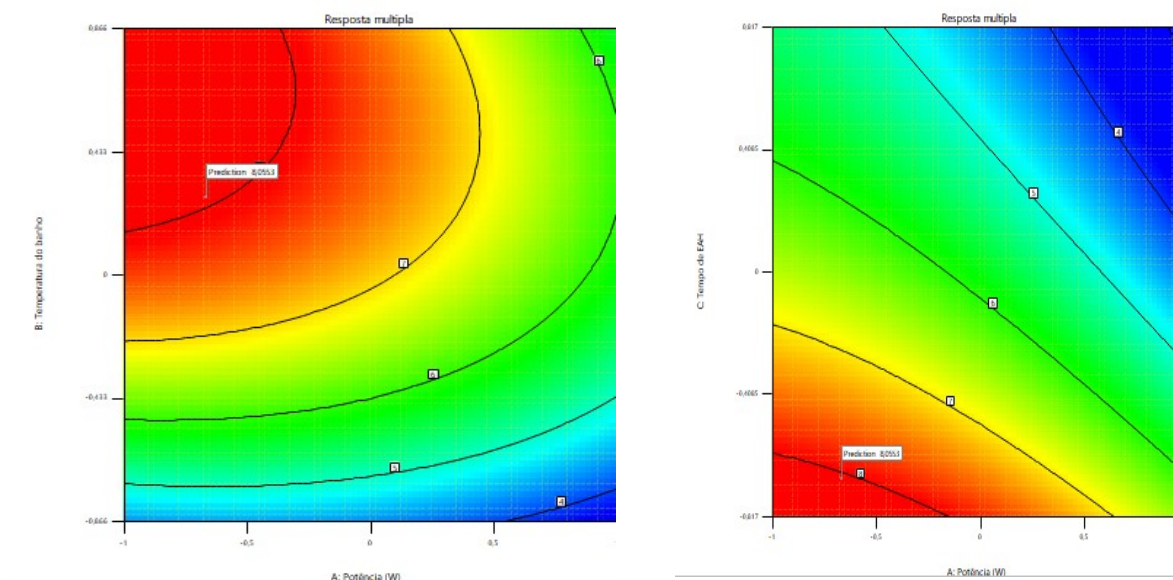
A utilização da EAU favorece a diminuição da temperatura extração, o que torna o procedimento mais econômico e ecológico. O efeito da EAU pode observado por meio da comparação com diferentes estudos que investigaram a otimização da extração de compostos bioativos de diferentes espécies de *Passiflora*. Santana e colaboradores (2017) investigaram a otimização da extração de compostos fenólicos das sementes de *P. edulis*, e obtiveram melhores resultados com a temperatura de 80 °C.

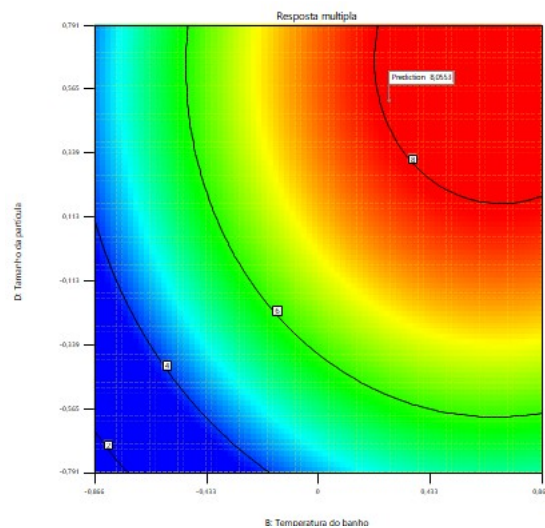
Além disso, o emprego da EAU também reduz consideravelmente o tempo de extração. Em um estudo conduzido por Sai-Ut *et al.* (2023), foram necessários 186 minutos para obter o melhor resultado na extração de fenólicos das sementes de *P. edulis*. Gomes *et al.* (2017) investigaram o processo de extração de cinco flavonoides das folhas de *P. edulis* e *P. alata*, sendo necessários cinco ciclos de 10 minutos (totalizando 50 minutos) para obter a maior concentração desses flavonoides na extração acelerada por solvente, evidenciando novamente a importância da EAU na redução do tempo de extração.

Vo *et al.* (2023; 2024) investigaram a otimização da EAU dos compostos fenólicos das cascas de *P. edulis*, obtendo melhores resultados para temperaturas de 63 °C e 60 °C, e potência de 608 W e 600 W, respectivamente. O tempo de extração foi de 20 minutos em ambos estudos. Apesar de apresentar um tempo de extração semelhante, a temperatura e a potência empregadas foram maiores do que os valores obtidos por meio da MD para a otimização da extração dos compostos de *P. cinnamomum*. Essa diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato de que, no presente estudo, além da EAU, foi empregada também a EAH, o que resultou no aumento do tempo de contato da matriz vegetal com o solvente extrator, e proporcionou um maior rompimento da parede celular.

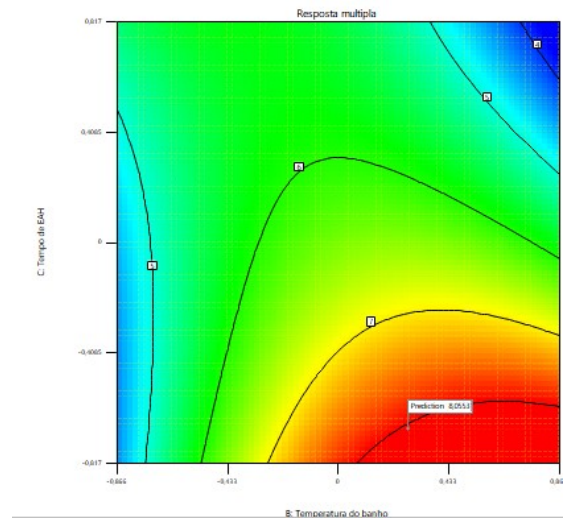
Felix e colaboradores (2018) otimizaram o processo de extração de compostos fenólicos de resíduos industriais de *Spondias mombin* L., obtendo a maior concentração desses compostos com um tempo total de extração de 20 minutos em um agitador. Esse valor é semelhante ao tempo de EAH encontrado por meio da MD, de 13 minutos.

Figura 14 – Gráficos de contorno para a resposta múltipla (RM) da EAU das folhas de *P. cinnamomum*, em função de (A) potência e temperatura do banho, (B) potência e tempo de EAH, (C) temperatura do banho e tamanho da partícula, (D) temperatura do banho e tempo de EAH, (E) tempo de EAH e tamanho da partícula e (F) potência e tamanho da partícula.

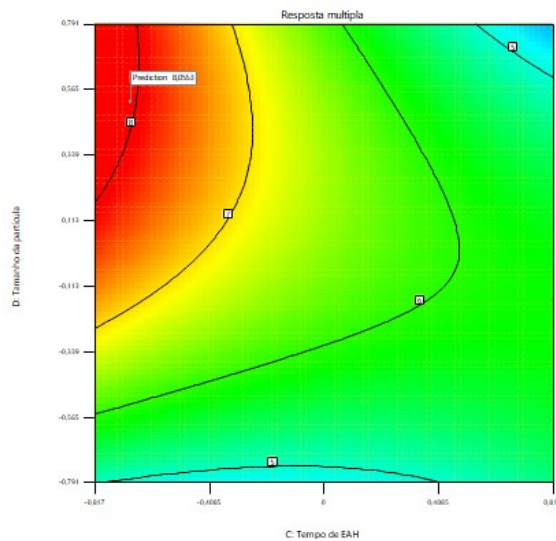




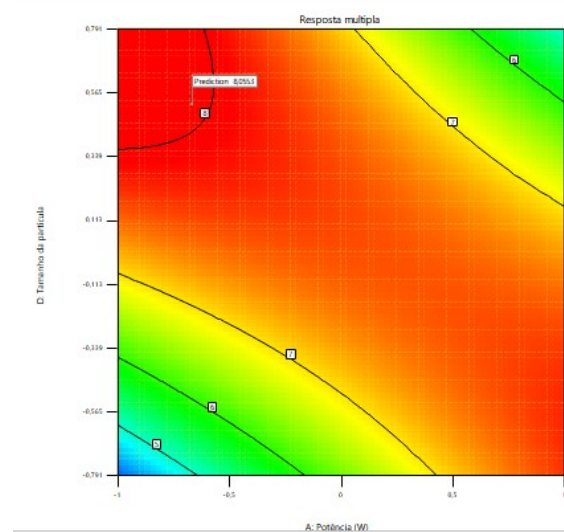
(C)



(D)



(E)



(F)

Tabela 18 – Valores codificados e reais do ponto ótimo da Matriz de Doehlert.

Variáveis	Valores codificados	Valores experimentais
Potência (X_1)	-0,667	40 W
Temperatura do banho (X_2)	0,275	39 °C
Tempo de EAH (X_3)	-0,690	13 min
Tamanho da partícula (X_4)	0,524	1,0 mm

4.7. VERIFICAÇÃO DO MODELO PREVISTO

A partir da equação de regressão estatística apresentada na Equação 12, foi possível determinar as condições ótimas para a obtenção da melhor resposta múltipla na extração das substâncias bioativas das folhas de *P. cinnamomum*. Foram realizadas extrações experimentais ($n = 3$) com as variáveis ajustadas conforme o ponto ótimo definido na Tabela 20. O objetivo dessas extrações foi comparar a RM obtida experimentalmente com a resposta prevista pelo modelo matemático gerado pelo software.

A RM prevista pelo modelo sob as condições ideais de EAU foi de $8,055 \pm 0,235$, enquanto os valores experimentais obtidos foram de $8,022 \pm 0,194$. A validade do modelo foi confirmada pela aplicação do teste t pareado, que comparou os valores previstos pelo modelo estatístico com aqueles obtidos experimentalmente. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois conjuntos de dados ($p > 0,05$), indicando uma boa correlação entre a previsão e a realidade experimental.

O coeficiente de variação para a RM das extrações experimentais foi de 2,420, o que demonstra que o método proposto é preciso e que o presente estudo de otimização é confiável. Adicionalmente, a RM obtida experimentalmente situou-se dentro da faixa do intervalo de confiança de 7,397 a 8,714, com um nível de confiança de 95%. Esses resultados indicam que o modelo se ajusta adequadamente para a extração das substâncias bioativas avaliadas sob as condições ideais de EAU.

4.8. QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS NO PONTO ÓTIMO

Após a determinação do ponto ótimo, por meio da MSR baseada em um modelo que usou PM – PFF – MD, foi possível quantificar as substâncias identificadas, utilizando as equações obtidas pelas curvas analíticas (Tabela 10, seção 4.2). A concentração de cada substâncias em $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ do extrato para as diferentes partes da planta estudadas podem ser observadas na tabela 19.

Tabela 19 – Concentrações das substâncias identificadas.

Substância	Concentração $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ do extrato						
	Casca	Flor	Folha PO	Folha POA	Folha POS	Galho	Polpa

Ácido cafeico	22,5 ^a	42,6 ^b	65,4 ^c	63,2 ^c	74,7 ^d	40,9 ^b	25,9 ^a
Ácido clorogênico	37,6 ^a	nd	265,3 ^e	181,6 ^c	203,9 ^d	64,6 ^b	22,6 ^a
Ácido cumárico	693,6 ^a	407,8 ^b	2264,6 ^c	1871,9 ^d	2291,5 ^c	1180,2 ^c	221,4 ^f
Ácido Gálico	524,0 ^a	835,0 ^b	859,2 ^b	861,4 ^b	1031,0 ^c	593,5 ^a	1606,6 ^d
Rutina	781,1 ^a	3245,6 ^b	15007,2 ^c	12793,3 ^d	15179,0 ^c	201,0 ^a	320,8 ^a
Vitexina	2242,3 ^a	2747,6 ^a	13430,2 ^b	7751,6 ^c	6936,2 ^d	1158,8 ^c	363,4 ^f
Pico A ¹	1917,2 ^a	1576,4 ^a	11405,5 ^b	7829,2 ^c	9017,4 ^d	1822,2 ^a	500,2 ^e
Pico B ²	5,2 ^a	21,9 ^b	44,7 ^c	31,2 ^d	32,4 ^d	4,3 ^a	nd
Pico C ³	21,6 ^a	61,1 ^b	522,5 ^c	418,4 ^d	463,7 ^c	65,3 ^b	nd
Total	6.245,1	8.938	43864,6	31801,8	35229,8	5130,8	3060,9

¹ Derivado da vitexina; ² derivado do ácido cafeico; ³ derivado da rutina.

Além das seis substâncias identificadas, foram avaliados também outros três picos adjacentes, referentes a derivados das substâncias ácido cafeico, rutina e vitexina. As substâncias que apresentaram maior concentração, em todas as amostras, foram rutina e vitexina. A vitexina é considerada um marcador químico da família Passifloreaceae (ALMEIDA *et al.*, 2024). Os maiores valores de vitexina foram encontrados nas folhas extraídas no ponto ótimo (13.430,2 µg g⁻¹), folhas POA (7.751,6 µg g⁻¹) e folhas POS (6.936,2 µg g⁻¹), respectivamente, seguidos da flor (2747,6 µg g⁻¹).

Em um estudo feito por Almeida *et al.* (2024) com a parte aérea (folhas e galhos) de *P. cincinnata*, com o objetivo de identificar e quantificar os flavonoides presentes nessa espécie, foi verificado que a concentração de vitexina nos extratos etanólico e metanólico foi de 3,82 e 5,25 µg · mL⁻¹, respectivamente. Esses valores são muito menores que o valor obtido para a folha no ponto ótimo, de 13.430,2 µg · g⁻¹, evidenciando a eficiência da otimização realizada em promover uma melhor extração dessa substância.

Um estudo conduzido por Gomes *et al.* (2017) teve como objetivo otimizar a extração acelerada por solventes de cinco flavonoides (rutina, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina) por meio de um planejamento Box-Behnken em diversas espécies de *Passiflora*. A concentração de vitexina no extrato das folhas de *P. cincinnata* foi inferior ao limite de detecção (0,747 mg · L⁻¹).

Dentre as 17 espécies avaliadas, apenas *P. setacea* apresentou concentração de vitexina, de $2480 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de extrato. Não foi detectada a presença de rutina nas folhas de *P. cincinnata*. Desse modo, o método desenvolvido para a otimização da EAU das substâncias bioativas de *P. cincinnata* foi mais eficiência na extração desses compostos.

Ácido gálico, ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina foram quantificados na polpa de *P. cincinnata* e *P. edulis* por Santos *et al.* (2021), após o processo de extração líquido-líquido com acetato de etila. Neste estudo, os autores encontraram na polpa de *P. cincinnata* as concentrações de $80 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $1340 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ e $1740 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, para rutina, ácido gálico e ácido clorogênico, respectivamente. Os valores para a rutina e ácido gálico são inferiores aos valores obtidos após o processo de otimização da EAU da polpa da mesma espécie, de $320,8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ e $1606,2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente; apenas a concentração de ácido clorogênico foi maior que o valor obtido, de $22,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Tais resultados evidenciam a eficiência da otimização da EAU para obter uma maior concentração das substâncias de interesse extraídas.

Silva e colaboradores (2020) avaliaram a concentração de diversos compostos presentes no fruto de uma nova variedade de *P. cincinnata* (BRS Sertão Forte) nos estágios intermediário e maduro. Dentre os compostos quantificados, estavam ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogênico e rutina. A rutina e o ácido gálico apresentaram maiores concentrações dentre as substâncias citadas, com $7,46$ e $6,07 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ para o fruto maduro, respectivamente. Ambos os valores são menores do que as concentrações obtidas por meio da otimização da EAU por meio de MSR de *P. cincinnata*, o que indica que o procedimento descrito nesse trabalho foi efetivo para promover uma maior extração das substâncias bioativas dessa espécie.

Estudos de otimização utilizando MSR foram realizados com diferentes partes de *Passiflora edulis*, o maracujá com maior distribuição comercial, por diversos autores. Jebli e colaboradores (2024) estudaram a otimização da EAU por meio de MSR para extração de compostos bioativos das cascas de *P. edulis*. Nesse estudo, os autores investigaram a influência do tempo e temperatura de extração, razão líquido/sólido e pH, encontrando o melhor resultado com as condições de 9,78 minutos, $49,64^\circ\text{C}$, $22,07 \text{ mL/g}$ e pH de 5,54. Foram avaliados ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico e rutina, sendo encontradas as concentrações de $313 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $242 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $358 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $488 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Por meio das três diferentes extrações feitas com as folhas (PO, POA e POS), foi possível avaliar tanto o efeito da utilização do banho ultrassônico, quanto o efeito da temperatura no processo extrativo. A utilização do ultrassom promoveu uma melhor extração total das substâncias avaliadas, no entanto, individualmente, as substâncias ácido clorogênico, vitexina, derivado do ácido cafeico, derivado da rutina e derivado da vitexina apresentaram melhores resultados. As

substâncias ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico e rutina apresentaram melhores concentrações na extração realizada em ultrassom e sem aquecimento, o que indica que esses compostos sofrem degradação com o calor.

Foi possível observar que a EAU promoveu um aumento de aproximadamente 72,5% na extração dos compostos quantificados, em comparação ao método de extração com aquecimento (mantendo-se constantes os demais parâmetros nas condições ótimas de extração. Isso indica que o processo de sonicação, no qual as ondas ultrassônicas rompem as paredes celulares, foi essencial para promover uma melhor liberação das substâncias bioativas analisadas da matriz vegetal.

4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para determinação da atividade antioxidante (AA) foram realizados os testes de sequestro do radical livre DPPH, sistema β -caroteno/ácido linolênico e método fosfomolibdato – capacidade antioxidante total com os extratos metanólicos das folhas (FPO), flores (FrPO), galhos (GPO), casca (CPO) e polpa (PPO) de *Passiflora cincinnata* extraídos no ponto ótimo, e nos extratos das folhas extraídos sem a presença de ultrassom e com aquecimento (FPOA), e sem a presença de ultrassom e sem aquecimento (FPOS).

4.9.1. Sequestro do radical livre DPPH

O teste do sequestro do radical livre DPPH foi feito conforme descrito no item 3.13.1. Após o cálculo da concentração CE_{50} , foram obtidos os seguintes resultados para as amostras e padrões avaliados, como mostra a Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste do DPPH com os extratos de *P. cincinnata* obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.

Extrato/Padrão	$CE_{50} \mu g \cdot mL^{-1} \pm DP^*$
PPO	$236,1 \pm 6,6^b$
FPO	$593,5 \pm 8,8^{c,d}$
FPOA	$1598,2 \pm 54,7^g$
FPOS	$1430,3 \pm 40,9^f$
GPO	$357,2 \pm 8,9^e$

FrPO	634,0 ± 7,5 ^d
CPO	548,2 ± 13,3 ^c
Quercetina	23,1 ± 0,8 ^a
Ácido ascórbico	66,8 ± 0,8 ^a

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Tukey).

Entre as partes da planta estudadas, a polpa apresentou melhores resultados para a AA por meio do teste de DPPH, com uma CE_{50} de 236,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. De acordo com a Gomes *et al.* (2012) a atividade antioxidante de uma amostra determinada pelo método DPPH pode ser considerada boa quando a CE_{50} do extrato for até três maior que a concentração do padrão, e moderada quando o valor obtido é de três a sete vezes maior que a concentração do padrão. Nesse sentido, os extratos da polpa e dos galhos apresentaram uma moderada AA em comparação com o valor obtido para o ácido ascórbico.

Em um estudo feito por Sunitha e Devaki (2009) com as folhas de *P. edulis*, após a extração etanólica em Soxhlet, foi obtido o valor de CE_{50} de $875 \pm 87,83 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando uma atividade antioxidante menor do que a encontrada nesse estudo de otimização com a espécie *P. cinnamomum*, com CE_{50} de $593,5 \pm 8,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Isso demonstra que o processo de otimização foi eficiente para aumentar a concentração de substâncias com atividade antioxidante no extrato de *P. cinnamomum*.

Leal e colaboradores (2020) investigaram a atividade antioxidante de diferentes partes de *P. cinnamomum* após o processo de maceração etanólica por 72 horas. Os valores de CE_{50} obtidos para as folhas e para a polpa foram de 65.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 87.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Apesar de os valores encontrados por Leal et al. serem inferiores aos valores obtidos nesse estudo de otimização da EAU de *P. cinnamomum* por meio de MSR, o tempo de extração de 72 horas foi muito superior ao tempo de 31 min de EAU, o que proporciona uma maior extração de substâncias com atividade antioxidante.

Por meio do teste de DPPH, também foi possível observar o efeito do banho ultrassônico na extração de substâncias antioxidantes. Observou-se que a utilização do ultrassom promoveu um aumento de cerca de 269,3% comparado com a extração convencional por aquecimento (mantendo-se constante os demais parâmetros no ponto médio), evidenciando a importância dessa etapa para a otimização da extração desses compostos.

4.9.2. Sistema β -caroteno/ácido linolênico

A tabela 21 apresenta os resultados obtidos para o teste do sistema β -caroteno/ácido linolênico.

Tabela 21 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste do β -caroteno com os extratos de *P. cincinnata* obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.

Extrato/Padrão	CE ₅₀ $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}^*$ 30 min.	CE ₅₀ $\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}^*$ 60 min.
PPO	436,6 $\pm$ 17,7 ^c	562,6 $\pm$ 14,1 ^d
FPO	516,4 $\pm$ 22,5 ^{c,d}	602,0 $\pm$ 15,7 ^d
FPOA	529,5 $\pm$ 25,4 ^d	877,2 $\pm$ 42,9 ^f
FPOS	898,4 $\pm$ 39,8 ^f	1446,3 $\pm$ 61,9 ^g
GPO	724,1 $\pm$ 31,8 ^e	934,4 $\pm$ 43,1 ^f
FrPO	524,9 $\pm$ 25,9 ^d	559,4 $\pm$ 25,7 ^d
CPO	597,8 $\pm$ 21,4 ^d	750,9 $\pm$ 26,1 ^e
Quercetina	38,6 $\pm$ 1,5 ^a	47,1 $\pm$ 2,4 ^a
Ácido ascórbico	201,5 $\pm$ 11,7 ^b	184,0 $\pm$ 12,5 ^b

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Tukey).

Os melhores resultados para o teste de β -caroteno foram obtidos na polpa, folha, flor e casca no ponto ótimo em 30 minutos, respectivamente.

Em um estudo conduzido por David *et al.* (2007), foi avaliada a AA de extratos metanólicos das partes aéreas de *P. cincinnata* por meio do teste de β -caroteno, com a concentração de 10 mg $\cdot$ mL⁻¹, o que equivale a 10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, tendo sido obtido o resultado de 70,1%. A porcentagem de AA para os extratos otimizados por meio de MSR das folhas de *P. cincinnata* foi de 49,07% para a concentração de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ após 30 minutos. Proporcionalmente, o valor encontrado por David e colaboradores (2007) para essa concentração seria de 4,21%, muito inferior ao obtido por meio da otimização, o que indica que a metodologia proposta foi eficiente para promover uma melhor extração das substâncias antioxidantes da espécie *Passiflora cincinnata*.

4.9.3. Método fosfomolibdato – capacidade antioxidante total

O método fosfomolibdato foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total das amostras. A tabela 22 mostra os resultados obtidos.

Tabela 22 – Resultados da atividade antioxidante pelo teste da capacidade antioxidante total (CAT) - complexação do fosfomolibdênio no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert

Extrato/Padrão	CE ₅₀ µg/mL ± DP*
PPO	567,7 ± 19,8 ^b
FPO	1189,6 ± 48,8 ^{d,e}
FPOA	1075,5 ± 37,0 ^{c,d}
FPOS	1289,5 ± 53,9 ^e
GPO	966,6 ± 41,8 ^c
FrPO	1206,3 ± 60,2 ^c
CPO	648,5 ± 7,5 ^b
Quercetina	136,6 ± 7,3 ^a
Ácido gálico	121,5 ± 3,6 ^a

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Tukey).

Os melhores resultados foram obtidos para a polpa e casca, com CE₅₀ de, respectivamente, 567,7 e 648,5 µg·mL⁻¹.

Em um estudo conduzido por Nithya *et al.* (2024), foi avaliada a CAT dos frutos de *P. edulis*. Os extratos foram preparados com diferentes proporções do suco concentrado dos frutos e humor aquoso artificial. Para a concentração de 200 µL · mL⁻¹, foi obtida uma AA de 11,87%, enquanto que, nesse estudo de otimização da *P. cinnamomum*, para a concentração de 200 µg·mL⁻¹, foi obtida uma AA de 20,8%.

Não foram encontrados na literatura relatos de determinação da atividade antioxidante de *P. cinnamomum* por meio do método CAT – complexação do fosfomolibdênio, de modo que este é o primeiro relato.

4.10. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TPT)

O teor de fenólicos totais (TPT) das extrações feitas no ponto ótimo foi determinado por meio do método de Folin-Ciocalteu, usando ácido gálico como padrão. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para a construção da curva analítica. Os resultados obtidos por meio da equação da curva foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$). A tabela 23 mostra os resultados obtidos.

Tabela 23 – Teor de fenólicos totais (TPC) expresso em $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ dos extratos de *P. cinnamomum* obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.

Extrato/Padrão	$\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1} \pm \text{DP}^*$
PPO	$116,5 \pm 6,7^a$
FPO	$95,4 \pm 5,4^b$
FPOA	$81,6 \pm 4,1^c$
FPOS	$86,6 \pm 2,8^{b,c}$
GPO	$68,1 \pm 3,6^d$
FrPO	$78,5 \pm 1,6^{c,d}$
CPO	$66,6 \pm 4,1^d$

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Tukey). $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1} = \text{mg}$ de equivalente de ácido gálico por grama do extrato.

Entre as partes da planta avaliadas, a polpa apresentou o maior TPT, com $116,5 \pm 6,7 \text{ mg EAG g}^{-1}$, diferenciando-se estatisticamente das demais partes. Esse alto teor de substâncias fenólicas pode explicar os resultados superiores da polpa nos testes de atividade antioxidante. Em contraste, os menores teores foram observados na casca e nos galhos, com $66,6$ e $68,1 \text{ mg EAG g}^{-1}$, respectivamente.

Os valores obtidos neste estudo superaram significativamente aqueles reportados na literatura para *P. cinnamomum*. Uma vez que, Leal *et al.* (2020) relataram um TPT de apenas $1,42 \text{ mg EAG g}^{-1}$ para o extrato etanólico dessa espécie. Em um estudo com *P. edulis* realizado por Vo *et al.* (2024), os teores de TPT utilizando a EAU e a EAM na casca foram de $21,03$ e $22,12 \text{ mg EAG g}^{-1}$, respectivamente, bem abaixo do valor de $66,6 \text{ mg EAG g}^{-1}$ obtido para a casca de *P. cinnamomum* no

presente trabalho. Santos et al. (2021) também relataram valores inferiores, com um TPT de 0,365 mg EAG g⁻¹ na polpa de *P. cinnata*. Esses resultados evidenciam a eficácia do método de otimização empregado na extração de fenólicos totais das diversas partes de *P. cinnata*.

Além de estar diretamente relacionados com a atividade antioxidante, as substâncias fenólicas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antivirais, antimicrobianas e anticancerígenas, em grande parte atribuídas a sua capacidade de se ligar a proteína e eliminar radicais livres (Phuyal *et al.*, 2020). Desse modo, os extratos de diferentes partes de *P. cinnata* apresentam um potencial para aplicação em atividades biológicas diversas.

4.11. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (TFT)

O teor de flavonoides totais das diversas partes dos extratos otimizados de *P. cinnata* foi determinado por meio do teste colorimétrico de alumínio (Phuyal *et al.*, 2020). Os resultados obtidos foram expressos por miligramas de quercetina por grama de extrato (mg EQ · g⁻¹).

Tabela 24 – Teor de flavonoides totais (TFT) expresso em mg EQ · g⁻¹ dos extratos de *P. cinnata* obtidos no ponto ótimo determinado pela matriz de Doehlert.

Extrato/Padrão	mg EAG · g ⁻¹ ± DP*
PPO	175,7 ± 3,62 ^a
FPO	178,2 ± 4,65 ^a
FPOA	61,7 ± 4,83 ^b
FPOS	70,6 ± 5,24 ^b
GPO	62,6 ± 3,30 ^b
FrPO	38,7 ± 2,68 ^c
CPO	68,0 ± 4,86 ^b

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, *p* < 0,05 (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Tukey). mg EQ · g⁻¹ = mg de equivalente de quercetina por grama do extrato.

O maior teor de flavonoides foi obtido nos extratos das folhas e da polpa de *P. cinnata* nas condições otimizadas, com valores 178,2 ± 4,65 e 175,7 ± 3,62 mg EQ g⁻¹, respectivamente,

diferenciando-se estatisticamente das demais partes. Enquanto o menor TFT foi observado nas flores (FrPO), com $38,7 \pm 2,68$ mg EQ g⁻¹, esse valor também se diferenciou estatisticamente dos demais. Um aspecto interessante a ser destacado é o impacto significativo da extração assistida por ultrassom no aumento da eficiência de extração de flavonoides das folhas do maracujá do mato. Observou-se que a EAU promoveu um aumento de aproximadamente 190% na extração de flavonoides comparado ao método convencional de extração com aquecimento (mantendo-se os demais parâmetros constantes nas condições ótimas de extração), indicando que o fenômeno de sonicação foi fundamental para otimizar a liberação dessas substâncias bioativas da matriz vegetal.

Os teores de flavonoides obtidos para a polpa neste estudo são muito superiores aos reportados por Silva *et al.* (2020) para a polpa da variedade *P. cincinnata* Mast. Sertão Forte, que apresentou 1,55 mg EQ g⁻¹. Similarmente, os valores para as folhas neste estudo superaram os observados por Gomes *et al.* (2017) na otimização de extração de folhas de *P. alata*, com um valor máximo de 110,89 mg EQ g⁻¹. No estudo de Vo *et al.* (2024), a otimização da EAU e EAM para a casca de *P. edulis* resultou em um TFT de 39,38 mg EQ g⁻¹, enquanto nosso trabalho obteve um valor 73% superior, com 68,0 mg EQ g⁻¹ para a mesma parte da planta.

Esses resultados evidenciam a eficácia do método de otimização desenvolvido, que se mostrou altamente eficiente na extração de flavonoides em diferentes partes de *P. cincinnata*. A comparação com a literatura confirma não apenas a superioridade do método de extração adotado, mas também destaca o avanço proporcionado por este estudo. Ao estabelecer um processo extrativo mais eficiente, o presente trabalho contribui para o aprimoramento das técnicas de obtenção de substâncias bioativas de potencial interesse farmacológico a partir das diversas partes do maracujá do mato, oferecendo um avanço significativo para estudos futuros nessa área.

4.12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da utilização das cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e cepas de *Streptococcus sobrinus* 6715. Além disso, também foram utilizadas cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (resistente à oxacilina) e isolados Clínicos de *S. aureus* 16A, 112, 92 e 29.

Após o processo de microdiluição em microplacas de 96 poços, as placas foram incubadas durante 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A leitura foi feita visualmente para avaliação do crescimento bacteriano, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços.

Os resultados obtidos para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) são mostrados na tabela 25.

Tabela 25 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de diferentes partes de *Passiflora cincinnata* para *S. mutans* ATCC 700610 e ATCC 25175 e *S. sobrinus* 6715.

	<i>S. mutans</i> ATCC 700610		<i>S. mutans</i> ATCC 25175	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
GPO	#	#	#	#
CPO	#	#	#	#
FrPO	#	#	#	#
PPO	125	500	500	#
FPO	250	1000	1000	#
FPOA	250	1000	1000	#
FPOS	250	1000	1000	#

Não houve atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (1000 a $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Não foi identificada atividade antimicrobiana para nenhuma das amostras nas concentrações testadas frente as cepas *S. sobrinus* 6715 e para as cepas de *S. aureus* e seus isolados.

As amostras de polpa e folha apresentaram atividade antimicrobiana frente as cepas de *S. mutans*. A polpa apresentou melhores resultados, com CIM de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e CBM de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a cepa *S. mutans* ATCC 700610 e CIM de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a cepa de *S. mutans* ATCC 25175. Já as três amostras de folhas testadas (extração no ponto ótimo, extração no ponto ótimo obtido pela matriz de Doehlert com o aquecimento indicado no planejamento e ponto ótimo obtido pela matriz de Doehlert sem o aquecimento indicado no planejamento) apresentaram CIM de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e CBM de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a *S. mutans* ATCC 700610 e CIM de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a *S. mutans* ATCC 25175.

Streptococcus mutans é o principal responsável pela formação de cáries dentárias. Esse microorganismo produz, a partir da sacarose, glucanos e frutanos extracelulares, além de ácidos, que são fatores cruciais para a manifestação de sua virulência (YATSUDA *et al.*, 2005). De acordo com a classificação definida por Holetz e colaboradores (2002), uma amostra apresenta boa atividade antimicrobiana quando a CIM é inferior a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, moderada quando está entre 100 e $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e baixa entre 500 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Valores acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ não são considerados clinicamente relevantes. Nesse sentido, a polpa de *P. cincinnata* apresentou moderada atividade antimicrobiana, enquanto as amostras das folhas apresentaram baixa atividade antimicrobiana.

Em estudos feitos anteriormente com extrato etanólico de *P. cincinnata*, não foi identificada atividade antimicrobiana clinicamente relevante frente às cepas de *S. aureus* (SIEBRA *et al.* 2016), confirmando os resultados obtidos nesse estudos. Além disso, não foram encontrados na literatura estudos sobre a atividade antimicrobiana dessa espécie frente as cepas de *S. mutans*, de modo que esse é o primeiro relato.

5. CONCLUSÃO

Por meio desse trabalho, foi possível desenvolver um método cromatográfico para identificação e quantificação de substâncias bioativas de *Passiflora cincinnata*. A metodologia desenvolvida possibilitou a identificação de seis substâncias, sendo elas: ácido gálico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico, vitexina e rutina. Por meio das curvas analíticas desenvolvidas com padrões comerciais, foi possível quantificar cada uma dessas substâncias em diferentes partes da planta, sendo encontrada as concentrações de vitexina e rutina de 13.430,2 e 15.007,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o extrato das folhas, respectivamente.

A extração das substâncias bioativas de *P. cincinnata* foi otimizada, utilizando metodologias de superfície de resposta. O processo de otimização ocorreu com uma quantidade reduzida de ensaios, devido aos planejamentos experimentais utilizados para a análise multivariada. Isso fez com que a otimização fosse mais sustentável e econômica. Para isso, foram utilizados os planejamentos de mistura, Plackett-Burman e matriz de Doehlert. Os fatores otimizados no processo de extração foram: tempo e RPM de EAH, tempo, temperatura, potência e frequência de EAU, tamanho da partícula, razão sólido/líquido e a mistura ideal de extração, sendo encontrados, respectivamente, os seguintes resultados: 13 minutos, 162 RPM, 31 minutos, 39 °C, 40 W, 37 Hz, 1,0 mm, 35:1 e 23% de água, 36% de etanol e 41% de acetona. Os resultados obtidos por meio da otimização de EAU e EAH foram superiores aos valores encontrados na literatura, tanto para extratos etanólicos, quanto para otimização da extração assistida por micro-ondas.

Com os extratos otimizados de diferentes partes da planta, foram quantificadas as substâncias ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido gálico, rutina e vitexina, com as maiores concentrações sendo obtidas na folha de, respectivamente, 65,4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 265,3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 2264,6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 859,2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 15007,2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 13430,2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Os valores obtidos foram superiores às concentrações das mesmas substâncias em diferentes extratos de *Passiflora cincinnata* e *Passiflora edulis* encontrados na literatura.

Além disso, foram realizados ensaios para determinação do teor de fenólicos, totais, teor de flavonoides totais e testes da atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. O teor de fenólicos totais para a folha de *P. cincinnata* foi de $95,4 \pm 5,4 \text{ mg EAG g}^{-1}$, enquanto que o teor de flavonoides totais de $178,2 \pm 4,65 \text{ mg EAG g}^{-1}$. Tais valores são superiores aos encontrados na literatura para a mesma espécie. Já a atividade antioxidante pode ser observada por meio dos testes de DPPH, β -caroteno e CAT, sendo encontrados melhores resultados para a polpa e para a folha.

No teste de atividade biológica, foram utilizadas cepas de três micro-organismos diferentes, sendo que as amostras da polpa e da folha apresentaram atividade antimicrobiana diante das cepas de *S. mutans*, com CIM e CBM de, respectivamente, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a polpa, e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a folha, sendo este ensaio citado pela primeira vez na literatura para *P. cincinnata*.

Desse modo, esse estudo contribui para o conhecimento químico da espécie *Passiflora cincinnata*, por se tratar do primeiro relato de otimização EAU associada a EAH para essa espécie, colaborando para a comunidade científica da área. Por fim, é importante destacar que a pesquisa desenvolvida nesse trabalho contribui com o conhecimento e a valorização da biodiversidade local.

REFERÊNCIAS

- ABOULGHAZI, A., FADIL, M., TOUZANI, S., HIBAOU, L., HANO, C., LYOUSSE, B. Phenolic Screening and Mixture Design Optimization for In Vitro Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Honey, Propolis, and Bee Pollen. **Journal of Food Biochemistry**, 2024(1). <https://doi.org/10.1155/2024/8246224>
- AHN, M., KUMAZAWA, S., USUI, Y., NAKAMURA, J., MATSUKA, M., ZHU, F., & NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 14, 1383–1392, 2007. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.04
- AHUJA, S. K., FERREIRA, G. M., MOREIRA, A. R. Application of Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology to Achieve Exponential Growth for Aggregated Shipworm Bacterium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 6, 666–675, 2004. <https://doi.org/10.1002/bit.10880>
- AYRES, A. S. F. S. J. SANTOS, W. B., JUNQUEIRA-AYRES, D. D., COSTA, G. M., RAMOS, F. A., CASTELLANOS, L. ALVES, J. S. F., ASTH, L. MEDEIROS, I.U., ZUCOLOTO, S. M. GAVIOLI, E.. C. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *Edulis*. **Neuroscience Letters**, v. 660, 79–85, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.010>
- BÚFALO, M. C., FERREIRA, I., COSTA, G., FRANCISCO, V., LIBERAL, J., CRUZ, M. T., LOPES, M. C., BATISTA, M. T., SFORCIN, M. B. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **J. Ethnopharmacol.** v. 149, 84–92, 2013.
- CAMPOS, G. B., SOUZA, S. G., LOBO, T. N., SILVA, D. C. C., SOUSA, D. S., OLIVEIRA, P. S., SANTOS, V. M., AMORIM, A. T., FARIAS, S. V. T., CRUZ, M. P., YATSUDA, R., MARQUES, L. M. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. **New Microbiologica**, v. 35, n. 2, p. 183-190, 2012.
- CARRERA, C., RUIZ-RODRÍGUEZ, A., PALMA, M., BARROSO, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, 100–104, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- CONCEIÇÃO, G. S., SEIXAS, H. M., SOUSA, I. P., BOAS, L. F. M. L. V., SOUZA, R. D. *Passiflora* no auxílio da ansiedade e depressão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i15.37219>
- COSTA, E. C. S., NUNES, T. S., DE MELO, J. I. M. Flora da Paraíba, Brasil: *Passifloraceae* sensu stricto. **Rodriguesia**, v. 66, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566117>
- FANG, G., LI, G., PANG, C., LI, W., WANG, D., LIU, C. Ultrasound-Assisted Extraction of Pristimerin from *Celastrus orbiculatus* Using Response Surface Methodology. In **Biol. Pharm. Bull** v. 39, n. 1, 2016.
- FELIX, A. C. S., NOVAES, C. G., ROCHA, M. P., BARRETO, G. E., DO NASCIMENTO, B. B., ALVAREZ, L. D. G. Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from *Spondias mombin* L Apple Bagasse Agroindustrial Residues. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, 2018, <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00116>

- GIRSANG, E., GINTING, C. N., LISTER, I. N. E., GUNAWAN, K. Y., WIDOWATI, W. Anti-inflammatory and antiaging properties of chlorogenic acid on UV-induced fibroblast cell. **PeerJ** v. 9, 2021.
- GOMES, A. P. E.; SILVA, K. E. DA; RADEKE, S. M.; OSHIRO, A. M. Caracterização física e química de kiwi in natura e polpa provenientes da comercialização de Dourados – MS. **Revista de Ciências Exatas e da Terra UNIGRAN**, v. 1, n. 1, 2012.
- GOMES, S. V. F., PORTUGAL, L. A., DOS ANJOS, J. P., DE JESUS, O. N., DE OLIVEIRA, E. J., DAVID, J. P., DAVID, J. M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species. **Microchemical Journal**, v. 132, 28–35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>
- HE, M. et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, 74–85, 2016.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, A. G.; NAKAMURA, C. V.; PRADO, B.; FILHO, D. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, 1027–1031, 2002.
- HWANG, S. J., KIM, Y. W., PARK, Y., LEE, H. J., KIM, K. W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflamm. Res.** v. 63, 81–90, 2014.
- JAN, S. KHAN, M. R. RASHID, U. BOKHARI, J. Assessment of Antioxidant Potential, Total Phenolics and Flavonoids of Different Solvent Fractions of Monotheca Buxifolia Fruit, **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4, n. 5, 246-254, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.09.003>.
- JEBLI, Z., RIGUENE, H., YAHYAOU, A., HASSNI, S., DALI, S., BEN SALEM, R., RIGANE, G. Ultrasound-assisted extraction, optimisation using response surface methodology and HPLC-DAD phenolic compounds quantification from Passiflora edulis S. peels cultivated in Tunisia. **Natural Product Research**, 1–9, 2024 <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2380013>
- KARIMI-KHOUSANI, O., HEIDARIAN, E., AMINI, S. A. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. **Pharmacol. Reports**, v. 69, 830–835, 2017.
- KOVAL'SKII, I. V et al. Mechanisms of Rutin Pharmacological Action (Review). **Pharm. Chem. J.** v. 48, 73–76, 2014.
- LAVOR, É. M., LEAL, A. E. B. P., FERNANDES, A. W. C., RIBEIRO, F. P. R. DE A., BARBOSA, J. DE M., GAMA E SILVA, M., TELES, R. B. DE A., OLIVEIRA, L. F. DA S., SILVA, J. C., ROLIM, L. A., DE MENEZES, I. R. A., ALMEIDA, J. R. G. DA S. Ethanol extract of the aerial parts of Passiflora cincinnata Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytomedicine**, v. 47, 58–68, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.052>
- LEAL, A. E. B. P., DE OLIVEIRA, A. P., SANTOS, R. F. DOS, SOARES, J. M. D., LAVOR, E. M. DE, PONTES, M. C., LIMA, J. T. DE, SANTOS, A. D. DA C., TOMAZ, J. C., OLIVEIRA, G. G. DE, NETO, F. C., LOPES, N. P., ROLIM, L. A., ALMEIDA, J. R. G. DA S. DETERMINATION of phenolic compounds, in vitro antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in

different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. **Natural Product Research**, v. 34, n. 7, 995–1001, 2020 <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548445>
LIMA, K. C.; PITIÁ, A. M. A.; SANTOS, J. M. dos. **Uma contribuição aos estudos de geomorfologia climática em ambiente semi-árido na região sudoeste da Bahia**. Anais. Conferência em Geomorfologia, Goiânia - GO, p. 1-15, 2006.

LIU, X., MÜLLERTZ, A., BAR-SHALOM, D., BERTHELSEN, R. Effect of centrifugation speed on the measured equilibrium solubility of poorly water-soluble compounds in viscous solvents. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101853>

LUO, M., LIU, X., ZHAO, Z., WANG, F., SHAO, C. Optimization of Glycerol Extraction of Chlorogenic Acid from Honeysuckle by Response Surface Methodology. **Processes**, v. 11, n. 1., 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11010110>

MARTINS, C. R., LOPES, W. A., BITTENCOURT DE ANDRADE, J. Solubilidade Das Substâncias Orgânicas. **Química Nova**, v. 36, 2013.

MOREIRA, B. O., BARBOSA FILHO, M. R. D., DE CARVALHO, A. L., DA SILVA, D. G., CRUZ, M. P., YATSUDA, R., DAVID, J. M. Application of response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from *Cenostigma macrophyllum*. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n.10, 2020. <https://doi.org/10.1002/cem.3290>

Nithya, S., Aravindan, B., Sankar, G., Jeevadharshana, G., Hemanth, U., Balamurugan, B., & Suresh, Jerad. A. Ex vivo anticataract effect of *Passiflora edulis* Sims. whole fruit extract against glucose induced snowflake cataract in goat lens. **Annals of Phytomedicine An International Journal**, v. 13, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.54085/ap.2024.13.1.69>

NEHRING, P., SERAGLIO . S. K. T. ; GONZAGA. L. V. , F.ETT R. 1; C. A. COSTA. O. Influência Dos Diferentes Solventes Na Avaliação Da Capacidade Antioxidante In Vitro De Frutos E Sementes De Pitaia (*Hylocereus polyrhizus*). **REVISTA CSBEA**, v. 2, 1-7, 2016.

NOVAES, C. G., FERREIRA, S. L. C., NETO, J. H. S., SANTANA, F. A., PORTUGAL, L. A., GOICOECHEA, H. C. A Multiple Response Function for Optimization of Analytical Strategies Involving Multi-elemental Determination. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, n. 1, 1-8, 2016.

OJEABURU, S. I., ORIAKHI, K. Hepatoprotective, antioxidant and, anti-inflammatory potentials of gallic acid in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in Wistar rats. **Toxicol. Reports**, v.8, 177–185, 2021.

OKECHUKWU, Q.N., UGWUONA, F.U., OFOEDU, C.E. JUCJNIEWICZ, S. OKPALA, C. O. R. Chemical composition, antibacterial efficacy, and antioxidant capacity of essential oil and oleoresin from *Monodora myristica* and *Tetrapleura tetraptera* in Southeast Nigeria. **Scientific Reports**, v. 12, n. 19861, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23161-5>.

OLIVEIRA, O. L. S.; ANDRADE, G. B.; DAVID, J. L. PUNGARTNIK, C. Mapeamento científico e tecnológico das espécies *Passiflora foetida* e *Passiflora cincinnata*. **Revista Humanidades e Inovação**, v. 8, n. 49, 153-163, 2021.

PEREIRA, S. V., COLOMBO, F. B., DE FREITAS, L. A. P. Ultrasound influence on the solubility of solid dispersions prepared for a poorly soluble drug. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, 461–469, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.022>

- PERTUZATTI, P.B.; SGANZERLA, M.; JACQUES, A.C.; BARCIA, M.T.; ZAMBIAZI, R.C. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems, **LWT - Food Sci. Technol.** v. 64, 259–263, 2015.
- PHUYAL, N., JHA, P. K., RATURI, P. P., RAJBHANDARY, S. Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. **Scientific World Journal**, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>
- PORTUGAL, L.A.; FERREIRA, H.S.; SANTOS, W.N.L.; FERREIRA, S.L.C. Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multielement flame atomic absorption spectrometry. **Microchem. Journal**, v. 87, 77–80, 2007.
- RAJHA, H. N., DARRA, N. EL, HOBAIKA, Z., BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., MAROUN, R. G., LOUKA, N. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. **Food and Nutrition Sciences**, v. 05, n. 04, 397–409, 2014. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54048>
- RIBEIRO, D. N.; ALVES, F. M. S.; RAMOS, V. H. S.; ALVES, P.; NARAIN, N.; VEDOY, D. R. L.; CARDOZO-FILHO, L.; JESUS, E. Extraction of passion fruit 8 (*Passiflora cincinnata* Mast.) pulp oil using pressurized ethanol and ultrasound: Antioxidant activity and kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, 1–9, 2020.
- RODRIGUES, J. Z. DE S. et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159, **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 104063, 2020.
- SAI-UT, P. KINGWASCHARAPONG, M.A.R. MAZUMDER, S. RAWDKUEN, Optimization of extraction of phenolic compounds and antioxidants from passion fruit and rambutan seeds using response surface methodology, **Journal of Agriculture and Food Research**, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100888>.
- SANTANA, F. C., OLIVEIRA TORRES, L. R., SHINAGAWA, F. B., OLIVEIRA E SILVA, A. M., YOSHIME, L. T., MELO, I. L. P., MARCELLINI, P. S., MANCINI-FILHO, J. Optimization of the antioxidant polyphenolic compounds extraction of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis* Sims) by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, 3552–3561, 2017 <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2813-3>
- SANTOS, E., ANDRADE, R., GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, 56–61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.005>
- SANTOS, M. D., ALMEIDA, M. C., LOPES, N. P. DE SOUZA, G. E. P. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. **Biol. Pharm. Bull.** v. 29, 2236–2240, 2006.
- SANTOS, T., B DE ARAUJO, F. P., NETO, A. F., DE FREITAS, S. T., DE SOUZA ARAÚJO, J., DE OLIVEIRA VILAR, S. B., BRITO ARAÚJO, A. J., LIMA, M. S. Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of the Pulp of Two Brazilian Passion Fruit Species: *Passiflora Cincinnata* Mast. And *Passiflora Edulis* Sims. **International Journal of Fruit Science**, v. 21, n. 1, 255–269, 2021. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1872050>

ŠAPONJAC, V. T.; KOVACEVIĆ, S.; ŠEREGELJ, V.; ŠOVLJANSKI, O.; MANDIĆ, A.; CETKOVIĆ, G.; VULIĆ, J.; PODUNAVAC-KUZMANOVIĆ, S.; CANADANOVIĆ, C.-BRUNET, J. Improvement of Carrot Accelerated Solvent Extraction Efficacy Using Experimental Design and Chemometric Techniques. **Processes**, v. 9, 1652, 2021 <https://doi.org/10.3390/pr9091652>

SHAH, N.A., KHAN, M.R., AHMAD, B., NOUREEN, U., KHAN, B., A., Investigation on flavonoid composition and anti free radical potential of *Sida cordata*. **BMC Complement Altern Med** v. 13, 276, 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-276>.

SIEBRA, A. L. A., OLIVEIRA, L. R., MARTINS, A. O. B. P. B., SIEBRA, D. C., ALBUQUERQUE, R. S., LEMOS, I. C. S., DELMONDES, G. A., TINTINO, S. R., FIGUEREDO, F. G., DA COSTA, J. G. M., COUTINHO, H. D. M., MENEZES, I. R. A., FELIPE, C. F. B., KERNTOPF, M. R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, 37–43, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.019>

SILVA, G. S., BORGES, G., S. C. CASTRO, C. D. P. C., AIDAR, S. T., MARQUES, A. T. B., FREITAS, S. T., RYBKA, A. C., P. CARDARELLI, H. R. Physicochemical quality, bioactive compounds and in vitro antioxidant activity of a new variety of passion fruit cv. BRS Sertão Forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) from Brazilian Semiarid region. **Scientia Horticulturae**, v. 272, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109595>

SPADI, A., ANGELONI, G., GUERRINI, L., CORTI, F., MICHELOZZI, M., CENCETTI, G., PARENTI, A., MASELLA, P. Using a Plackett–Burman design to maximise yield of rosemary essential oil by distillation. **Industrial Crops and Products**, v. 166, 2021. doi:10.1016/j.indcrop.2021.113488

PRAGASAM, S. J., VENKATESAN, V., RASOOL, M. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of p-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats. *Inflammation* 36, 169–176 (2013).

SPIGNO, G. TRAMELLI, L.; D. M. DE FAVERI, Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics,” **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 2007 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>

TARLEY, C. R. T., SILVEIRA, G., DOS SANTOS, W. N. L., MATOS, G. D., DA SILVA, E. G. P., BEZERRA, M. A., FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, n. 1, 58–67, 2009. doi:10.1016/j.microc.2009.02.002

TOUAIBIA, M., JEAN-FRANÇOIS, J. DOIRON, J. Caffeic Acid, A Versatile Pharmacophore: An Overview. **MINI-REVIEWS Med. Chem.** v. 11, 695–713, 2011.

TRUONG, D. H., NGUYEN, D. H., TA, N. T. A., BUI, A. V., DO, T. H., NGUYEN, H. C. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *severinia buxifolia*. **Journal of Food Quality**, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>

VENTURINI, C. L. et al. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. **Biomed. Pharmacother.** 97, 143–151, 2018.

VO, T. P., NGUYEN, N. T. U., LE, V. H., PHAN, T. H., NGUYEN, T. H. Y., & NGUYEN, D. Q. Optimizing Ultrasonic-Assisted and Microwave-Assisted Extraction Processes to Recover Phenolics and Flavonoids from Passion Fruit Peels. **ACS Omega**, v. 8, n. 37, 33870–33882, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04550>

Vo, P. T., Chieng, H. M. N., Nguyen, Q. D. Ultrasonic-assisted Processes to Recover Phenolics and Flavonoids from Passion Fruit Peels. **Chemical Engineering Transactions**, 108, 13–18, 2024. <https://doi.org/10.3303/CET24108003>

YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, n. 2, 183–189, 2005.

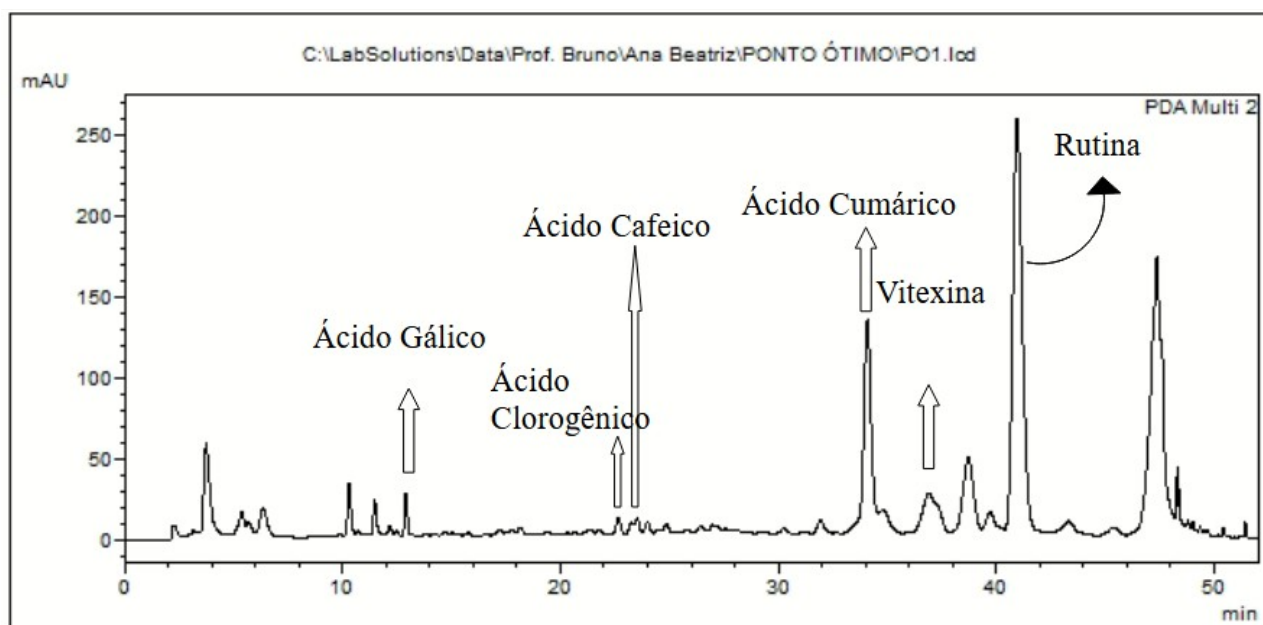
ZIELINSKA, D. et al. Caffeic Acid Modulates Processes Associated with Intestinal Inflammation. **Nutrients**, v.13, (2021).

ZHU, H. ET AL. Anti-Inflammatory Effects of p-Coumaric Acid, a Natural Compound of *Oldenlandia diffusa*, on Arthritis Model Rats. EVIDENCE-BASED Complement. **Altern. Med.** 2018.

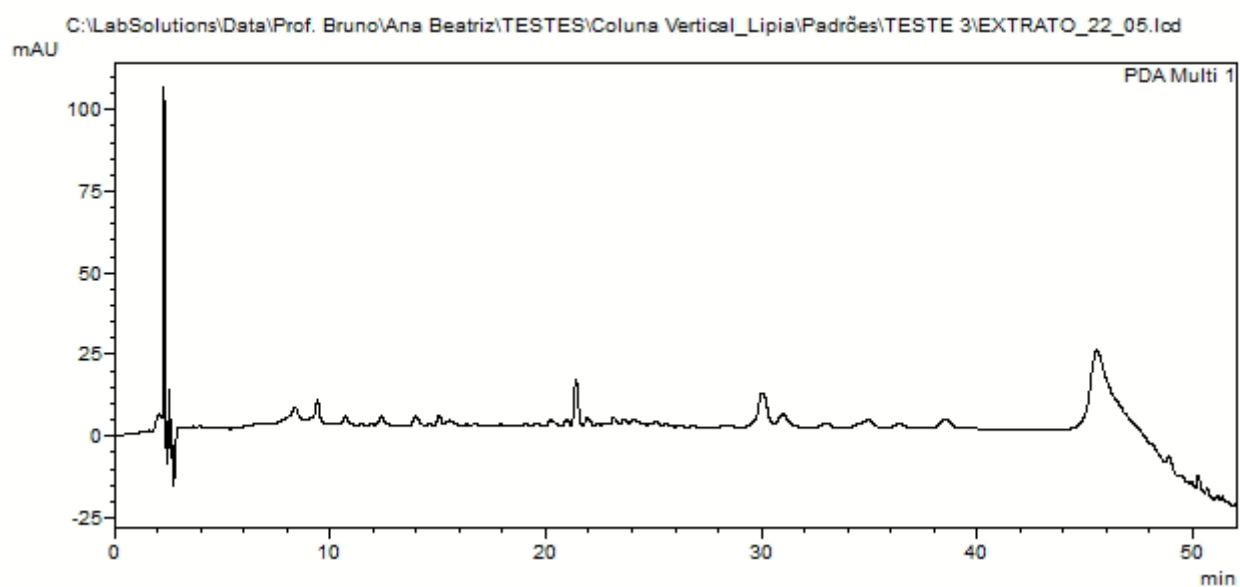
APÊNDICE A

CROMATOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

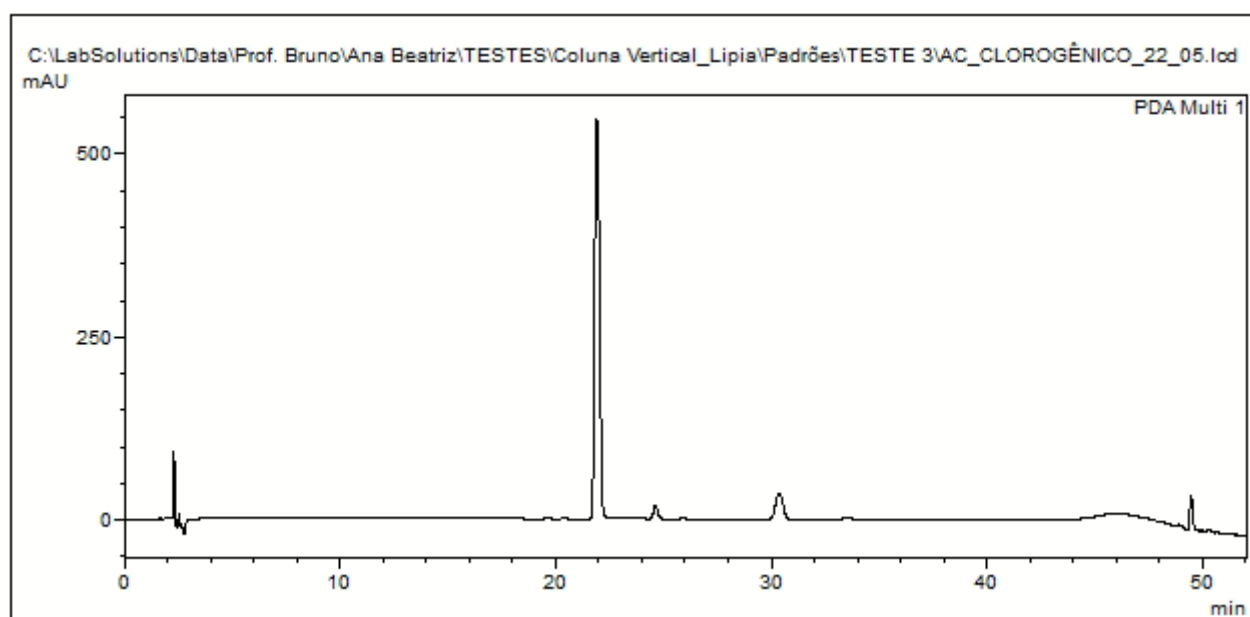
Substâncias identificadas



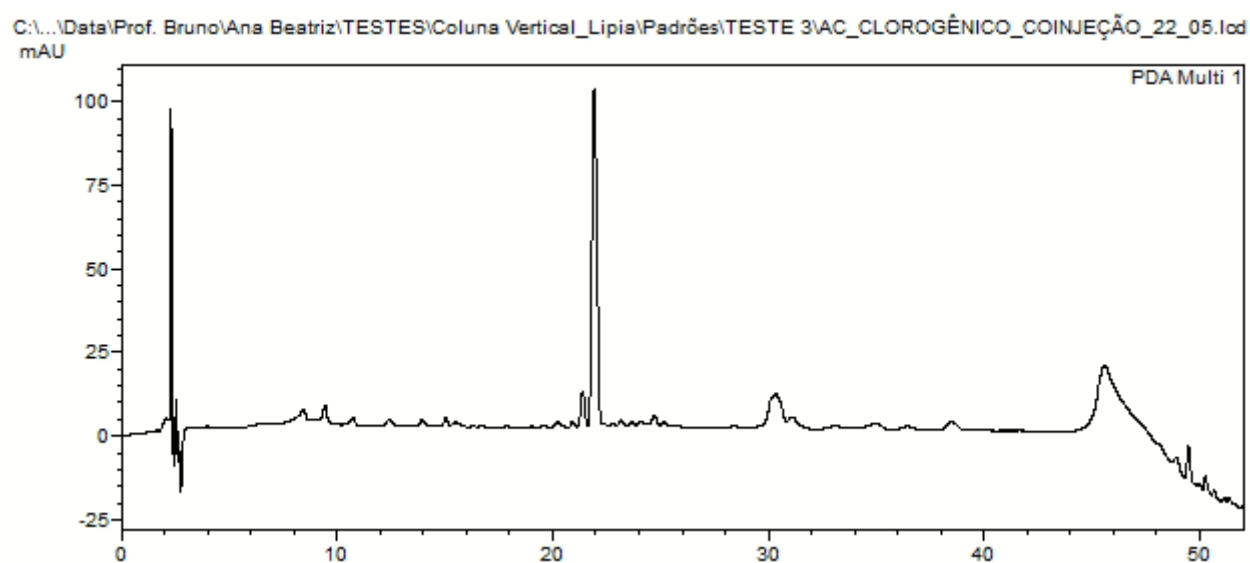
Extrato antes da otimização



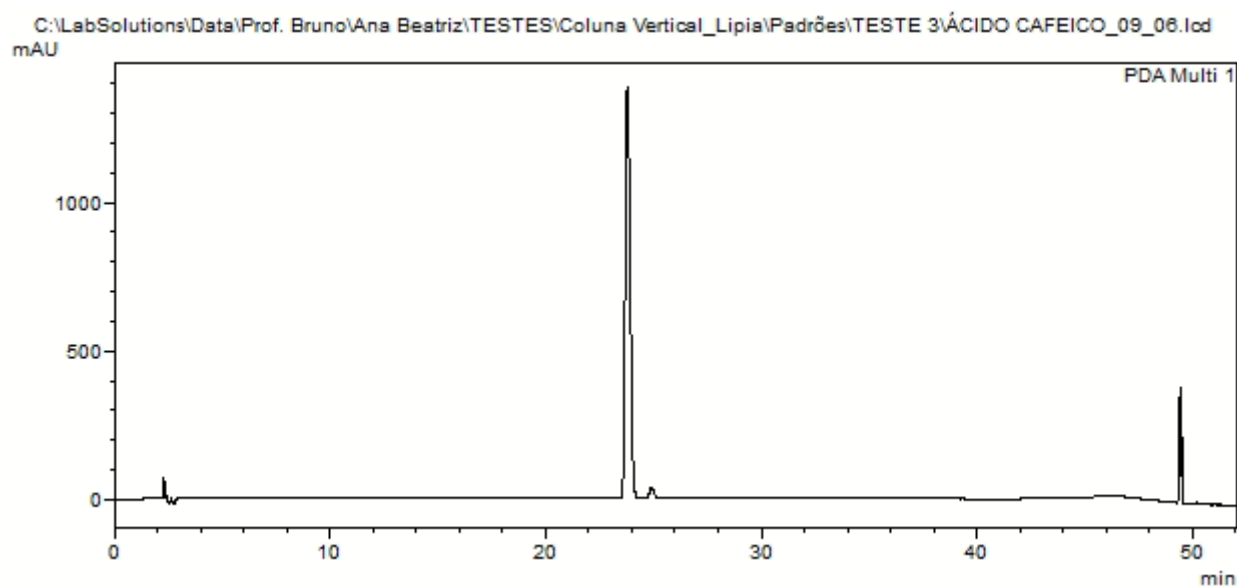
Ácido clorogênico



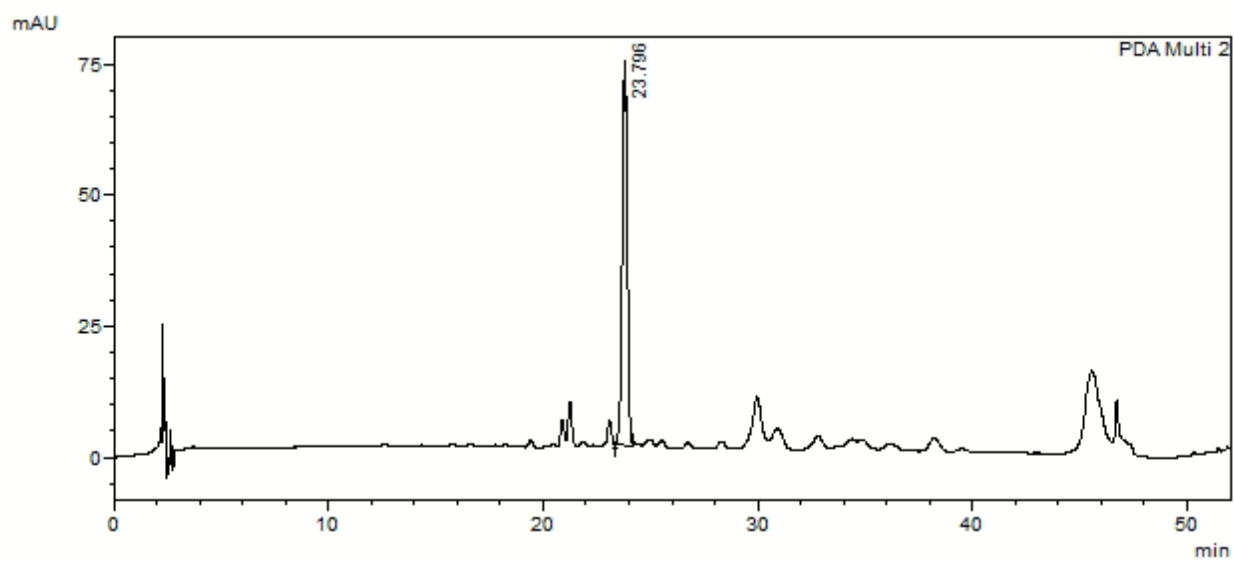
Ácido Clorogênico Co-injeção



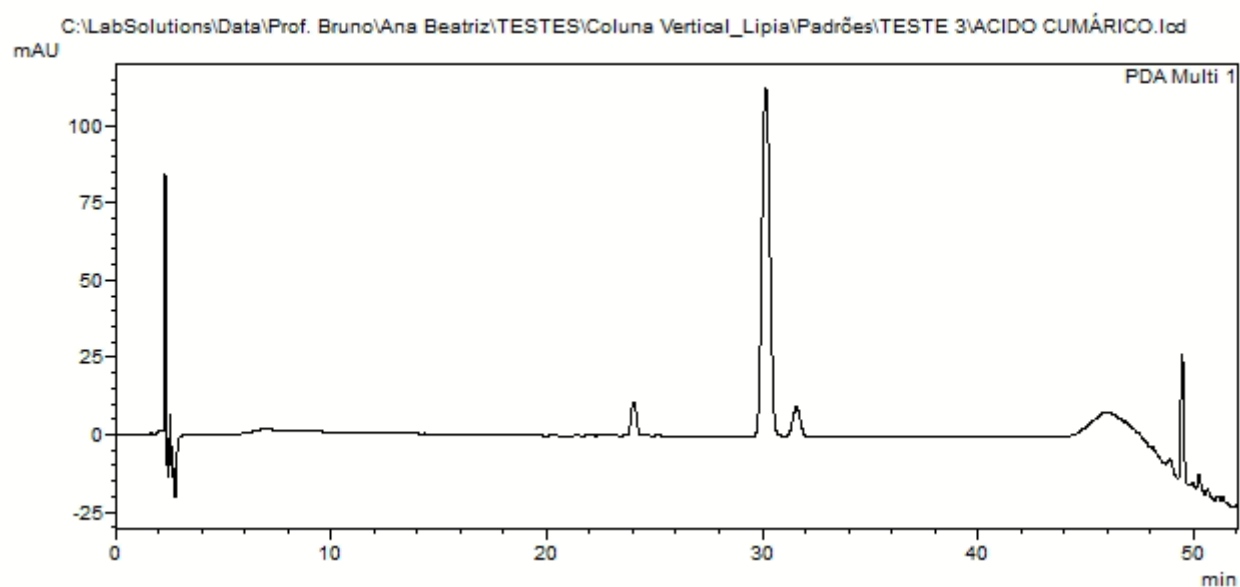
Ácido Cafeico



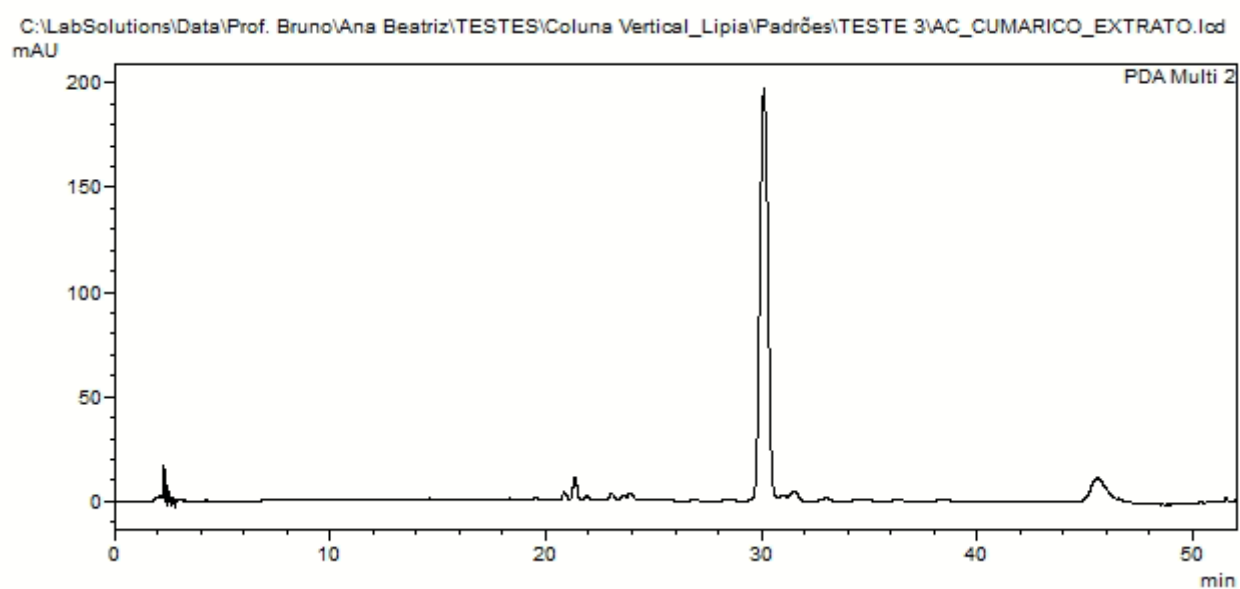
Ácido Cafeico co-injeção



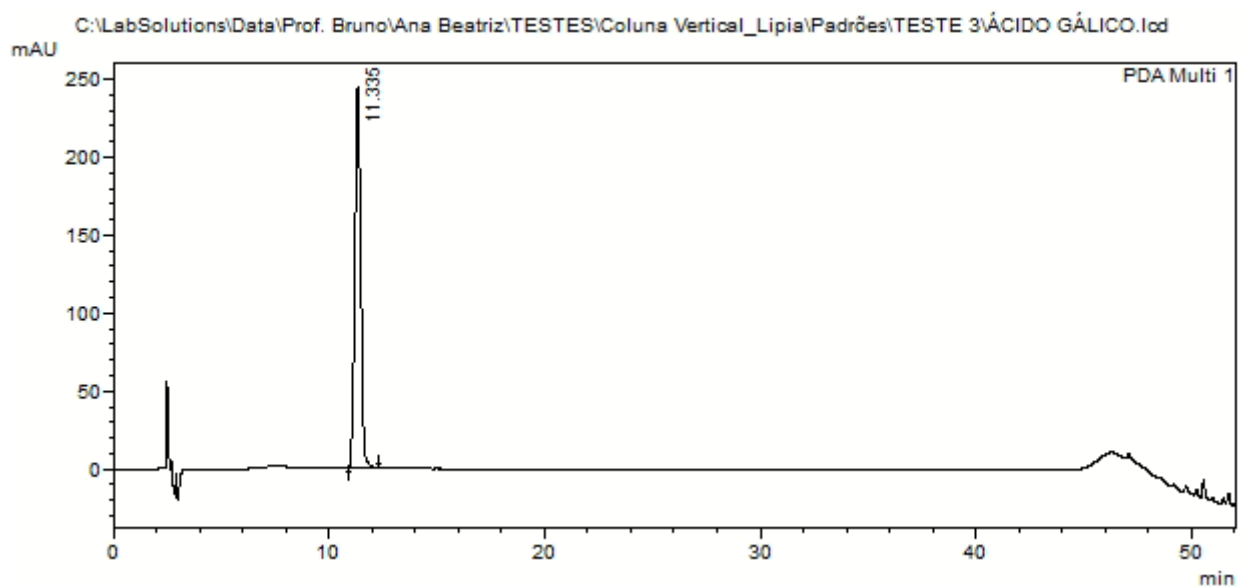
Ácido Cumárico



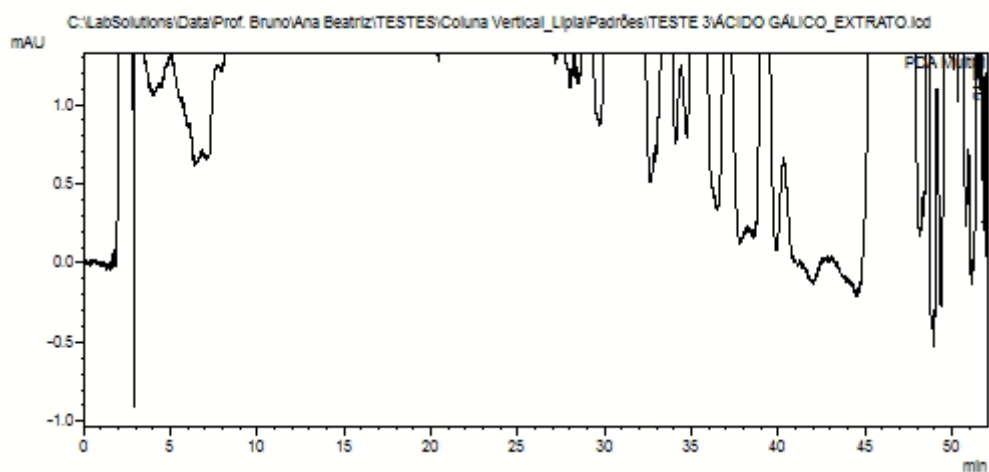
Ácido cumárico co-injeção



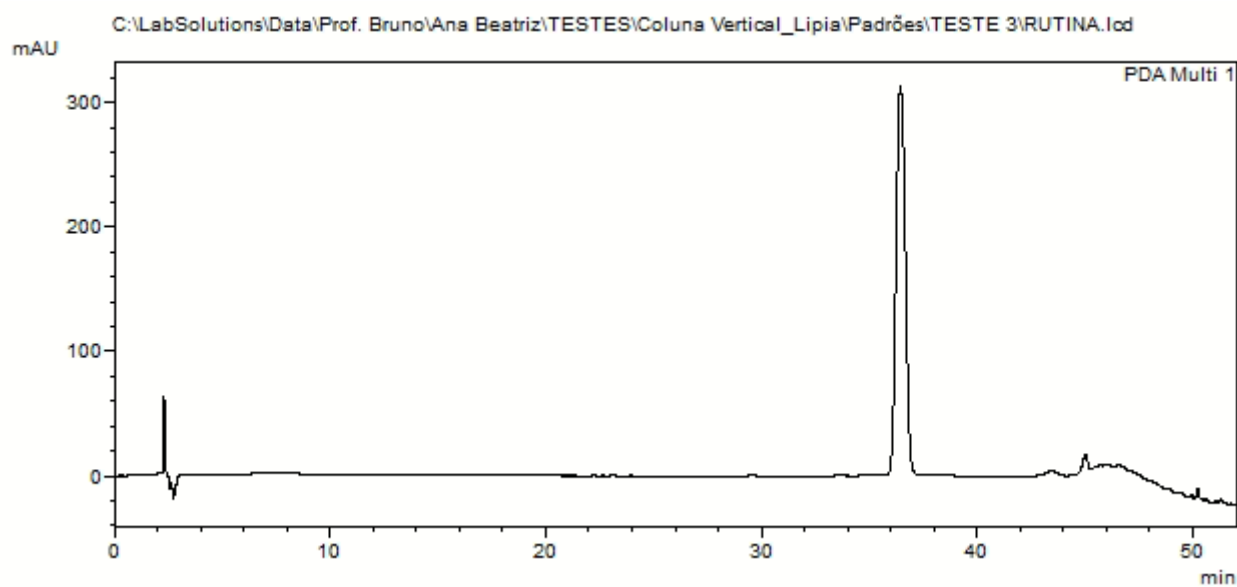
Ácido Gálico



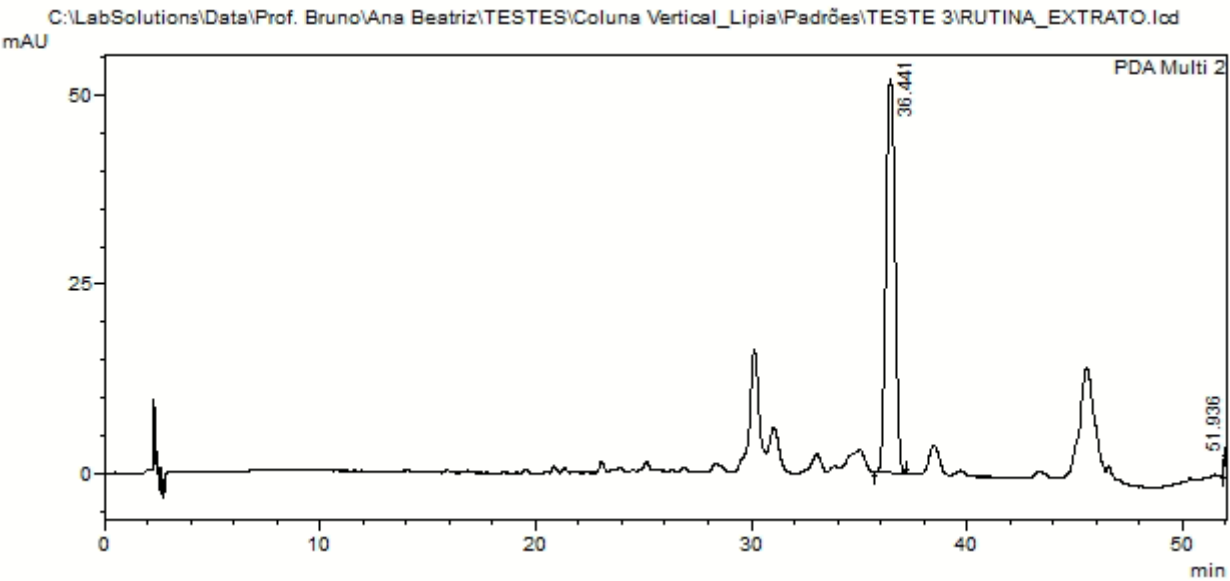
Ácido Gálico Co-injeção



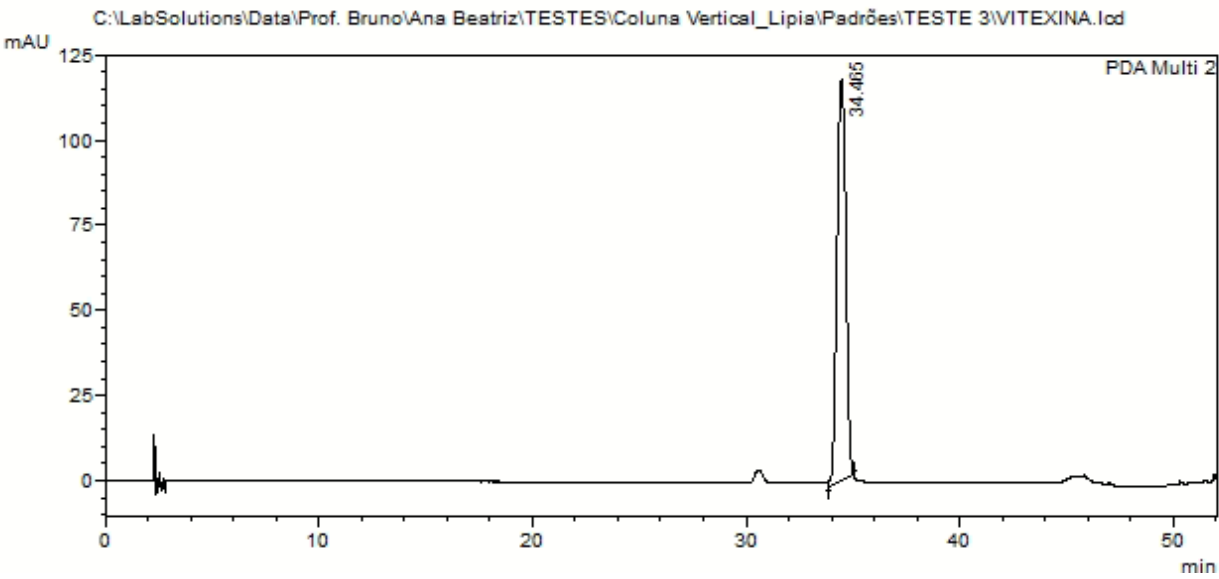
Rutina



Rutina co-injeção



Vitexina



Vitexina co-injeção

